



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RICARDO FARIAS DE ALMEIDA

ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE FOLHAS DA ESPÉCIE DE CAFÉ
***Coffea arabica*: ISOLAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DO**
POTENCIAL ANTIOXIDANTE, DE INIBIÇÃO DA ENZIMA DE CONVERSÃO DA
ANGIOTENSINA E DE ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

FORTALEZA
2017

RICARDO FARIAS DE ALMEIDA

ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE FOLHAS DA ESPÉCIE DE CAFÉ *Coffea arabica*: ISOLAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, DE INIBIÇÃO DA ENZIMA DE CONVERSÃO DA ANGIOTENSINA E DE ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan

Coorientador: Prof. Dr. Robert Wyn Owen.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A45e Almeida, Ricardo Farias de.

Estudo químico e farmacológico de folhas da espécie de café *Coffea arabica* : isolamento de compostos bioativos e avaliação do potencial antioxidante, de inibição da enzima de conversão da angiotensina e de atividade anticolinesterásica / Ricardo Farias de Almeida. – 2017.

134 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

Coorientação: Prof. Dr. Robert Wyn Owen.

1. *Coffea arabica*. 2. Folhas de café . 3. Mangiferina . 4. Compostos fenólicos. 5. Antioxidante. I. Título.

CDD 540

RICARDO FARIAS DE ALMEIDA

ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE FOLHAS DA ESPÉCIE DE CAFÉ *Coffea arabica*: ISOLAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, DE INIBIÇÃO DA ENZIMA DE CONVERSÃO DA ANGIOTENSINA E DE ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 03/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical

Profa. Dra. Adriana Farah de Miranda Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cristiane Pinto Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho aos meus pais Silvio e Blanda, que nunca pouparam esforços para incentivar e investir nos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e paciência para superar todas as dificuldades durante o doutorado.

Aos meus pais Silvio e Blanda, que batalharam por anos para me proporcionar uma educação de qualidade, muitas vezes abrindo mão dos próprios sonhos.

Às minhas irmãs Paula e Natália, por todo desprendimento em ajudar e pelo companheirismo.

À minha orientadora Dra. Teresa Trevisan, pela orientação na elaboração deste trabalho, ensinamentos, parceria e confiança em mim depositada.

Ao meu co-orientador Robert Wyn Owen, pela orientação e todo suporte dado durante o doutorado “sanduíche” na Alemanha.

À banca examinadora, pelas sugestões dadas para melhoria deste trabalho.

A todos os funcionários e professores da Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, em especial à funcionária Célia e à professora Maria Goretti.

Aos meus amigos do laboratório de Produtos Naturais/Curso de Química Irvila, Francisco das Chagas, Pablo, Jacklyne, Debora, Lilian, Samuel Marques, Samuel Santos, Luan, Max, Wagner, Rose, Mairton, Katarina e Gessica por toda ajuda, parceria e momentos de descontração.

À CAPES pela bolsa concedida no Brasil e CNPq e DAAD pelas bolsas concedidas no exterior durante o doutorado “sanduíche”.

RESUMO

No presente trabalho de tese, foi investigada a presença de mangiferina, ácidos clorogênicos e compostos fenólicos ainda não identificados em folhas de *Coffea arabica* de várias regiões do Brasil (Ceará, Minas Gerais e São Paulo) e Costa Rica (Heredia e Turrialba), além de uma marca comercial para fazer infusão. Além disso, atividade antihipertensiva, antioxidante e anticolinesterásica dos extratos metanólicos e substâncias puras foi avaliada. O estudo químico dos extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica*, com a utilização da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e a espectrometro de massas com ionizador por “eletrospray“, permitiu a identificação e quantificação de 16 substâncias, pertencentes às classes das xantonas, ácidos clorogênicos e flavonoides, além da cafeína: Ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, mangiferina, isomangiferina, quercetina-3-*O*-glucosídeo, rutina, rutina glucosídeo, campferol-3-*O*-ramnoglucosídeo, campferol-3-*O*-diglucosídeo ramnosídeo, quercetina-3-*O*-diglucosídeo e quercetina-3-*O*-ramnogalactosídeo. As cinco últimas substâncias descritas nunca foram relatadas anteriormente na literatura no gênero *Coffea*. Os flavonoides citados rutina, rutina glucosídeo, quercetina-3-*O*-glucosídeo e quercetina-3-*O*-diglucosídeo foram isolados por cromatografia líquida semi-preparativa e tiveram suas estruturas confirmadas com auxílio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear. Quanto à quantificação de metabólitos secundários nas folhas de *Coffea arabica*, as amostras apresentaram elevadas concentrações de compostos polifenólicos, com destaque para as amostras coletadas em São Paulo, com teores de ácido clorogênico, mangiferina e rutina variando entre 1,52-22,45 g/kg, 1,02-10,31 g/kg e 0,27-8,11 g/kg, respectivamente. A quantificação permitiu verificar que a produção de metabólitos nas folhas é influenciada por vários fatores, como exposição à radiação solar, fatores mecânicos, adubação do solo, altitude do terreno e idade da folha. A liberação de mangiferinas totais (mangiferina e isomangiferina) do pó de folha de café em infusão mostrou-se fortemente dependente da temperatura. Os extratos metanólicos de folhas de *Coffea arabica* coletadas no Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica, assim como as substâncias puras mangiferina, rutina e ácido clorogênico, apresentaram atividade antioxidante nos ensaios DPPH, FRAP, ORAC e HX/XO. Os compostos quantificados, pertencentes às três classes polifenólicas, mostraram excelentes correlações com os ensaios antioxidantes. Nenhum extrato metanólico ou substância pura testada apresentou inibição significativa da enzima conversora de angiotensina, assim como

nenhuma amostra apresentou atividade anticolinesterásica. O presente estudo revelou que o chá de folhas de café pode ser uma excelente bebida funcional, contendo altos teores de compostos polifenólicos com efeitos biológicos positivos como a atividade antioxidante, que pode ajudar potencialmente a proteger o corpo contra danos causados por estresse oxidativo, entre outros tipos de danos.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Folhas de café. Mangiferina. Compostos fenólicos. Antioxidante. Antihipertensivo. Anticolinesterásico

ABSTRACT

The present work investigated the presence of mangiferin, chlorogenic acids and unpublished phenolic compounds in *Coffea arabica* leaves from several regions of Brazil (Ceará, Minas Gerais and São Paulo) and Costa Rica (Heredia and Turrialba), as well in a commercial source. In addition, antihypertensive, antioxidant and anticholinesterase activity of the methanolic extracts and pure substances were evaluated. The chemical study of the methanolic extracts of *Coffea arabica* leaves using the High-performance liquid chromatography coupled to diode array detector and mass spectrometry using the electrospray ionization interface technique allowed the identification and quantification of 16 substances belonging to the classes of xanthenes, chlorogenic acids and flavonoids, along caffeine: neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, mangiferin, isomangiferin, quercetin-3-*O*-glucoside, kaempferol-3-*O*-ramnogluconide, kaempferol-3-*O*-digluconide ramnoside, rutin, rutin glucoside, quercetin-3-*O*-digluconide e quercetin-3-*O*-ramnogalactoside. The last five described substances have never been previously reported in the literature in the genus *Coffea*. The flavonoids rutin, glucoside rutin, quercetin-3-*O*-glucoside and quercetin-3-*O*-digluconide were isolated by semi-preparative liquid chromatography and had their structures confirmed using the Nuclear Magnetic Resonance technique. About to the quantification of secondary metabolites in *Coffea arabica* leaves, the samples presented high concentrations of polyphenolic compounds, especially the samples collected in São Paulo, with levels of chlorogenic acid, mangiferin and rutin varying between 1.52-22.45 g / kg, 1.02-10.31 g / kg and 0.27-8.11 g / kg, respectively. The quantification of compounds in *Coffea arabica* leaves allowed to verify that the production of secondary metabolites in leaves is influenced by several factors, such as sun exposure, mechanical factors, soil fertilization, altitude and leaf age. The release of total mangiferins (mangiferin and isomangiferin) from the infusion of coffee leaf powder was strongly dependent on temperature. The methanolic extracts of *Coffea arabica* leaves collected in Ceará, Minas Gerais, São Paulo and Costa Rica as well as mangiferin and chlorogenic acid showed antioxidant activity in the DPPH, FRAP, ORAC and HX/XO assays. The three classes of polyphenols all showed excellent correlations in the antioxidant assays. None methanolic extract or pure substance tested showed significant inhibition of the angiotensin-converting enzyme, as no sample showed anticholinesterase activity. The present study show that coffee leaf tea could be an excellent functional beverage, containing many polyphenolic compounds with many positive biological effects, such as high

antioxidant activity that may potentially help protect the body against damage linked to oxidative stress, among other types of damage.

Keywords: *Coffea arabica*. Coffee leaves. Mangiferin. Phenolic compounds. Antioxidant. Antihypertensive. Anticholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Chá e café.....	20
Figura 2 – <i>Camellia sinensis</i> e <i>Coffea arabica</i> L.....	20
Figura 3 – Representação estrutura da mangiferina.....	22
Figura 4 – Ilustração da espécie <i>Coffea arabica</i>	27
Figura 5 – Registro fotográfico da espécie <i>Coffea arabica</i>	27
Figura 6 – Representação estrutural dos compostos detectados em folhas do gênero <i>Coffea</i>	32
Figura 7 – Mapas de Pacoti, Mulungu e Guaramiranga no estado do Ceará.....	37
Figura 8 – Mapas de Perdões, Bom Sucesso e Manhumirim no estado de Minas Gerais..	39
Figura 9 – Mapa de Campinas no estado de São Paulo.....	41
Figura 10 – Mapas de Turrialba e Heredia nas províncias de Cartago e Heredia.....	43
Figura 11 – Folhas de café comerciais “CHÁ & CIA”, ervas medicinais.....	45
Figura 12 – Reações envolvidas na avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres (HX/XO).....	52
Figura 13 – Reação envolvida na avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH).....	54
Figura 14 – Determinação da atividade antioxidante expresso como a área sob a curva AUC, onde a Capacidade antioxidante= AUC amostra - AUC branco.....	56
Figura 15 – Esquema de redução do complexo $Fe^{3+}/TPTZ$ à $Fe^{2+}/TPTZ$	56
Figura 16 – Formação do ácido hipúrico a partir do substrato hipuril-histidil-leucina (HHL), pela ação da enzima conversora da angiotensina I (ECA).....	58
Figura 17 – Estrutura do Captopril.....	59
Figura 18 – Mecanismo para a reação enzimática do teste de Ellman.....	59
Figura 19 – Etapas do ensaio da metodologia modificada por Rhee.....	60
Figura 20 – Cromatograma CLAE do extrato metanólico de folhas de <i>Coffea arabica</i> ,	

amostra MGBS1, em quatro comprimentos de onda (257, 320, 340 e 278 nm).....	62
Figura 21 – Espectros de massas de cada substância identificada em folhas de <i>Coffea arabica</i>	63
Figura 22 – Representação estrutural dos 16 compostos identificados.....	69
Figura 23 – Representação estrutural de quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo.....	74
Figura 24 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) de C1.....	75
Figura 25 – Expansão no espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) de C1 na região de δH 3-6.....	75
Figura 26 – Espectro de RMN ¹³ C-BB (150 MHz, CD ₃ OD) de C1.....	76
Figura 27 – Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (150 MHz, CD ₃ OD) de C1	76
Figura 28 – Representação estrutural da rutina.....	77
Figura 29 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de C2.....	79
Figura 30 – Expansão no espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de C2 na região de δH 3-4.....	79
Figura 31 – Espectro de RMN ¹³ C-BB (100 MHz, CD ₃ OD) de C2	80
Figura 32 – Expansão no espectro de RMN ¹³ C-BB (100 MHz, CD ₃ OD) de C2 na região de δc 66-80.....	80
Figura 33 – Representação estrutural da quercetina-3- <i>O</i> -diglucosídeo.....	81
Figura 34 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) de C3.....	83
Figura 35 – Expansão no espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) de C3 na região de δH 3-4.....	83
Figura 36 – Espectro de RMN ¹³ C-BB (150 MHz, CD ₃ OD) de C3.....	84
Figura 37 – Expansão no espectro de RMN ¹³ C-BB (150 MHz, CD ₃ OD) de C3 na região de δc 55-85.....	84
Figura 38 – Representação estrutural da rutina glucosídeo.....	85
Figura 39 – Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) de C4.....	87

Figura 40 – Expansão no espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) de C4 na região de δH 3-6.....	88
Figura 41 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (150 MHz, CD_3OD) de C4.....	88
Figura 42 – Expansão no espectro de RMN ^{13}C -BB (150 MHz, CD_3OD) de C4 na região de δc 60-85.....	89
Figura 43 – Espectro bidimensional HMBC (600, 150 MHz, CD_3OD) de C4.....	89
Figura 44 – Cromatogramas CLAE-IES-EM do extrato de metanólico (A) e de uma infusão aquosa a 100 °C (B) da amostra comercial de folhas de <i>Coffea arabica</i>	90
Figura 45 – Liberação linear de mangiferinas totais do pó de folhas de café (100-1000 mg/10 ml) por infusão a 100°C de uma fonte comercial de <i>Coffea arabica</i>	92
Figura 46 – Relação de dependência da temperatura com a liberação total de mangiferinas a partir de folhas de café secas e trituradas (100 mg/5,0 mL) em infusão de uma fonte comercial de <i>Coffea arabica</i>	93
Figura 47 – Dendrograma de similaridade entre amostras.....	101
Figura 48 – Componentes principais PC1xPC2 (Amostras de São Paulo e Ceará).....	102
Figura 49 – Componentes principais PC1xPC2 (Amostras de São Paulo).....	103
Figura 50 – Comparação da inibição do ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico pelos extratos metanólicos das amostras CEG4, MGP1, SP6 e CR3	112
Figura 51 – Comparação da inibição da atividade da xantina oxidase pelos extratos metanólicos das amostras CEG4, MGP1, SP6 e CR3.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Número de relatos científicos sobre a composição química das folhas de café do gênero <i>Coffea</i> , encontrados com os programas computacionais ScinFinder e Scopus.....	29
Tabela 2	– Teor de compostos fenólicos e cafeína em folhas de <i>Coffea arabica</i> em comparação com outros alimentos funcionais.....	30
Tabela 3	– Xantonas, ácidos clorogênicos, flavonoides, ácidos fenólicos e alcaloides identificados nas folhas do gênero <i>Coffea</i>	31
Tabela 4	– Descrição do local e característica das folhas de café coletadas no Ceará.....	38
Tabela 5	– Descrição do local e característica das folhas de café coletadas em Minas Gerais.....	40
Tabela 6	– Descrição do local e característica dos cafeeiros das amostras coletadas em São Paulo.....	42
Tabela 7	– Descrição do local e característica das folhas de café coletadas em Turrialba e Heredia.....	44
Tabela 8	– Rendimento dos extratos obtidos das folhas de <i>Coffea arabica</i>	46
Tabela 9	– Compostos identificados em CLAE-IES-EM nos extratos metanólicos de <i>Coffea arabica</i>	68
Tabela 10	– Fração reunidas para análise de RMN.....	73
Tabela 11	– Deslocamento químico de RMN ¹³ C e seus respectivos hidrogênios em comparação com os descritos na literatura para quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo (LIU <i>et al.</i> , 2010).....	74
Tabela 12	– Deslocamento químico de RMN ¹³ C e de seus respectivos hidrogênios em comparação com os descritos na literatura para rutina (LI <i>et al.</i> , 2008).....	78
Tabela 13	– Deslocamento químico de RMN ¹³ C e de seus respectivos hidrogênios em comparação com os descritos na literatura para quercetina-3- <i>O</i> -diglucosídeo (SEUTTER VON LOETZEN <i>et al.</i> , 2014).....	82
Tabela 14	– Deslocamento químico de RMN ¹³ C e de seus respectivos hidrogênios em	86

comparação com os descritos na literatura para rutina glucosídeo (AQUINO <i>et al.</i> , 1987).....	
Tabela 15 – Compostos quantificados nas folhas de <i>Coffea arabica</i> coletadas no estado do Ceará.....	94
Tabela 16 – Compostos quantificados nas folhas de <i>Coffea arabica</i> coletadas no estado de Minas Gerais.....	96
Tabela 17 – Compostos quantificados nas folhas de <i>Coffea arabica</i> coletadas no estado de São Paulo.....	98
Tabela 18 – Compostos quantificados nas folhas de <i>Coffea arabica</i> coletadas na Costa Rica.....	100
Tabela 19 – Potencial antioxidante dos extratos metanólicos das amostras do Ceará.....	106
Tabela 20 – Potencial antioxidante dos extratos metanólicos das amostras de Minas Gerais.....	107
Tabela 21 – Potencial antioxidante dos extratos metanólicos das amostras de São Paulo...	108
Tabela 22 – Potencial antioxidante dos extratos metanólicos das amostras da Costa Rica..	110
Tabela 23 – IC ₅₀ das amostras CEG4, MGP1, SP6 e CR3 em relação à inibição do ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico e à inibição da enzima xantina oxidase.....	111
Tabela 24 – Potencial antioxidante das substâncias mangiferina, ácido clorogênico, rutina e cafeína.....	113
Tabela 25 – Correlação entre o teor de mangiferinas totais (mangiferina + isomangiferina), flavonóides, ácidos clorogênicos e cafeína (g/kg) em folhas de café e a capacidade para eliminar os radicais DPPH e peroxilo (teste ORAC) bem como reduzir ferro (III) para ferro (II) (ensaio FRAP).....	114
Tabela 26 – Correlação entre os ensaios antioxidantes.....	114
Tabela 27 – Taxas de conversão do substrato hipuril-histidil-leucina em ácido hipúrico pela ação da enzima conversora de angiotensina I na presença das amostras e substâncias testadas.....	116
Tabela 28 – Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos de <i>Coffea arábica</i>	117

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Esquema de elaboração dos extratos hexânicos e metanólicos.....	45
Fluxograma 2 – Esquema de fracionamento por SPE.....	50
Fluxograma 3 – Esquema de fracionamento das amostras C1, C2, C3 e CC4.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE	Enzima acetilcolinesterase
ACTI	Iodeto de Acetilcolina
BB	Broad Band decoupling
CLAE-DAD-IES-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas com ionizador “electrospray”
CLAE-SP	Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa
d	Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polazation Transfer
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazina
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
ECA	Enzima conversora da angiotensina I
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HXXO	Hipoxantina/Xantina oxidase
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LOD	Limites de detecção
LOQ	Limites de quantificação
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
m/z	Relação massa carga
NAPs	Sobreposição de sinais
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PCA	Análise de componentes principais
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
SPE	Extração em fase sólida
t	Tripleto
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico

LISTA DE SÍMBOLOS

δ Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	20
2.1	A família Rubiaceae	25
2.2	A espécie <i>Coffea arábica</i>	26
3	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	28
3.1	Atividade farmacológica e metabólitos secundários detectados nas folhas do gênero <i>Coffea</i>	28
4	OBJETIVOS	36
4.1	Geral	36
4.2	Específicos	36
5	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1	Material estudado- folhas de <i>Coffea arábica</i>	37
5.1.1	<i>Folhas de café do Brasil (Ceará)</i>	37
5.1.2	<i>Folhas de café do Brasil (Minas Gerais)</i>	39
5.1.3	<i>Folhas de café do Brasil (São Paulo)</i>	41
5.1.4	<i>Folhas de café da Costa Rica (Turrialba e Heredia)</i>	43
5.1.5	<i>Folhas de café comerciais para fazer infusão</i>	45
5.2	Preparações do material vegetal	45
5.2.1	<i>Preparação dos extratos hexânicos e metanólicos</i>	45
5.2.2	<i>Preparação das infusões de folha de <i>Coffea arábica</i></i>	48
5.3	Métodos cromatográficos	48
5.3.1	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas com ionizador “electrospray” (CLAE-DAD-IES EM)</i>	48
5.3.1.1	<i>Análise quantitativa dos extratos metanólicos e infusões das folhas de café</i>	49
5.3.2	<i>Extração em fase sólida (SPE)</i>	49
5.3.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativo (CLAE-SP)</i>	50
5.3.4	<i>Ensaio HX/XO (xantina/ xantina oxidase)</i>	51
5.4	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	53
5.5	Métodos de avaliação da atividade antioxidante	54
5.5.1	<i>Ensaio DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazina)</i>	54

5.5.2	<i>Ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)</i>	55
5.5.3	<i>Ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)</i>	56
5.5.4	<i>Correlações entre os compostos quantificados e atividade antioxidante</i>	57
5.6	Ensaio de inibição da enzima conversora da angiotensina I (ECA)	57
5.7	Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase	59
5.8	Tratamento quimiométrico de dados	60
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1	Análise qualitativa dos extratos metanólicos das folhas de <i>Coffea arabica</i> por CLAE- DAD-IES-EM	61
6.2	Isolamento e determinação estrutural de C1, C2, C3 e C4	72
6.2.1	<i>Fracionamento do extrato metanólico da amostra comercial</i>	72
6.2.2	<i>Determinação estrutural de C1, C2, C3 e C4</i>	73
6.2.2.1	<i>Determinação estrutural de C1</i>	73
6.2.2.2	<i>Determinação estrutural de C2</i>	77
6.2.2.3	<i>Determinação estrutural de C3</i>	81
6.2.2.4	<i>Determinação estrutural de C4</i>	85
6.3	Análise quantitativa dos extratos e infusões de <i>Coffea arabica</i>	90
6.3.1	<i>Análise quantitativa das infusões da amostra comercial</i>	90
6.3.2	<i>Análise quantitativa dos extratos metanólicos das folhas de <i>Coffea arabica</i> coletadas no Brasil e Costa Rica</i>	94
6.3.2.1	<i>Análise quantitativa das amostras do Ceará</i>	94
6.3.2.2	<i>Análise quantitativa das amostras de Minas Gerais</i>	96
6.3.2.3	<i>Análise quantitativa das amostras de São Paulo</i>	98
6.3.2.4	<i>Análise quantitativa das amostras da Costa Rica</i>	99
6.3.2.5	<i>PCA- Análise de componentes principais</i>	101
6.4	Avaliação do potencial antioxidante dos extratos metanólicos de <i>Coffea arabica</i> pelos ensaios HX/XO, DPPH, FRAP e ORAC	105
6.4.1	<i>Análise do potencial antioxidante das amostras do Ceará</i>	106
6.4.2	<i>Análise do potencial antioxidante das amostras de Minas Gerais</i>	107
6.4.3	<i>Análise do potencial antioxidante das amostras de São Paulo</i>	108
6.4.4	<i>Análise do potencial antioxidante das amostras da Costa Rica</i>	109
6.4.5	<i>Análise do potencial antioxidante das amostras do Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica pelo ensaio HX/XO</i>	110

6.4.6	<i>Análise do potencial antioxidante das substâncias mangiferina, ácido clorogênico, rutina e cafeína pelos ensaios DPPH, FRAP, ORAC e HX/XO...</i>	113
6.4.7	<i>Correlações entre os compostos quantificados e atividade antioxidante.....</i>	114
6.5	Ensaio de inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA).....	115
6.6	Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	116
7	CONCLUSÕES.....	118
	REFERÊNCIAS.....	120
	ANEXO A- COMPOSTOS QUANTIFICADOS NAS FOLHAS DE CAFÉ DAS QUATRO LOCALIDADES.....	131

1 INTRODUÇÃO

O chá e o café (Figura 1), as bebidas mais populares do mundo, têm sido consumidas por milhares de anos. O chá é produzido por infusões das folhas secas ou botões de *Camellia sinensis* e, dependendo da forma de processamento e época de colheita, podem originar os chás verde, preto ou oolong (WANG; HO, 2009; LYN *et al.*, 2003) (Figura 2). A produção anual de cerca de 1,8 milhão de toneladas de folhas secas fornece por volta de 40 litros de bebida *per capita* em todo o mundo (WANG; HO, 2009). O café é a terceira bebida mais consumida no mundo, depois da água e do chá (WANG; HO, 2009). O café é produzido a partir dos grãos torrados do fruto do cafeeiro (Figura 2). *Coffea arabica* L. (café Arábica-Figura 2) e *C. canephora* Pierre ex Froehner A. (café robusta) são as duas espécies utilizadas na produção de café, fornecendo 58,23 e 41,77% da produção comercial mundial, respectivamente [Organização Internacional do Café (OIC), 2015].

Figura 1- Chá e café



Fonte: <http://www.rivertea.com>

Figura 2- *Camellia sinensis* e *Coffea arabica* L.

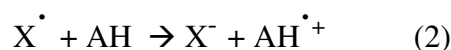
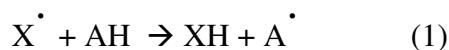


Fonte: <http://www.rivertea.com>

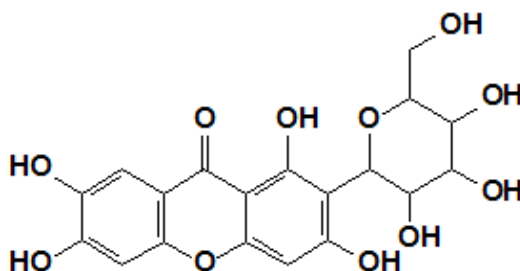
Muitos estudos relatam a relação entre o consumo de chá ou café e a prevenção de doenças, o que pode estar relacionado aos seus conteúdos de polifenóis, majoritariamente flavonoides e ácido fenólicos (WANG; HO, 2009).

Há um crescente interesse na quimioprevenção usando produtos naturais, especialmente compostos fenólicos, como um meio promissor para o controle do câncer. Uma grande variedade de compostos fenólicos, particularmente aqueles encontrados em plantas medicinais, foi encontrada por possuir atividades anticarcinogênica e antimutagênica. A maioria destes compostos fenólicos de ocorrência natural possui propriedades antioxidativas que podem estar associadas com a quimioprevenção (OWEN *et al.*, 2000). A quimioprevenção é definida como o uso de agentes químicos naturais ou sintéticos para reverter, suprimir ou prevenir o processo de evolução do câncer (carcinogênese) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

No processo normal de respiração celular, durante o transporte de elétrons nas mitocôndrias, o oxigênio pode ser reduzido parcialmente, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) (SEIFRIED *et al.*, 2007). Muitos fatores podem ajudar a promover um aumento maior que o normal na produção dessas espécies reativas (estresse oxidativo), como fatores externos tais como o tabagismo, obesidade, poluentes ambientais, radiações, drogas, pesticidas, solventes industriais e o ozônio (CAROCHO; FERREIRA, 2013). As EROs, quando presentes em concentrações suficientemente altas, podem danificar proteínas e lipídios celulares ou formar aductos de DNA, que podem promover a atividade cancerígena. A célula conta com vários antioxidantes que são capazes de restringir as lesões induzidas pelos EROs. Esses antioxidantes, que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, podem ser produzidos pela própria célula ou obtidos pela dieta, como os compostos fenólicos citados anteriormente (SEIFRIED *et al.*, 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013; SILVA; JASIULIONIS, 2014). Eles podem inibir a ação de radicais livres por dois mecanismos principais: pela doação de átomos de hidrogênio (1) ou pela transferência de elétron, causando a redução do radical livre (2) (PRIOR *et al.*, 2005).



O composto químico mangiferina, um entre diversos exemplos de substâncias fenólicas, é uma promessa considerável como um quimiopreventivo natural. A mangiferina (1,3,6,7-tetra-hidroxixantona-C2- β -D-glucosídeo), cuja a representação estrutural é apresentada na Figura 3, é uma xantona C-glicosilada altamente resistente à hidrólise e está amplamente distribuída no reino vegetal como revisto por Vyas *et al.*, 2012.

Figura 3- Representação estrutura da mangiferina

Fonte: Barreto *et al.*, 2008

Além de inibir a carcinogênese no intestino (YOSHIMI *et al.*, 2001), estudos relatam que o composto mangiferina possui potentes efeitos citoprotetores e antígenotóxicos contra a toxicidade induzida por CdCl_2 em células HepG₂ com base no espectro de absorção, que foram atribuídas a uma redução nos níveis de espécies reativas de oxigênio (SATISH RAO *et al.*, 2009), propriedades anti-alérgicas (RIVERA *et al.*, 2006), propriedades anti-helmínticas (GARCIA *et al.*, 2003), efeitos gastroprotetores (CARVALHO *et al.*, 2007; MORAIS *et al.*, 2012), potentes efeitos hepatoprotetores sobre os danos causados ao fígado induzidos por CCl_4 em ratos (RASOOL *et al.*, 2012), efeitos quimiopreventivos e quimioterapêuticos (RAJENDRAN *et al.*, 2008) e propriedades antivirais (YOOSOOK *et al.*, 2000). A mangiferina também foi utilizada nos gêneros alimentícios para o tratamento de diabetes (WADA, 2007) e no tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas e sintomas do envelhecimento (MATUTE *et al.*, 2007, RAO *et al.* 2012). A mangiferina também é relatada na literatura possuindo fortes efeitos sequestrantes de espécies reativas de oxigênio (BARRETO *et al.*, 2008) que atacam moléculas de DNA, proteínas e lipídeos, contribuindo para o desenvolvimento de várias doenças crônicas, incluindo o câncer (TANG *et al.*, 2004). A mangiferina é considerada não-tóxica, pois a sua dose letal mediana (DL50) de ingestão relatada em ratos é de 400 mg/kg (JAGETIA; BAIGA, 2005).

As seguintes espécies de plantas são reportadas na literatura por conter mangiferina: *Anemarrhena asphodeloides*, *Aphloia theiformis*, *Arrabidaea patellifera*, *Arrabidaea samydoides*, *Bersama abyssinica*, *Bombax ceiba*, *Bombax malabaricum*, *Cratogeomys cochinchinensis*, *Cyclopia genistoides*, *Cyclopia subternata*, *Folium mangiferae*, *Folium pyrrosiae*, *Gentiana lutea*, *Gentianella nitida*, *Gnidia involucrata*, *Hypericum perforatum*, *Mahkota Dewa*, *Mangifera indica*, *Mangifera odorata*, *Phaleria cumingii*, *Phaleria macrocarpa*, *Mangifera Persiciformis*, *Polygala hongkongensis*, *Pyrrosia gralla*, *Rhizoma anemarrhenae*, *Rhizoma belamcandae*, *Salacia hainanensis*, *Salacia oblonga*, *Salacia*

reticulate, *Swertia macrosperma*, *Swertia chirata*, *Swertia mussotii*, *Swertia punicea*, *Trichomanes reniforme* and *Zizyphus cambodiana* (VYAS *et al.*, 2012). Entretanto, estas plantas, exceto as espécies *Cyclopia subternata* e *Mangifera indica* (BARRETO *et al.*, 2008), não são uma fonte viável de mangiferina para consumo oral, por serem tóxicas. A espécie *Cyclopia subternata*, juntamente com outras espécies do gênero *Cyclopia*, são populares pela preparação de um chá de ervas denominado "honeybush". Esta planta representa uma fonte viável natural de mangiferina, sendo relatadas concentrações de 11,8 gramas de substância por 100g (118 g/kg) de extrato por Beer e Joubert (2010). Entretanto, a disponibilidade desse vegetal é extremamente limitada, pois é um arbusto endêmico da região de Cape Fynbos, na África do Sul, ou seja, ocorre somente naquela região (KOKOTKIEWICZ; LUCZKIEWICZ, 2009).

Campa *et al.* (2012) identificaram o composto mangiferina nas folhas de sete espécies de café Africana: *C. anthonyi*, *C. arabica*, *C. eugenioides*, *C. heterocalyx cf.*, *C. pseudozanguebariae*, *C. salvatrix* e *C. sessiliflora*, que representam excelentes fontes naturais desse potente agente preventivo de doenças, cujas propriedades foram descritas. Assim como as folhas secas ou botões de *Camellia sinensis*, as folhas do cafeeiro também podem ser aproveitadas para fazer infusão, resultando em uma bebida pouco conhecida no Brasil, porém bastante consumida no continente africano. Além do composto mangiferina, Campa *et al.*, (2012) também identificaram a presença de ácidos clorogênicos nas folhas das mesmas espécies mencionadas para mangiferina e em mais outras 16 espécies (*C. canephora*, *C. congensis*, *C. humilis*, *C. liberica*, *C. mannii*, *C. racemosa*, *C. stenophylla*, *C. leroyi*, *C. andrambovatensis*, *C. ankaranensis*, *C. augagneuri*, *C. millotii*, *C. perrieri*, *C. resinosa*, *C. tsirananae*, *C. vohemarensis*).

Os ácidos clorogênicos são compostos fenólicos formados pela esterificação do ácido quínico com ácidos cinâmicos, tais como o ácido caféico, ferúlico ou p-cumárico. Diversos efeitos benéficos do café podem ser atribuídos a esses compostos. (REGAZZONI *et al.*, 2016). Os grupos mais abundantes de isômeros de ácido clorogênico no café são os ácidos cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos e feruloilquínicos (FELBERG *et al.*, 2015). Eles exercem propriedades benéficas à saúde, não só devido à suas potentes atividades antioxidantes, mas também como agentes hepatoprotetores, hipoglicêmicos, antiespasmódicos, antivirais, antibacterianos e antiinflamatórios, além de reduzir o risco relativo de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e doença de Alzheimer (FARAH; DONANGELO, 2006; FELBERG *et al.*, 2015).

Devido ao alto potencial farmacológico dos compostos mencionados (mangiferina e ácidos clorogênicos), além de existir relativamente poucos estudos relacionados à composição fenólica das folhas de café (TREVISAN *et al.*, 2016; PATAY *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2014; DELAROZA *et al.*, 2014; JUNIOR *et al.*, 2012; CAMPA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2011; MAGALHAES *et al.* 2010; TALAMOND *et al.*, 2008; BERTRAND *et al.*, 2003; ASHIHARA *et al.*, 1996), uma vez que o maior foco está voltado para as sementes de café, no presente trabalho foi investigada a presença de mangiferina, ácidos clorogênicos e compostos fenólicos ainda não identificados em folhas de *Coffea arabica* coletadas em várias regiões do Brasil (Ceará, Minas Gerais e São Paulo) e Costa Rica (Heredia e Turrialba) e de uma marca comercial para fazer infusão, o que levará ao aproveitamento de um subproduto do café. Além disso, atividade antihipertensiva, antioxidante e anticolinesterásica dos extratos metanólicos e substâncias puras foram avaliadas.

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 A família Rubiaceae

A família Rubiaceae é a quarta família em número de espécies das Angiospermas, ficando atrás apenas das famílias Orchidaceae, Asteraceae e Leguminosae (DELPRET; JARDIM, 2012). A família possui uma distribuição cosmopolita, possuindo cerca de 660 gêneros e 11.150 espécies, com a maioria dos gêneros e espécies ocorrendo em regiões tropicais úmidas. Esta é uma das maiores famílias de plantas floríferas e é representada quase mundialmente, embora seja mais abundante nas regiões tropicais de ambos os hemisférios. São importantes membros econômicos da família o café (*Coffea*), a quinquina (*Cinchona*), a garança (*Rubia*), e várias plantas hortícolas (TAO *et al.*, 2011).

Segundo Jung-Mendaçolli (2007), a família *Rubiaceae* é constituída por:

Árvores, arbustos, subarbustos, ervas, trepadeiras, lianas ou epífitas. Folhas simples, inteiras, opostas, decussadas, verticiladas, raro alternas; estípulas interpeciolares ou intrapeciolares; domácias presentes ou não. Inflorescência terminal ou axilar, paniculada a cimosas, racemosa, capitada ou espiciforme, até flor solitária. Flores bissexuadas ou unissexuadas, geralmente actinomorfas, (2-3)4-5(6-7)-meras; distília presente ou não; corola gamopétala, prefloração valvar, imbricada ou contorta; androceu isostemone, estames alternos aos lobos da corola; ovário ínfero, raro súpero, 2(1-8)-locular, lóculos 1 a multiovulados; estilete 1, bífido ou multifido, estigmas tantos quantos os lóculos do ovário; disco geralmente presente. Fruto drupáceo, bacáceo ou capsular.

Os cafeeiros pertencem à família Rubiaceae e são classificados em dois gêneros, o *Coffea* L. e o *Psilanthus* Hook, os quais diferem, basicamente, por particularidades apresentadas nas estruturas das folhas (BRIDSON, 1987). Existem perto de 103 espécies do gênero *Coffea*, todas exclusivamente restritas às florestas tropicais da África, Madagascar e ilhas do Oceano Índico (Ilhas Mascarenhas) (KUFA; BURKHARDT, 2011). Já o gênero *Psilanthus* Hook possui 20 espécies, todas ocorrendo da África Ocidental ao norte da Austrália (DAVIS *et al.*, 2011).

2.2 A espécie *Coffea arabica*

Dentre as 103 espécies do gênero *Coffea* L., *Coffea arabica* (Figuras 4 e 5) é a espécie mais utilizada na produção de café, fornecendo aproximadamente 60% da produção comercial, como dito anteriormente. Apesar de seu nome, a planta é nativa da Etiópia e não da Arábia. Acredita-se que a espécie foi introduzida na Arábia antes do século XV. A espécie foi plantada em Java em 1690, e o cultivo logo se espalhou por todas as Índias Ocidentais, América Central e certas regiões da América do Sul (SMALL, 2009).

Segundo Coste (1955, *apud* Souza *et al.*, 2004, p.11) a espécie *Coffea arabica* é descrita da seguinte forma:

As plantas de café arábica são arbustos monocaules, com até 4,0 m de altura. As folhas são ovaladas ou sub lanceoladas, os bordos são ondulados, e geralmente medem cerca de 10 cm a 15 cm de comprimento por 4 cm a 6 cm de largura. A coloração predominante é verde escura, sendo que a epiderme superior apresenta aspecto brilhante. Nos vértices formados entre as nervuras secundárias e a principal, geralmente ocorrem minúsculas cavidades denominadas domácias. As flores são hermafroditas e agrupadas em conjuntos de 8 a 15, formando inflorescências denominadas glomérulos. A base de cada flor é composta por um pedicelo de 1mm a 3 mm de comprimento e um cálice curto. As pétalas, geralmente em número de cinco, são soldadas formando a corola que mede cerca de 8 mm a 10 mm longitudinais. A partir de cada pétala surge um filete curto, em cuja extremidade fixam-se anteras lineares de 6 mm a 8 mm. O pistilo é constituído de um tubo longo (12 mm a 15 mm) que se projeta, a partir do ovário até acima da corola, culminando com um estigma bifido. O fruto é uma drupa ovóide bilocular, que quando madura pode apresentar coloração vermelha ou amarela. Por causa da pouca importância do endocarpo, é frequentemente considerado como baga. As sementes, geralmente em número de duas, são envolvidas pelo endocarpo, que é chamado de pergaminho e recobertas por um perisperma delgado, conhecido como película prateada. O grão é comercialmente conhecido como fava e compõe-se principalmente do endosperma, que apresenta coloração verde azulado. O endosperma é rico em polissacarídeos (50% a 55% da matéria seca do grão), lipídeos (12% - 18%) e proteínas (11% - 13%).

Figura 4- Ilustração da espécie *Coffea arabica*.



Fonte: SMALL, 2009, p. 188.

Figura 5- Registro fotográfico da espécie *Coffea arabica*.



Fonte: M.T.S. TREVISAN.

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1 Atividade farmacológica e metabólitos secundários detectados nas folhas do gênero *Coffea*

O estudo da composição química das folhas de café é negligenciado até os dias de hoje devido ao foco nas sementes, cuja composição e atividades farmacológicas já foram e ainda são extensivamente estudadas. As sementes de café são ricas em substâncias polifenólicas, as quais são relatadas na literatura possuindo atividade antioxidante, hepatoprotetora, antibacteriana, antiviral, antiinflamatória e hipolipidêmica (PATAY *et al.*, 2016). Apesar de as sementes do café serem um alvo maior de estudos científicos, crescente atenção tem sido dada para as folhas nos últimos anos devido à sua composição polifenólica, o que pode inferir a infusão feita a partir das folhas alto potencial nutracêutico. A Tabela 2 (página 30) apresenta o teor de compostos fenólicos e cafeína encontrados nas folhas de *Coffea arabica*, teores equiparáveis aos encontrados em alimentos funcionais como a semente do café, chá verde e preto, erva-mate, carqueja e folhas da mangueira (PUANGPRAPHANT; MEJIA, 2009; MARQUES; FARAH, 2009; VIEIRA *et al.*, 2009; BARRETO *et al.*, 2008; FARAH *et al.*, 2005).

A infusão das folhas de café é preparada a partir de folhas secas da espécie *Coffea arabica*, de forma semelhante ao chá verde (*C. sinensis*). Existem relativamente poucos estudos sobre o uso de folhas de café como planta medicinal (GIDAY, ASFAW E WOLDU, 2010), embora seu uso tenha sido comum de três a quatro séculos na África. A infusão de folhas de *Coffea arabica* é consumida no continente africano para tratar diarreia e dores intestinais. Também é usado para gerenciar o vírus HIV nos distritos de Kamuli, Sembabule, Kabale e Gulu em Uganda (LAMORDE *et al.*, 2010). Na Nicarágua, as folhas de café também são mencionadas para dor de cabeça e dores de estômago e no Peru como supressora de tosse, bem como para febre e estimulação da produção de prolactina no México. Por outro lado, o chá feito com as folhas do café liberiano foi descrito como atividade laxante (ROSS, 2005).

Na Tabela 3 (página 31), estão registradas as 24 substâncias identificadas nas folhas do gênero *Coffea* nos últimos 30 anos (1987 a 2017), pertencentes às classes das xantonas, ácidos clorogênicos, flavonoides e alcaloides. As representações estruturais dessas substâncias estão apresentadas na Figura 6 (página 13). A busca foi realizada nos programas computacionais SciFinder® e Scopus (www.scopus.com), utilizando as palavras chave

“*coffea xanthone leaves*”, “*coffea chlorogenic acids leaves*”, “*coffea flavonoids leaves*”, “*coffea phenolic leaves*” e “*coffea alkaloids leaves*”, para pesquisa de compostos das classes das xantonas, ácidos clorogênicos, ácidos fenólicos, flavonoides e alcaloides. Os resultados obtidos com a busca estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Número de relatos científicos sobre a composição química das folhas de café do gênero *Coffea*, encontrados com os programas computacionais ScinFinder e Scopus.

Dados compilados	Scifinder	Scopus
Coffea/folhas/ácidos clorogênicos	2	29
Coffea/folhas/fenólicos	6	33
Coffea/folhas/flavonoides	1	14
Coffea/folhas/xantonas	1	5
Coffea/folhas/cafeina	7	49

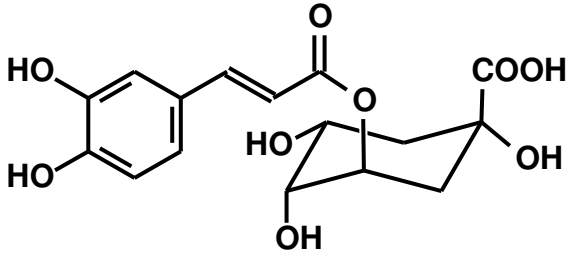
Tabela 2. Teor de compostos fenólicos e cafeína em folhas de *Coffea arabica* em comparação com outros alimentos funcionais.

	<i>Coffea arabica</i> (folhas)	<i>Coffea arabica</i> (semente)	<i>Mangifera Indica</i> (folhas)	<i>Camellia sinensis</i> (chá verde)	<i>Camellia sinensis</i> (chá preto)	<i>Ilex paraguariensis</i> (erva-mate)	<i>Baccharis Genistelloides</i> (carqueja)
Compostos	g/100 g peso seco						
Mangiferina	0,57 (CAMPA <i>et al.</i> , 2012)	-	5,81 (BARRETO <i>et al.</i> , 2008)	-	-	-	-
Ácido 3-cafeoilquínico	0,10 (CAMPA <i>et al.</i> , 2012)	0,48 (FARAH <i>et al.</i> , 2005)	-	0,04 (MARQUES; FARAH, 2009)	0,03 (MARQUES; FARAH, 2009)	1,40 (HECK <i>et al.</i> , 2008)	0,23 (MARQUES; FARAH, 2009)
Ácido 4-cafeoilquínico	0,26 (CAMPA <i>et al.</i> , 2012)	0,54 (FARAH <i>et al.</i> , 2005)	-	0,08 (MARQUES; FARAH, 2009)	0,06 (MARQUES; FARAH, 2009)	1,22 (HECK <i>et al.</i> , 2008)	0,18 (MARQUES; FARAH, 2009)
Ácido 5-cafeoilquínico	3,23 (CAMPA <i>et al.</i> , 2012)	3,12 (FARAH <i>et al.</i> , 2005)	-	0,02 (MARQUES; FARAH, 2009)	0,05 (MARQUES; FARAH, 2009)	3,14 (HECK <i>et al.</i> , 2008)	0,36 (MARQUES; FARAH, 2009)
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	0,05 (CAMPA <i>et al.</i> , 2012)	0,24 (FARAH <i>et al.</i> , 2005)	-	-	-	0,55 (MARQUES; FARAH, 2009)	0,12 (MARQUES; FARAH, 2009)
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	0,17 (CAMPA <i>et al.</i> , 2012)	0,25 (FARAH <i>et al.</i> , 2005)	-	-	-	2,33 (MARQUES; FARAH, 2009)	0,30 (MARQUES; FARAH, 2009)
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	0,04 (CAMPA <i>et al.</i> , 2012)	0,28 (FARAH <i>et al.</i> , 2005)	-	-	-	1,36 (MARQUES; FARAH, 2009)	0,19 (MARQUES; FARAH, 2009)
Ácido 4-feruloilquínico + Ácido 5-feruloilquínico	0,12 (CAMPA <i>et al.</i> , 2012)	0,25 (FARAH <i>et al.</i> , 2005)	-	-	-	1,3 (MARQUES; FARAH, 2009)	0,01 (MARQUES; FARAH, 2009)
Cafeína	0,21 (ASHIHARA <i>et al.</i> , 1996)	0,93-1,33 (SILVAROLLA <i>et al.</i> , 2000)	-	2,41 (TFOUNI <i>et al.</i> , 2017)	3,17 (TFOUNI <i>et al.</i> , 2017)	1,66 (HECK <i>et al.</i> , 2008)	-

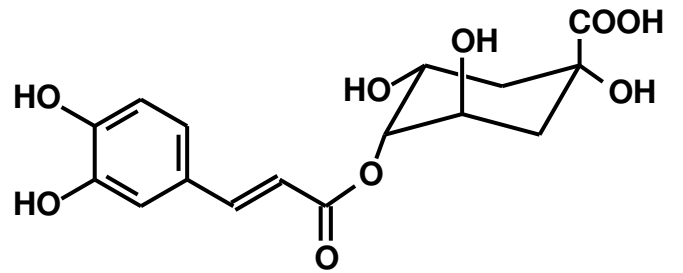
Tabela 3- Xantonas, ácidos clorogênicos, flavonoides, ácidos fenólicos e alcaloides identificados nas folhas do gênero *Coffea*.

Xantonas	Espécies	Referências
1 Mangiferina	<i>C. anthonyi</i> , <i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. heterocalyx</i> cf., <i>C.pseudozanguebariae</i> , <i>C. salvatrix</i> , <i>C. sessiliflora</i>	TREVISAN <i>et al.</i> , 2016 ALMEIDA <i>et al.</i> , 2014 CAMPA <i>et al.</i> , 2012 TALAMOND <i>et al.</i> , 2008
2 Isomangiferina	<i>C. anthonyi</i> , <i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. heterocalyx</i> cf., <i>C.pseudozanguebariae</i> , <i>C. salvatrix</i> , <i>C. sessiliflora</i>	TREVISAN <i>et al.</i> , 2016 ALMEIDA <i>et al.</i> , 2014 CAMPA <i>et al.</i> , 2012 TALAMOND <i>et al.</i> , 2008
Ácidos Clorogênicos	Espécies	Referências
3 Ácido 5-cafeoilquínico	<i>C. anthonyi</i> , <i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. heterocalyx</i> cf., <i>C.pseudozanguebariae</i> , <i>C. salvatrix</i> , <i>C. sessiliflora</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. congensis</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. liberica</i> , <i>C. mannii</i> , <i>C. racemosa</i> , <i>C. stenophylla</i> , <i>C. leroyi</i> , <i>C. andrambovatensis</i> , <i>C. ankaranensis</i> , <i>C. augagneuri</i> , <i>C. millotii</i> , <i>C. perrieri</i> , <i>C. resinosa</i> , <i>C. tsirananae</i> , <i>C. vohemarensis</i> , <i>C. benghalensis</i>	PATAY <i>et al.</i> , 2016 ALMEIDA <i>et al.</i> , 2014 DELAROZA <i>et al.</i> , 2014 JUNIOR <i>et al.</i> , 2012 CAMPA <i>et al.</i> , 2012 BERTRAND <i>et al.</i> , 2003 FERNANDES <i>et al.</i> , 2011 MAGALHAES <i>et al.</i> , 2010 MONDOLOT <i>et al.</i> , 2006
4 Ácido 4-cafeoilquínico	<i>C. anthonyi</i> , <i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. heterocalyx</i> cf., <i>C.pseudozanguebariae</i> , <i>C. salvatrix</i> , <i>C. Sessiliflora</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. congensis</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. liberica</i> , <i>C. mannii</i> , <i>C. racemosa</i> , <i>C. stenophylla</i> , <i>C. leroyi</i> , <i>C. andrambovatensis</i> , <i>C. ankaranensis</i> , <i>C. augagneuri</i> , <i>C. millotii</i> , <i>C. perrieri</i> , <i>C. resinosa</i> , <i>C. Tsirananae</i> , <i>C. vohemarensis</i>	CAMPA <i>et al.</i> , 2012 JUNIOR <i>et al.</i> , 2012
5 Ácido 3-cafeoilquínico	<i>C. anthonyi</i> , <i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. heterocalyx</i> cf., <i>C.pseudozanguebariae</i> , <i>C. salvatrix</i> , <i>C. Sessiliflora</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. congensis</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. liberica</i> , <i>C. mannii</i> , <i>C. racemosa</i> , <i>C. stenophylla</i> , <i>C. leroyi</i> , <i>C. andrambovatensis</i> , <i>C. ankaranensis</i> , <i>C. augagneuri</i> , <i>C. millotii</i> , <i>C. perrieri</i> , <i>C. resinosa</i> , <i>C. Tsirananae</i> , <i>C. vohemarensis</i>	CAMPA <i>et al.</i> , 2012 JUNIOR <i>et al.</i> , 2012
6 Ácido 4-feruloilquínico	<i>C. arabica</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. liberica</i> , <i>C. mannii</i> , <i>C. stenophylla</i> , <i>C. leroyi</i> , <i>C. andrambovatensis</i> , <i>C. ankaranensis</i> , <i>C. resinosa</i> , <i>C. vohemarensis</i>	CAMPA <i>et al.</i> , 2012
7 Ácido 5-feruloilquínico	<i>C. arabica</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. liberica</i> , <i>C. mannii</i> , <i>C. stenophylla</i> , <i>C. leroyi</i> , <i>C. andrambovatensis</i> , <i>C. ankaranensis</i> , <i>C. resinosa</i> , <i>C. vohemarensis</i>	CAMPA <i>et al.</i> , 2012 MONDOLOT <i>et al.</i> , 2006
8 Ácido 3,4-dicafeoilquínico	<i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. heterocalyx</i> cf., <i>C.pseudozanguebariae</i> , <i>C. salvatrix</i> , <i>C. Sessiliflora</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. congensis</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. liberica</i> , <i>C. racemosa</i> , <i>C. augagneuri</i> , <i>C. perrieri</i> , <i>C. resinosa</i> , <i>C. tsirananae</i> ,	CAMPA <i>et al.</i> , 2012 MONDOLOT <i>et al.</i> , 2006
9 Ácido 3,5-dicafeoilquínico	<i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. heterocalyx</i> cf., <i>C.pseudozanguebariae</i> , <i>C. salvatrix</i> , <i>C. sessiliflora</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. congensis</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. liberica</i> , <i>C. racemosa</i> , <i>C. leroyi</i> , <i>C. andrambovatensis</i> , <i>C. ankaranensis</i> , <i>C. augagneuri</i> , <i>C. perrieri</i> , <i>C. resinosa</i> , <i>C. Tsirananae</i> , <i>C. Vohemarensis</i>	CAMPA, <i>et al.</i> , 2012 MONDOLOT, <i>et al.</i> , 2006
10 Ácido 4,5-dicafeoilquínico	<i>C. anthonyi</i> , <i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. heterocalyx</i> cf., <i>C.pseudozanguebariae</i> , <i>C. salvatrix</i> , <i>C. Sessiliflora</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. congensis</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. liberica</i> , <i>C. racemosa</i> , <i>C. leroyi</i> , <i>C. andrambovatensis</i> , <i>C. ankaranensis</i> , <i>C. augagneuri</i> , <i>C. perrieri</i> , <i>C. resinosa</i> , <i>C. vohemarensis</i>	CAMPA <i>et al.</i> , 2012 MONDOLOT <i>et al.</i> , 2006

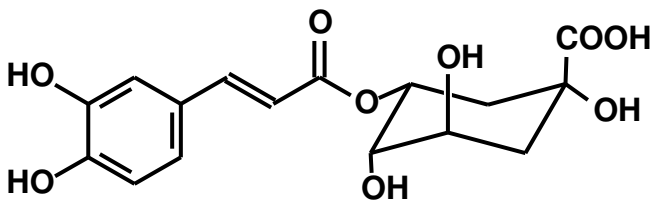
(3)



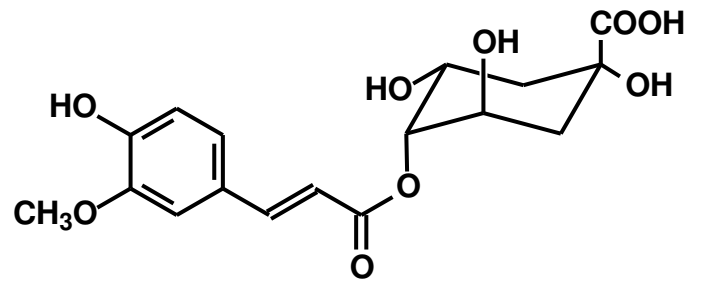
(4)



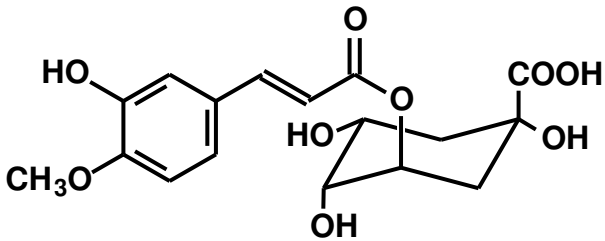
(5)



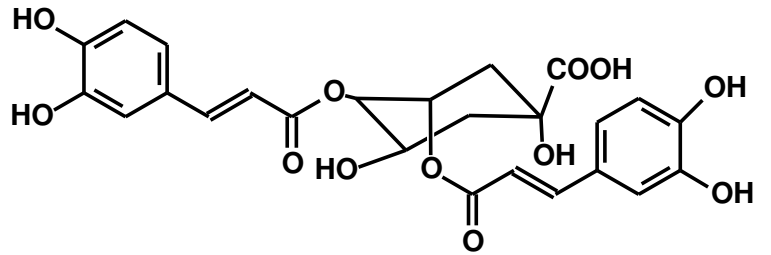
(6)



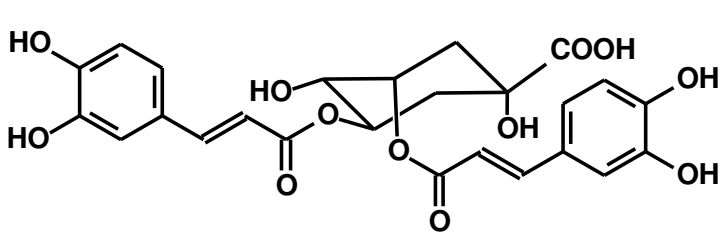
(7)



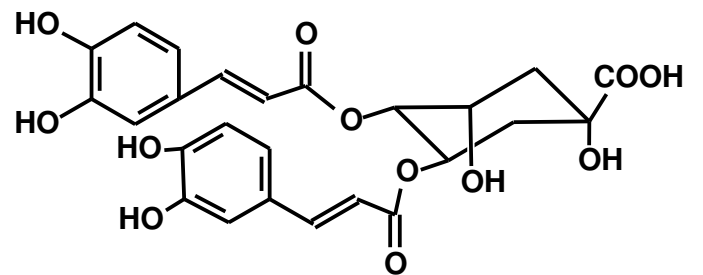
(8)



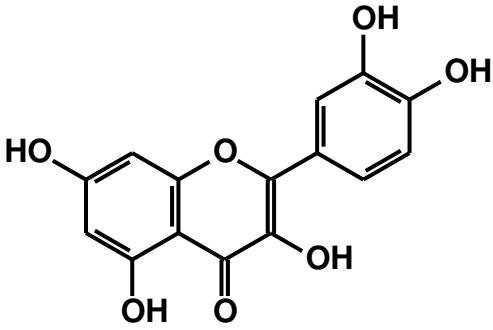
(9)



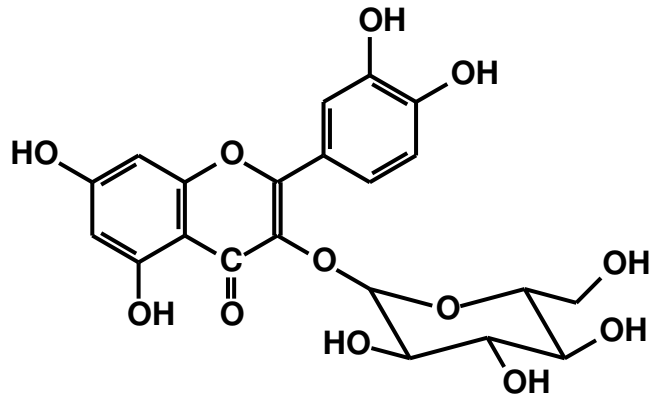
(10)



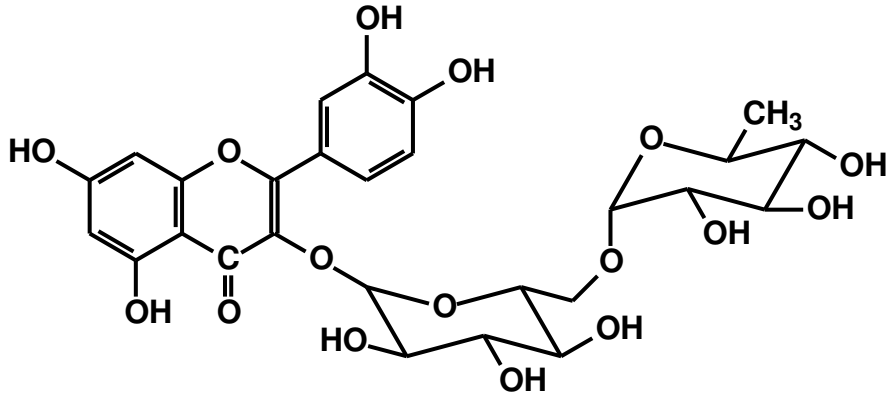
(11)



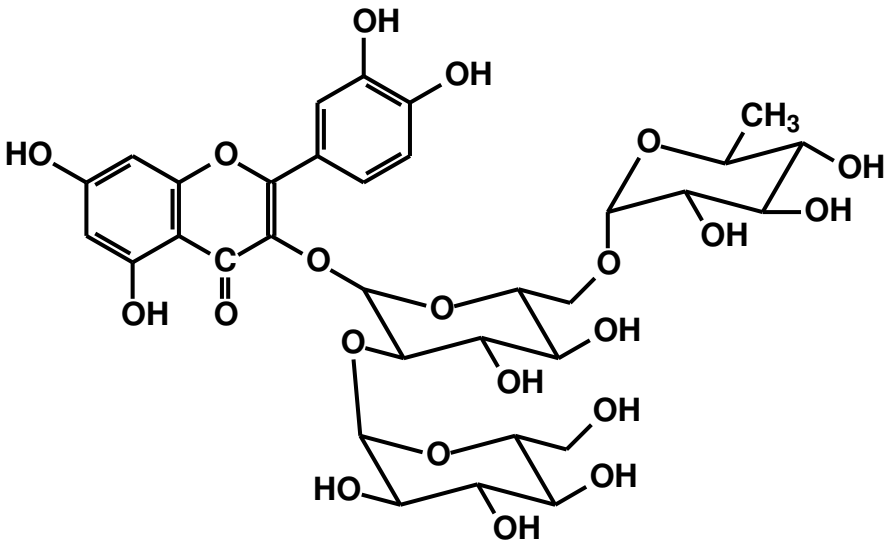
(12)



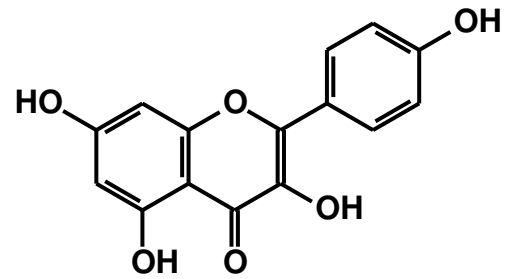
(13)



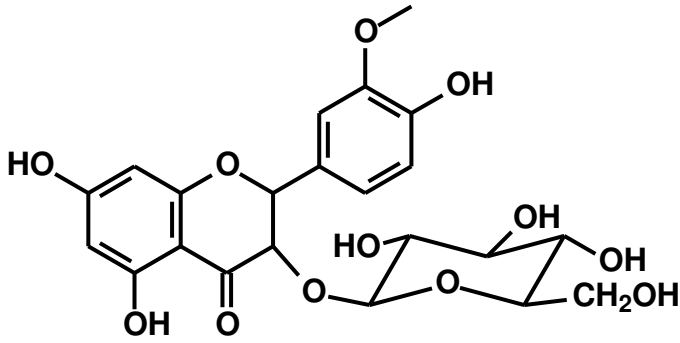
(14)



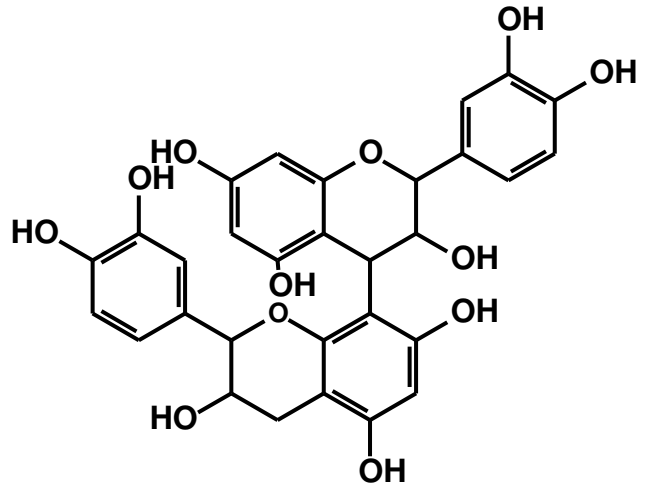
(15)



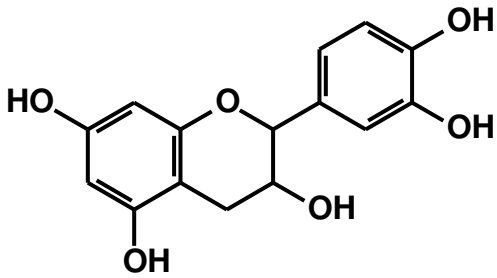
(16)



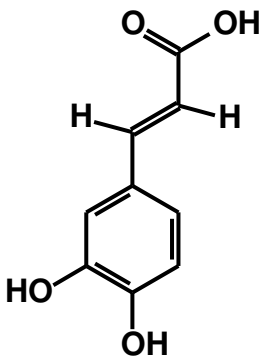
(17)



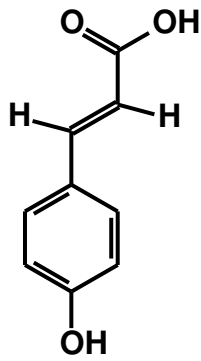
(18)



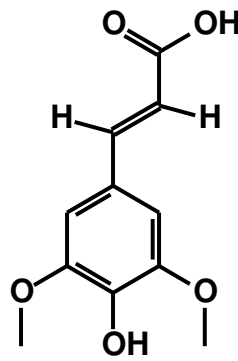
(19)



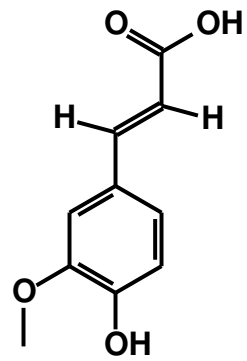
(20)



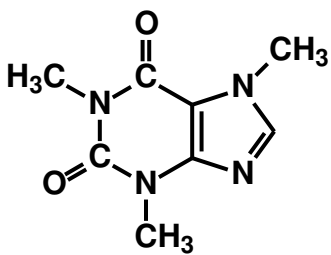
(21)



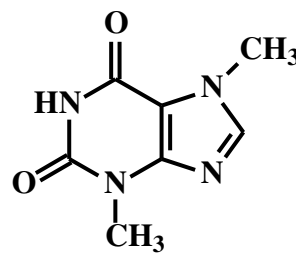
(22)



(23)



(24)



4 OBJETIVOS

4.1 Geral

- Estudo químico e farmacológico de folhas de *Coffea arabica*.

4.2 Específicos

- Identificar, quantificar e isolar mangiferina, ácidos clorogênicos e compostos fenólicos ainda não identificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas no Brasil (Ceará, Minas Gerais e São Paulo), Costa Rica (Cartago e Heredia) e de uma amostra comercial.

- Avaliar características similares entre os compostos fenólicos quantificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas em São Paulo e Ceará com análise de reconhecimento de padrões (PCA).

- Avaliar os extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica* e compostos puros ou isolados quanto:

- 1) à inibição da enzima conversora de angiotensina;
- 2) ao potencial antioxidante (DPPH, FRAP, ORAC e HX/XO);
- 3) à inibição da enzima acetilcolinesterase;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material estudado- folhas de *Coffea arabica*

O material estudado foi coletado em diversas localidades do Brasil (Ceará, Minas Gerais, São Paulo) e Costa Rica (Herradura e Turrialba) pela professora Dra. Maria Teresa Sales Trevisan. O material trata-se de folhas de café da espécie *Coffea arabica*. Todas as amostras foram detalhadas nos subtópicos seguintes segundo local de coleta, tratamento ao cafeeiro ou cultivares. Além do material coletado, folhas de café (*Coffea arabica*) para fazer infusão da marca “CHÁ & CIA”, vendidos comercialmente, foram utilizadas no presente estudo.

5.1.1. Folhas de café do Brasil (Ceará)

As amostras de folha de café obtidas no estado do Ceará foram coletadas nos municípios de Pacoti, Mulungu e Guaramiranga, localizados na serra de Baturité a 736, 801 e 865 metros de altitude, respectivamente. A Figura 7 mostra o mapa desses municípios.

Figura 7- Mapas de Pacoti, Mulungu e Guaramiranga no estado do Ceará.



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Mulungu_%28Cear%C3%A1%29, com modificações.

As amostras são providas de cafeeiros sombreados, plantio sem fins comerciais. O sombreamento com emprego de outras plantas gera condições mais favoráveis ao desenvolvimento do café, como a diminuição da amplitude térmica e da demanda hídrica da planta devido à diminuição da incidência solar direta, assim como na redução da incidência de ventos que contribuem para a evaporação da água das folhas e para danos mecânicos que deixam as plantas suscetíveis a doenças. As folhas estudadas seguem nomeadas na Tabela 4, detalhadas com o local da coleta e características do cafeeiro.

Tabela 4- Descrição do local e característica das folhas de café coletadas no Ceará.

Amostra	Município e local de coleta	Descrição
CEP1	Pacoti, Sítio São Gonçalo	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEG1	Guaramiranga, Sítio São Francisco	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEG2	Guaramiranga, distrito de Pernambucoquinho, Sítio Canadá	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEG3	Guaramiranga, Sítio Correntinho	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEG4	Guaramiranga, Sítio do Paulo	Folhas jovens (5-8 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEG4.2	Guaramiranga, Sítio do Paulo	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEG5	Guaramiranga, Sítio Paulo 2	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEG6	Guaramiranga, Sítio Santa Cecília	Folhas (adultas 10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEG7	Guaramiranga, distrito de Pernambucoquinho, Sítio Bota Fogo	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEM1	Mulungu, Pousada Le Rêve	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.
CEM2	Mulungu, Pousada Le Rêve	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas do chão, logo abaixo do cafeeiro sombreado.
CEM3	Mulungu, Sítio São Roque	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro sombreado.

5.1.2. Folhas de café do Brasil (Minas Gerais)

As amostras de folhas de café obtidas no estado de Minas Gerais foram coletadas nos municípios de Manhumirim, Perdões e Bom Sucesso, localizados a 618, 848 e 952 metros de altitude, respectivamente. As amostras foram coletadas durante a segunda semana de setembro (2013). A Figura 8 apresenta o mapa dos municípios de coleta.

Figura 8- Mapas de Perdões, Bom Sucesso e Manhumirim no estado de Minas Gerais.



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Bom_Sucesso_%28Minas_Gerais%29, com modificações.

As folhas de Bom Sucesso são provenientes de cafeeiros que possuíam tratamentos tradicionais, onde o café produzido possuía fins comerciais. As provindas de Manhumirim são de cafeeiros submetidos a tratamento homeopático, onde o café produzido também possuía fins comerciais. O tratamento homeopático se baseia no princípio de que "semelhante pelo semelhante se cura", ou seja, o tratamento se dá a partir da diluição e dinamização da mesma substância que produz a doença em uma planta saudável, tornando-a mais resistente a doenças, a pragas e a impactos ambientais, pois estimula o sistema de defesa dela. Já as amostras provindas de Perdões possuíam três tipos de tratamentos: tratamento tradicional, tratamento "quebra-vento" e tratamento "cobertura do solo e adubação verde", onde o café produzido também possuía fins comerciais. O tratamento "quebra vento" consiste

em utilizar uma ou mais fileiras de árvores ou arbustos plantados ao longo das extremidades do terreno da plantação de café, com o propósito de quebrar a força dos ventos e proteger contra impactos negativos causados por ventos muito fortes. Já o tratamento "cobertura do solo e adubação verde" consiste em plantar uma cobertura verde de leguminosas debaixo ou entre as plantas de café e cobrir a superfície do solo com qualquer material orgânico. Além de reter a umidade do solo, a cobertura verde e a cobertura do solo com material orgânico ajudam a reduzir a erosão e aumentar a fertilidade do solo. Os tratamentos "quebra vento" e "cobertura do solo e adubação verde" foram desenvolvidos por uma iniciativa de pesquisa chamada "coffee & climate", um projeto de pesquisa global articulado por grandes empresas particulares e instituições públicas que oferecem aos produtores de café um conjunto de técnicas para enfrentar o cenário de mudanças climáticas na cadeia do café. A coordenação do projeto no Brasil está sob a responsabilidade da Fundação Hans Neumann. A iniciativa também apoia cafeicultores na Guatemala, Tanzânia e Vietnã.

As folhas coletadas no estado de Minas Gerais seguem nomeadas na Tabela 5, detalhadas com o local da coleta e características das folhas e cafeeiros.

Tabela 5- Descrição do local e característica das folhas de café coletadas em Minas Gerais.

Amostra	Município e local de coleta	Descrição
MGBS1	Bom Sucesso, Propriedade Bom Sucesso	Folhas jovens (5-8 cm), coletadas diretamente do cafeeiro; tratamento tradicional.
MGBS1.2	Bom Sucesso, Propriedade Bom Sucesso	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro; tratamento tradicional.
MGM1	Manhumirim, Propriedade Parada Independência	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro; tratamento homeopático.
MGP1	Perdões, Comunidade de Machado	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro; tratamento "quebra vento".
MGP2	Perdões, Comunidade de Machado	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas da parte do cafeeiro próxima ao solo, com tratamento "cobertura do solo e adubação verde".
MGP2.2	Perdões, Comunidade de Machado	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas da parte superior do cafeeiro; tratamento "cobertura do solo e adubação verde".

(continuação)

Amostra	Município e local de coleta	Descrição
MGP3	Perdões, Comunidade de Machado	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro; tratamento tradicional.

5.1.3. Folhas de café do Brasil (São Paulo)

As amostras de folha de café obtidas no estado de São Paulo foram coletadas no município de Campinas localizado a 685 metros de altitude. As amostras foram coletadas durante a primeira semana de maio (2014). A Figura 9 mostra o mapa desse município.

Figura 9- Mapa de Campinas no estado de São Paulo.



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Campinas>.

As amostras de folha de café foram obtidas de diferentes cultivares de café, desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), instituto de pesquisa da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. As amostras foram obtidas na sede do instituto em Campinas, no Centro de Café ‘Alcides Carvalho’, e seguem nomeadas e detalhadas com as características dos cultivares na Tabela 6.

Tabela 6- Descrição do local e característica dos cafeeiros das amostras coletadas em São Paulo.

Amostra	Cultivar	Descrição
SP1	IAC Ouro Verde	Porte baixo, ramificação secundária abundante; folhas novas, coloração verde ou bronze; frutos vermelhos de maturação média a tardia; sementes com peneira média entre 16 e 17, suscetível à ferrugem.
SP2	Obatã 1669-20	Porte baixo; internódios curtos; boa ramificação secundária; brotos novos de coloração verde; frutos grandes, vermelhos e de maturação média a tardia, sementes com peneira média 17; moderadamente resistente à ferrugem.
SP3	Tupi 1669-33	Porte baixo; internódios curtos; brotos novos de coloração bronze; frutos vermelhos e de maturação precoce; sementes com peneira média em torno de 17; resistente à ferrugem.
SP4	Catuaí Amarelo IAC-62	Porte baixo; internódios curtos; ramificação secundária abundante; frutos vermelhos de maturação média a tardia; sementes de tamanho médio; peneira média em torno de 16; suscetível à ferrugem.
SP4.2	Catuaí Amarelo IAC-86	
SP5	Catuaí Vermelho IAC- 144	
SP5.2	Catuaí Vermelho IAC-44	
SP5.3	Catuaí Vermelho IAC-81	
SP5.4	Catuaí Vermelho IAC-99	
SP6	Caturra Vermelho IAC 477	
SP7	Acaiá 474-19	Porte alto, frutos vermelhos e de maturação mais uniforme, de média para precoce; sementes maiores, com peneira média em torno de 18; suscetível à ferrugem.
SP8	Icatu Amarelo IAC 2944	Porte alto; vigoroso; frutos amarelos de maturação média a tardia; sementes com peneira média em torno de 17; resistente à ferrugem. Frutos mais aderentes aos ramos.

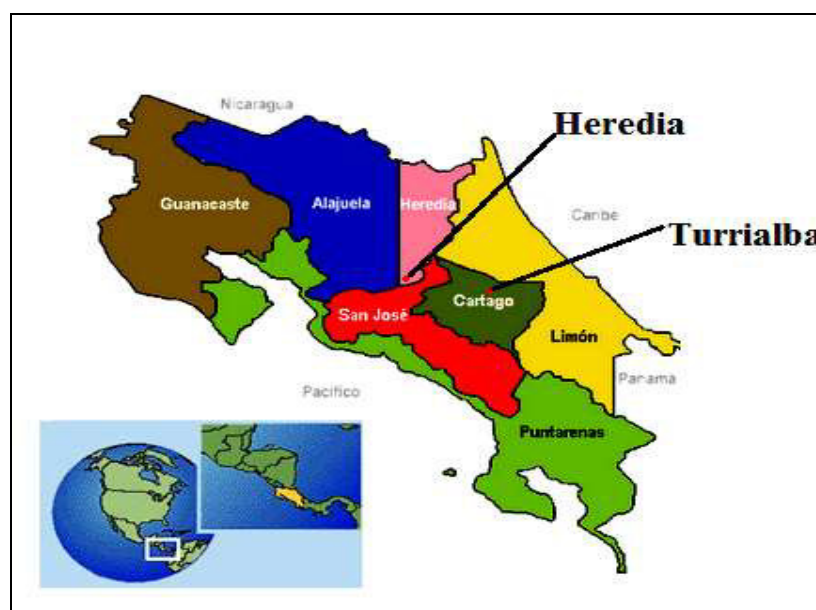
(continuação)

Amostra	Cultivar	Descrição
SP9	Icatu Vermelho IAC 2945	Porte alto; vigoroso: frutos vermelhos de maturação média a tardia; sementes com peneira média em torno de 17; resistente à ferrugem. Frutos mais aderentes aos ramos.
SP9.2	Icatu Vermelho IAC 4445	
SP9.3	Icatu Vermelho IAC 4043	
SP9.4	Icatu Vermelho IAC 4041	
SP9.5	Icatu Vermelho IAC 4040	
SP10	Mundo Novo IAC 515	Porte alto; vigoroso, frutos vermelhos e de maturação média; sementes com peneira média em torno de 17; suscetível à ferrugem. A linhagem IAC 388-17-1 apresenta ramos laterais mais longos (maior diâmetro da copa).
SP10.2	Mundo Novo IAC 388-17-1	
SP10.3	Mundo Novo IAC 376-4	

5.1.4 Folhas de café da Costa Rica (Turrialba e Heredia)

As amostras de folha de café obtidas na Costa Rica são da espécie *Coffea arábica*, foram coletadas nas cidades de Turrialba e Heredia, localizadas a 638 e 1150 metros de altitude, respectivamente. Turrialba faz parte da província Cartago e Heredia, é capital da província Heredia, como mostra o mapa apresentado na Figura 10. As amostras foram coletadas entre os dias 11 e 16 de novembro (2012).

Figura 10- Mapas de Turrialba e Heredia nas províncias de Cartago e Heredia.



Fonte: <http://llatinocostarica.blogspot.com.br/>, com modificações.

As amostras de folha de Turrialba foram obtidas de cafeeiros da variedade caturra, cultivares pertencentes a um projeto de pesquisa que estuda processos ecológicos que promovem a sustentabilidade e melhor produtividade do café sob diferentes condições ambientais, em associação com árvores e sob manejo orgânico e convencional. Esse projeto é apoiado pelos institutos MIP-Noruega, CATIE, Sede, CIRAD, URC, ICAFE. O manejo orgânico recomenda a manutenção de cobertura vegetal sobre o solo e adubação verde. Além disso, o manejo do solo no sistema orgânico prioriza as fontes orgânicas de nutrientes e não utiliza fertilizantes químicos de alta solubilidade. Já as amostras obtidas em Heredia foram coletadas de cafeeiros com tratamento convencional, com fins comerciais.

As folhas estudadas seguem nomeadas na Tabela 7, detalhadas com o local da coleta, características dos cafeeiros e descrição dos tratamentos.

Tabela 7- Descrição do local e característica das folhas de café coletadas em Turrialba e Heredia.

Amostra	Cidade e local de coleta	Descrição
CR1	Turrialba, área campal, coordenadas 9°53'44"N, 83° 40.7°W	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro da variedade caturra; baixo tratamento orgânico; sombreamento com <i>Erythrina poeppigiana</i> (Poró).
CR2	Turrialba, área campal, coordenadas 9°53'44"N, 83° 40.7°W	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro da variedade caturra; intensivo tratamento orgânico; sombreamento com <i>Erythrina poeppigiana</i> (Poró).
CR3	Turrialba, área campal, coordenadas 9°53'44"N, 83° 40.7°W	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro da variedade caturra; alto tratamento convencional; plena exposição ao sol.
CR4	Turrialba, área campal, coordenadas 9°53'44"N, 83° 40.7°W	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro da variedade caturra; alto tratamento convencional; sombreamento com <i>Erythrina poeppigiana</i> (Poró).
CR5	Heredia, Britt Coffee Tour	Folhas adultas (10-20 cm), coletadas diretamente do cafeeiro.

5.1.5 Folhas de café comerciais para fazer infusão

Três potes de folhas de café para fazer infusão da marca “CHÁ & CIA” (Figura 11) foram adquiridos via internet. O produto tem origem brasileira.

Figura 11- Folhas de café comerciais “CHÁ & CIA”, ervas medicinais.



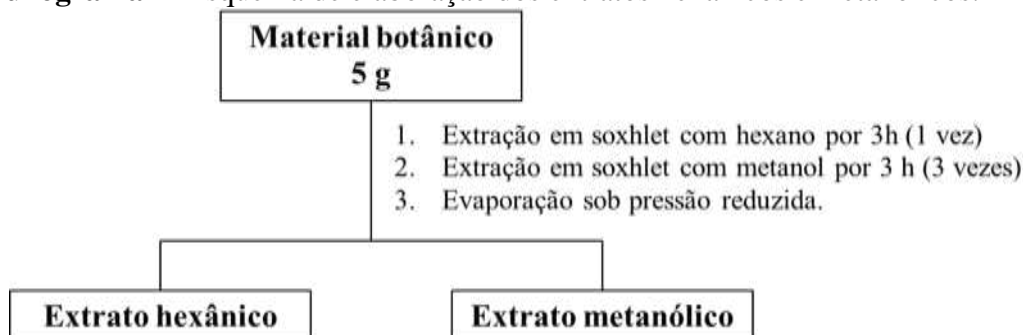
Fonte: <https://www.chaacia.com.br/ervas-a-b-c-d/cafe-coffee-arabica-l-100-gr-g>

5.2 Preparações do material vegetal

5.2.1 Preparação dos extratos hexânicos e metanólicos

As folhas de *Coffea arabica* coletadas nas quatro localidades foram secas à temperatura ambiente (entre 24-33°C) e à sombra. Após total secagem, as folhas foram pulverizadas com auxílio de um moinho elétrico. Cinco gramas do pó resultante foram submetidos à extração a quente com 200 mL de hexano por três horas (uma vez) em um aparelho Soxhlet, para remoção de lipídeos. Após evaporação do hexano, o material foi extraído por três horas com 200 mL de metanol (3 vezes), como mostrado no Fluxograma 1.

Fluxograma 1- Esquema de elaboração dos extratos hexânicos e metanólicos.



Fonte: Próprio autor.

Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida em evaporador rotatório a 40°C e os extratos hexânicos e metanólicos obtidos foram secos em “speed vacuum” (SpeedVac, Bachhofer, Reutlingen, Germany). Já as folhas de café comercial, para fazer infusão, foram diretamente pulverizadas com auxílio de um moinho elétrico, visto que já se encontravam secas na embalagem. Após pulverização do material em moinho elétrico, 25 gramas do pó resultante foram extraídos em um aparelho Soxhlet, de acordo com procedimento descrito no Fluxograma 1. A maior quantidade de material utilizada teve como objetivo obter uma maior quantidade de extrato para posterior purificação de compostos químicos por Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa. A Tabela 8 contém o rendimento dos extratos metanólicos e hexânicos obtidos.

Tabela 8- Rendimento dos extratos obtidos das folhas de *Coffea arabica*.

Amostras	Extrato	Rendimento	Extrato	Rendimento
	Hexânico (g)	(%)	Metanólico (g)	(%)
CEP1	0,19	3,7	0,72	14,5
CEG1	0,13	2,5	0,79	15,8
CEG2	0,15	3,0	1,01	20,2
CEG3	0,19	3,9	0,72	14,4
CEG4	0,09	1,8	0,30	6,1
CEG4.2	0,14	2,8	1,05	21,1
CEG5	0,11	2,1	1,35	26,9
CEG6	0,16	3,1	1,00	20,0
CEG7	0,17	3,5	0,85	16,9
CEM1	0,21	4,3	1,42	28,5
CEM2	0,27	5,5	1,17	23,5
CEM3	0,11	2,2	1,00	20,0
MGBS1	0,09	1,8	1,07	21,3
MGBS1.2	0,15	2,9	0,85	16,9
MGM1	0,13	2,5	0,93	18,5
MGP1	0,19	3,8	1,46	29,2
MGP2	0,26	5,1	1,59	31,8
MGP2.2	0,09	1,9	1,04	20,8

(continuação)

Amostras	Extrato	Rendimento	Extrato	Rendimento
	Hexânico (g)	(%)	Metanólico (g)	(%)
MGP3	0,18	3,5	1,69	33,6
SP1	0,20	4,0	1,80	35,9
SP2	0,22	4,4	2,22	44,4
SP3	0,13	2,6	1,83	36,6
SP4	0,08	1,7	0,80	15,9
SP4.2	0,10	2,1	0,99	19,7
SP5	0,09	1,8	0,99	19,9
SP5.2	0,11	2,3	0,87	17,3
SP5.3	0,12	2,5	0,71	14,3
SP5.4	0,16	3,1	1,03	20,5
SP6	0,18	3,6	1,60	31,8
SP7	0,14	2,9	1,12	22,3
SP8	0,17	3,3	1,23	24,6
SP9	0,15	3,1	0,86	17,2
SP9.2	0,14	2,7	0,76	15,3
SP9.3	0,18	3,6	1,17	23,4
SP9.4	0,14	2,8	1,06	21,2
SP9.5	0,10	2,0	1,10	21,9
SP10	0,18	3,6	1,05	20,9
SP10.2	0,18	3,6	1,22	24,4
SP10.3	0,18	3,5	1,87	37,5
CR1	0,08	1,7	0,75	15,0
CR2	0,10	2,0	0,80	15,9
CR3	0,13	2,6	0,87	17,4
CR4	0,10	2,0	0,69	13,7
CR5	0,10	2,0	1,06	21,1
Amostra Comercial	7,35	7,9	19,42	20,84

5.2.2 Preparação das infusões de folha de *Coffea arabica*

Para avaliar a eficiência da extração de mangiferina por infusão, quantidades variáveis (100-1000 mg) de pó de folha de café comercial para fazer chá foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e 10,0 mL de água bidestilada fervente; adicionados em duplicata. O sistema foi mantido num banho de água a 100°C durante 20 min. As soluções, em seguida, foram filtradas. Para avaliar a taxa de extração, amostras de 100 mg de pó de folha de café foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e 10,0 mL de água bidestilada fervente; adicionados em duplicata. O sistema foi mantido em banho-maria a 100°C durante 1 a 30 minutos. As soluções, em seguida, foram filtradas. Finalmente, para avaliar o efeito da temperatura sobre a eficiência da extração, amostras de 100 mg de pó de folha de café foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e 5,0 mL de água bidestilada variando entre 35 e 100 °C de temperatura; adicionados. Os sistemas foram mantidos em bloco de aquecimento durante 5 min. As soluções, em seguida, foram filtradas.

5.3 Métodos cromatográficos

5.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas com ionizador “electrospray” (CLAE-DAD-IES-EM)

Para as análises qualitativas e quantitativas dos extratos metanólicos de todas as amostras coletadas e da amostra comercial, assim como das infusões, foi utilizado um cromatógrafo líquido Hewlett Packard série 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) pertencente ao laboratório de Toxicologia e Fatores de Risco do Câncer do Centro Alemão de Pesquisas do Câncer (Heidelberg, Alemanha), equipado com coluna de fase reversa C18 (Phenomenex Ltd, Aschaffenberg, Alemanha) com dimensões de 250 x 4,6 mm, acoplado a detector de arranjo de diodos e a um espectrômetro de massas de quadrupolo simples Hewlett Packard série 1101 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) operando com ionizador “electrospray”. Os espectros de massas foram gerados no modo negativo sob as seguintes condições: voltagem do fragmentador = 100 V, voltagem do capilar = 2500 V, pressão do nebulizador = 30 psi, temperatura do gás secante = 350 °C, faixa de detecção de massas 100 – 1500 D, pressão máxima de 400 bar. O controle de instrumentos e manipulação de dados foi realizado com o software HP Chemstation em um computador (KHALLOUKI *et al.*, 2007).

Para injeção no cromatógrafo, os extratos foram dissolvidos em solução de metanol e DMSO (1:1) e ajustados para a concentração de 5 mg/ml. Já as infusões foram diretamente injetadas após serem filtradas. As injeções foram feitas em duplicata.

A taxa de fluxo de solvente foi 1 mL/min e o volume de injeção 10µL. A fase móvel utilizada consistiu em uma solução aquosa 2% de ácido acético (solvente A) e acetonitrila (solvente B), seguindo gradiente e tempo de eluição total de 45 min: inicialmente 95%A:5%B por dez minutos, 90% A:10% B por um minuto, 85%A:15%B por nove minutos, 60% A:40% B por dez minutos, 40% A:60% B por 10 minutos, 0% A:100% B por 5 minutos e até o tempo final do experimento. Os compostos foram detectados pela sua absorvância no UV a 257, 278 320 e 340 nm à temperatura ambiente (KHALLOUKI *et al.*, 2007).

Com os dados obtidos nos cromatogramas (áreas dos picos), as substâncias presentes nos extratos foram quantificadas a partir das curvas padrão de padrões autênticos ou compostos purificados.

5.3.1.1 Análise quantitativa dos extratos metanólicos e infusões das folhas de café

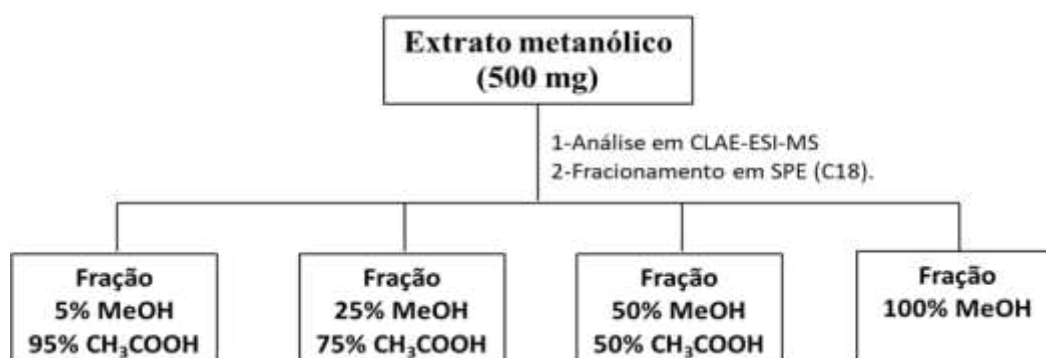
Os teores de ácidos clorogênicos, xantonas, flavonoides e cafeína nas folhas de café foram calculados a partir de curvas padrão de padrões autênticos ou compostos purificados, na faixa de 0-1000 µM a 320 nm, 257 nm, 340 nm e 278 nm, respectivamente. Os padrões ácido clorogênico, ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, rutina e cafeína foram obtidos da Sigma-Aldrich, enquanto isomangiferina e mangiferina foram previamente purificados em laboratório. Os compostos quercetina-3-*O*-glucosídeo, quercetina-3-*O*-diglucosídeo, rutina glucosídeo, quercetina-3-*O*-ramnogalactosídeo, campferol-3-*O*-ramnoglucosídeo e campferol-3-*O*-diglucosídeo ramnosídeo não possuíam padrões autênticos puros ou purificados, então a concentração dos metabólitos foi calculada contra curvas padrão da molécula central, quercetina ou campferol (Sigma-Aldrich), com correções relevantes de massa molecular. Os dados de quantificação obtidos foram expressos em g/kg de peso seco.

5.3.2 Extração em fase sólida (SPE)

O extrato metanólico de folhas de café comercial foi fracionado em cartuchos de fase sólida (Sílica de octadecil-modificada, CHROMABOND® C18 ec, Macherey Nagel) de 45 mL/5.000 mg, sob sucção, em coletor apropriado. Foram solubilizados 500 mg do extrato

metanólico em 50 mL de uma solução de 2% de ácido acético em água com auxílio de um sonicador e, em seguida, a solução resultante foi centrifugada por 10 min, 400 rpm, em temperatura ambiente. Os cartuchos de SPE foram previamente condicionados com metanol (4 ml) e, em seguida, com a solução de 2% de ácido acético em água (4 ml). O fracionamento foi feito com 50 mL das seguintes soluções: 5% metanol em 95% ácido acético (5%MeOH; 95% CH₃COOH), 25% metanol em 75% ácido acético (25%MeOH; 75% CH₃COOH), 50% metanol em 50% ácido acético (50% MeOH; 50% CH₃COOH) e 100% metanol (100% MeOH), como apresentado no Fluxograma 2 (PFUNDSTEIN *et al.*, 2010). Todas as frações foram secadas em “speed vacuum” (SpeedVac, Bachhofer, Reutlingen, Germany), pesadas e analisadas em CLAE-IES-EM, segundo método descrito no item 4.3.1 para análise dos metabólitos presentes e escolha da fração para posterior purificação em CLAE-SP.

Fluxograma 2- Esquema de fracionamento por SPE.



Fonte: Próprio autor.

5.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativo (CLAE-SP)

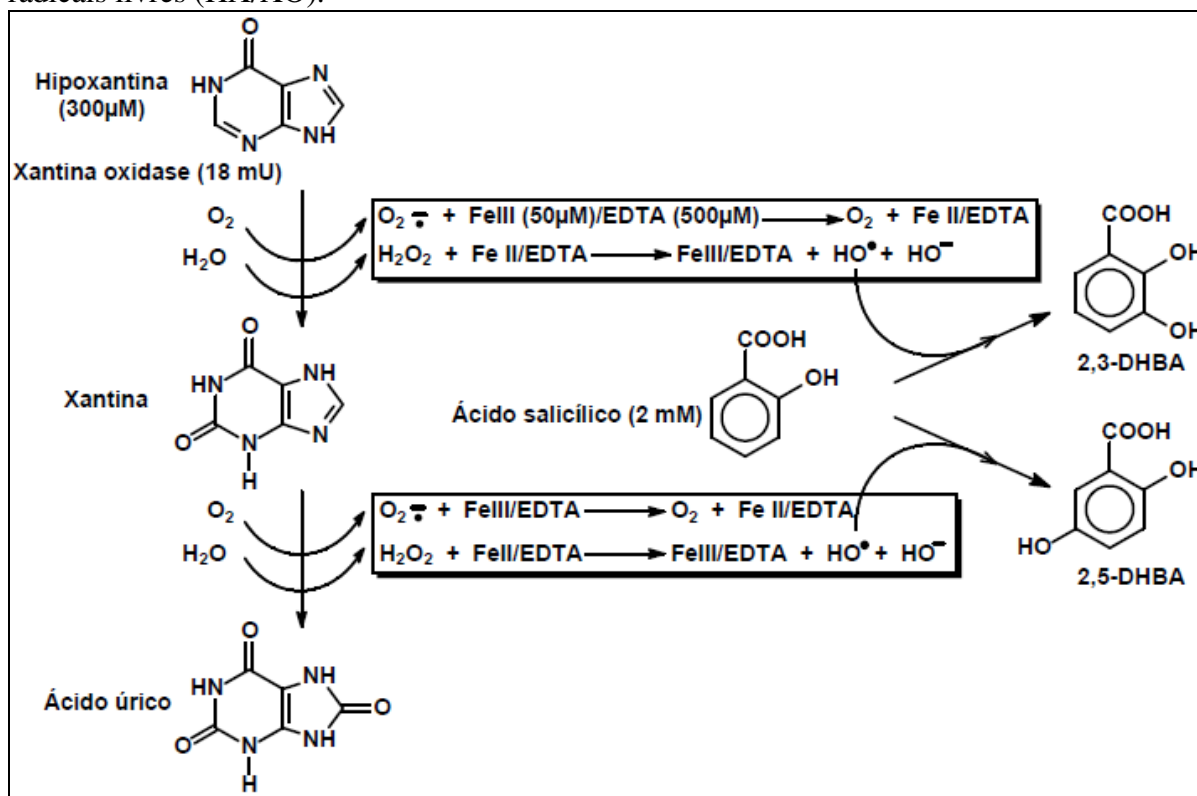
Para a purificação dos compostos das frações obtidas por SPE, cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa foi conduzida em um cromatógrafo líquido HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com coluna de fase reversa C18 (Zorbax Eclipse Plus, Agilent, Waldbronn, Alemanha), com dimensões de 250 x 10 mm. A fase móvel e gradiente de eluição utilizados foram os mesmos que estão descritos no item 4.3.1. O fluxo de solvente foi de 3 mL/min e injeção de 50µL. A detecção foi feita com um detector de arranjo de diodos (UV), com registro nos comprimentos de onda 257, 278, 320 e 340 nm.

5.3.4 Ensaio HX/XO (*xantina/ xantina oxidase*)

Para o ensaio de medição do potencial antioxidante frente à enzima hipoxantina/xantina oxidase e de inibição da enzima conversora de angiotensina I dos extratos metanólicos das amostras, foi utilizado cromatógrafo líquido Hewlett Packard série 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), pertencente ao laboratório de Toxicologia e Fatores de Risco do Câncer do Centro Alemão de Pesquisas do Câncer (Heidelberg, Alemanha), equipado com coluna de fase reversa C18 (Phenomenex Ltd, Aschaffenberg, Alemanha), com dimensões de 250 x 4,6 mm e acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD). O detector UV foi ajustado a 325 nm para a detecção dos produtos da reação (ácidos 2,5-di-hidroxibenzoico e 2,3-di-hidroxibenzoico).

Este ensaio consiste em um sistema contendo a enzima xantina e o substrato hipoxantina. A enzima xantina oxida a hipoxantina em xantina que, por sua vez, é oxidada a ácido úrico. Durante a reação de oxidação da hipoxantina a ácido úrico, há a liberação de radicais hidroxila que são capturados pelo ácido salicílico presente no meio, levando à formação de ácidos benzóicos dihidroxilados (ácido 2,3-diidroxibenzóico e ácido 2,5-diidroxibenzóico). No ensaio, a hipoxantina e o ácido salicílico, juntamente com seus produtos de oxidação, são quantificados em um sistema padrão em CLAE (OWEN, *et al.*, 2000). Portanto, quando uma amostra a ser avaliada é adicionada a esse sistema, se a mesma conseguir competir com o ácido salicílico na captura dos radicais hidroxila, haverá uma menor formação dos produtos ácido 2,3-diidroxibenzóico, ácido 2,5-diidroxibenzóico e ácido úrico, indicando uma atividade antioxidante da amostra analisada. As reações envolvidas nesse ensaio são mostradas na Figura 12.

Figura 12- Reações envolvidas na avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres (HX/XO).



Fonte: Owen, R.W., *et al.* 2000.

Para o ensaio, foi preparada a solução tampão fosfato, pH= 6,6 (500 mL de solução: 19,05 mL 1M K_2HPO_4 , 30,95 mL 1M KH_2PO_4 , 73mg EDTA, 32,7 mg $FeCl_3$, 20,5 mg hipoxantina, 138 mg ácido salicílico). Soluções dos extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica* foram preparadas em metanol na concentração de 10 mg/ml. Em seguida, foram adicionadas em duplicatas em tubos plásticos do tipo Falcon de 15 mL, nas seguintes quantidades: 5 μL, 10 μL, 25 μL, 50 μL, 100 μL, 250 μL e 500μL. Após a secagem em nitrogênio, foram adicionadas 2,0 mL da solução tampão (pH= 6,6). Com o auxílio de um ultrassom, os extratos foram completamente dissolvidos no tampão. Em seguida, foi adicionada aos tubos Falcon a enzima xantina oxidase (5 μL), seguindo incubação a 37 °C por três horas. Após a incubação, foram adicionados 10 μL de ácido clorídrico (HCl) concentrado para parar a reação. Uma alíquota de 1,0 mL de cada fração foi centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm e 100 μL do sobrenadante retirado para análise em CLAE. A fase móvel utilizada consistiu em solução aquosa 2% de ácido acético (solvente A) e metanol (solvente B), seguindo gradiente e tempo de eluição total de 45 min: inicialmente 95% A:5% B por dois minutos, 75% A : 25% B por oito minutos, 60% A:40% B por dez minutos, 50% A : 50% B por dez minutos e 0% A : 100% B até o tempo final do experimento. A taxa de fluxo

da fase móvel foi 1,0 mL/min e a injeção de 20 µL. A detecção foi feita em um detector de arranjo de diodos (UV) ajustado nos comprimentos de onda 325 nm para a detecção do ácido salicílico e seus produtos da reação de oxidação (ácidos 2,5-diidroxibenzóico e 2,3-diidroxibenzóico) e em 278 nm para detecção da hipoxantina e seus produtos de oxidação (xantina e ácido úrico).

Também foi avaliada no mesmo ensaio a capacidade de inibir a formação de ácido úrico. A xantina oxidase é a enzima que produz ácido úrico, a partir do substrato hipoxantina. Se o composto em análise ocupa o lugar da hipoxantina no sítio ativo da enzima, irá interromper a produção de uratos (forma fisiológica do ácido úrico) e também, indiretamente, de radicais livres.

A quantificação dos produtos finais da enzima (ácido úrico) ou das reações radicalares (ácido 2,5-diidroxibenzóico e ácido 2,3-diidroxibenzóico) foi realizada usando curvas de calibração feitas com padrões autênticos nos comprimentos de onda adequados. Os mesmos foram submetidos à análise em CLAE-DAD, em duplicata, na seguinte faixa de concentração (MeOH): 1000, 500, 250, 100 e 50 µM. O IC₅₀ de cada amostra; foi calculado com o programa Table curve (Jandel Scientific, Chicago, IL).

5.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros unidimensionais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono 13 (RMN ¹³C) foram obtidos em espectrômetro da Bruker Avance II (III), pertencente ao laboratório de Toxicologia e Fatores de Risco do Câncer do Centro Alemão de Pesquisas do Câncer (Heidelberg, Alemanha), operando na frequência de 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C ou 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C.

Foi utilizado metanol deuterado (CD₃OD) na dissolução das amostras para obtenção dos espectros.

Os deslocamentos químicos (δ) dos núcleos de ¹H e ¹³C foram reportados em relação ao TMS (tetrametilsilano) ($\delta = 0$ ppm para ¹H e ¹³C), usando o sinal do solvente como referência interna secundária ($\delta_H = 3.31$ ppm e $\delta_C = 49.05$ ppm para soluções de CD₃OD).

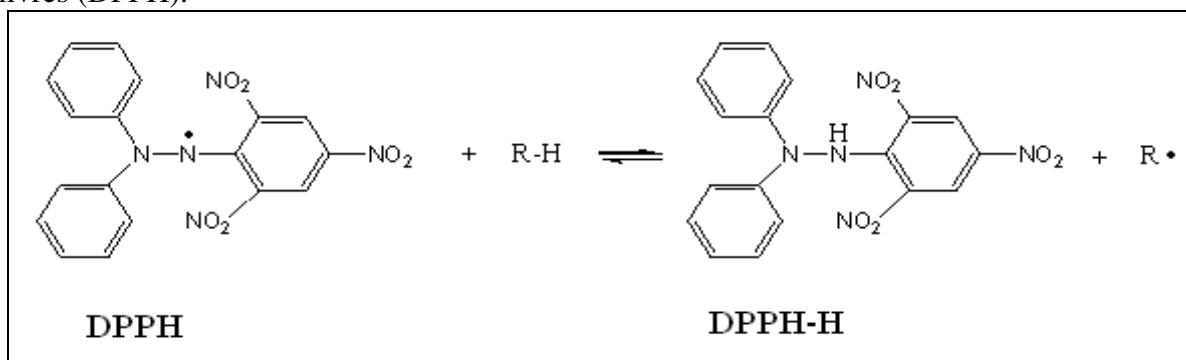
5.5 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

5.5.1 Ensaio DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazina)

O ensaio DPPH para avaliação quantitativa da capacidade sequestradora de radicais livres frente ao radical sintético 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (DPPH) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Silva *et al.* (2006). Este ensaio avalia a capacidade do antioxidante de neutralizar radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio ou pela transferência de elétron (PRIOR *et al.*, 2005).

O teste é baseado na diminuição da absorbância do radical 1,1-difenil-2-picrihidrazina causada pela sua redução por uma substância antioxidante. Devido à presença ímpar de elétron, a solução contendo o radical DPPH tem uma cor violeta característica com absorção a 517 nm. Após sua reação com o antioxidante, a cor violeta passa a ser amarela, diminuindo gradualmente a absorvidade a 515 nm (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As reações que estão envolvidas nesse método estão apresentadas na Figura 13.

Figura 13- Reação envolvida na avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH).



Fonte: SANTOS *et al.*, 2011, com modificações.

Os extratos metanólicos foram analisados nas concentrações 1000-25 ppm em metanol e as substâncias puras nas concentrações 1,0-0,01 mmol/L. 20 μ L das soluções de diferentes concentrações dos extratos e compostos puros foram adicionados em duplicata em placas de 96 poços. A reação foi iniciada após a adição 180 μ L da solução de DPPH (Sigma-Aldrich Chemie) na concentração de 20 μ g/mL em metanol. A absorbância foi mensurada após 10 minutos em um equipamento Universal micro plate reader (Elx 800 Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA) versus uma solução controle. A concentração de DPPH foi calculada a partir de uma curva padrão de DPPH entre 1-100 μ g/mL medidas

simultaneamente. O IC₅₀ foi calculado como a quantidade de antioxidante presente na amostra necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% e, para esse cálculo, foi utilizado o programa “Table Curve” (Jandel Scientific, Chicago, IL).

5.5.2 Ensaio ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

O ensaio ORAC foi realizado de acordo com a metodologia descrita por HUANG *et al.*, 2002. Ele avalia a capacidade do antioxidante de neutralizar radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio (PRIOR *et al.*, 2005).

Esse ensaio baseia-se no dano causado por radicais peroxil, gerados por uma fonte radicalar AAPH 3,3'-azo-bis-(2-amidinopropano)-diidroclore; Wako Chemicals ao composto fluorescente fluoresceína (3',6'-di-hidroxiespiro[2-benzofuran-3,9'-xanten]-1-ona), o que causa uma diminuição da intensidade da fluorescência com o passar do tempo. Se uma amostra apresenta capacidade de impedir o dano causado por este radical livre à fluoresceína, a capacidade é observada com a preservação da fluorescência. Paralelamente às amostras, reações contendo o branco e o padrão Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) são realizadas.

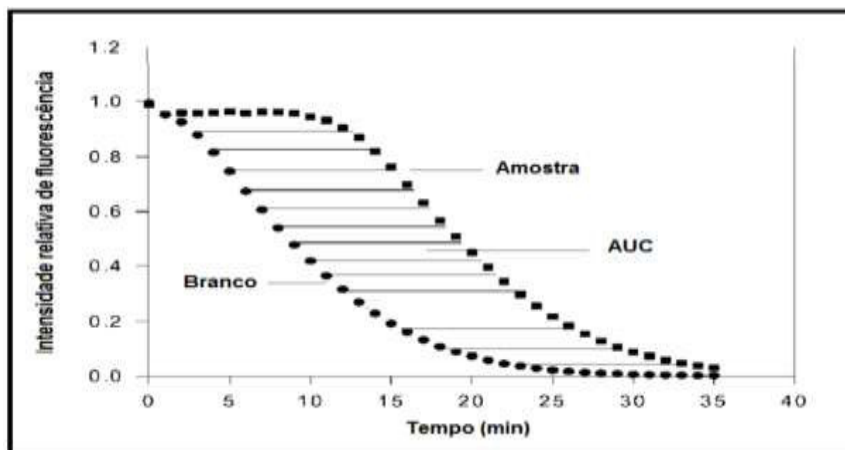
Alíquotas de 20µl de uma solução estoque de 10 mM de Trolox em DMSO, armazenadas a -20°C, foram descongeladas e diluídas com tampão ORAC para concentração 20 µM imediatamente antes do uso. O tampão ORAC contém 74 mM de dihidrogenofosfato de potássio/ hidrogenofosfato de dipotássio em pH= 7,4.

Amostras pré-preparadas de concentração 1 mM em DMSO, no caso de substâncias puras, e 1000 ppm em DMSO, no caso de extratos metanólicos, foram diluídas em tampão ORAC até a concentração final de 20 µM e 20 ppm, respectivamente. Em seguida, 10 µM de amostra, tampão (branco) ou Trolox (padrão), foram adicionados em quadruplicata em placas de 96 poços, juntamente com 170 µM de fluoresceína e, em seguida, incubados por 10 minutos a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de 20 µl de AAPH (51,75 mg/mL) recém preparada no tampão ORAC. O declínio da fluoresceína foi medido a 37 °C de 2 em 2 minutos até 122 minutos, utilizando uma leitora de microplaca de fluorescência Cytoflour 4000 (excitação em 530/25 nm, emissão em 585/30 nm) (Perspective Biosystems, Minnesota, USA).

Ao fim da reação, a quantificação foi obtida usando-se a "área sob a curva" (AUC), seguido da subtração do AUC do branco, como mostrado na Figura 14. O Trolox é

utilizado como padrão de calibração e os resultados do ensaio são expressos como unidades de ORAC, onde 1 unidade de ORAC equivale ao declínio produzido por 1 $\mu\text{mol/L}$ de Trolox.

Figura 14- Determinação da atividade antioxidante expresso como a área sob a curva AUC, onde a Capacidade antioxidante= AUC amostra - AUC branco.

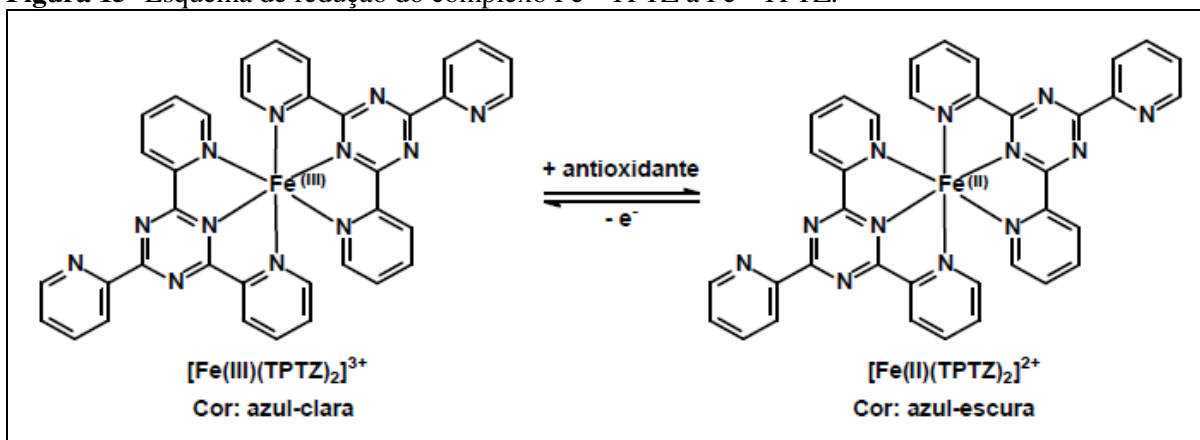


Fonte: HUANG *et al.*, (2002), com modificações.

5.5.3 Ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

O ensaio FRAP avalia a capacidade do antioxidante de neutralizar radicais livres pela transferência de elétron, fazendo reduzir o complexo $\text{Fe}^{3+}/2,4,6\text{-tripiridil-s-triazina}$ (TPTZ) para a forma Fe^{2+} que possui coloração azul, como mostra a Figura 15. (PRIOR *et al.*, 2005)

Figura 15- Esquema de redução do complexo $\text{Fe}^{3+}/\text{TPTZ}$ à $\text{Fe}^{2+}/\text{TPTZ}$.



Fonte: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index>, com modificações.

TPTZ foi obtido na Riedel Haen (Seelze, Alemanha). Os extratos metanólicos foram analisados nas concentrações 1000-25 ppm em metanol e as substâncias puras nas concentrações 1,0-0,01 mmol/L. 10 µl de amostra foram incubadas com 30 µl de água bidestilada e 300 µl de FRAP reagente, que consiste em 25 ml de tampão de acetato (acetado de sódio 300mM, pH= 3,6), 2,5 ml de TPTZ (10 mM TPTZ em HCl 40 mM) e 2,5 ml de solução FeCl₃ (FeCL₃.6H₂O 20 mM em água bidestilada). Todos os reagentes foram preparados minutos antes da análise e pré-aquecidos a 37°C. Uma curva de calibração de sulfato ferroso (0,01-1,0 mmol/L) foi usada e os resultados expressos em mM de Fe²⁺/L.

Após repouso de 5 minutos, a reação foi medida a cada minuto durante 10 minutos a 595 nm em um equipamento Universal micro plate reader (Elx 800 Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA). Uma curva de regressão linear foi gerada para as diferentes concentrações da amostra com o programa Excel. Com essa curva, os valores de EC₁ foram calculados como a concentração de antioxidante (µM), dando uma absorbância equivalente a 1 mM de solução de Fe²⁺, de acordo com Pulido *et al.*, 2000.

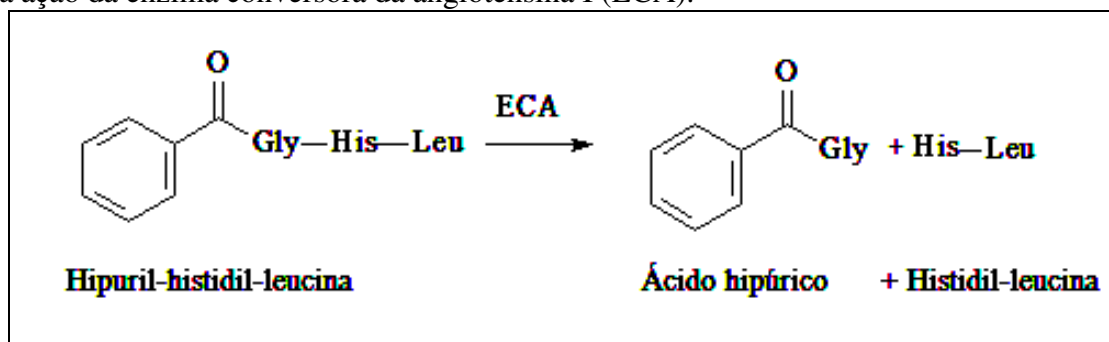
5.5.4 Correlações entre os compostos quantificados e atividade antioxidante

Correlações entre a concentração de mangiferinas totais (mangiferina+ isomangiferina), flavonoides, ácidos clorogênicos e cafeína (g/kg) em folhas de café e a capacidade sequestradora de radicais DPPH e peroxil (teste ORAC), bem como a redução do ferro (III) para ferro (II) (ensaio FRAP), foram avaliadas utilizando o programa Origin (versão 7.5).

5.6 Ensaio de inibição da enzima conversora da angiotensina I (ECA)

Este ensaio baseia-se na formação do ácido hipúrico a partir do substrato hipuril-histidil-leucina (HHL) pela ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) purificada a partir de pulmão de coelho (Figura 16). Se uma amostra é capaz de inibir a ação desta enzima, não há a formação do produto ácido hipúrico. O substrato hipuril-histidil-leucina (HHL) e a enzima ECA foram obtidos da Sigma-Adrich. O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida por LAHOGUE *et al.*, 2010.

Figura 16- Formação do ácido hipúrico a partir do substrato hipuril-histidil-leucina (HHL), pela ação da enzima conversora da angiotensina I (ECA).

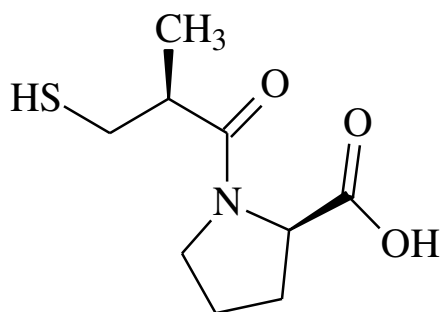


Fonte: CUSHMAN & CHEUNG, 1971.

O substrato foi preparado dissolvendo HHL (5 mM-2,15 mg/ml) em Tris-HCl 50 mM (pH 8.3), contendo NaCl 0,3 M. A solução de ECA foi preparada dissolvendo a enzima (200 milliunits/ml) em Tris-HCl 50mM (pH 7,5), contendo NaCl 0,3 M. Alíquotas de 250 μ l foram estocadas a -20°C até minutos antes da análise.

25 μ L de amostras 10 mg/ml (DMSO), no caso de extratos, e 1 mg/ml (DMSO), no caso de compostos puros, foram misturados a 100 μ L de substrato em tubos de teste de vidro, em duplicata. Após incubação por 10 minutos a 37°C, 50 μ l de solução de ECA foram adicionados aos tubos, que foram, em seguida, incubados por 1 hora a 37°C. Após uma hora, a reação foi parada com adição de 100 μ l de HCl 1M.

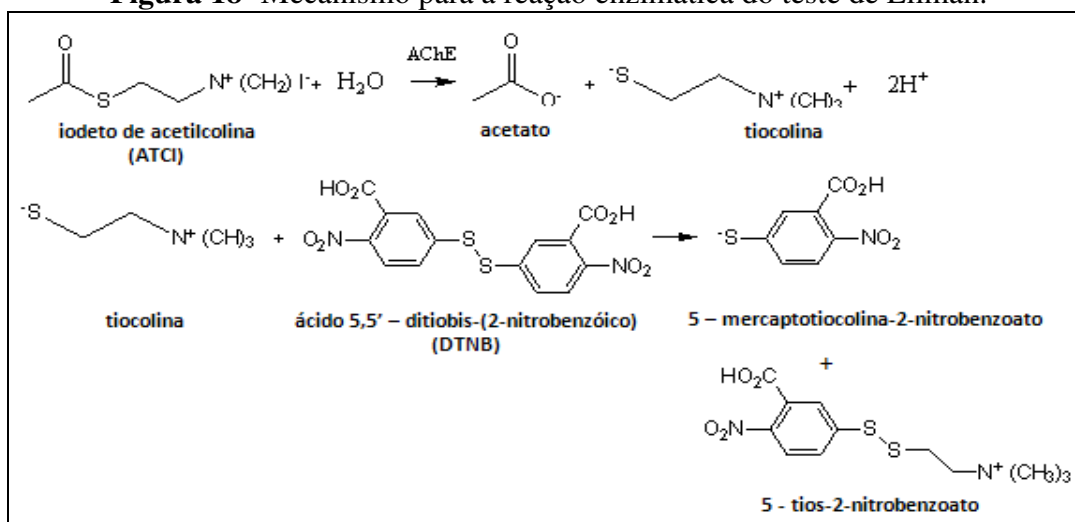
Em seguida, uma alíquota de 100 μ L foi retirada para análise em CLAE. A fase móvel utilizada consistiu em solução aquosa 0,05% de ácido trifluoroacético (solvente A) e 0,05% ácido trifluoroacético em acetonitrila (solvente B), seguindo gradiente e tempo de eluição total de 17 min: inicialmente 95% A:5% B, variando B para 60% em 10 minutos, mantendo assim por 2 minutos e, em seguida, B retornando para 5% em 1 minuto, mantendo assim por 4 minutos. A taxa de fluxo da fase móvel foi 1,0 mL/min e a injeção de 5 μ L. A detecção foi feita em um detector de arranjo de diodos (DAD) ajustado no comprimento de onda 228 nm. O anti-hipertensivo Captopril obtido da Sigma-Adrich (Figura 17) foi usado como controle positivo na concentração de 2 ng/mL e o metanol utilizado como controle negativo. O tratamento dos dados foi realizado no programa Excel. Somente para as amostras que apresentaram uma inibição da enzima superior a 60% foram calculados os IC₅₀.

Figura 17- Estrutura do Captopril.

Fonte: BARREIRO & FRAGA, 2008.

5.7 Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase

O objetivo desse ensaio é encontrar substâncias que apresentam a propriedade de inibir a enzima acetilcolinesterase, inibição que está diretamente ligada ao tratamento da doença Mal de Alzheimer (RHEE, 2001). É baseado em procedimento descrito por Ellman *et al.*, (1961). As reações que estão envolvidas nesse método estão apresentadas na Figura 18.

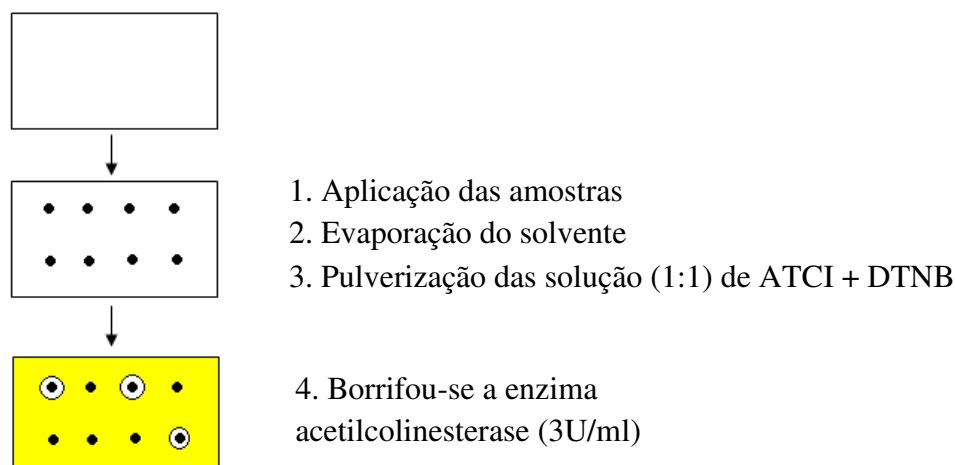
Figura 18- Mecanismo para a reação enzimática do teste de Ellman.

Fonte: Ellman *et al.* (1961).

Este ensaio é baseado em procedimento descrito por Ellman *et al.* (1961), adaptado para CCD por Rhee *et al.* (2001). É considerado um método colorimétrico e que pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa, mas nesse trabalho foi utilizada somente a forma qualitativa. É um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica.

A metodologia consiste em retirar uma alíquota de 5 µl de extrato na concentração 10 mg/ml e aplicar em uma cromatoplaca. Após a evaporação do solvente, foi borrifada uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol.L⁻¹ com o reagente de Ellman (ácido 5,5' – Ditiobis- (2 –nitrobenzóico, DTNB, 1 mmol.L⁻¹), deixando em repouso por 3 minutos para a secagem da placa. Em seguida, foi borrifada a enzima acetilcolinesterase (3 U/ml). Após 10 minutos, ocorre o surgimento de uma coloração amarela, porém, onde há inibição da enzima, observa-se um halo branco em torno dos “spots” em que foram aplicadas as amostras. Em 20-30 minutos, a coloração desaparece. Como controle positivo, foi utilizada solução do padrão sal de Eserina (2 mg/ml) e como controle negativo, foram utilizados solventes. Na Figura 19, estão apresentadas as etapas desse método.

Figura 19- Etapas do ensaio da metodologia modificada por Rhee.



Fonte: Próprio autor

5.8 Tratamento quimiométrico de dados

Os dados foram tratados quimiometricamente utilizando o software *statistica 6.0*. A análise de reconhecimento de padrões (PCA) foi feita com o objetivo de avaliar características similares no conjunto de dados obtidos. As variáveis escolhidas foram os metabólitos secundários quantificados nas folhas de café coletadas em São Paulo e no Ceará. Os dados foram autoescalados na construção das componentes principais. A Quimiometria pode ser definida como uma especialidade da química que envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar e classificar um conjunto de dados de interesse químico (SOUSA & POPPI *et al.*, 2012).

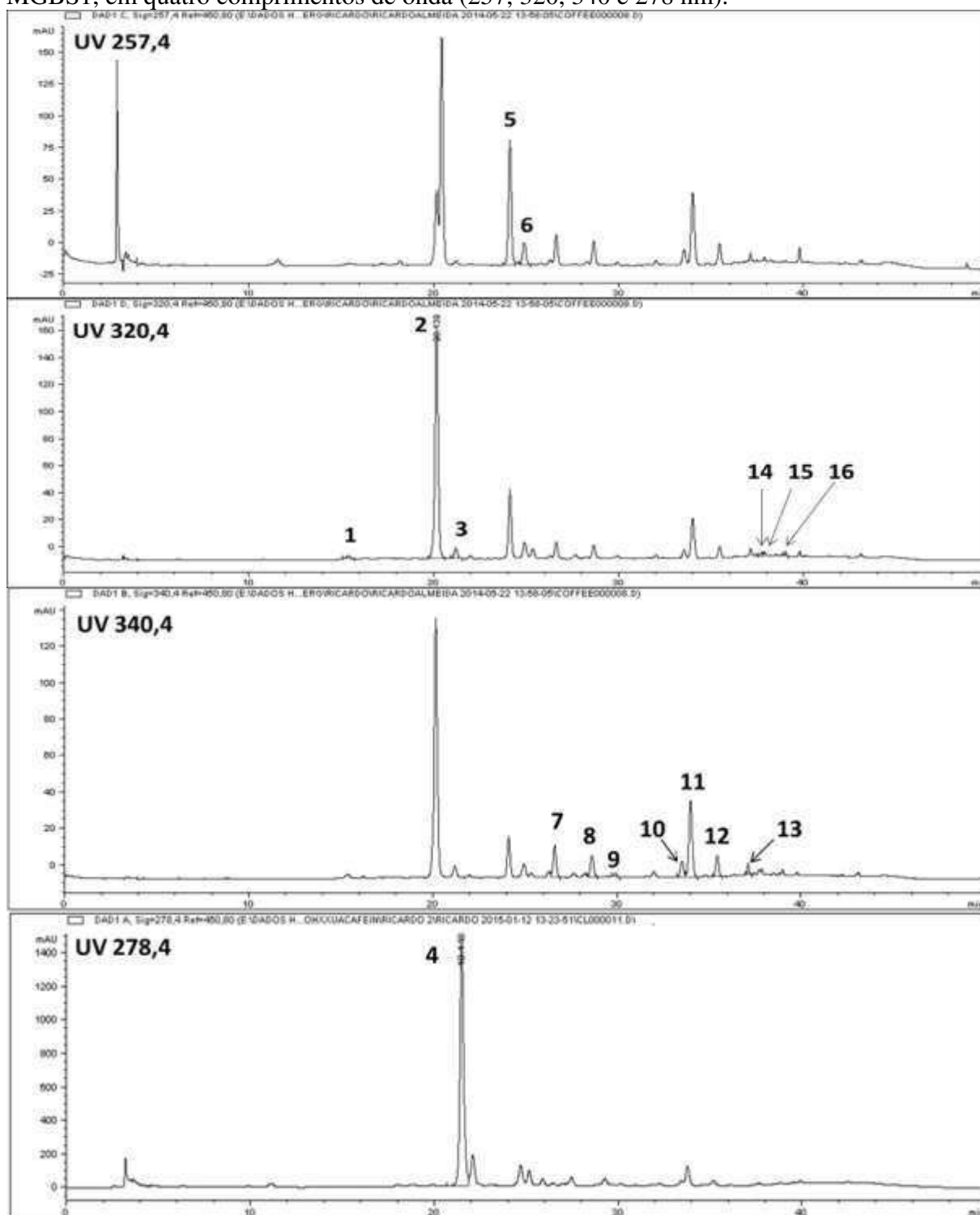
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise qualitativa dos extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica* por CLAE-DAD-IES-EM

Os extratos metanólicos obtidos das folhas de *Coffea arabica* foram submetidos à análise de CLAE-DAD-IES-EM, seguindo o que é descrito na parte de procedimento experimental deste trabalho. As amostras apresentaram perfil químico semelhante, mas foi observada diferença na concentração das substâncias. Devido ao grande número de amostras (45 no total) e conseqüentemente o número de cromatogramas obtidos, foi apresentado apenas um cromatograma representando as quatro localidades (São Paulo, Ceará, Minas Gerais e Costa Rica) e a amostra comercial.

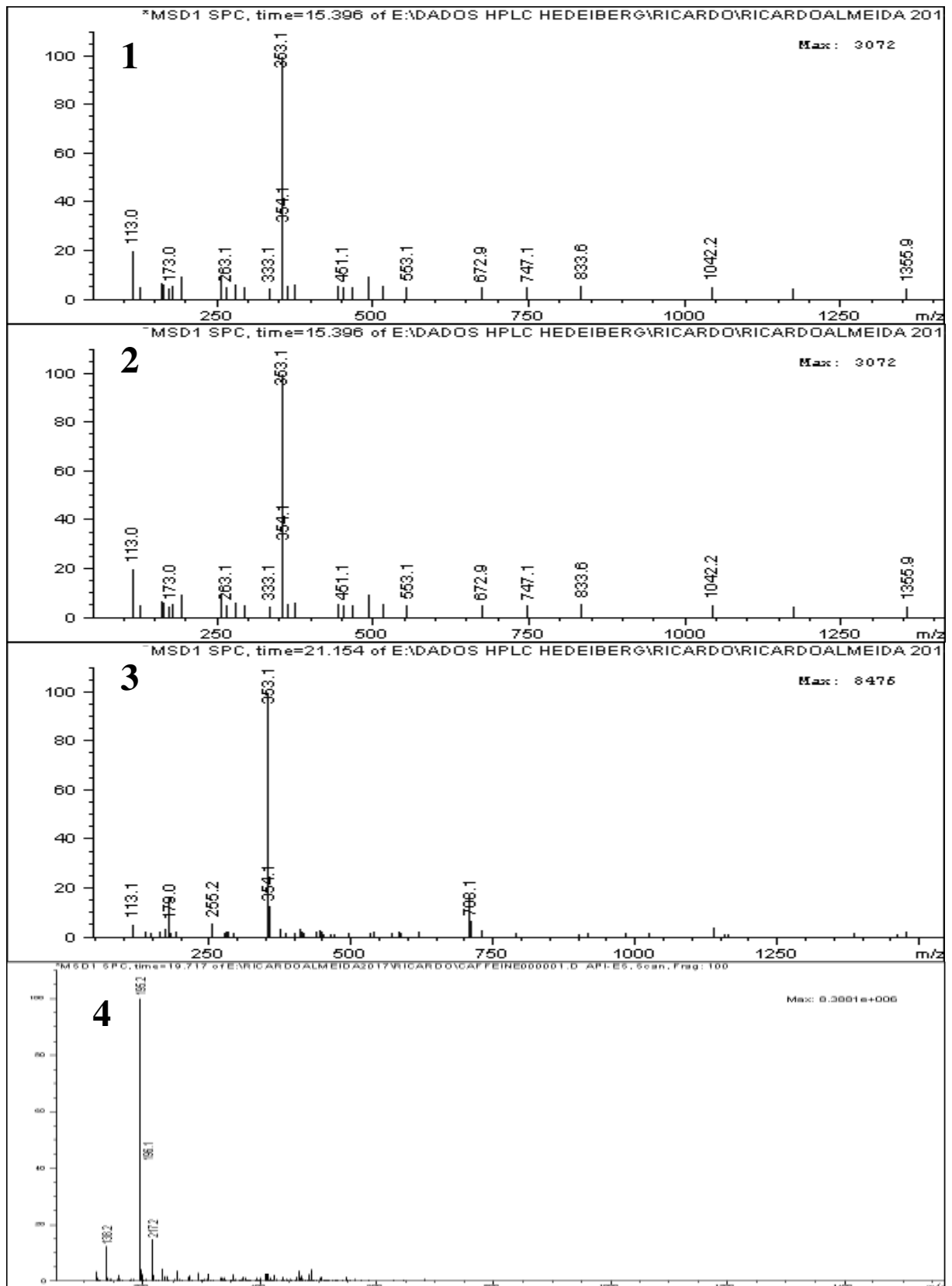
A Figura 20 apresenta o cromatograma de CLAE da amostra MGBS1, o qual visualmente apresenta a maior quantidade de picos. Os espectros de massa de cada substância identificada são apresentados na Figura 21.

Figura 20-Cromatograma CLAE do extrato metanólico de folhas de *Coffea arabica*, amostra MGBS1, em quatro comprimentos de onda (257, 320, 340 e 278 nm).

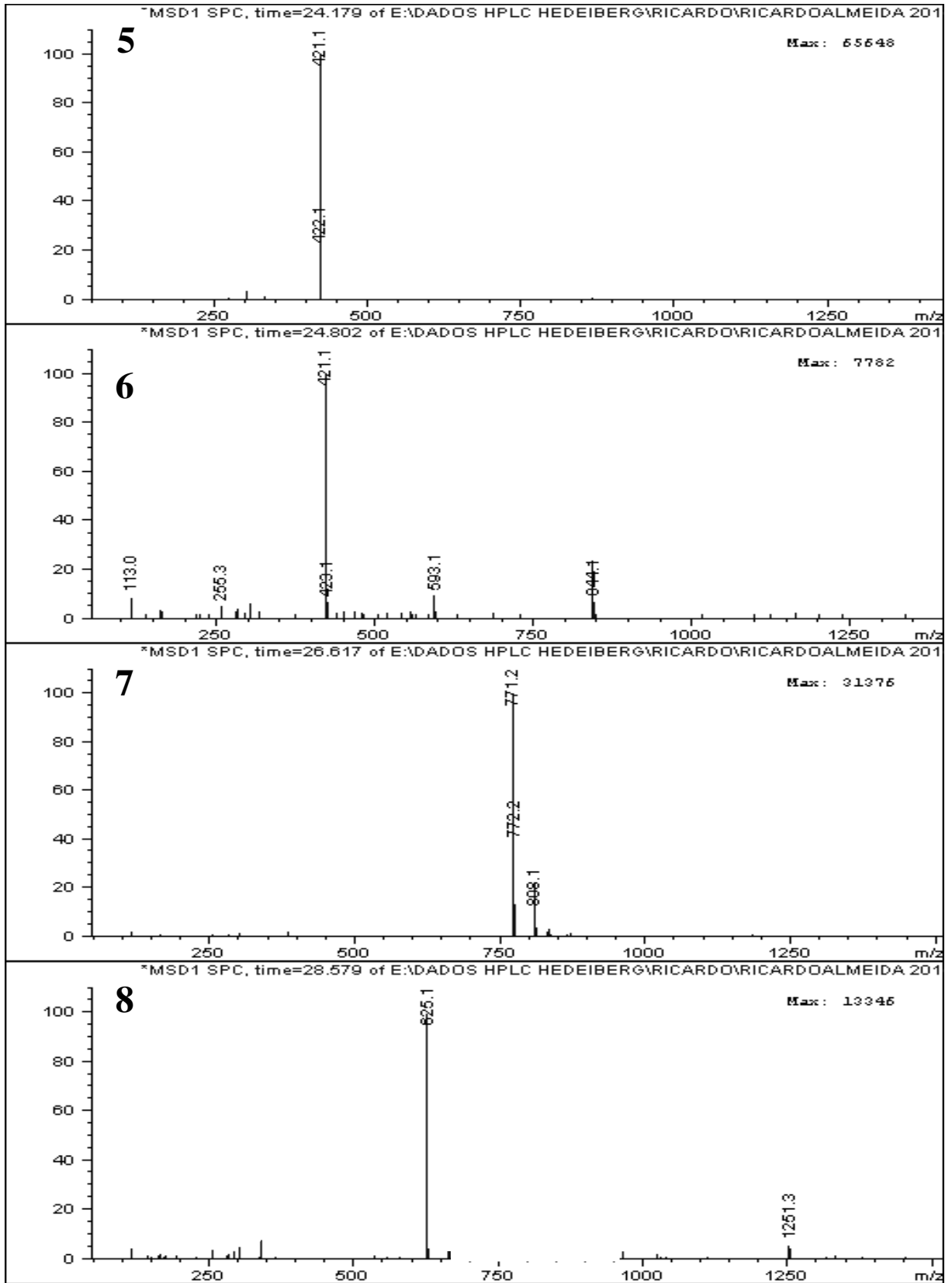


(1) Ácido neoclorogênico, (2) ácido clorogênico, (3) ácido criptoclorogênico, (4) cafeína, (5) mangiferina, (6) isomangiferina, (7) rutina glucosídeo, (8) quercetina-3-*O*-diglucosídeo, (9) campferol-3-*O*-diglucosídeo ramnosídeo, (10) quercetina-3-*O*-ramnogalactosídeo, (11) rutin, (12) quercetina-3-*O*-glucosídeo, (13) campferol-3-*O*-ramnoglucosídeo, (14) ácido 3,4-dicafeoilquínico, (15) ácido 3,5-dicafeoilquínico, (16) ácido 4,5-dicafeoilquínico.

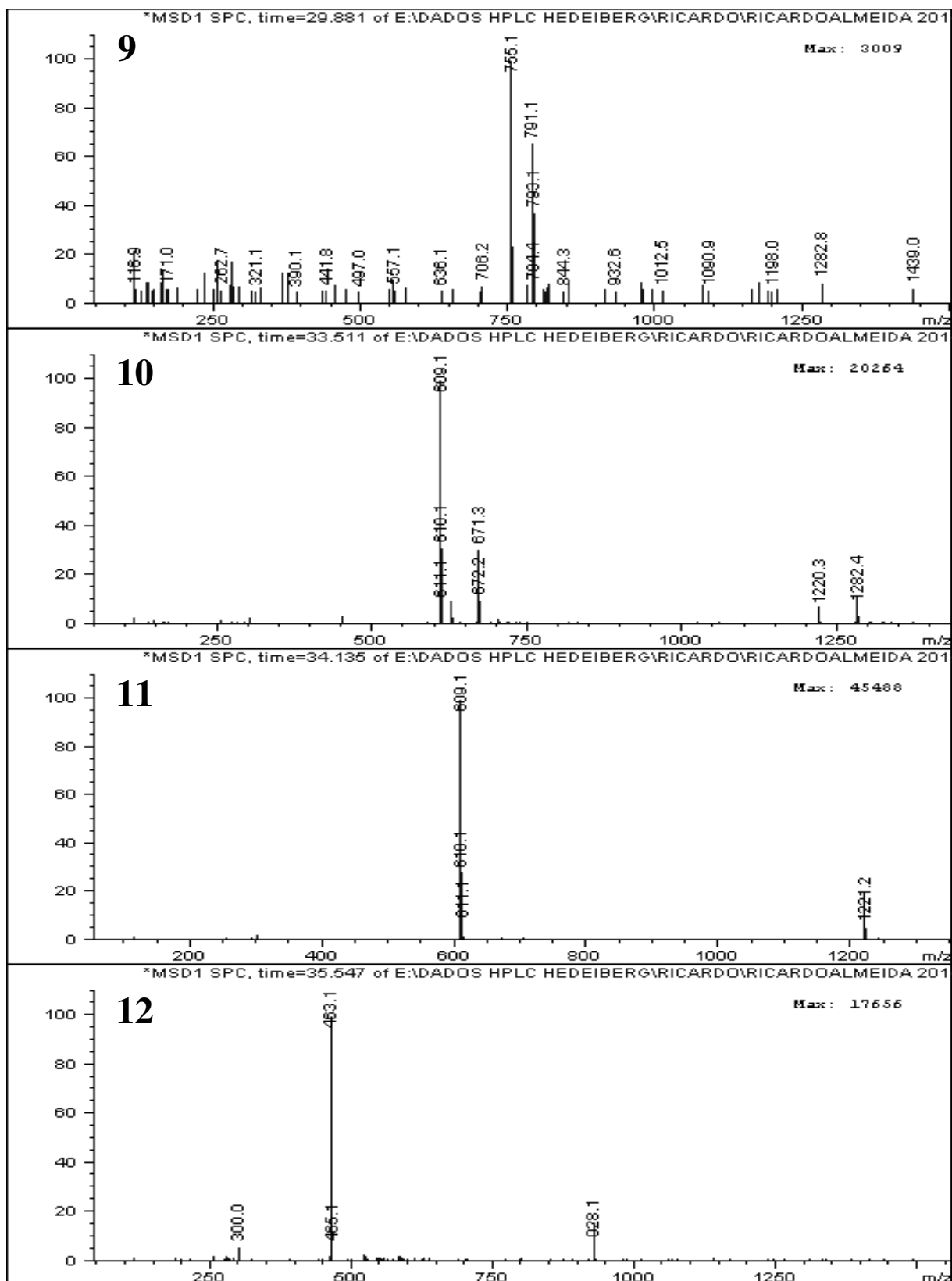
Figura 21- Espectros de massas de cada substância identificada em folhas de *Coffea arabica*.



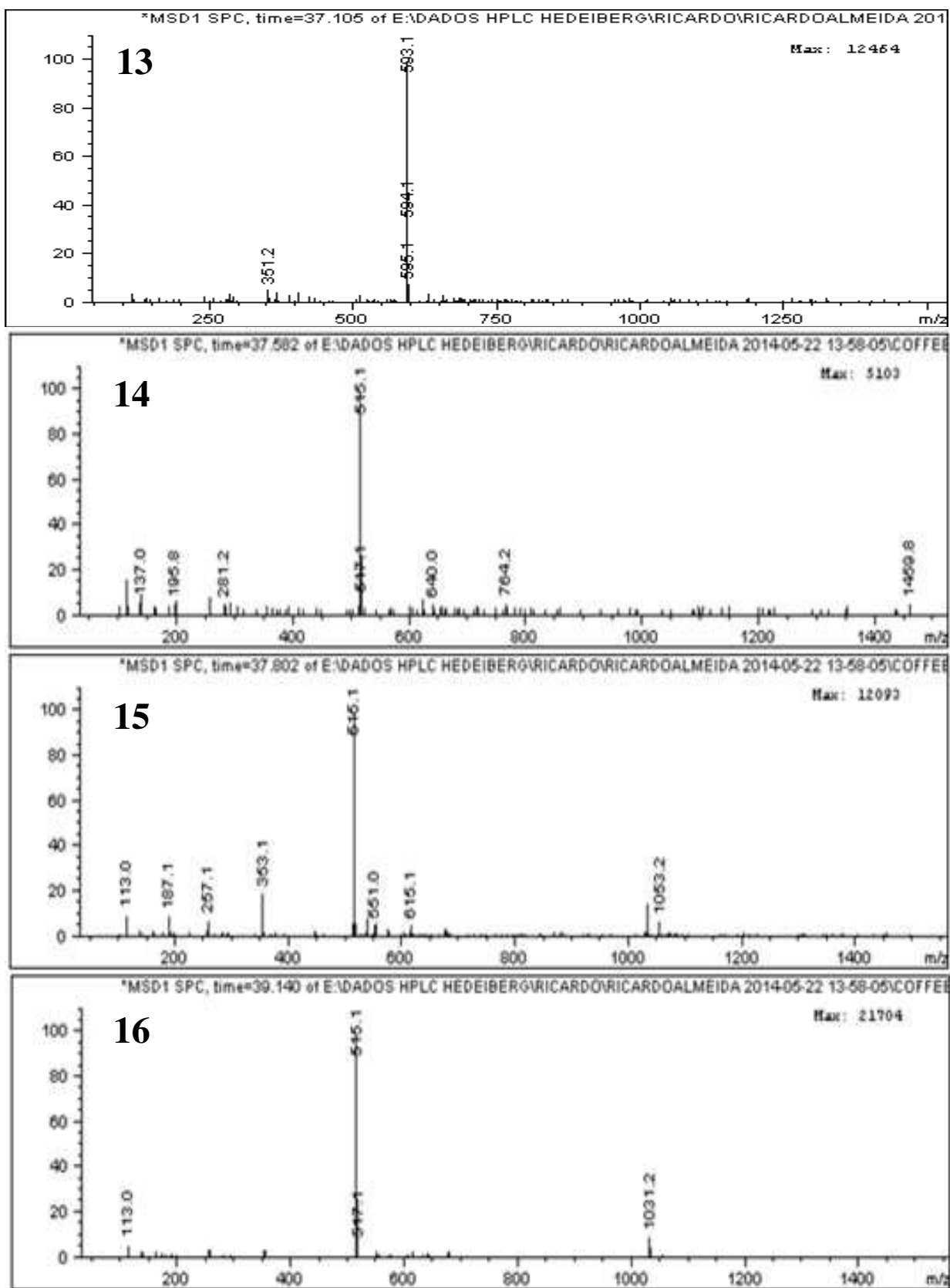
(1) Ácido neoclorogênico, (2) ácido clorogênico, (3) ácido criptochlorogênico, (4) cafeína.



(5) mangiferina, (6) isomangiferina, (7) rutina glucosídeo, (8) quercetina-3-*O*-diglucosídeo.



(9) campferol-3-*O*-diglucosídeo ramnosídeo, (10) quercetina-3-*O*-ramnogalactosídeo, (11) rutin, (12) quercetina-3-*O*-glucosídeo.



(13) campferol-3-O-ramnoglusosídeo, (14) ácido 3,4-dicafeoilquínico, (15) ácido 3,5-dicafeoilquínico, (16) ácido 4,5-dicafeoilquínico.

A utilização da técnica CLAE-DAD juntamente com a CLAE-IES-EM, assim como a comparação com padrões autênticos comercialmente disponíveis ou previamente purificados, possibilitou a identificação e a quantificação de 16 metabólitos (Tabela 8). Seis metabólitos pertencentes à classe dos ácidos clorogênicos (ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) e a cafeína já foram detectados anteriormente em café, principalmente nos grãos verdes de *Coffea arabica*. (KY *et al.*, 2001; MOHAMMED ;AL-BAYATI, 2009; ALONSO-SALCES *et al.*, 2009; MONTEIRO; FARAH, 2012; RODRIGUES; BRAGAGNOLO, 2013; CLIFFORD *et al.*, 2003; BELGUIDOUM *et al.*, 2014; JESZKA-SKOWRON *et al.*, 2014, CAMPA *et al.*, 2012).

A presença de mangiferina e isomangiferina em café foi determinada pela primeira vez no gênero *Coffea* por Talamond *et al.*, 2008, nas folhas da espécie *Coffea pseudozanguebariae* coletadas na França. A presença de mangiferina e isomangiferina em café também foi determinada em trabalho desenvolvido por Campa *et al.*, 2012 nas folhas de *Coffea pseudozanguebariae*, *Coffea arabica* e em mais 5 espécies de café coletadas na África em Madagascar, entretanto, nunca sendo relatadas anteriormente em café brasileiro.

Os flavonoides rutina e quercetina-3-*O*-glucosídeo foram recentemente detectados nas folhas de *C. arabica* e *C. benghalensis* por Patay *et al.* (2016). Os demais flavonoides rutina glucosídeo, quercetina-3-*O*-diglucosídeo, campferol-3-*O*-diglucosídeo ramnosídeo, quercetina-3-*O*-ramnogalactosídeo e campferol-3-*O*-ramnoglucosídeo nunca foram relatados anteriormente nos taxa de *Coffea*. Para confirmar a estrutura química dos flavonoides identificados, visto que, com exceção da rutina, o laboratório onde o presente estudo foi realizado não possuía padrões autênticos desses compostos, quatro deles foram isolados e tiveram suas estruturas caracterizadas por RMN, como descrito no próximo tópico.

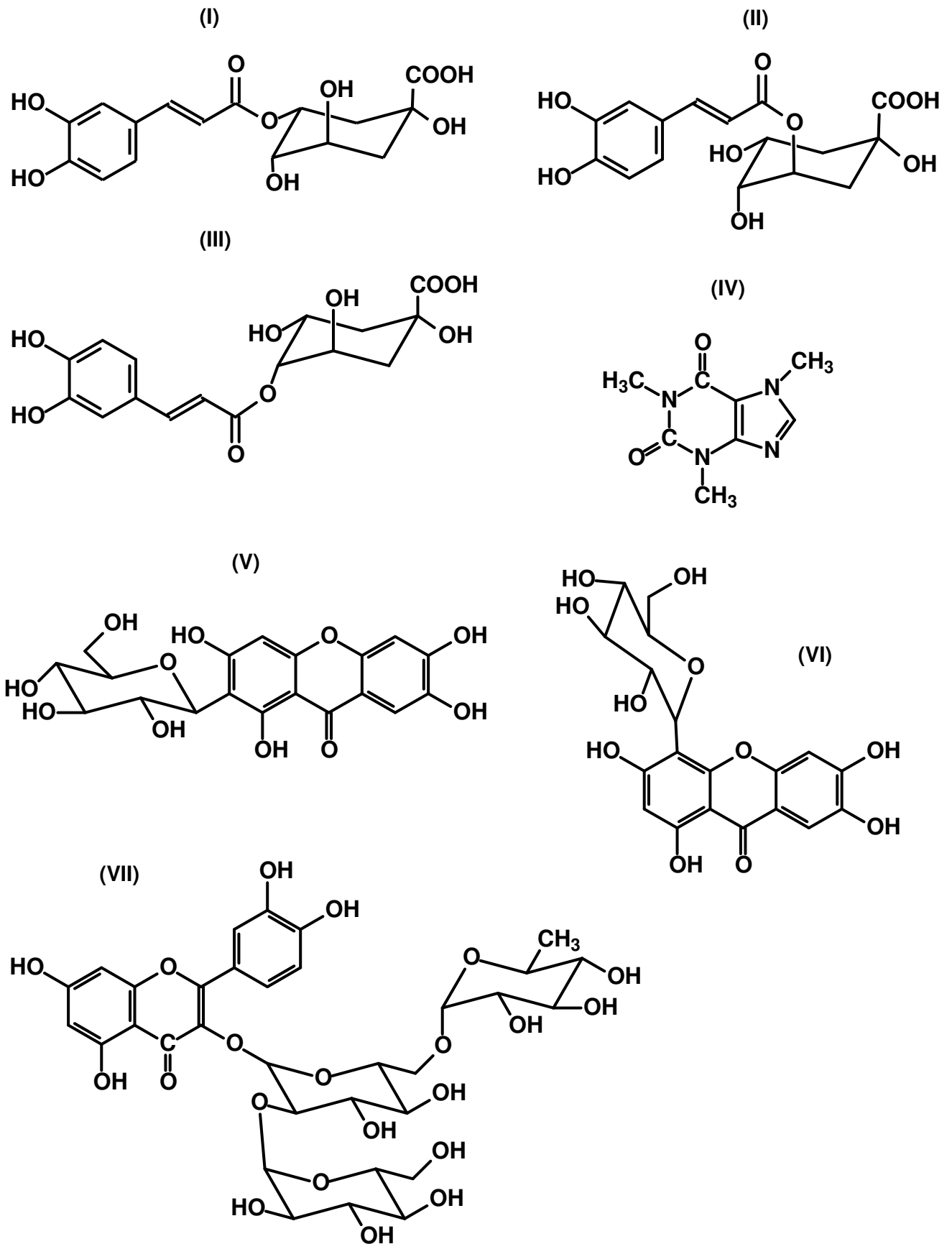
A Tabela 9 apresenta o resumo dos dados obtidos com as duas técnicas, que foram essenciais à identificação das 16 substâncias. A representação estrutural (Figura 22) de cada uma é apresentada logo após, de acordo com a numeração apresentada na Tabela 9.

Tabela 9- Compostos identificados em CLAE-IES-EM nos extratos metanólicos de *Coffea arabica*.

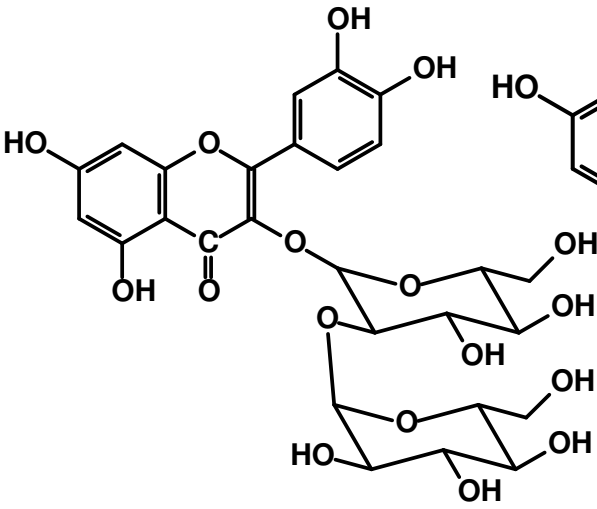
Nº	Composto	Fórmula molecular	Massa exata (g/mol)	DAD (λ nm)	Rt (min)	[M-H] ⁻
I	Ácido neoclorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,31	235,325	15,43	353,1
II	Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,31	235,325	18,90	353,1
III	Ácido criptoclorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,31	235,325	19,90	353,1
IV	Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	230,273	19,97	193,1
V	Mangiferina	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	422,08	257,320,365	22,64	421,1
VI	Isomangiferina	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	422,08	257,320,365	23,52	421,0
VII	Rutina glucosídeo	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	772,10	255,355	25,09	771,1
VIII	Quercetina diglucosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	626,52	255,355	27,16	625,1
IX	Campferol diglucosídeo ramnosídeo	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	756,67	265,350	28,43	755,1
X	Quercetina ramnogalactosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15	255,355	31,43	609,1
XI	Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15	255,355	32,30	609,0
XII	Quercetina glucosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,09	255,355	33,10	463,0
XIII	Campferol ramnoglucosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594,52	265,350	36,13	593,1
XIV	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,46	235,325	37,58	515,1
XV	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,46	235,325	37,80	515,1
XVI	Ácido 4,5-dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,46	235,325	39,14	515,1

RT: Tempo de retenção.

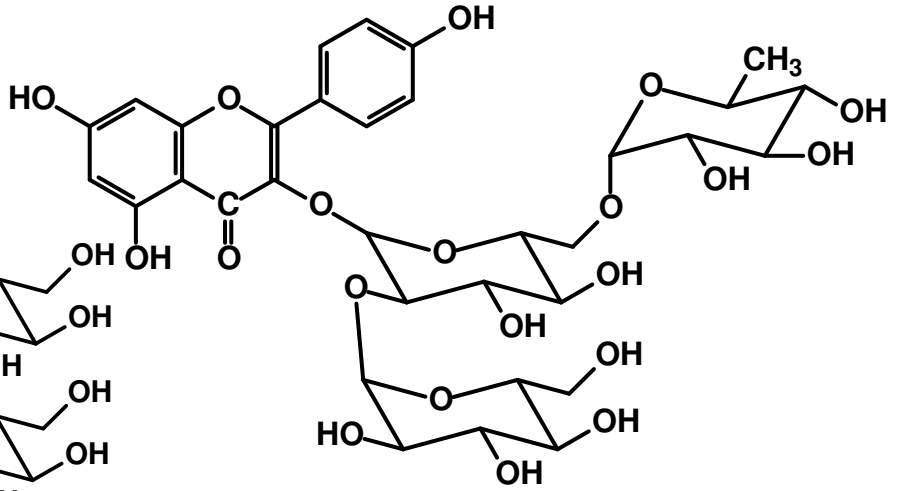
Figura 22- Representação estrutural dos 16 compostos identificados.



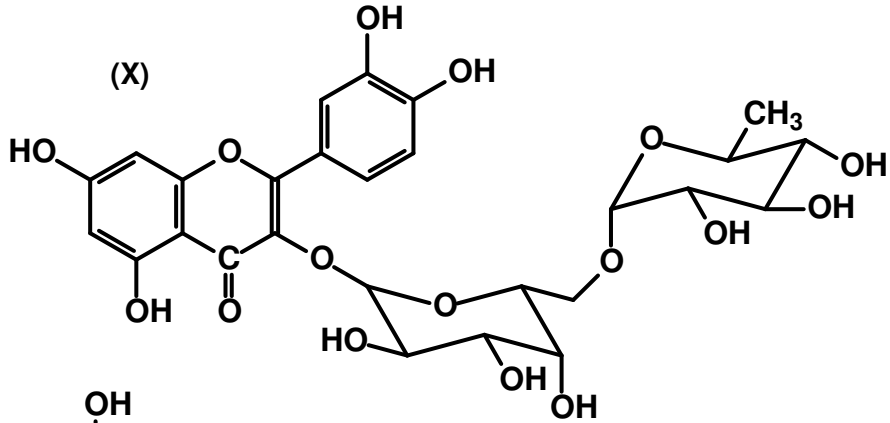
(VIII)



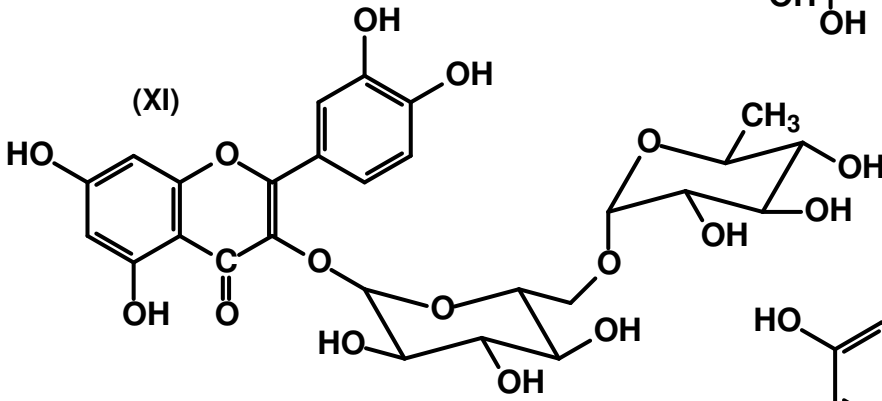
(IX)



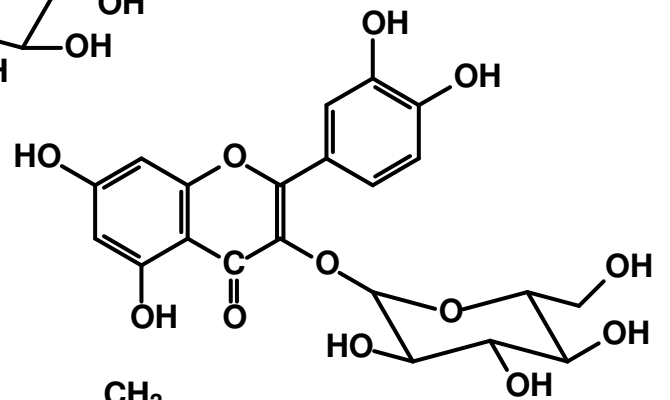
(X)



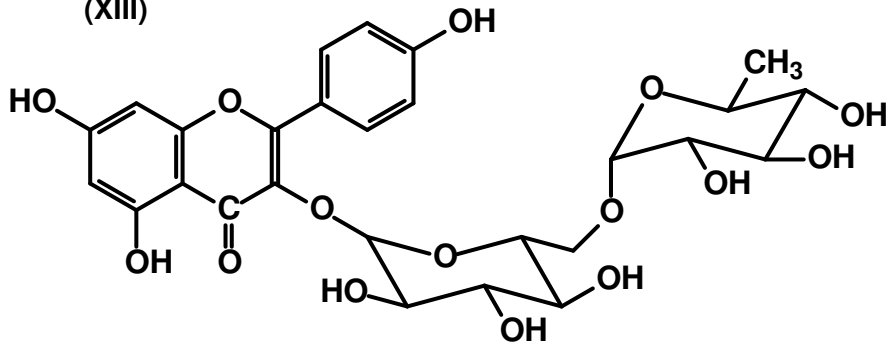
(XI)



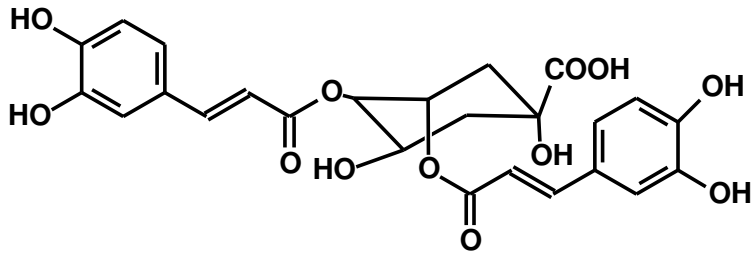
(XII)



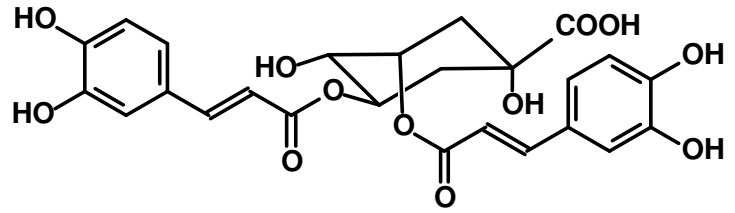
(XIII)



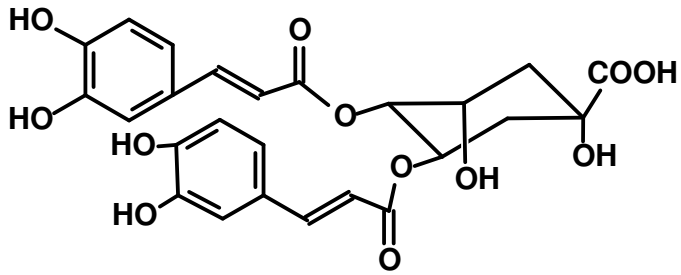
(XIV)



(XV)



(XVI)



6.2 Isolamento e determinação estrutural de C1, C2, C3 e C4

6.2.1 Fracionamento do extrato metanólico da amostra comercial

O extrato metanólico da amostra comercial foi fracionado em cartuchos de fase sólida (SPE) de acordo como que é descrito na parte de procedimento experimental deste trabalho, onde foram obtidas quatro frações (Fluxograma 3). Após a análise das quatro frações obtidas por CLAE-IES-EM, as frações 25% MeOH/75% CH₃COOH e 50% MeOH/50% CH₃COOH foram escolhidas para análise em CLAE-SP.

A análise das duas frações escolhidas por CLAE-SP resultou em mais 13 frações, conforme apresentadas no Fluxograma 3. Cada uma delas foi seca em “speed vacuum”, pesadas e, em seguida, analisada por CLAE-IES-EM como descrito no item 5.3.1 deste trabalho. Após a análise dos cromatogramas obtidos, as frações semelhantes foram reunidas, conforme apresentadas na Tabela 10 e quatro amostras foram enviadas para análise de RMN (C1, C2, C3 e C4).

Fluxograma 3- Esquema de fracionamento das amostras C1, C2, C3 e C4.

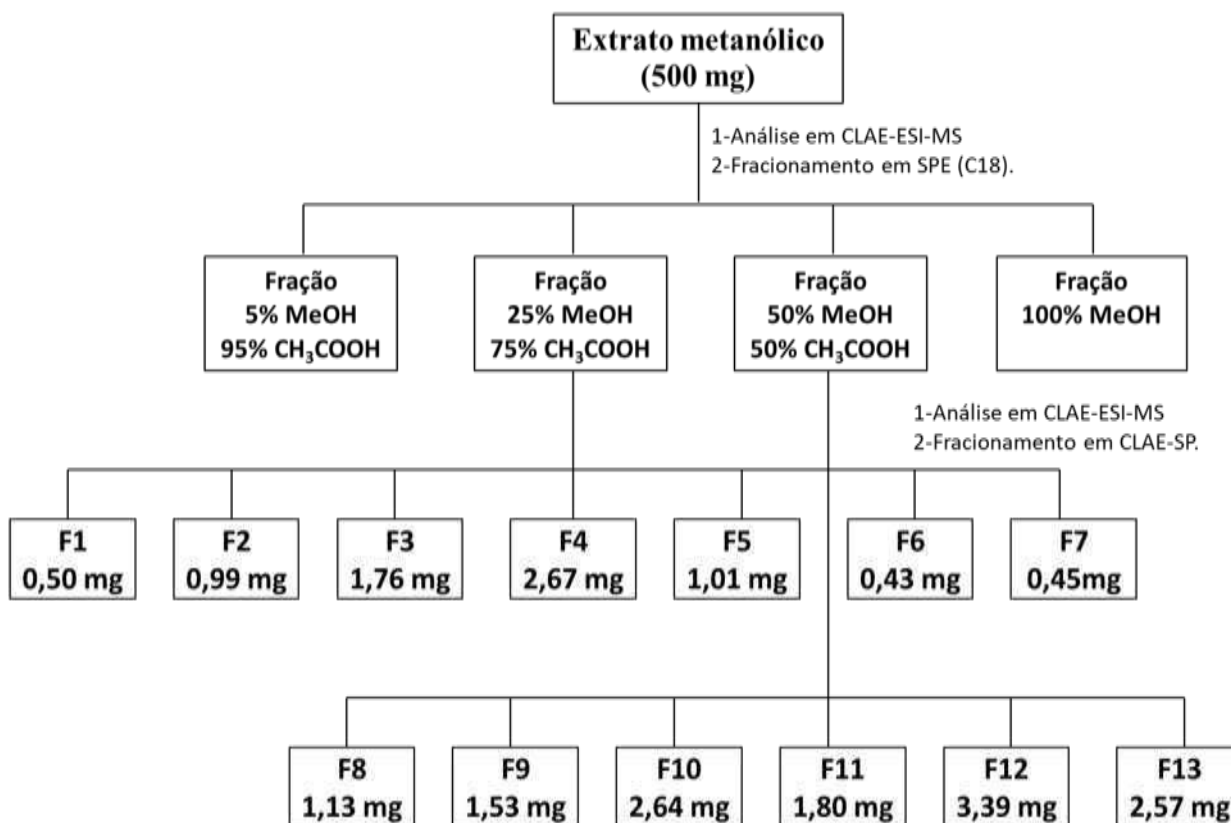


Tabela 10- Frações reunidas para análise de RMN.

Frações semelhantes	Massa Total (mg)	Identificação da amostra
F1+F12	3,39	C1
F2+F13	3,56	C2
F3+F11	3,56	C3
F4+F10	5,21	C4

6.2.2 Determinação estrutural de C1, C2, C3 e C4

6.2.2.1 Determinação estrutural de C1

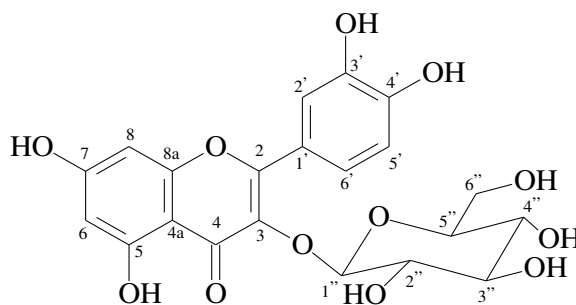
O fracionamento do extrato metanólico da amostra comercial possibilitou o isolamento de quatro substâncias, denominadas C1, C2, C3 e C4.

O espectro de RMN ^1H (Figura 24, com expansão na Figura 25) do composto C1 apresentou dois dupletos com relação meta entre eles em δ_{H} 6,20 ($J=2,1$ Hz) e outro em δ_{H} 6,39 ($J=2,1$ Hz), típicos do padrão de substituição do anel A (AGRAWAL, 1989). O espectro também apresentou sinais em δ_{H} 7,71 (d, $J=2,2$ Hz), δ_{H} 6,87 (d, $J=8,5$ Hz) e δ_{H} 7,58 (dd, $J=2,2$ Hz; $J=8,5$ Hz) típicos de um sistema AMX do anel C (SILVERSTEIN, 2007). Foi observado ainda sinal em δ_{H} 5,22 (d, $J=5,22$ Hz) referente a um hidrogênio ligado a carbono anomérico, que em conjunto com os sinais de hidrogênios metínicos na faixa de δ_{H} 3,21-3,48 e os sinais em δ_{H} 3,70 (dd, $J=11,9$; 2,4 Hz) e δ_{H} 3,57 (dd, $J=11,9$; 5,4 Hz) referentes a hidrogênios metilênicos oxigenados, suportam a presença de uma glicose.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 26) apresentou 21 linhas espectrais. O sinal em δ_{C} 179,5 de carbonila conjugada é bem característico dos flavonoides. A comparação do espectro de RMN ^{13}C -BB com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 27) mostrou apenas um sinal de CH_2 em δ_{C} 62,3, cinco sinais de carbonos metínicos oxigenados, sendo um deles referente ao carbono anomérico α -glicose (δ_{C} 104,4), cinco carbonos monohidrogenados sp^2 e nove carbonos não hidrogenados todos com hibridização sp^2 .

Os dados obtidos com a espectrometria de massas no item 6.1 deste trabalho (FM. $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$; $[\text{M}-\text{H}]^- = 463,0$) corroboram com dados discutidos.

Após análise dos dados espectrais, juntamente com os dados obtidos com a espectrometria de massas e comparação com os dados da literatura (Tabela 11), foi possível concluir que C1 trata-se do flavonoide quercetina-3-*O*-glucosídeo (Figura 23).

Figura 23- Representação estrutural de quercetina-3-*O*-glucosídeo.**Tabela 11-** Deslocamento químico de RMN ^{13}C e seus respectivos hidrogênios em comparação com os descritos na literatura para quercetina-3-*O*-glucosídeo (LIU *et al.*, 2010).

C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C} literatura
2	159,08		159,1
3	135,69		136,2
4	179,53		179,6
4a	105,68		104,6
5	163,12		162,2
6	100,09	6,207 (d, $J_{\text{H}8} = 2,1$ Hz)	98,6
7	166,45		165,6
8	94,85	6,394 (d, $J_{\text{H}6} = 2,1$ Hz)	94,4
8a	158,58		159,1
1'	123,14		122,0
2'	117,62	7,711 (d, $J_{\text{H}6'} = 2,2$ Hz)	116,0
3'	145,99		145,0
4'	149,95		150,2
5'	116,07	6,873 (d, $J_{\text{H}6'} = 8,5$ Hz)	116,9
6'	123,25	7,587 (dd, $J_{\text{H}5'} = 8,5$; $J_{\text{H}2'} = 2,2$ Hz)	122,7
1''	104,45	5,226 (d, $J_{\text{H}2''} = 7,7$ Hz)	100,6
2''	75,78	3,483 (dd, $J_{\text{H}3''} = 9,1$; $J_{\text{H}1''} = 7,7$ Hz)	74,9
3''	78,19	3,425 (t, $J_{\text{H}2''} = J_{\text{H}4''} = 9,0$ Hz)	77,9
4''	71,31	3,348 (dd, $J_{\text{H}5''} = 9,8$; $J_{\text{H}3''} = 8,8$ Hz)	70,2
5''	78,44	3,218 (ddd, $J_{\text{H}4''} = 9,7$; $J_{\text{H}6\text{b}''} = 5,3$; $J_{\text{H}6\text{a}''} = 2,4$ Hz)	76,0
6a''	62,63	3,709 (dd, $J_{\text{H}6\text{b}''} = 11,9$; $J_{\text{H}5''} = 2,4$ Hz)	61,7
6b''		3,574 (dd, $J_{\text{H}6\text{a}''} = 11,9$; $J_{\text{H}5''} = 5,4$ Hz)	

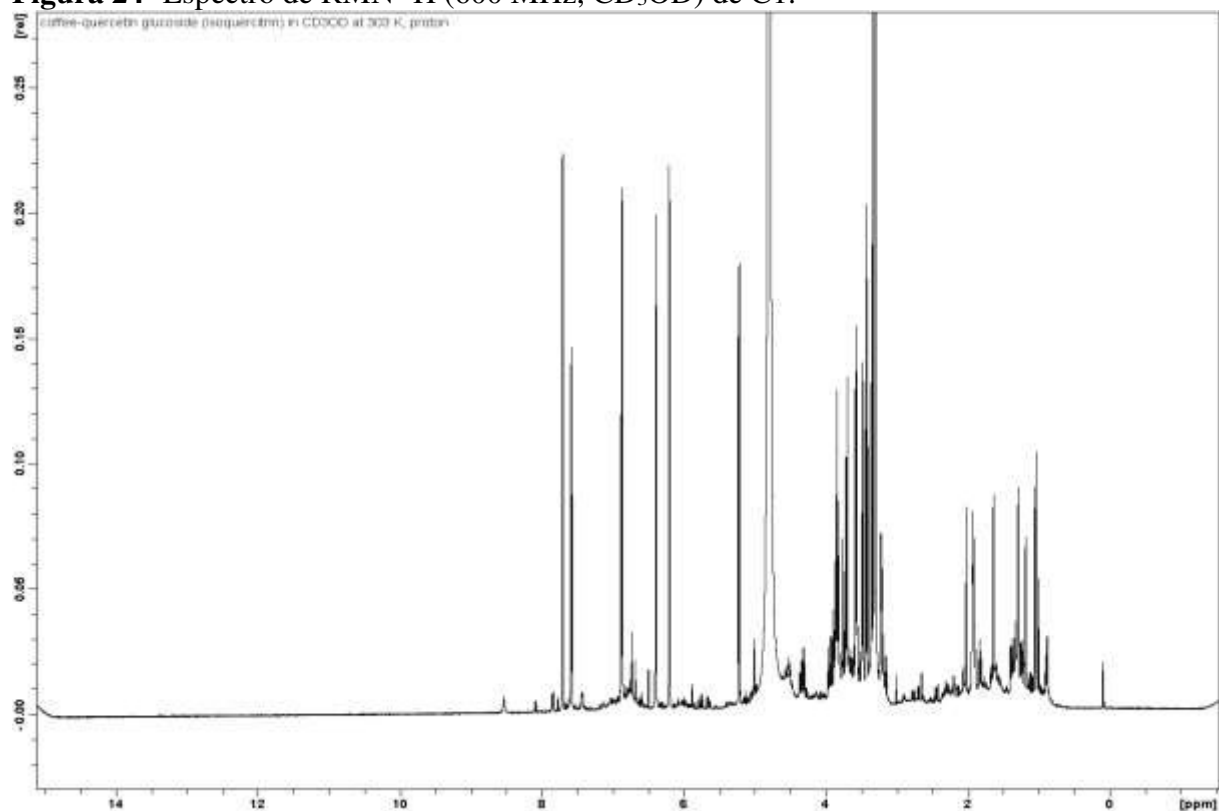
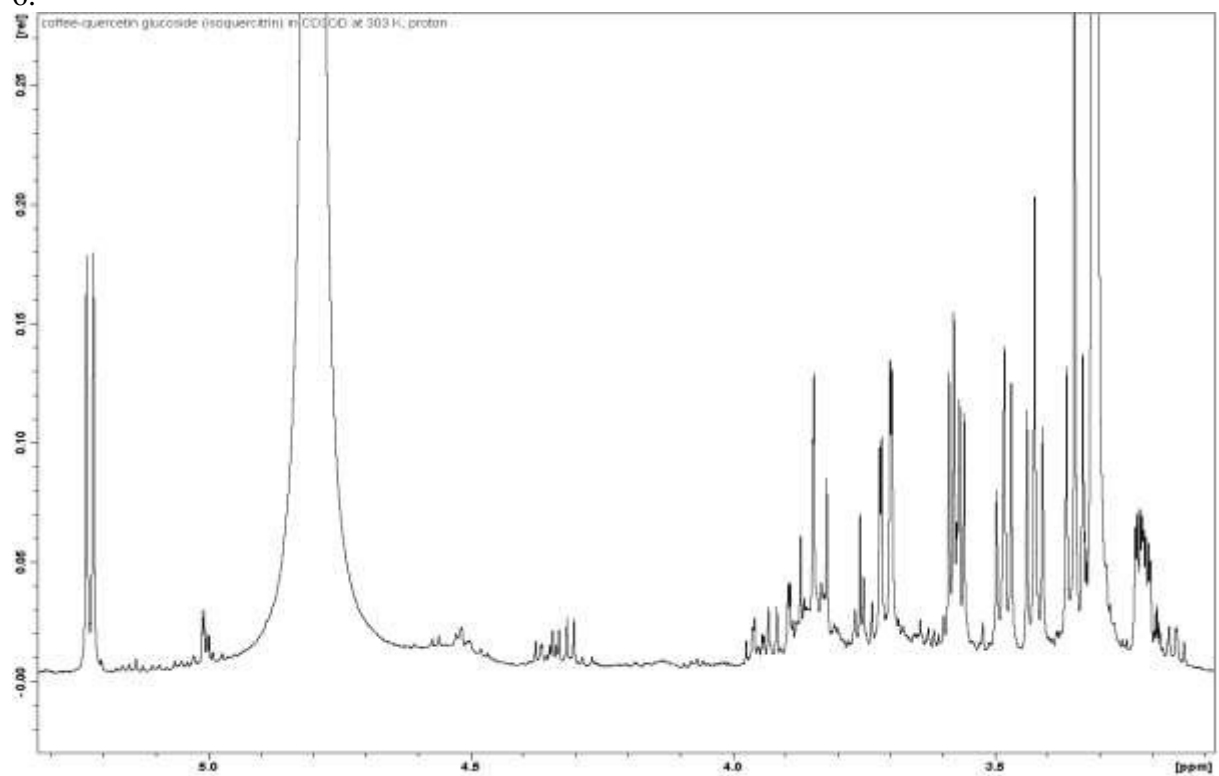
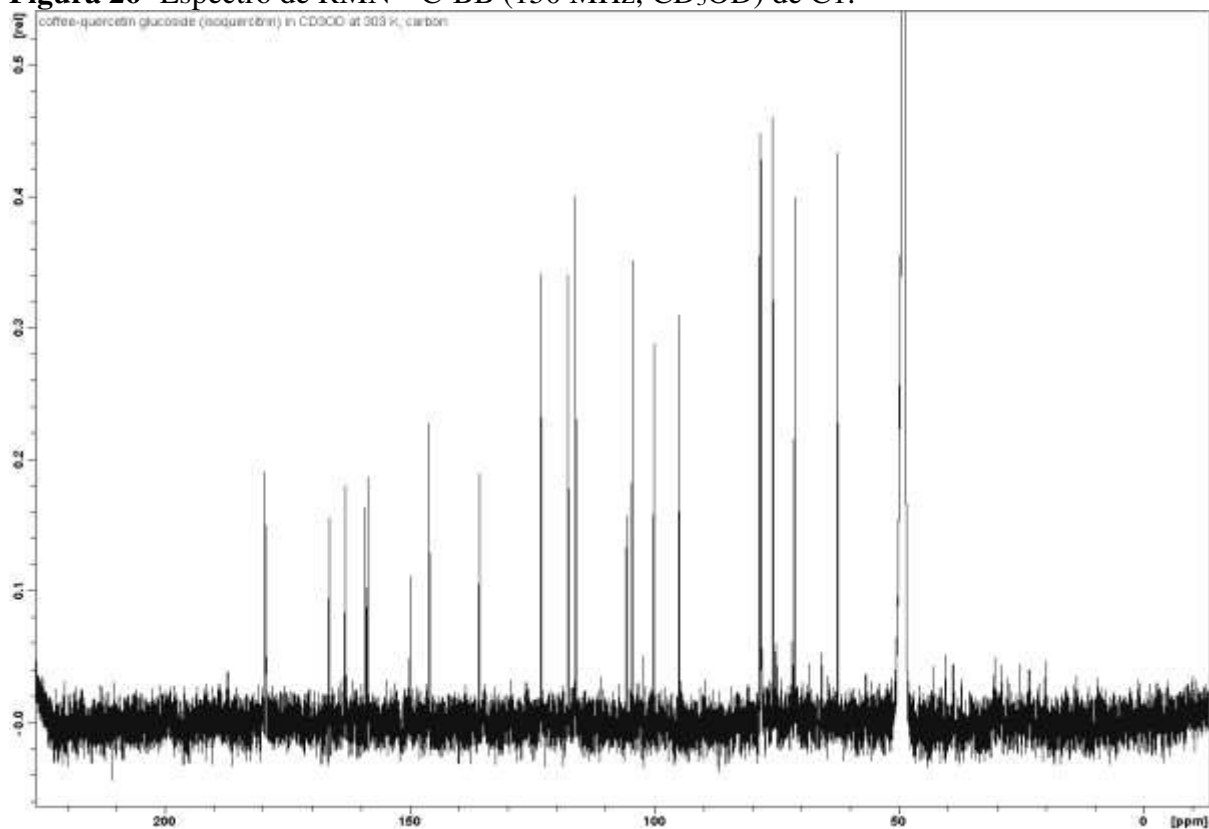
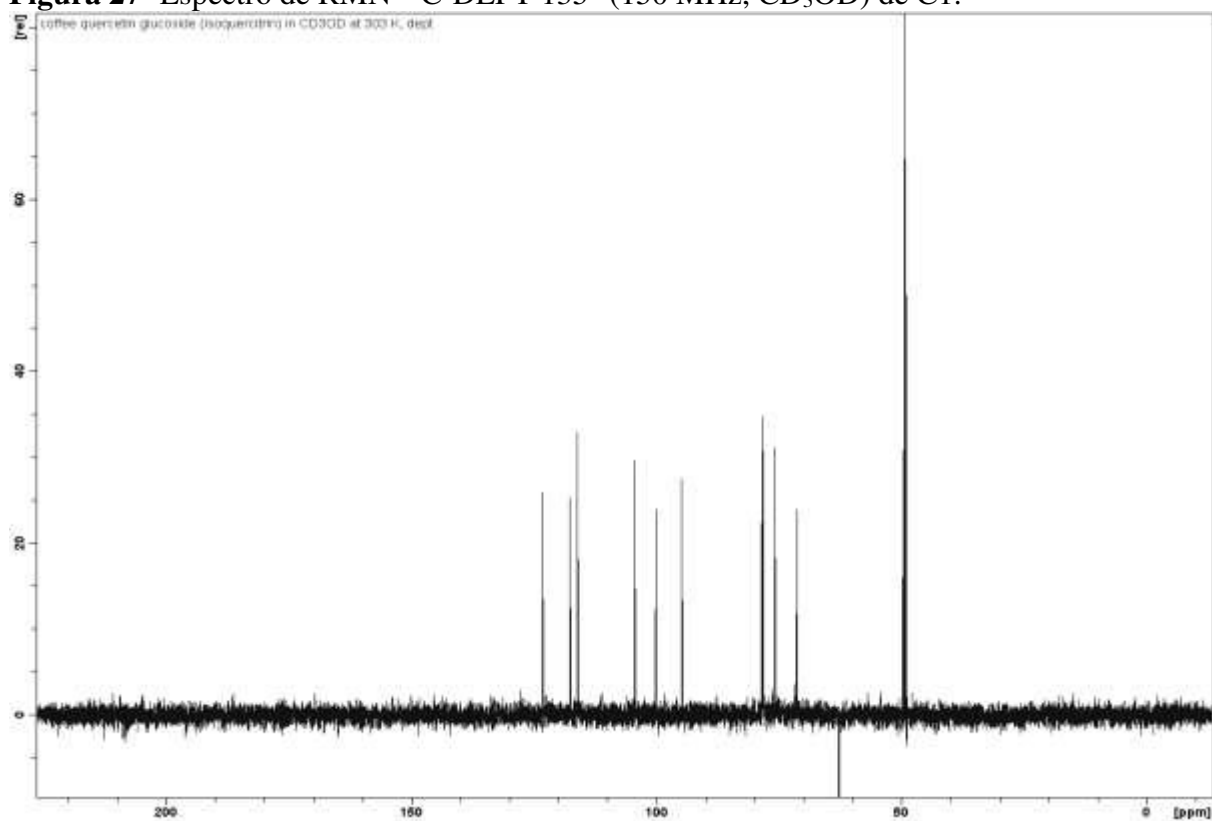
Figura 24- Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) de C1.**Figura 25-** Expansão no espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) de C1 na região de δH 3-6.

Figura 26- Espectro de RMN ^{13}C -BB (150 MHz, CD_3OD) de C1.**Figura 27-** Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (150 MHz, CD_3OD) de C1.

6.2.2.2 Determinação estrutural de C2

O espectro de RMN ^1H (Figura 29, expansão na Figura 30) do composto C2 apresentou sinais semelhantes ao do composto quercetina glicosídeo. No entanto, foram observados mais sinais na região de hidrogênios oxigenados na faixa de δ_{H} 3,00-4,00, sendo a presença dos sinais em 4,52 (d, $J=1,9$ Hz), referentes a mais um hidrogênio de carbono anomérico e à metila duplete em δ_{H} 1,12 ($J=6,20$ Hz), condizentes da presença de uma raminose.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 31, expansão na Figura 32) apresentou 27 linhas espectrais. A comparação com a molécula anterior mostrou que o composto possui a mesma aglicona flavonoídica, assim como a presença da glicose, porém com a adição de uma raminose. O grupamento ramnopiranosil está ligado na posição 6'' com base na diferença de deslocamento químico δ_{C} 68,63 em relação ao composto quercetina glicosídeo [(C-6'') δ_{C} 62,3].

Os dados obtidos com a espectrometria de massas no item 6.1 deste trabalho (FM. $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$; $[\text{M}-\text{H}]^- = 609,0$) corroboram com dados discutidos.

Após análise dos dados espectrais, juntamente com os dados obtidos com a espectrometria de massas e comparação com os dados da literatura (Tabela 12), foi possível concluir que C2 trata-se do flavonoide rutina (Figura 28).

Figura 28- Representação estrutural da rutina.

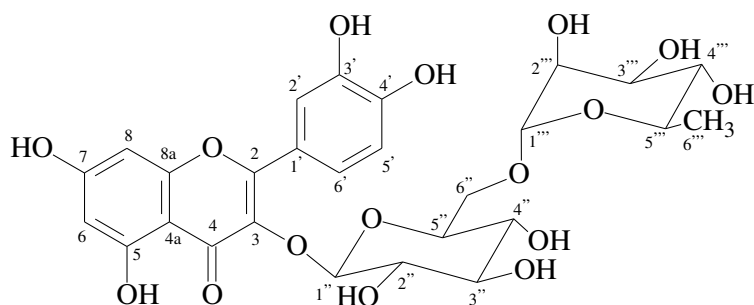


Tabela 12- Deslocamento químico de RMN ^{13}C e de seus respectivos hidrogênios em comparação com os descritos na literatura para rutina (LI *et al.*, 2008).

C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C} literatura
2	159,39		159,28
3	135,65		135,63
4	179,42		179,33
4a	105,60		105,59
5	162,99		162,86
6	100,19	6,211 (d, $J_{\text{H8}} = 2,1$ Hz)	99,93
7	166,46		165,92
8	95,02	6,400 (d, $J_{\text{H6}} = 2,0$ Hz)	94,87
8a	158,61		158,42
1'	123,62		123,57
2'	117,73	7,670 (d, $J_{\text{H6}'} = 2,2$ Hz)	117,72
3'	145,92		145,74
4'	149,95		149,73
5'	116,14	6,877 (d, $J_{\text{H6}'} = 8,4$ Hz)	116,04
6'	123,15	7,633 (dd, $J_{\text{H5}'} = 8,4$; $J_{\text{H2}'} = 2,2$ Hz)	123,10
1''	102,47	5,100 (d, $J_{\text{H2}''} = 7,6$ Hz)	102,38
2''	75,76	NAPs: 3,83–3,24	75,71
3''	78,25		78,16
4''	71,47		71,37
5''	77,28		77,15
6''	68,63		68,54
1'''	104,80	4,520 (d, $J_{\text{H2}'''} = 1,5$ Hz)	104,76
2'''	72,15	NAPs*: 3,83–3,24	72,06
3'''	72,31		72,23
4'''	73,99		73,93
5'''	69,76		69,67
6'''	17,92	1,123 (d, $J_{\text{H5}'''} = 6,2$ Hz)	17,86

*Sobreposição de sinais

Figura 29- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de C2.

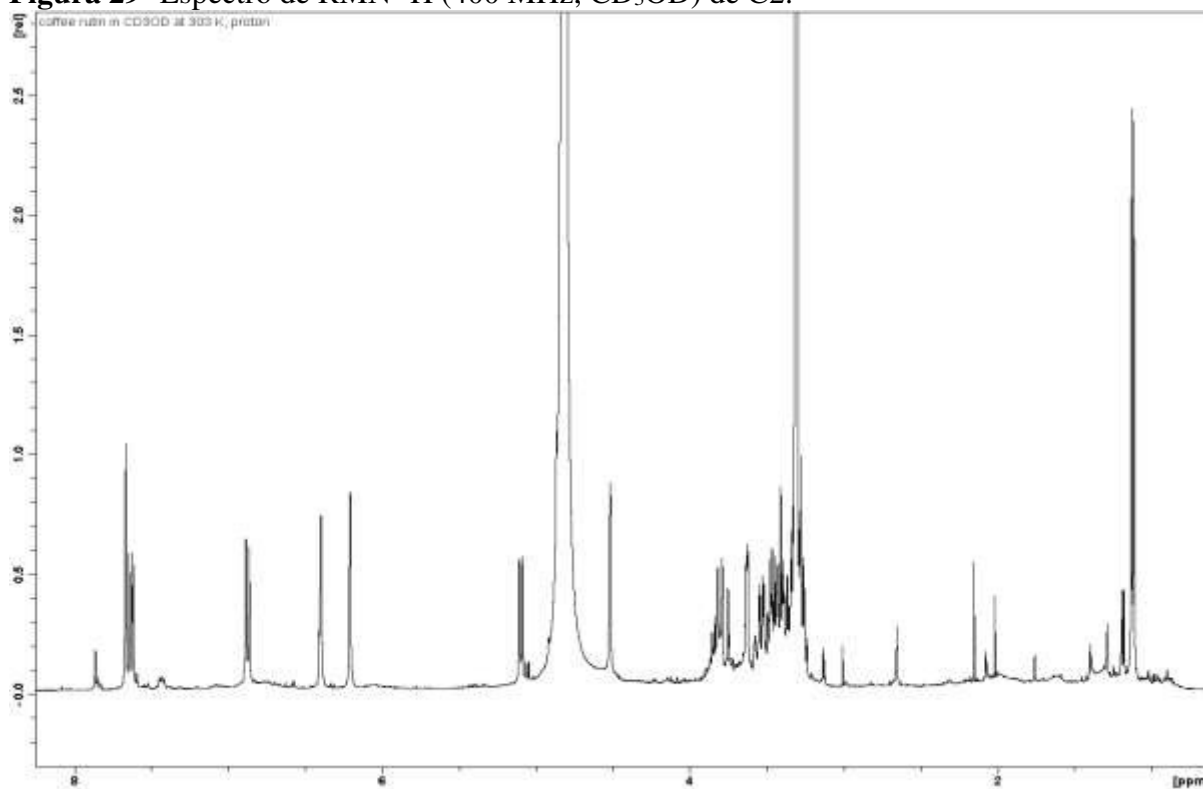


Figura 30- Expansão no espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de C2 na região de δH 3-4.

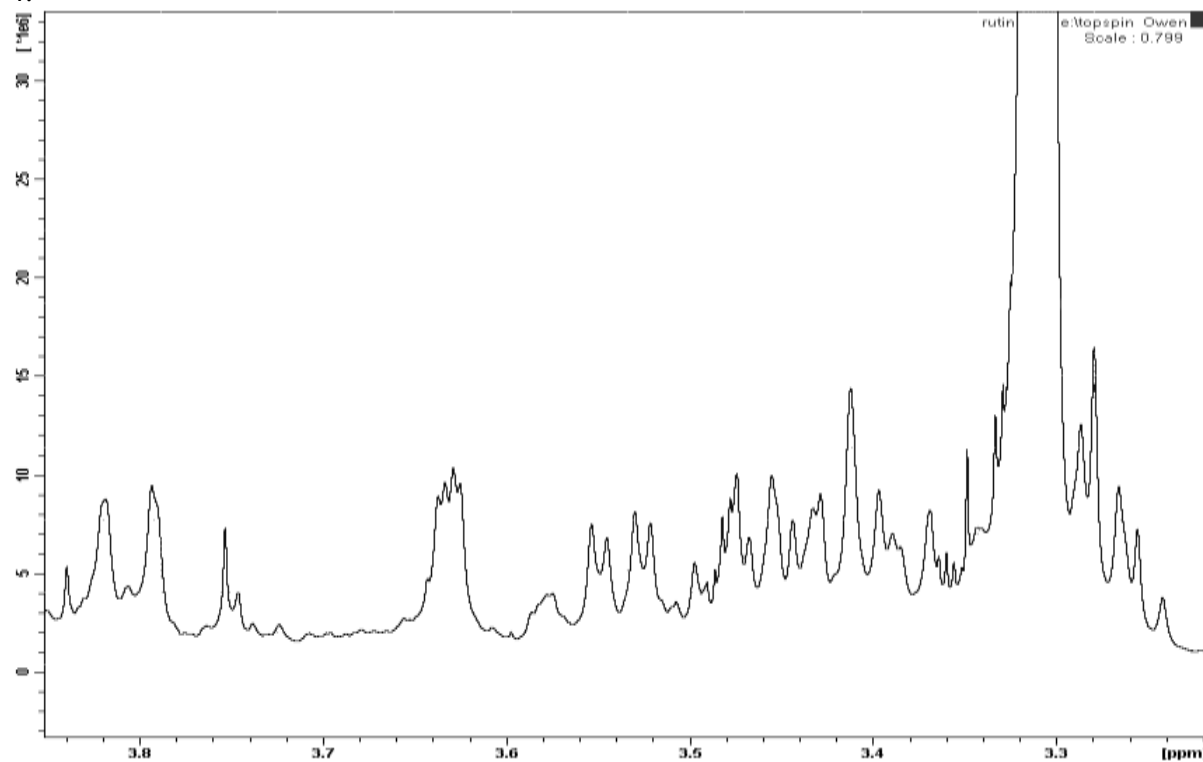


Figura 31- Espectro de RMN ^{13}C -BB (100 MHz, CD_3OD) de C2.

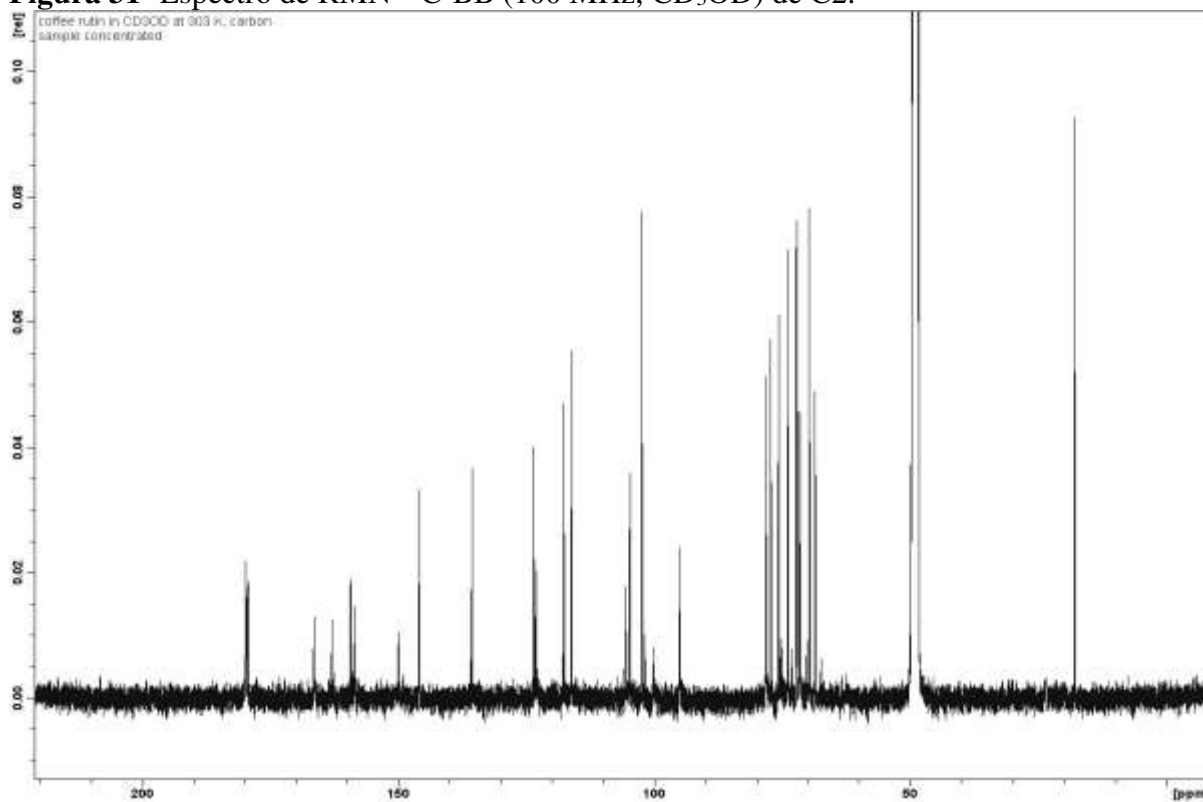
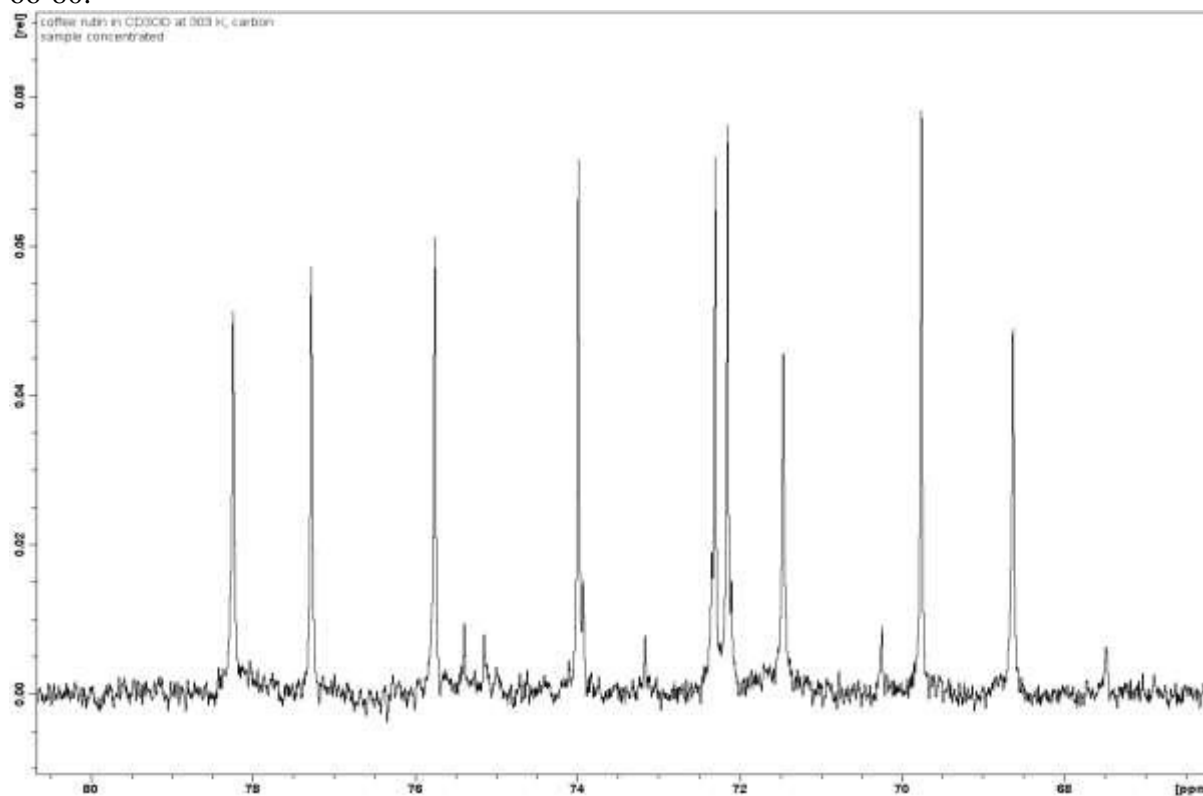


Figura 32- Expansão no espectro de RMN ^{13}C -BB (100 MHz, CD_3OD) de C2 na região de δc 66-80.



6.2.2.3 Determinação estrutural de C3

Os dados de RMN ^1H (Figura 34, expansão na Figura 35) do composto C3 apresentaram sinais semelhantes ao do composto rutina. No entanto, não foram observados os sinais característicos da raminose, sendo as principais diferenças observadas em δ_{H} 4,75 (d, $J= 7,50$ Hz) do hidrogênio ligado ao carbono anomérico e dos hidrogênios metilênicos δ_{H} 3,55-3,70, condizentes com a presença de uma glicose em vez de uma ramnose.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 36, expansão na Figura 37) apresentou 27 linhas espectrais. A comparação do espectro de RMN ^{13}C de C3 com o da rutina mostrou que as principais diferenças estão no carbono anomérico em δ_{C} 101,3, no carbono em δ_{C} 83,0 (C-2'') e do carbono hidroximetilênico em δ_{C} 62,4, sugerindo a presença de uma glicose ligada em C-2'', com base nas diferenças de deslocamento químico observadas.

Os dados obtidos com a espectrometria de massas no item 6.1 deste trabalho (FM. $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$; $[\text{M}-\text{H}]^- = 625,1$) corroboram com dados discutidos.

Após análise dos dados espectrais, juntamente com os dados obtidos com a espectrometria de massas e comparação com os dados da literatura (Tabela 13), foi possível concluir que C3 trata-se da quercetina-3-*O*-diglucosídeo (Figura 33).

Figura 33- Representação estrutural da quercetina-3-*O*-diglucosídeo.

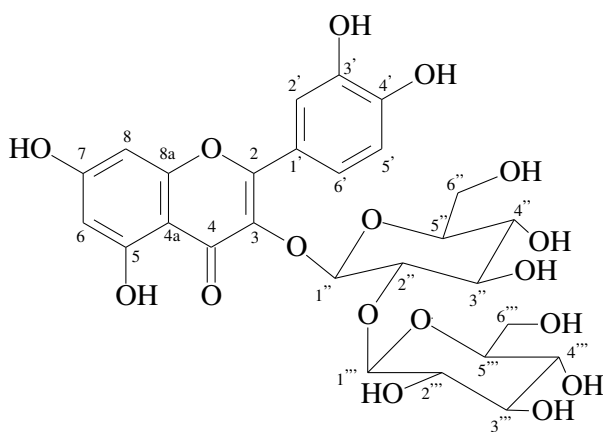


Tabela 13- Deslocamento químico de RMN ^{13}C e de seus respectivos hidrogênios em comparação com os descritos na literatura para quercetina-3-*O*-diglicosídeo (SEUTTER VON LOETZEN *et al.*, 2014).

C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C} literatura
2	158,92		159,0
3	135,16		135,2
4	179,81		179,9
4a	105,80		105,9
5	163,20		163,2
6	99,98	6,202 (d, $J_{\text{H8}} = 2,1$ Hz)	99,9
7	166,19		166,0
8	94,77	6,386 (d, $J_{\text{H6}} = 2,1$ Hz)	94,8
8a	158,58		158,6
1'	123,11		123,2
2'	117,79	7,672 (d, $J_{\text{H6}'} = 2,2$ Hz)	117,9
3'	146,04		146,1
4'	149,90		149,9
5'	116,23	6,892 (d, $J_{\text{H6}'} = 8,4$ Hz)	116,3
6'	123,11	7,536 (dd, $J_{\text{H5}'} = 8,4$; $J_{\text{H2}'} = 2,2$ Hz)	123,2
1''	101,28	5.347 (d, $J_{\text{H2}''} = 7,6$ Hz)	101,3
		NAPs: 3,90–3,17	
2''	83,02		83,0
3''	77,97		78,0
4''	71,17		71,2
5''	78,31		78,4
6''	62,45		62,5
1'''	105,08	4,757 (d, $J_{\text{H2}'''} = 7,5$ Hz)	105,1
		NAPs: 3,90–3,17	
2'''	75,63		75,7
3'''	77,96		78,0
4'''	71,04		71,1
5'''	78,13		78,2
6'''	62,40		62,4

Figura 34- Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) de C3.

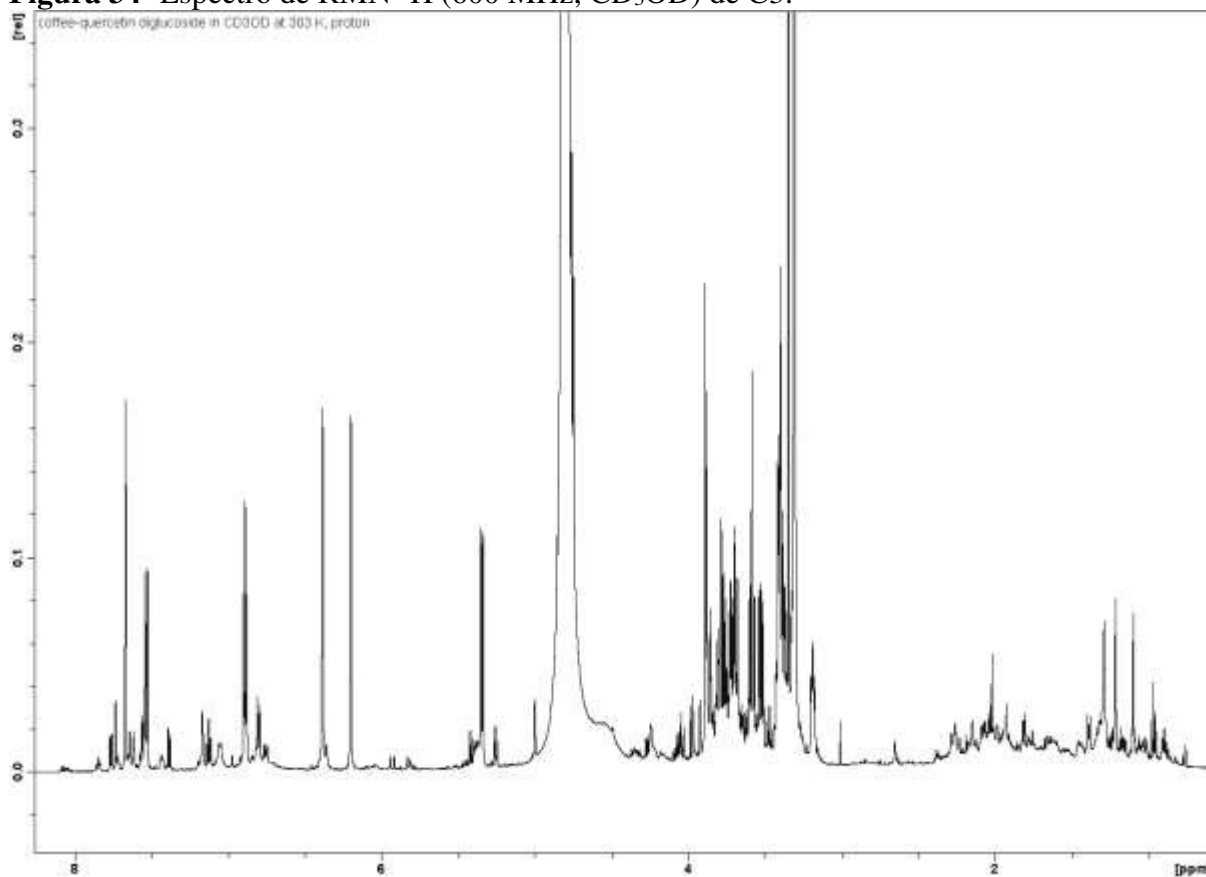


Figura 35- Expansão no espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) de C3 na região de δH 3-4.

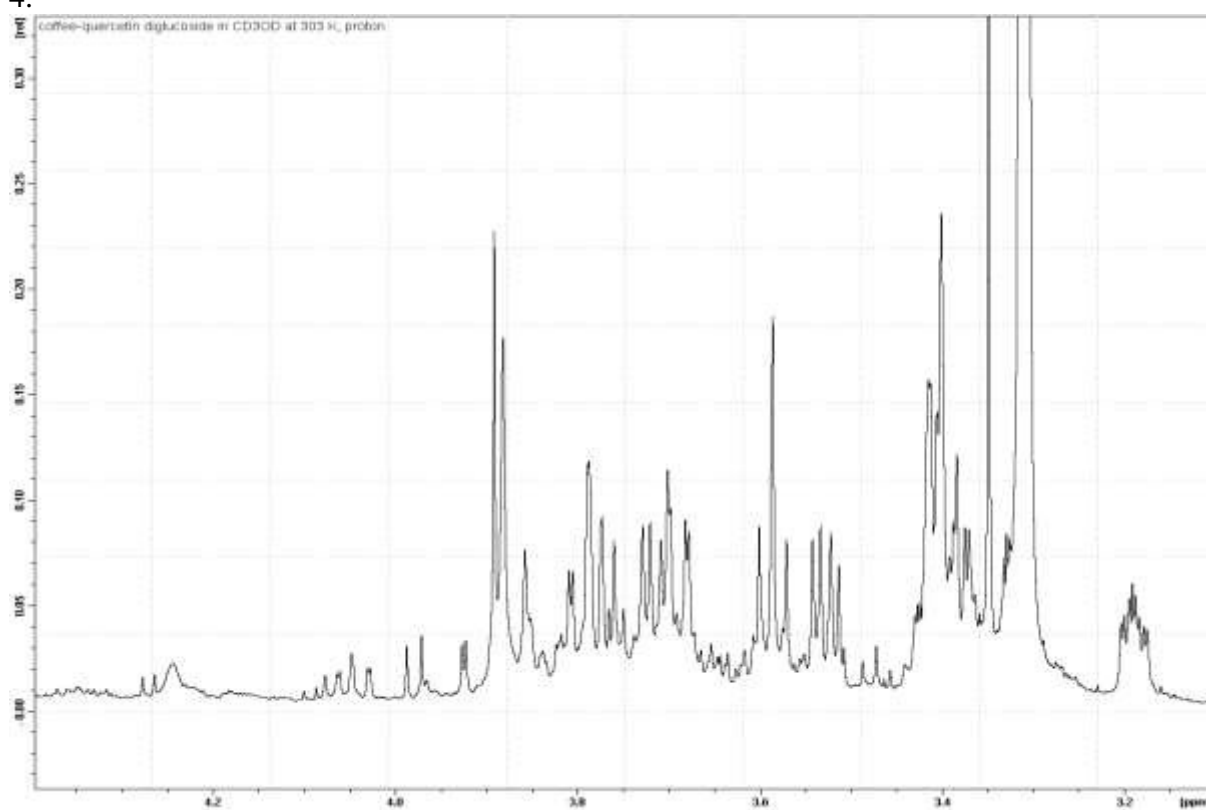


Figura 36- Espectro de RMN ^{13}C -BB (150 MHz, CD_3OD) de C3.

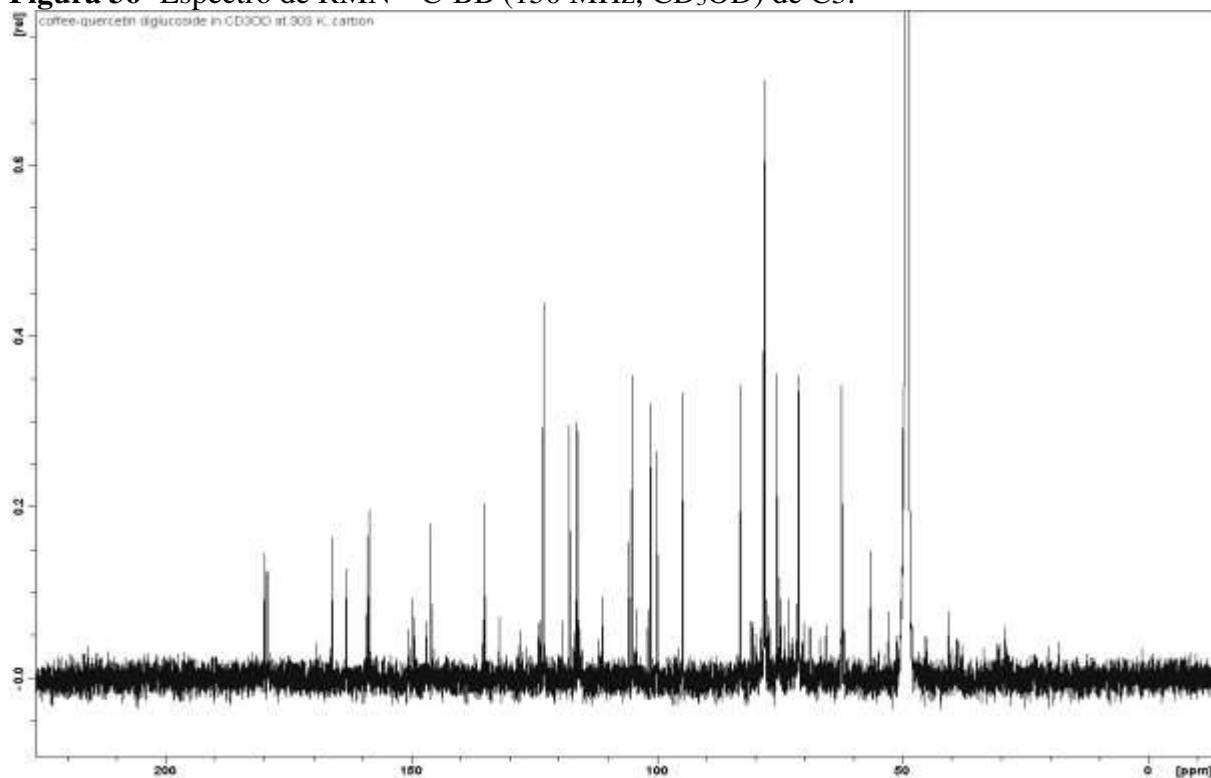
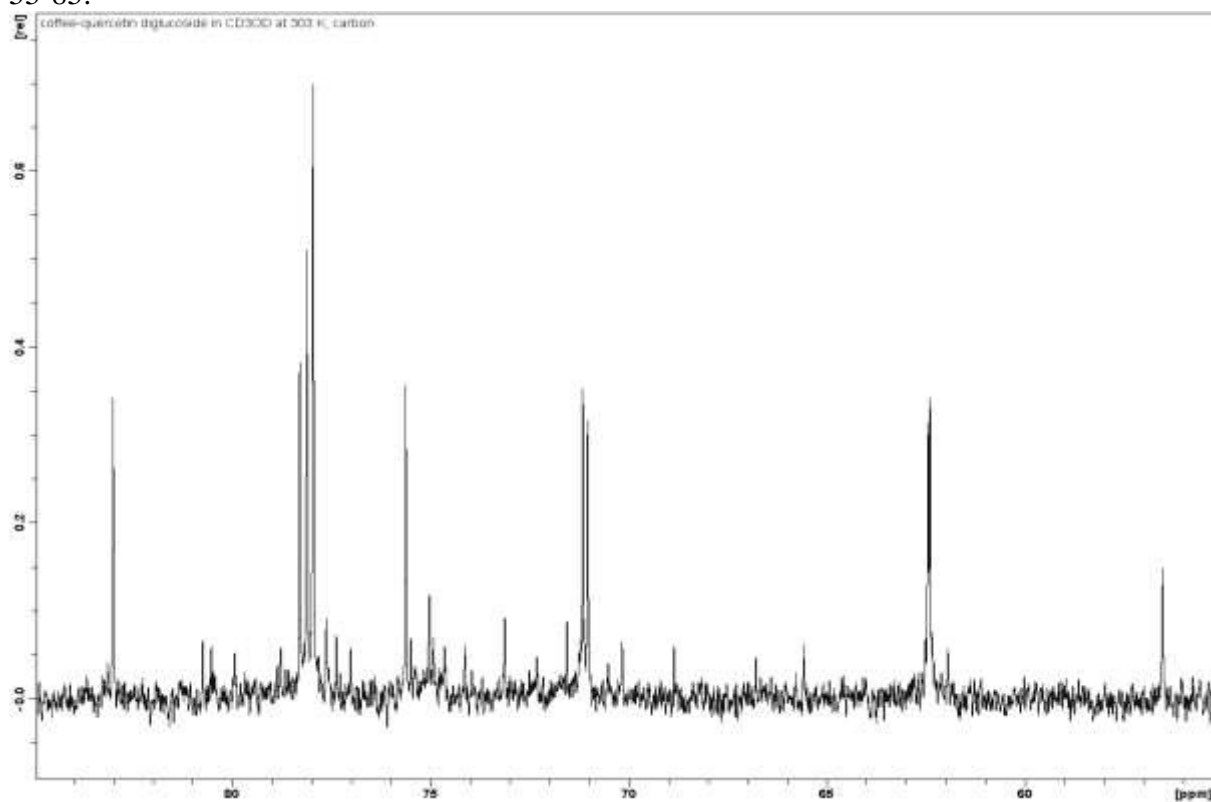


Figura 37- Expansão no espectro de RMN ^{13}C -BB (150 MHz, CD_3OD) de C3 na região de δc 55-85.



6.2.2.4 Determinação estrutural de C4

Os dados de RMN ^1H (Figura 39, expansão na Figura 40) do composto C4 apresentaram sinais semelhantes ao do composto descrito anteriormente. Foram observados sinais na região de hidrogênios oxigenados na faixa de δ_{H} 3,8–3,2, bem como sinais em δ_{H} 4,5 (d, $J= 1,7$ Hz), δ_{H} 5,3 (d, 7,6) e δ_{H} 4,7 (d, 7,4), referentes a três hidrogênios ligados a carbonos anoméricos, sugerindo a presença de três unidades glicosídicas. A presença da metila duplete em δ_{H} 1,095 (d, 6,2) é condizente com uma raminose.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 41, expansão na Figura 42) de C4 apresentou 33 linhas espectrais. Os sinais de carbono anomérico em δ_{C} 101,2, 102,2 e 104,9 ratificam a presença das três unidades glicosídicas. Com base nos deslocamentos químicos observados para os sinais de carbono em δ_{C} 82,7 (C-2'') e 68,2 (C-6''), pode-se indicar que as outras duas unidades glicosídicas estão ligadas em C2 e C6. A localização precisa das unidades glicosídicas pode ser confirmada através do experimento bidimensional de HMBC.

O espectro HMBC (Figura 43) de C4 mostrou a correlação do hidrogênio H-1''' com C-6'', confirmando a posição do grupamento ramnopiranosil em C-6''. Em consequência, a unidade glicopiranosil está em C-2''.

Os dados obtidos com a espectrometria de massas no item 6.1 deste trabalho (FM. $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{21}$; $[\text{M}-\text{H}]^- = 771,1$) corroboram com dados discutidos.

Após análise dos dados espectrais, juntamente com os dados obtidos com a espectrometria de massas e comparação com os dados da literatura (Tabela 14), foi possível concluir que C4 trata-se da rutina glucosídeo (Figura 38).

Figura 38- Representação estrutural da rutina glucosídeo.

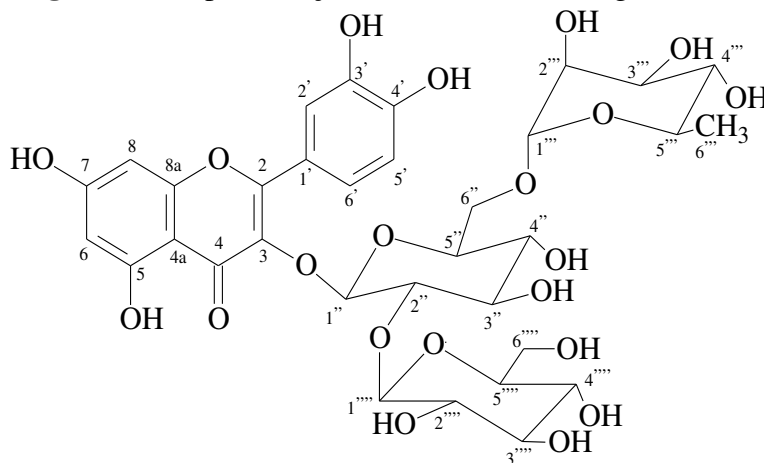


Tabela 14- Deslocamento químico de RMN ^{13}C e de seus respectivos hidrogênios em comparação com os descritos na literatura para rutina glucosídeo (AQUINO *et al.*, 1987).

C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C} literatura
2	159,26		158,6
3	134,92		135,5
4	179,64		179,3
4a	105,72		105,5
5	163,09		163,0
6	100,09	6,206 (d, $J_{\text{H8}} = 2,1$ Hz)	100,0
7	166,19		166,5
8	94,98	6,387 (d, $J_{\text{H6}} = 2,1$ Hz)	95,1
8a	158,60		159,0
1'	123,23		123,6
2'	117,90	7,657 (d, $J_{\text{H6}'} = 2,2$ Hz)	117,9
3'	145,96		145,0
4'	149,85		149,4
5'	116,26	6,893 (d, $J_{\text{H6}'} = 8,4$ Hz)	116,3
6'	123,31	7,544 (dd, $J_{\text{H5}'} = 8,4$; $J_{\text{H2}'} = 2,1$ Hz)	123,3
1''	101,25	5,281 (d, $J_{\text{H2}''} = 7,6$ Hz)	101,1
2''	82,69	NAPs: 3,81–3,23	82,8
3''	77,93		77,9
4''	71,34		71,4
5''	77,04		77,1
6''	68,19		68,2
1'''	102,21	4,490 (d, $J_{\text{H2}'''} = 1,7$ Hz)	102,2
2'''	72,15	NAPs: 3,81–3,23	72,1
3'''	72,32		72,4
4'''	73,96		74,0
5'''	69,75		69,7
6'''	17,88	1,095 (d, $J_{\text{H5}'''} = 6,2$ Hz)	17,8
1''''	104,90	4,759 (d, $J_{\text{H2}''''} = 7,4$ Hz)	104,9
2''''	75,52	NAPs: 3,81–3,23	75,5
3''''	77,92		77,9
4''''	71,20		71,4

(continuação)

C	δ_c	δ_H	δ_c literatura
5'''	78,21		78,2
6'''	62,45	NAPs: 3,81–3,23	62,6

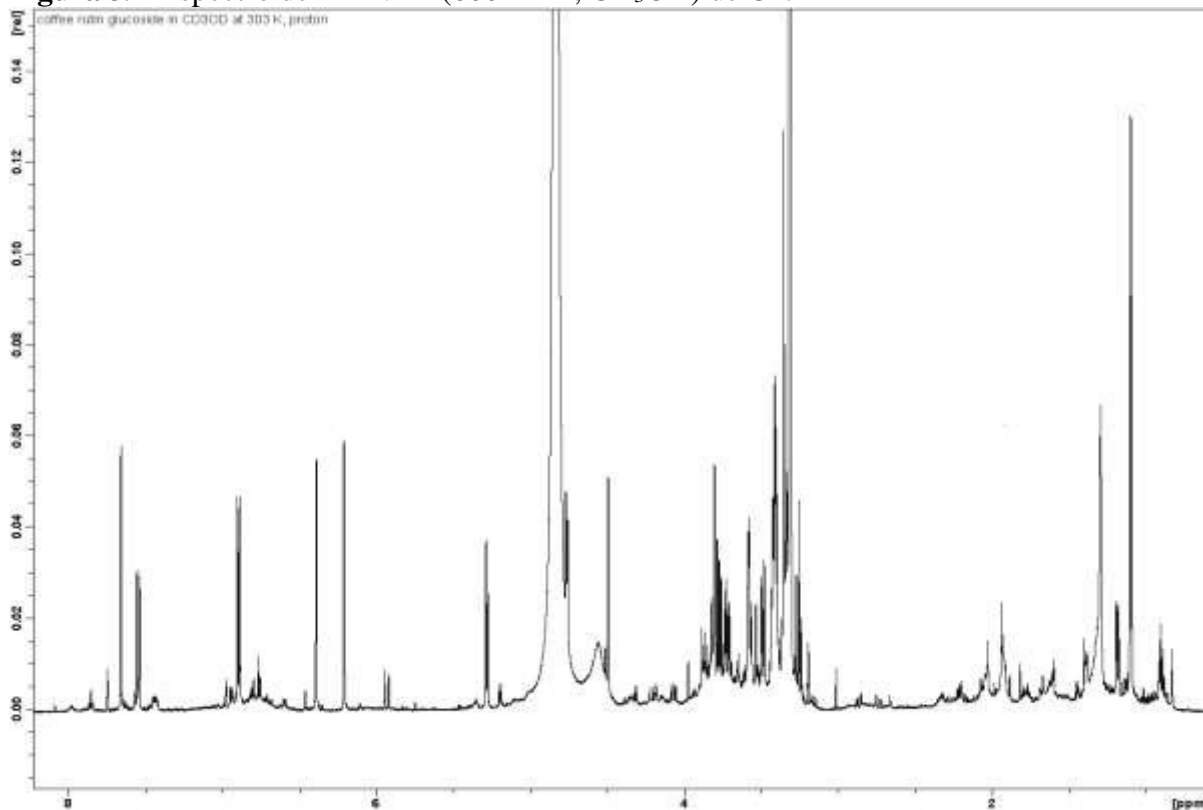
Figura 39- Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) de C4.

Figura 40- Expansão no espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) de C4 na região de δH 3-6.

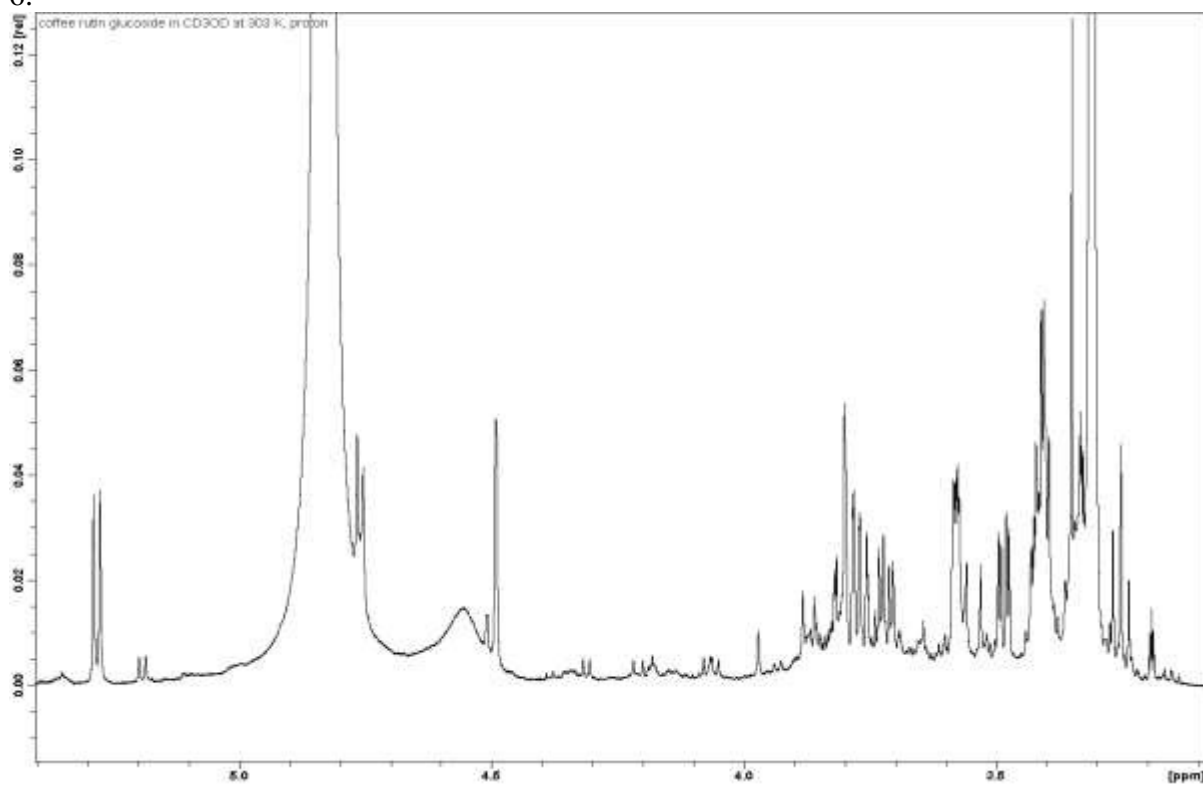


Figura 41- Espectro de RMN ^{13}C -BB (150 MHz, CD_3OD) de C4.

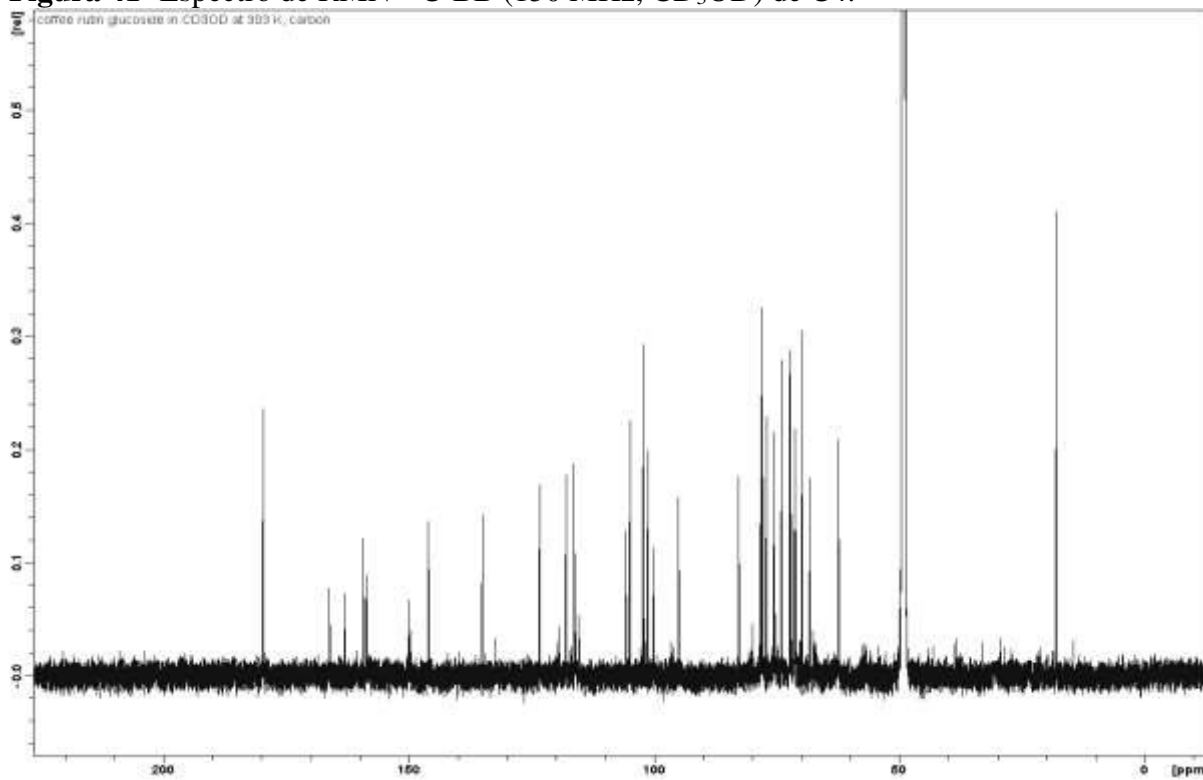


Figura 42- Expansão no espectro de RMN ^{13}C -BB (150 MHz, CD_3OD) de C4 na região de δc 60-85.

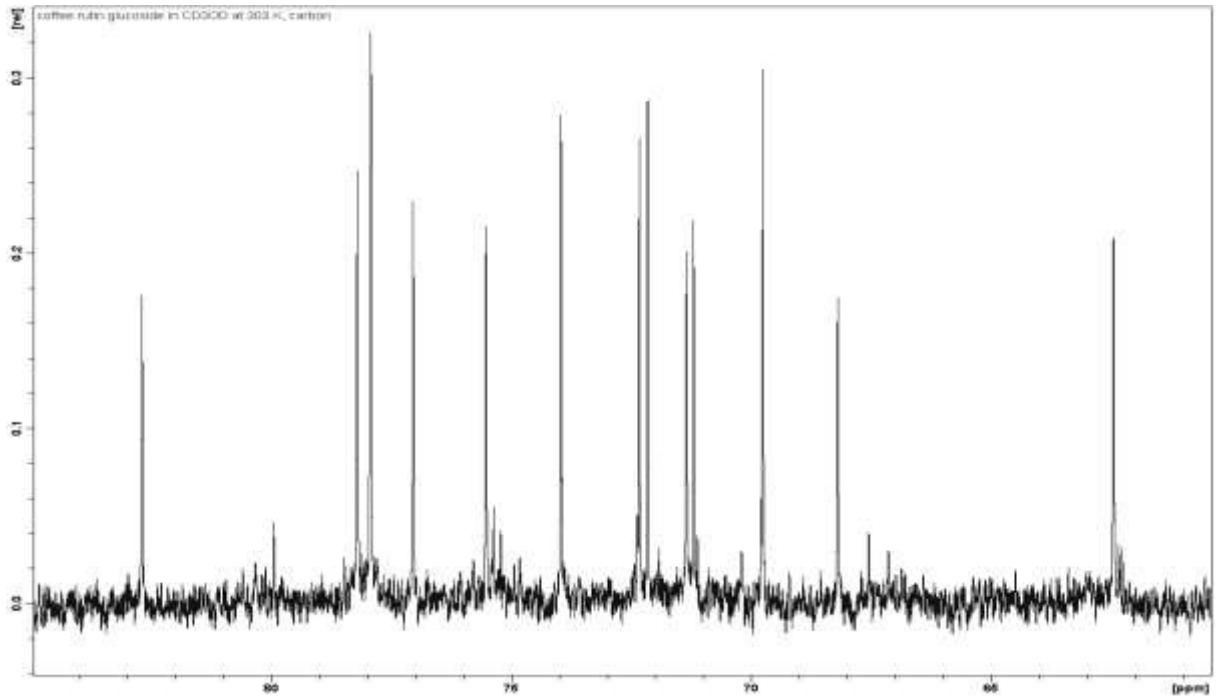
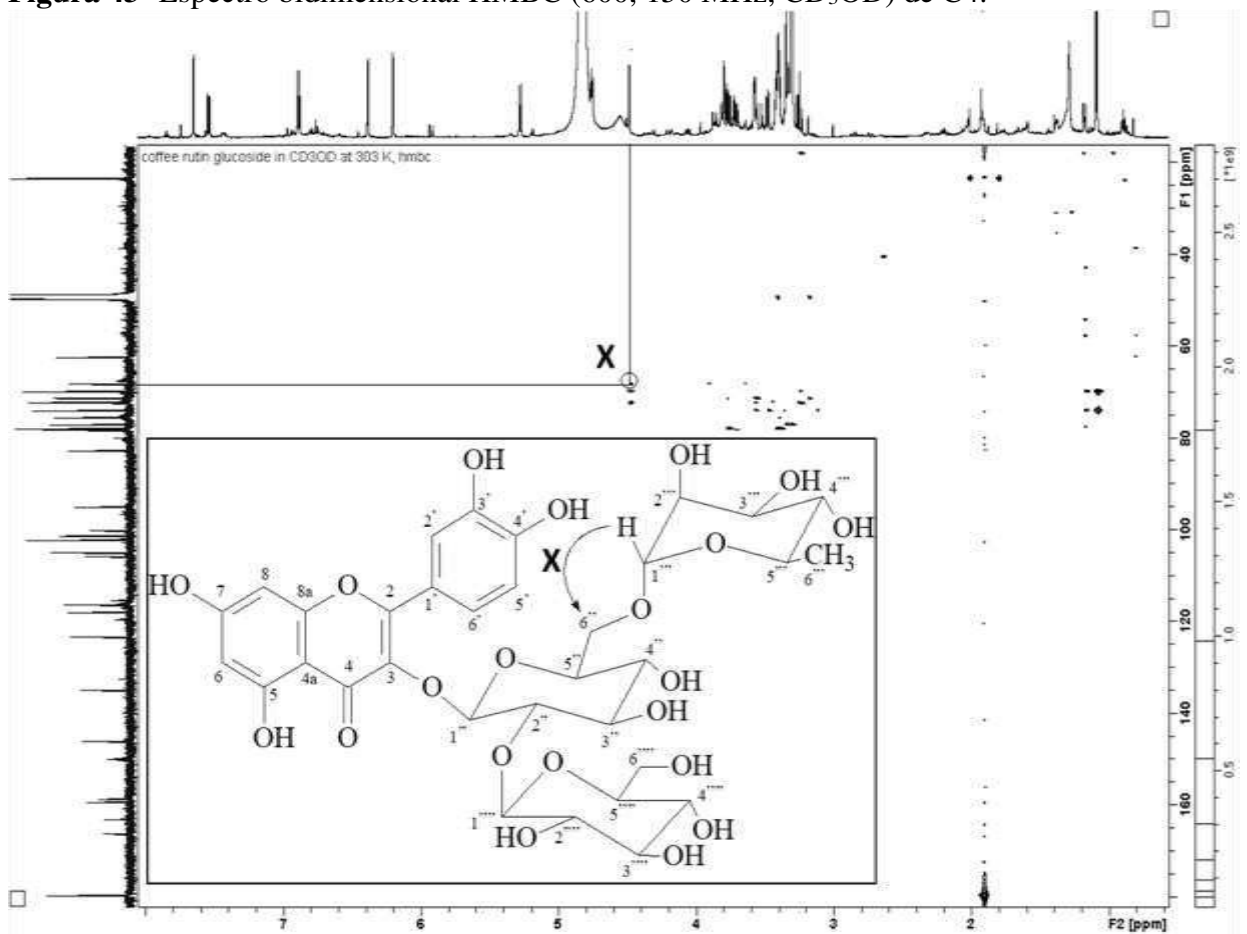


Figura 43- Espectro bidimensional HMBC (600, 150 MHz, CD_3OD) de C4.

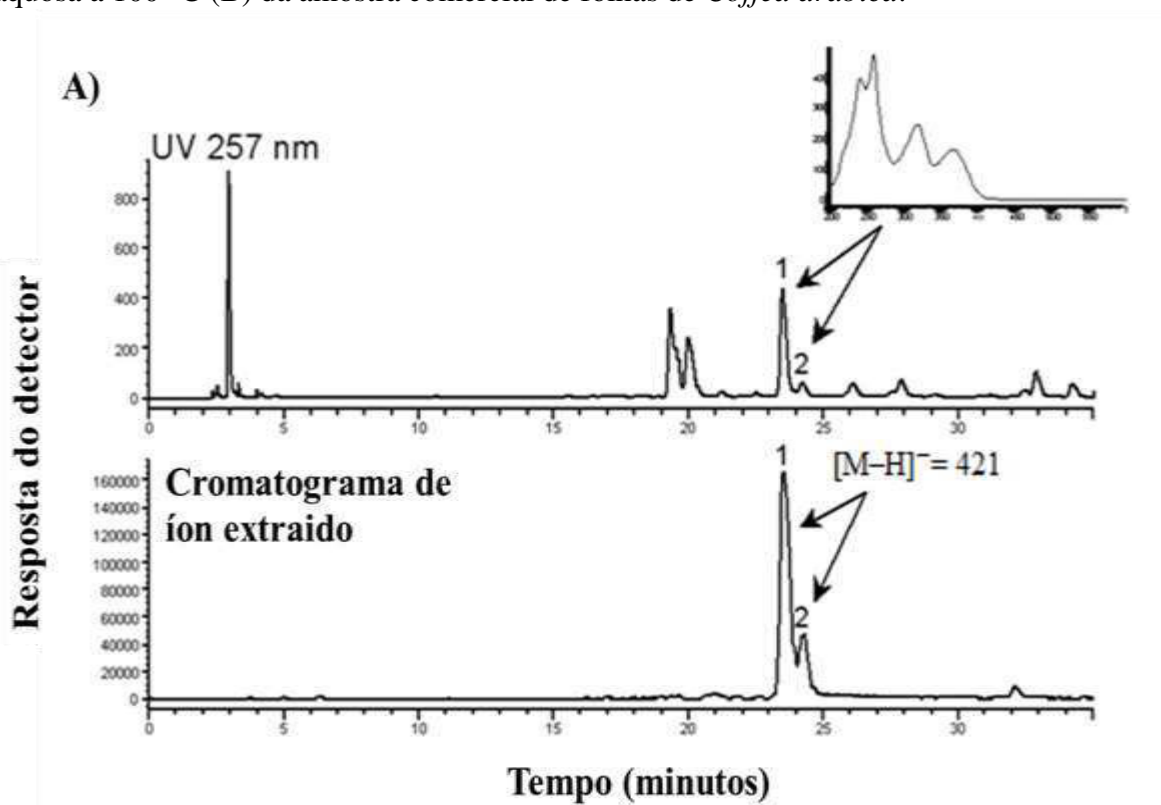


6.3 Análise quantitativa dos extratos e infusões de *Coffea arabica*

6.3.1 Análise quantitativa das infusões da amostra comercial

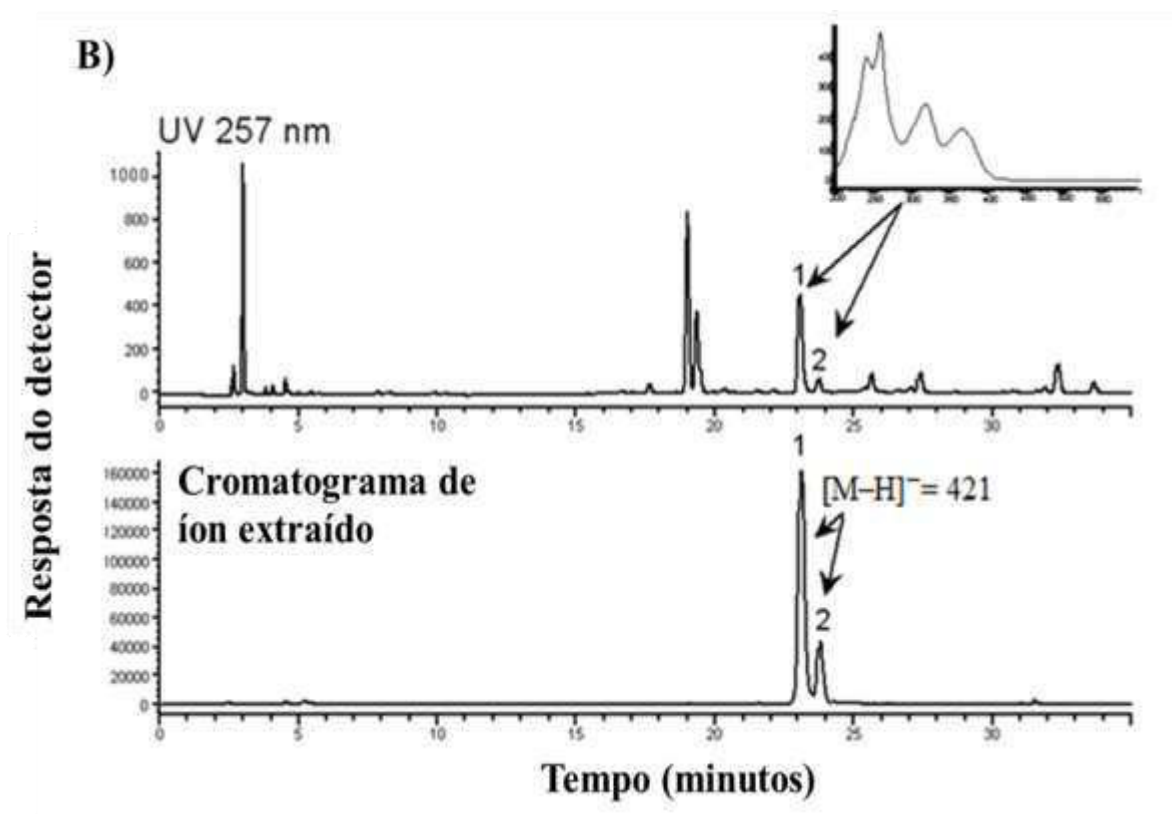
O extrato metanólico e as infusões preparadas a partir das folhas de café comercial foram submetidos à análise de CLAE-DAD-IES-EM, como descrito na parte de procedimento experimental deste trabalho e os espectros obtidos (somente um representando a infusão) estão apresentados na Figura 44.

Figura 44- Cromatogramas CLAE-IES-EM do extrato de metanólico (A) e de uma infusão aquosa a 100 °C (B) da amostra comercial de folhas de *Coffea arabica*.



(continuação)

Figura 44- Cromatogramas CLAE-IES-EM do extrato metanólico e de uma infusão aquosa a 100 °C da amostra comercial de folhas de *Coffea arabica*.

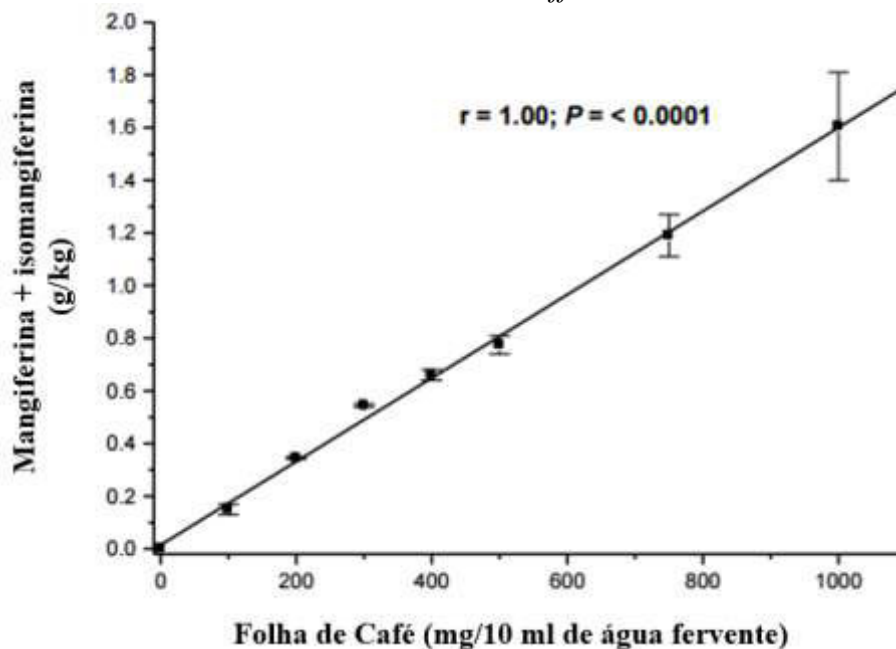


Acima: cromatograma UV (257 nm) nas condições utilizadas para HPLC-ESI-MS. Abaixo: íons extraídos individuais em $m/z = 421$ $[M-H]^-$ - de mangiferina (Pico 1) e isomangiferina (Pico 2).

Em seguida, foi feita a quantificação de mangiferinas totais nas amostras (mangiferina e isomangiferina). Os resultados obtidos foram expressos em g/kg de fonte seca, como apresentado na Figura 45.

As infusões em água destilada fervente de quantidades variáveis (100-1000 mg) de folhas de café secas e trituradas da amostra comercial e com manutenção desta temperatura durante vinte minutos revelaram que a liberação de mangiferinas totais mostrou uma resposta linear em relação a dosagem (Figura 45).

Figura 45- Liberação linear de mangiferinas totais do pó de folhas de café (100-1000 mg/10 ml) por infusão a 100°C de uma fonte comercial de *Coffea arabica*.

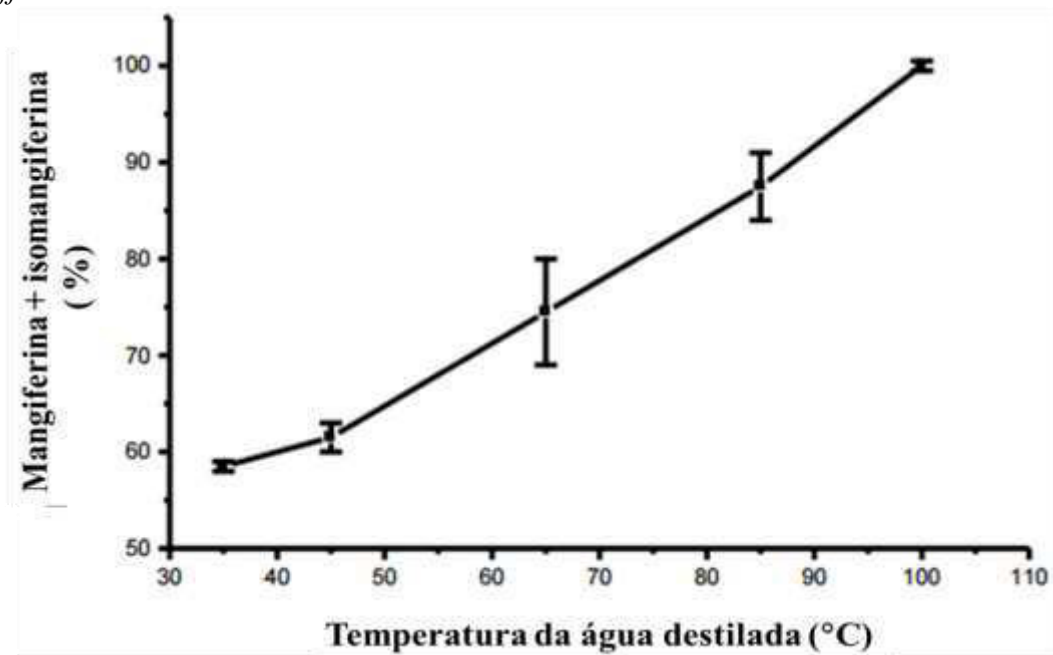


Foi observado que a infusão de 1000 mg de folhas de café secas e trituradas em água fervente liberou mais de 50% das mangiferinas disponíveis presentes (1,6 g/kg), em comparação com a extração a quente em metanol por Soxhlet (3,05 g/kg).

Em relação ao tempo de extração, a liberação de mangiferinas por infusão em água fervente foi praticamente instantânea, com uma extração de 53% (em comparação com a extração a quente com metanol) após apenas um minuto, sem aumento após 30 minutos.

Ao avaliar o efeito da temperatura sobre a eficiência da extração em intervalo de 10 min, a liberação de mangiferinas das folhas de café secas e trituradas foi fortemente dependente da temperatura. A 35°C, a liberação de mangiferinas foi 59% eficiente em comparação com a água fervente, aumentando para 88% a 85°C e 100% a 100 °C (Figura 46). Apesar de ter sido 100% extraída das folhas de café em água a 100 °C, a mangiferina apresenta baixa solubilidade em em água (1,57 mg/L) (DUTRA *et al.*, 2017).

Figura 46- Relação de dependência da temperatura com a liberação total de mangiferinas a partir de folhas de café secas e trituradas (100 mg/5,0 mL) em infusão de uma fonte comercial de *Coffea arabica*.



Os resultados obtidos nesse tópico foram publicados no jornal científico **Food Analytical Methods**, no ano de 2016 (TREVISAN *et al.* 2016).

6.3.2 Análise quantitativa dos extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica* coletadas no Brasil e Costa Rica

A análise quantitativa dos compostos majoritários mangiferina, ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido clorogênico, rutina e cafeína nas folhas de café foi realizada de acordo com o que é descrito na parte de procedimento experimental deste trabalho, item 5.3.1.1. Os resultados obtidos foram expressos em g/kg de fonte seca.

Os dados obtidos são apresentados nos subtópicos seguintes, de acordo com cada localidade (Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica).

6.3.2.1 Análise quantitativa das amostras do Ceará

A Tabela 15 apresenta as concentrações de mangiferina, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, rutina e cafeína em g/kg de peso seco.

Tabela 15- Compostos quantificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas no estado do Ceará.

Amostra	Compostos quantificados (g/kg)					
	M	ACG1	ACG2	ACG3	R	C
CEP1	1,01	0,11	1,72	0,12	0,39	0,06
CEG1	1,34	0,05	1,46	0,11	0,18	6,42
CEG2	0,94	0,00	1,17	0,09	0,16	4,95
CEG3	1,30	0,28	3,85	0,37	0,25	1,45
CEG4	1,68	0,18	3,76	0,26	0,37	1,52
CEG4.2	1,51	0,28	3,56	0,35	0,50	9,22
CEG5	0,91	0,48	4,87	0,62	3,15	2,93
CEG6	0,71	0,08	0,90	0,13	0,10	8,72
CEG7	1,18	0,07	1,66	0,10	0,06	7,87
CEM1	1,24	0,53	2,24	0,21	0,40	6,81
CEM2	0,43	0,00	0,23	0,10	0,42	6,45
CEM3	1,49	0,01	1,21	0,13	0,12	9,63

M.= mangiferin; ACG1=ácido neoclorogênico; ACG2= ácido clorogênico; ACG3= ácido criptoclorogênico; R= rutina; C= cafeína

De forma geral, a concentração dos compostos nas folhas desidratadas variou entre 0,71-1,68 g/kg para mangiferina, 0,23-4,87 g/kg para ácido clorogênico, 0,10-3,15 g/kg para rutina e 0,06-9,63 g/kg para cafeína, enquanto o composto ácido neoclorogênico e criptoclorogênico apresentaram valores menores que 1,00 g/kg em todas as amostras. Vale destacar que a amostra CEG5 (amostra de folhas adultas coletadas diretamente do cafeeiro sombreado) apresentou a maior concentração de ácido clorogênico e rutina. Estudo desenvolvido por Rego, 2015, associou a atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso dos frutos de *H. speciosa* Gomes (conhecida popularmente como “mangabeira”) a esses dois compostos, fortalecendo a ideia de que o consumo de infusões de folhas de café pode trazer benefícios para a saúde.

Além da atividade anti-inflamatória, a rutina (também conhecida como vitamina P) é relatada na literatura por também possuir atividades antidiabéticas, neuroprotetoras, gastroprotetoras e antiglicantes, propriedades que podem ser atribuídas à grande atividade antioxidante desse composto (GULPINAR et al., 2012; ABDEL-RAHEEM, 2010; PASHIKANTI, et al., 2010; MAHMOUD, 2012).

Campa et al., 2012 apresentaram os dados de quantificação de mangiferina em porcentagem de peso na faixa de 0,026-16,359% para 7 diferentes espécies de folhas de café, o que é equivalente a 0,26-163,6 g/kg. Os valores mais elevados, referentes aos encontrados nas folhas da espécie *Coffea salvatrix*, são aproximados aos relatados nas folhas jovens da manga (BARRETO et al, 2008), o que é surpreendente. Em relação à espécie *Coffea arabica*, os mesmos autores obtiveram os seguintes dados de quantificação: mangiferina (0,566%-5,66 g/kg), ácido neoclorogênico (0,098%-0,98 g/kg), ácido clorogênico (3,231%- 32,31 g/kg) e ácido criptoclorogênico (0,256%-2,56 g/kg), valores superiores aos encontrados no presente estudo para as folhas coletadas no Ceará.

Chaves et al., 2013, quantificaram cafeína em folhas da espécie *Coffea arabica* obtidas de diferentes cultivares, obtendo resultados variando entre 2,0-8,0 g/kg. Esses valores se assemelham aos encontrados no presente estudo para as folhas coletadas no Ceará (0,06-9,63 g/Kg). Os teores de cafeína encontrados são menores do que os relatados por Lin et al, 2003, em folhas da espécie *Camellia sinensis*, onde folhas jovens apresentaram teores entre 14,53-27,38 g/kg e folhas adultas entre 11,43-17,12 g/kg.

Comparando as folhas jovens com as adultas (CEG4 e CEG4.2), só foi observada grande variação nos teores cafeína, onde as jovens apresentaram concentração de 1,52 g/kg, enquanto as adultas apresentaram concentração de 9,22 g/kg. Raju e Gopal, 1979, e Chaves et al., 2004, observaram resultados diferentes, pois verificaram níveis maiores de cafeína em

folhas jovens em relação a folhas velhas de *Coffea arabica*, assim como Lin *et al*, 2003, que observaram maiores teores de cafeína em sete amostras de folhas jovens frescas de *Camellia sinensis* em relação a folhas velhas frescas da mesma espécie. Sabe-se também que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos, tais como ácidos fenólicos, lactonas sesquiterpênicas, alcalóides, flavonóides, óleos essenciais e estilbenos. De fato, nota-se frequentemente uma correlação inversa entre alta atividade metabólica e produção de aleloquímicos, isto é, um decréscimo na produção de metabólitos secundários (notadamente derivados fenólicos) em períodos de crescimento tecidual rápido (NETO; LOPES, 2007).

6.3.2.2 Análise quantitativa das amostras de Minas Gerais

A Tabela 16 apresenta as concentrações de mangiferina, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, rutina e cafeína em g/kg de folhas desidratadas.

Tabela 16- Compostos quantificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas no estado de Minas Gerais.

Amostra	Compostos quantificados (g/kg)					
	M	ACG1	ACG2	ACG3	R	C
MGBS1	4,17	0,23	5,73	0,42	2,93	9,23
MGBS1.2	1,21	0,20	2,42	0,25	0,78	5,52
MGM1	0,48	0,22	1,23	0,24	0,32	5,65
MGP1	7,77	0,37	19,84	0,76	3,15	7,08
MGP2	3,95	0,31	9,97	0,60	1,10	7,28
MGP2.2	8,48	0,35	17,55	0,72	4,33	12,66
MGP3	9,71	0,31	22,67	0,98	4,71	11,70

M.= mangiferin; ACG1=ácido neoclorogênico; ACG2= ácido clorogênico; ACG3= ácido criptoclorogênico; R= rutina; C= cafeína

As folhas coletadas em Manhumirim (MGM1), obtidas de cafeeiros homeopatizados, apresentaram as menores concentrações para todas as substâncias em relação às demais amostras, porém valores esses semelhantes aos das folhas coletadas em Bom Sucesso (MGBS1.2), sugerindo que a prática homeopática utilizada pouco influenciou na produção de metabolitos de defesa dessa planta. Entretanto é necessário um estudo mais aprofundado nesse aspecto para se obter resultados mais confiantes.

Entre as amostras que foram coletadas no município de Perdões (MGP1, MGP2, MGP2,2 e MGP3), foi observado que as folhas obtidas de cafeeiro com tratamento tradicional (MGP3) apresentaram as maiores concentrações de praticamente todos os compostos quando comparadas com as folhas obtidas de cafeeiros com tratamento "quebra vento" e "cobertura do solo e adubação verde". As plantas estão sujeitas a diversos fatores mecânicos, causados por chuva, granizo, vento, areia, invasão por patógenos e pastagem de herbívoros. Esses fatores mecânicos podem influenciar a expressão do metabolismo secundário na planta. Além disso, os nutrientes do solo também influenciam na produção de metabólitos secundários na planta (NETO; LOPES, 2007). Dessa forma, os tratamentos "quebra vento" e "cobertura do solo e adubação verde" podem ter influenciado os cafeeiros na produção de menos metabólitos secundários em relação ao cafeeiro com tratamento tradicional. Estes tratamentos são utilizados para produção de café gourmet, onde altas concentrações de ácidos clorogênicos prejudica a qualidade do café.

Comparando as folhas coletadas da parte superior do cafeeiro com as coletadas da parte inferior (MGP2 e MGP2.2), foram observadas maiores concentrações de todas as substâncias nas folhas coletadas na parte superior, praticamente o dobro no caso da mangiferina, ácido clorogênico e cafeína e quase quatro vezes mais no caso da rutina. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que as folhas localizadas na parte superior da planta estão mais expostas ao sol e conseqüentemente sob condições mais estressantes, sendo necessária maior produção de metabólito secundário pela planta. Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Delarozza *et al*, 2014, em que foi observado que os espectros dos picos de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV de arranjo de diodos (HPLC-UV-DAD) dos extratos mostravam que folhas de *Coffea arabica* expostas ao sol apresentam absorções mais fortes para a cafeína, ácido clorogênico e teobromina do que as folhas "autossombreadas" da parte de baixo do cafeeiro.

Comparando as folhas jovens com as adultas (MGBS1 e MGBS1.2), foram observadas maiores concentrações de mangiferina, ácido clorogênico, rutina e cafeína nas folhas jovens em relação às folhas adultas. Este resultado está de acordo com os observados por Bertrand *et al.*, 2003, Campa *et al.*, 2012 e Chaves *et al.*, 2004, que observaram diminuições nos teores de ácido clorogênico, mangiferina e cafeína, respectivamente, nas folhas de café à medida que elas amadureciam.

Os resultados obtidos nesse tópico em relação às amostras de Bom Sucesso e Manhumirim foram publicados no periódico científico **Food Analytical Methods**, no ano de 2016 (TREVISAN *et al.* 2016).

6.3.2.3 Análise quantitativa das amostras de São Paulo

A Tabela 17 apresenta as concentrações de mangiferina, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, rutina e cafeína em g/kg de folhas desidratadas.

Tabela 17- Compostos quantificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas no estado de São Paulo.

Amostra	Compostos quantificados (g/kg)					
	M	ACG1	ACG2	ACG3	R	C
SP1*	9,04	0,51	20,72	0,74	7,35	7,69
SP2*	7,01	0,52	17,26	0,80	5,40	8,34
SP3*	5,04	-	14,43	0,47	4,70	7,14
SP4*	1,22	-	2,87	0,09	1,51	5,72
SP4.2*	2,06	-	4,66	0,19	3,00	5,99
SP5*	2,44	-	4,96	0,18	3,16	6,80
SP5.2*	2,07	-	3,82	0,20	3,10	5,23
SP5.3*	1,75	-	3,80	0,15	2,05	4,70
SP5.4*	3,51	-	5,48	0,15	3,14	7,32
SP6*	10,31	0,36	22,45	0,71	8,11	9,62
SP7**	1,83	-	3,80	0,18	1,43	4,25
SP8**	1,02	-	2,14	0,12	1,00	7,62
SP9**	3,16	-	5,09	0,17	0,27	2,72
SP9.2**	1,42	-	1,52	0,06	0,82	3,60
SP9.3**	3,26	-	6,84	0,29	1,77	6,00
SP9.4**	2,25	-	4,42	0,19	1,98	5,80
SP9.5**	1,05	-	1,64	0,06	0,66	7,01
SP10**	1,42	-	3,39	0,14	1,04	7,97
SP10.2**	1,15	-	2,73	0,11	0,82	5,77
SP10.3**	5,04	-	12,19	0,52	2,73	7,86

M.= mangiferina; ACG1=ácido neoclorogênico; ACG2= ácido clorogênico; ACG3= ácido criptoclorogênico; R= rutina; C= cafeína

* Amostras oriundas de cafeeiros de pequeno porte.

** Amostras oriundas de cafeeiros de grande porte.

Foi observado que a maioria das amostras não apresentou ácido neoclorogênico (salvo três amostras), assim como apresentou baixas concentrações de ácido criptoclorogênico.

A maioria das amostras provindas de cafeeiros de porte baixo apresenta maiores teores de mangiferina, ácido clorogênico, rutina e cafeína quando comparadas com amostras provindas de cafeeiros de grande porte. Uma possível justificativa atribui-se ao fato de que plantas de grande porte possuem maiores copas, deixando-as menos expostas ao sol.

De forma geral, houve uma grande variação nos teores de quatro substâncias: 1,02-10,31 g/kg para mangiferina, 1,52-22,45 g/kg para ácido clorogênico, 0,27-8,11 para rutina e 2,72-9,62 g/kg para cafeína, sendo os valores mais elevados referentes aos encontrados nas folhas provindas do cultivar Caturra Vermelho IAC 477 (SP6). Essa amostra apresentou teor de ácido clorogênico (22,45 g/kg) próximo ao encontrado em folhas de *Ilex paraguariensis* (31,4 g/kg), mais popularmente conhecido como erva-mate. Entretanto, a mesma amostra, além das amostras SP1, SP2 e SP3, apresentou maiores teores de rutina em relação ao encontrado na erva mate (4,30 g/kg). Todas as 20 amostras apresentaram teores menores de cafeína em relação aos encontrados na erva mate (HECK *et al.*, 2008).

Os teores de cafeína observados nas 20 amostras (2,72 -9,62 g/kg) se assemelham aos encontrados em folhas de *C. arabica* coletadas também no Brasil (2,0-8,0 g/kg), em trabalho desenvolvido por Chaves *et al.*, 2013. Duas amostras (SP1 e SP6) apresentaram teores de mangiferina maiores em relação a folhas de *C. arabica* coletadas na África (5,66 g/kg) (CAMPA *et al.*, 2012).

6.3.2.4 Análise quantitativa das amostras da Costa Rica

A Tabela 18 (página 97) apresenta as concentrações de mangiferina, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, rutina e cafeína em g/kg de folhas desidratadas.

Tabela 18- Compostos quantificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas na Costa Rica.

Amostra	Compostos quantificados (g/kg)					
	M.	ACG1	ACG2	ACG3	R.	C.
CR1	0,68	0,11	0,71	0,12	0,10	2,55
CR2	1,19	0,22	2,39	0,25	0,13	5,72
CR3	1,31	0,17,	1,55	0,22	0,36	7,47
CR4	0,78	0,13	1,18	0,17	0,08	5,58
CR5	3,33	0,28	3,22	0,33	0,71	5,02

M.= mangiferin; ACG1=ácido neoclorogênico; ACG2= ácido clorogênico; ACG3= ácido criptoclorogênico; R= rutina; C= cafeína

Foi observado que a amostra CR1 provinda de cafeeiros com baixo tratamento orgânico e sombreado apresentou os menores teores para os seis metabólitos secundários. Já as amostras com tratamento tradicional e expostas a pleno sol (CR3 e CR5) apresentaram as maiores concentrações das cinco substâncias, corroborando mais uma vez com os dados obtidos por Delarozza *et al.*, 2014, que observaram nos espectros de HPLC-UV-DAD dos extratos de folhas de *Coffea arabica* expostas ao sol absorções mais fortes para a cafeína, ácido clorogênico e teobromina.

Também foi observado que a amostra CR5 (Folhas providas de Heredia) apresentou maiores teores de cinco substâncias, principalmente mangiferina e rutina. A altitude e o índice de radiação ultravioleta exercem efeitos sobre o desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários nas plantas, apesar de existirem relativamente poucos estudos neste sentido (NETO; LOPES, 2007), portanto esses fatores podem ser o motivo do resultado observado, já que Heredia fica 512 metros mais elevada do que Turrialba.

Comparando os dados obtidos com os da literatura, a amostra CR5 apresentou maior teor de ácido clorogênico (3,22 g/kg) em relação aos teores encontrados em alimentos funcionais como o chá verde (0,22 g/kg) e o chá preto (0,49 g/kg) e teor comparável ao encontrado nas folhas de *Baccharis genistelloides* (3,60 g/kg), popularmente conhecida como carqueja. Todas as 5 amostras apresentaram menores teores de cafeína em relação aos chás verde (24,1 g/kg) e preto (31,7 g/kg) (MARQUES; FARAH, 2009; TFOUNI *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos nesse tópico foram publicados no jornal científico **Food Analytical Methods**, no ano de 2016 (TREVISAN *et al.* 2016).

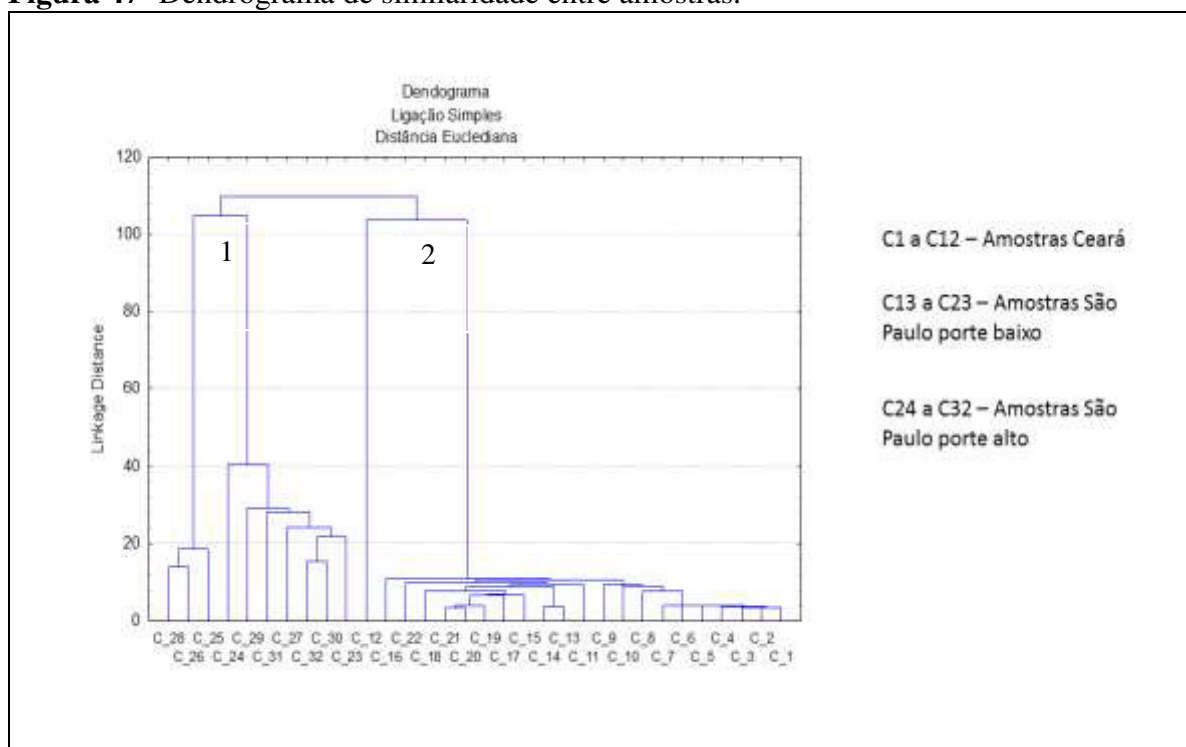
6.3.2.5 PCA- Análise de componentes principais

Além da quantificação de mangiferina, cafeína, rutina e três ácidos clorogênicos, os demais compostos identificados por CLAE-IES-EM neste trabalho também foram quantificados nas folhas de café das quatro localidades (Anexo A).

Com o objetivo de melhor visualizar os dados de quantificação das folhas de café coletadas em diferentes regiões e de cafeeiros de diferentes portes (amostras de São Paulo), e como esses metabólitos podem diferenciar as diferentes amostras, foi realizada a análise de componentes principais-PCA.

Para dar início a análise dos dados, foi realizado um dendrograma (Figura 47).

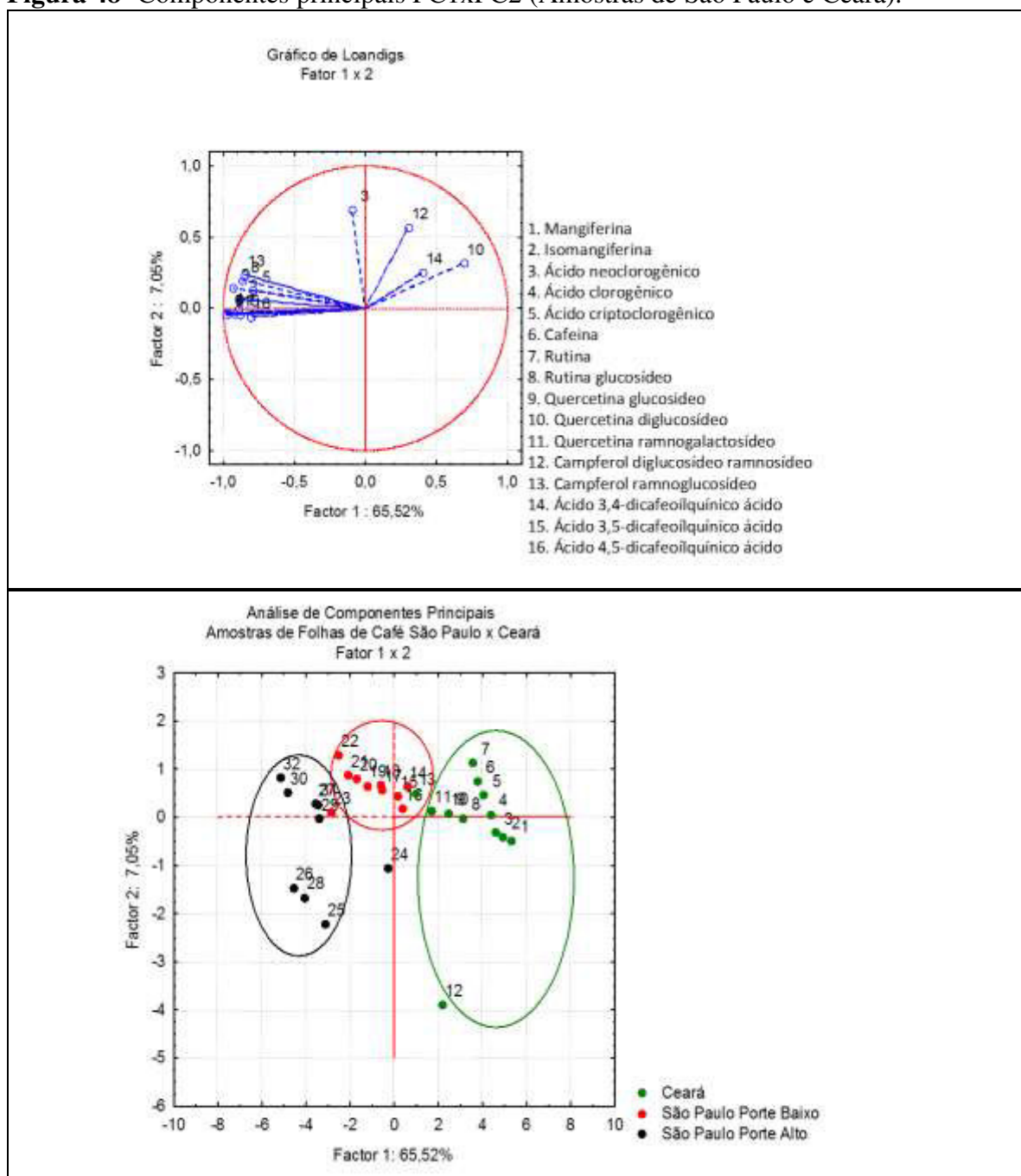
Figura 47- Dendrograma de similaridade entre amostras.



Fonte: F. L. F SILVA.

Foi observada dentro do dendrograma a diferenciação em 4 grupos, em que uma diferenciação clara é observada entre as amostras de São Paulo-porte alto e as demais (Ceará e São Paulo-porte baixo). Uma segunda diferenciação é observada dentro de um mesmo cluster (2), em que é observada a diferenciação das amostras de São Paulo-porte baixo e Ceará. Para melhor observar as diferenciações, foram utilizadas as componentes principais PC1xPC2 (Figura 48).

Figura 48- Componentes principais PC1xPC2 (Amostras de São Paulo e Ceará).



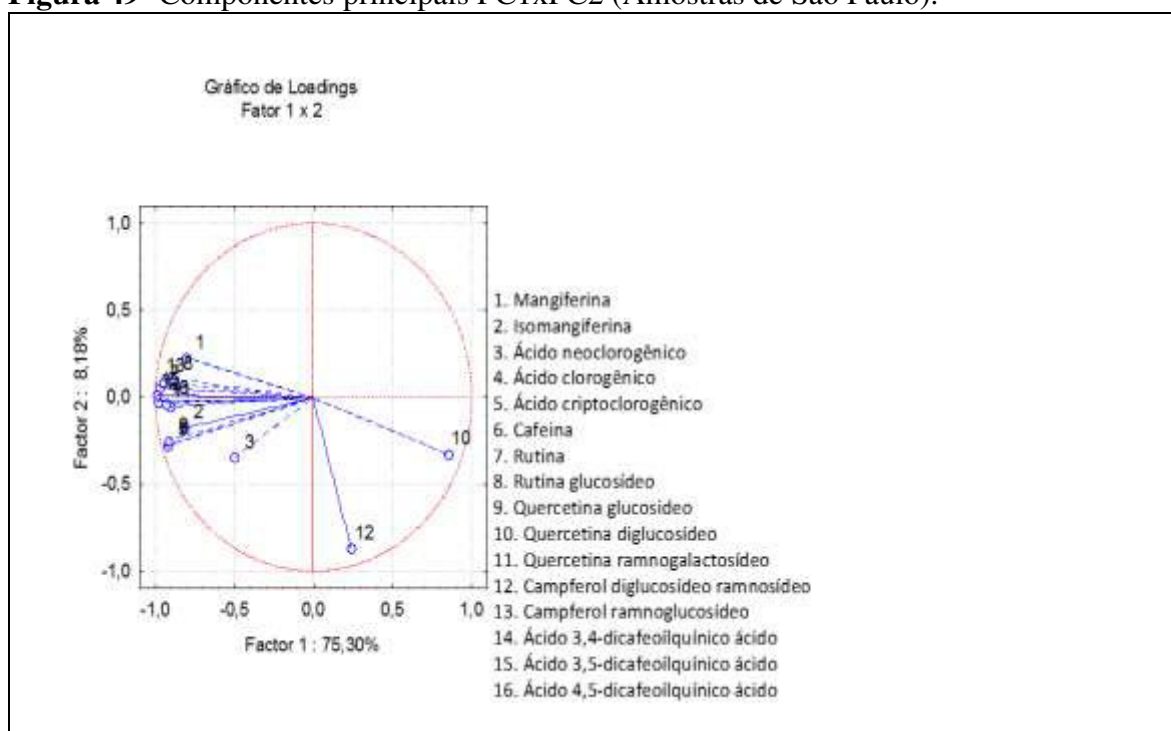
Fonte: F. L. F SILVA

Com a análise dos componentes principais, foi observada a diferenciação em 3 grupos principais, que representam as amostras de São Paulo-porte alto, São Paulo-porte baixo e Ceará. Com o gráfico de *loadings*, é observada a primeira diferenciação entre as amostras de São Paulo e Ceará devido às substâncias 10, 12 e 14 (quercetina-3-*O*-diglicosídeo, caempferol-3-*O*-diglicosídeo ramnosídeo e ácido 3,4-dicafeoilquiníco), que aparecem em maior concentração nas amostras de São Paulo.

Uma vez que as amostras de São Paulo são oriundas de cafeeiros cultivados a pleno sol, isso pode conferir a planta um maior estresse oxidativo (maior índice de radiação UV) e conseqüentemente uma maior produção de metabólitos secundários pela planta, em comparação às amostras do Ceará, que são oriundas de cafeeiros sombreados (menor índice de radiação UV) (NETO; LOPES, 2007). Esses dados corroboram mais uma vez com os obtidos por Delarozza *et al.*, (2014).

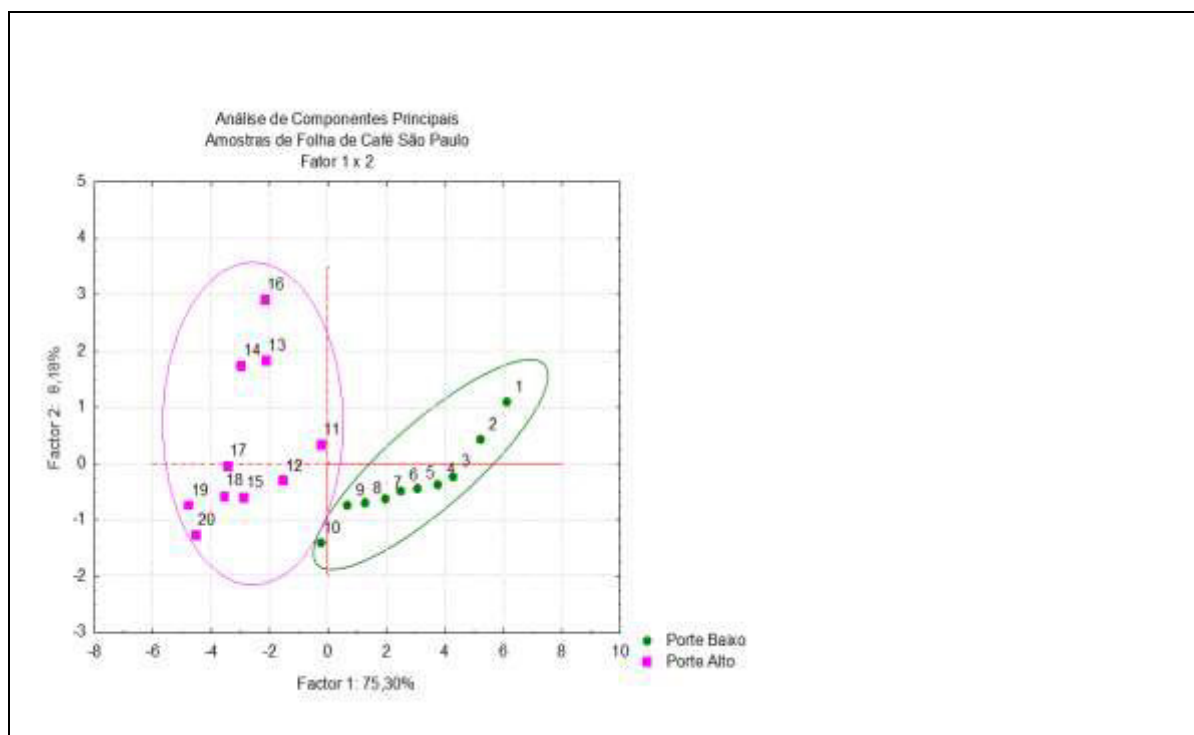
Com o gráfico de *loadings*, também foi possível observar uma segunda diferenciação entre as amostras de São Paulo (porte alto e porte baixo), devido à substância 3, ao ácido neoclorogênico. O composto 3 é observado em baixa concentração e em poucas amostras de São Paulo-porte baixo, então resolveu se excluir as amostras do Ceará e realizar um novo PCA, utilizando um grupo mais homogêneo, como pode ser observado na Figura 49.

Figura 49- Componentes principais PC1xPC2 (Amostras de São Paulo).



Fonte: F. L. F SILVA

Figura 49- Componentes principais PC1xPC2 (amostras de São Paulo). **(Continuação)**



Fonte: F. L. F SILVA

Neste novo PCA, pode-se observar a diferenciação clara em dois grupos, São Paulo-porte alto e São Paulo-porte baixo. Essa diferenciação ocorre devido a dois compostos, 10 e 12 (quercetina-3-*O*-diglicosídeo e caempferol-3-*O*-diglicosídeo ramnosídeo) que aparecem ambos em maior concentração nas amostras de São Paulo-porte baixo. Os cafeeiros de porte baixo devem ser mais suscetíveis a estresse oxidativo em relação aos cafeeiros de porte alto, pois como já dito anteriormente, a maior produção de metabólitos secundários pela planta pode estar associada a um maior estresse oxidativo. Como já dito em tópico anterior, uma possível justificativa atribui-se ao fato que plantas de grande porte possuem maiores copas, deixando a planta menos exposta ao sol.

6.4 Avaliação do potencial antioxidante dos extratos metanólicos de *Coffea arabica* pelos ensaios HX/XO, DPPH, FRAP e ORAC

A capacidade antioxidante dos extratos está diretamente ligada à sua composição química, ao sistema do teste, às condições reacionais e na forma como os resultados são expressos. É influenciado por um grande número de fatores, por este motivo o potencial antioxidante não pode ser avaliado por um único método. Faz-se necessária a avaliação da capacidade antioxidante por vários mecanismos com fundamentos de ação diferentes (FRANKEL; MEYER, 2000).

Os ensaios de avaliação do potencial antioxidante utilizados nesse trabalho de tese atendem a requisitos importantes, como simplicidade, reprodutibilidade intra e interdiária, ter mecanismo químico e ponto final definido, utilizar fonte radical relevante e por ter instrumentação prontamente disponível no laboratório onde foi desenvolvido o trabalho (PRIOR *et al.*, 2005).

O método DPPH foi escolhido por ser um simples, rápido, prático e com boa estabilidade, além de ser vantajoso para amostras solúveis em solventes orgânicos (SUCUPIRA *et al.*, 2012). É um ensaio recomendado por ser preciso para avaliação da capacidade antioxidante de produtos naturais (TOMEI; SALVADOR, 2007). Da mesma forma, o método FRAP trata-se de um ensaio simples, rápido e prático, além de barato, robusto e não requer equipamento especializado. Este ensaio foi originalmente desenvolvido por Benzie and Strain (BENZIE; STRAIN, 1996) para medir atividade antioxidante em plasma, mas posteriormente foi adaptado para o uso em espécies botânicas (PRIOR *et al.*, 2005), outra razão pela qual o método foi utilizado no presente trabalho. O método ORAC não possui a mesma rapidez e praticidade como o método DPPH e FRAP, porém apresenta uma grande vantagem em relação às demais metodologias: os radicais peroxila ou hidroxila são usados como pró-oxidantes, o que confere um maior significado biológico em relação aos outros métodos. Além disso, o método se adapta a amostras com antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Os resultados das análises do potencial antioxidante dos extratos metanólicos são apresentados nos subtópicos seguintes, de acordo com cada localidade (Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica). Como a capacidade antioxidante de um extrato é influenciada por sua composição química, o potencial antioxidante das substâncias puras majoritárias mangiferina, ácido clorogênico, rutina e cafeína também foi avaliado.

6.4.1 Análise do potencial antioxidante das amostras do Ceará

Os extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica* coletadas no Ceará foram analisados quanto ao seu potencial antioxidante pelos ensaios DPPH, FRAP e ORAC e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19- Potencial antioxidante dos extratos metanólicos das amostras do Ceará.

Amostra	DPPH IC ₅₀ (mg/L)	FRAP EC ₁ (mg/L)	ORAC (ORAC-unidades)
CEP1	1986,93	2658,12	0,95
CEG1	805,14	878,47	2,10
CEG2	953,93	1408,86	1,54
CEG3	447,13	1085,33	1,65
CEG4	151,6	482,11	2,87
CEG4.2	456,16	1115,79	1,63
CEG5	527,81	1580,62	1,20
CEG6	345,39	1015,15	1,78
CEG7	348,37	1105,17	1,68
CEM1	332,89	968,53	1,66
CEM2	1826,63	2547,20	0,80
CEM3	407,49	1121,66	1,64

IC₅₀: concentração de cada amostra onde 50% do radical DPPH é capturado.

EC₁: concentração da amostra capaz de fornecer um aumento na leitura de absorvância equivalente àquela obtida com uma solução 1mM de Fe (II).

A amostra CEG4, referente às folhas jovens coletadas em Guaramiranga, foi a que apresentou o maior potencial antioxidante nos três ensaios, o que pode ser atribuído à maior concentração de compostos fenólicos nessa amostra em relação às demais. Em relação ao ensaio DPPH, essa amostra apresentou IC₅₀ = 151,6 mg/L, valor próximo ao encontrado por Morais *et al*, 2009 ao estudar a atividade antioxidante do chá verde (*Camellia sinensis*), o qual apresentou IC₅₀ = 140,0 mg/L para o mesmo ensaio. O chá verde é relatado na literatura com alta atividade antioxidante devido ao seu conteúdo de flavonoides, majoritariamente catequinas (MORAIS *et al*, 2009; WANG; HO, 2009).

Os compostos fenólicos têm despertado grande interesse devido ao seu elevado poder antioxidante, capaz de remover radicais livres, quelar íons metálicos com atividade

redox, modular a expressão gênica e interagir com mecanismos de sinalização celular, sendo atribuída grande parte de sua bioatividade a estas características (RHODES,1996).

Devido à análise HX/XO ser muita extensa, além da grande quantidade de solvente requerida para o teste, este ensaio foi realizado somente com a amostra CEG4, já que a mesma obteve maior potencial antioxidante nos ensaios DPPH, FRAP e ORAC. Os resultados obtidos são apresentados no subtópico 6.4.5, juntamente com os resultados obtidos para as amostras representantes das outras localidades (Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica).

6.4.2 Análise do potencial antioxidante das amostras de Minas Gerais

Os extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica* coletadas em Minas Gerais foram analisados quanto ao seu potencial antioxidante pelos ensaios DPPH, FRAP e ORAC e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20- Potencial antioxidante dos extratos metanólicos das amostras de Minas Gerais.

Amostra	DPPH IC ₅₀ (mg/L)	FRAP EC ₁ (mg/L)	ORAC (ORAC-unidades)
MGBS1	368,64	832,15	1,95
MGBS1.2	729,04	1319,13	1,53
MGM1	1337,89	1493,89	1,41
MGP1	94,81	425,31	3,08
MGP2	103,34	478,44	2,82
MGP2.2	125,91	567,02	2,51
MGP3	94,62	473,09	2,78

IC₅₀: concentração de cada amostra onde 50% do radical DPPH é capturado.

EC₁: concentração da amostra capaz de fornecer um aumento na leitura de absorvância equivalente a aquela obtida com uma solução 1mM de Fe (II).

De forma geral, todas as amostras referentes às folhas coletadas em Perdões (MGP1, MGP2, MGP2.2 e MGP3) apresentaram maior atividade antioxidante em relação às coletadas em Bom Sucesso e Manhumirim, sendo as amostras MGP1 e MGP3, referentes às folhas provindas de cafeeiros com tratamento "quebra vento" e "sem tratamento", respectivamente, as que apresentaram as maiores atividades antioxidante. Todas

as amostras, com exceção a amostra MGM1, apresentaram melhores atividades antioxidantes no ensaio DPPH em relação a amostra de chá preto (*Camellia sinensis*), a qual apresentou $IC_{50} = 960$ mg/L em trabalho desenvolvido por Moraes *et al.*, 2009.

Também foi observado que a amostra MGBS1, referente a folhas jovens, apresentou maior atividade antioxidante em relação à amostra MGBS1.2, referente a folhas velhas do mesmo cafeeiro. O mesmo resultado foi observado anteriormente entre duas amostras coletadas no Ceará.

Uma das duas amostras que obtiveram maior potencial nos três ensaios (MGP1) foi analisada no ensaio HX/XO e os resultados obtidos são apresentados no subtópico 6.4.5.

6.4.3 Análise do potencial antioxidante das amostras de São Paulo

Os extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica* coletadas em São Paulo foram analisados quanto ao seu potencial antioxidante pelos ensaios DPPH, FRAP e ORAC e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21- Potencial antioxidante dos extratos metanólicos das amostras de São Paulo.

Amostras	DPPH IC_{50} (mg/L)	FRAP EC_1 (mg/L)	ORAC (ORAC-unidades)
SP1*	76,53	435,75	2,85
SP2*	246,56	504,13	2,63
SP3*	120,49	367,26	3,40
SP4*	206,37	607,65	2,49
SP4.2*	200,16	659,45	2,38
SP5*	174,57	665,42	2,41
SP5.2*	350,03	1015,58	1,75
SP5.3*	255,14	870,11	1,84
SP5.4*	268,54	860,82	1,93
SP6*	76,42	429,83	3,10
SP7**	341,53	1215,02	1,55
SP8**	219,08	1704,89	2,22
SP9**	821,63	654,33	1,30
SP9.2**	301,26	1168,29	1,36

(continuação)

Amostras	DPPH IC ₅₀ (mg/L)	FRAP EC ₁ (mg/L)	ORAC (ORAC-unidades)
SP9.3**	355,38	1184,42	1,61
SP9.4**	335,35	1186,76	1,72
SP9.5**	883,88	1517,55	1,25
SP10**	600,04	1274,05	1,44
SP10.2**	467,46	1352,52	1,37
SP10.3**	135,38	529,29	2,41

IC₅₀: concentração de cada amostra onde 50% do radical DPPH é capturado.

EC₁: concentração da amostra capaz de fornecer um aumento na leitura de absorvância equivalente àquela obtida com uma solução 1mM de Fe (II).

* Amostras oriundas de cafeeiros de pequeno porte.

** Amostras oriundas de cafeeiros de grande porte.

Foi observado que a amostra SP6, referente às folhas providas do Caturra Vermelho IAC 477, apresentou o maior potencial antioxidante nos três ensaios. Esta amostra apresentou ótima atividade antioxidante no ensaio DPHH (IC₅₀ = 76,4 mg/L), atividade superior em relação a alimentos funcionais como chá verde (IC₅₀= 140,0 mg/L), canela (IC₅₀ = 370,0 mg/mL) cravo (IC₅₀= 460,0 mg/mL), louro (IC₅₀= 760,0 mg/mL) e chá preto (IC₅₀ = 960,0 mg/mL) (MORAIS *et al.*, 2009).

Também foi observado que as amostras providas de cafeeiros de pequeno porte foram as que apresentaram os maiores valores de potencial antioxidante nos três ensaios, o que pode ser atribuído à maior concentração de compostos fenólicos nessas amostras em relação às demais.

A amostra SP6 foi analisada no ensaio HX/XO e os resultados obtidos estão apresentados no subtópico 6.4.5.

6.4.4 Análise do potencial antioxidante das amostras da Costa Rica

Os extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica* coletadas na Costa Rica foram analisados quanto ao seu potencial antioxidante pelos ensaios DPPH, FRAP e ORAC e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22- Potencial antioxidante dos extratos metanólicos das amostras da Costa Rica.

Amostras	DPPH IC₅₀ (mg/L)	FRAP EC₁ (mg/L)	ORAC (ORAC-unids)
CR1	515,94	1453,83	1,54
CR2	492,74	1234,56	1,58
CR3	434,55	1095,61	1,67
CR4	724,09	1251,01	1,49
CR5	895,35	1274,37	1,46

IC₅₀: concentração de cada amostra onde 50% do radical DPPH é capturado.

EC₁: concentração da amostra capaz de fornecer um aumento na leitura de absorvância equivalente àquela obtida com uma solução 1mM de Fe (II).

A amostra CR3, referente às folhas de cafeeiros com tratamento tradicional e plena exposição ao sol, foi a que apresentou maior potencial antioxidante nos três ensaios, entretanto todas as amostras apresentaram resultados semelhantes. Essa amostra foi analisada no ensaio HX/XO e os resultados obtidos estão apresentados no subtópico 6.4.5.

6.4.5 Análise do potencial antioxidante das amostras do Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica pelo ensaio HX/XO

Os extratos metanólicos das amostras CEG4, MGP1, SP6 e CR3 foram analisados quanto aos seus potenciais antioxidantes pelos ensaios HX/XO de acordo de com a metodologia descrita nos procedimentos experimentais desse trabalho e os valores de IC₅₀ em relação à inibição do ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico e à inibição da enzima xantina oxidase são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23- IC₅₀ das amostras CEG4, MGP1, SP6 e CR3 em relação à inibição do ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico e à inibição da enzima xantina oxidase.

Amostras	HX/XO IC₅₀ (µg/mL)	AU IC₅₀ (µg/mL)
CEG4	1608,10	1538,40
MGP1	>2500	444,71
SP6	>2500	571,12
CR3	>2500	>2500

HX/XO IC₅₀- Concentração das amostras capaz de inibir 50% do ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico.

AU- Concentração das amostras capaz de inibir 50% do ácido úrico formados pelas espécies reativas.

>2500- IC₅₀ maior que a concentração máxima testada (2500µg/mL).

Somente a amostra CEG4 apresentou atividade antioxidante no ensaio HX/XO em termos de inibição do ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico. Entretanto essa mesma amostra, assim como as amostras MGP1 e SP6, apresentou atividade de inibição da enzima xantina oxidase.

A Figura 50 compara a inibição do ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico das amostras CEG4, MGP1, SP6 e CR3 em várias concentrações. Já a Figura 51 compara a inibição da atividade da xantina oxidase das amostras CEG4, MGP1, SP6 e CR3 em várias concentrações.

Figura 50- Comparação da inibição do ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico pelos extratos metanólicos das amostras CEG4, MGP1, SP6 e CR3.

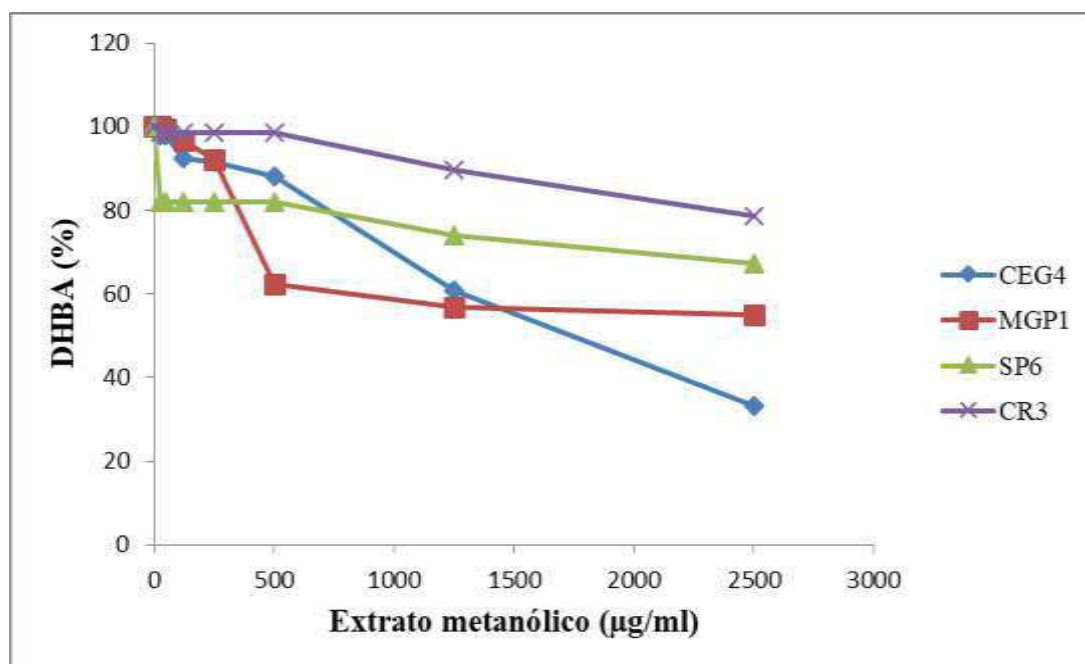
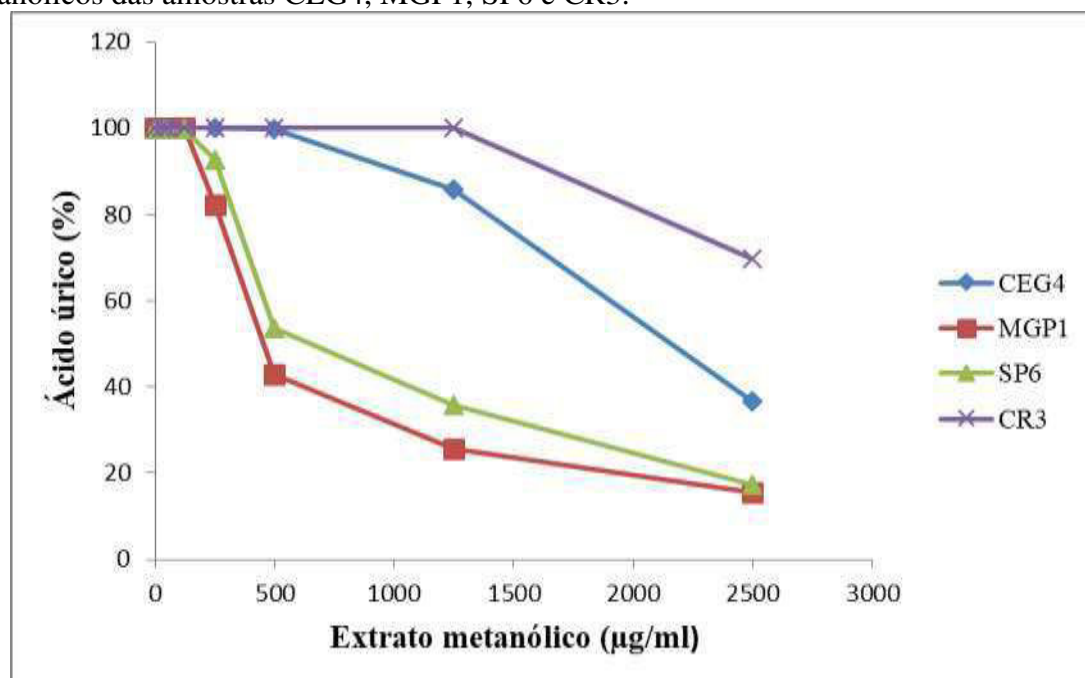


Figura 51- Comparação da inibição da atividade da xantina oxidase pelos extratos metanólicos das amostras CEG4, MGP1, SP6 e CR3.



6.4.6 Análise do potencial antioxidante das substâncias mangiferina, ácido clorogênico, rutina e cafeína pelos ensaios DPPH, FRAP, ORAC e HX/XO

As substâncias mangiferina, ácido clorogênico, rutina e cafeína foram analisadas quanto aos seus potenciais antioxidantes pelos ensaios DPPH, FRAP, ORAC e HX/XO e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 24. A mangiferina apresentou maior potencial nos ensaios DPPH e FRAP, enquanto a rutina apresentou maior potencial antioxidante no ensaio ORAC.

Barreto *et al.*, 2009, encontram resultados diferentes em relação ao composto mangiferina nos ensaios DPPH ($IC_{50} = 0,59 \mu M$), FRAP ($EC_1 = 1.03 \mu M$) e ORAC (12.85 unids), entretanto encontraram resultado semelhante no ensaio HX/XO ($0,47 mM = 198,34 \mu g/mL$).

Os compostos ácido clorogênico e rutina também apresentaram resultados diferentes no ensaio DPPH em trabalhos desenvolvidos por KWEON *et al.*, 2001 e IACOPINI *et al.*, 2008 ($IC_{50} = 12,3 \mu M$ e $IC_{50} = 7,4 \mu M$, respectivamente). Entretanto, Khallouki *et al.*, 2015a, ao avaliar a atividade antioxidante do ácido clorogênico, encontraram resultados semelhantes nos ensaios FRAP e ORAC ($EC_1 = 478,0 \mu M$ e 3,07 unids) aos encontrados no presente trabalho ($EC_1 = 475,53 \mu M$ e 3,10 unids).

Tabela 24- Potencial antioxidante das substâncias mangiferina, ácido clorogênico, rutina e cafeína.

Composto	Ensaio				
	DPPH IC_{50} (μM)	FRAP EC_1 (μM)	ORAC (ORAC-unids)	HX/XO IC_{50} ($\mu g/mL$)	AU IC_{50} ($\mu g/mL$)
Mangiferina	70,04	329,46	3,19	242,41	210,11
Ácido clorogênico	128,22	475,53	3,10	270,15	256,91
Cafeína	Inativo	Inativo	0,30	479,07	Inativo
Rutina	101,74	417,19	4,80	48,26	46,99

IC_{50} : concentração de cada amostra onde 50% do radical DPPH é capturado.

EC_1 : concentração da amostra capaz de fornecer um aumento na leitura de absorbância equivalente àquela obtida com uma solução 1mM de Fe (II).

HX/XO IC_{50} - Concentração das amostras ($\mu g/mL$) capaz de inibir 50% do ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico.

AU IC_{50} - Concentração das amostras capaz de inibir 50% do ácido úrico formados pelas espécies reativas.

6.4.7 Correlações entre os compostos quantificados e atividade antioxidante

As três classes de polifenóis mostraram excelentes correlações com os ensaios antioxidantes, enquanto a cafeína, embora tenha apresentado correlação negativa com os ensaios DPPH e FRAP, apresentou fraca correlação com a capacidade antioxidante no teste ORAC (Tabela 25).

Tabela 25- Correlação entre o teor de mangiferinas totais (mangiferina + isomangiferina), flavonoides, ácidos clorogênicos e cafeína (g/kg) em folhas de café e a capacidade para eliminar os radicais DPPH e peróxido (teste ORAC), bem como reduzir ferro (III) para ferro (II) (ensaio FRAP).

Compostos fenólicos	DPPH	FRAP	ORAC
Mangiferinas	-0,55 (p < 0,001)	-0,69 (p < 0,0001)	0,71 (p < 0,0001)
Flavonoides	-0,57 (p < 0,001)	-0,60 (p < 0,001)	0,65 (p < 0,0001)
Ácidos clorogênicos	-0,52 (p < 0,01)	-0,69 (p < 0,0001)	0,74 (p < 0,0001)
Ácidos dicafeoil quínicos	-0,44 (p < 0,01)	-0,54 (p < 0,001)	0,61 (p < 0,001)
Ácidos clorogênicos totais	-0,55 (p < 0,001)	-0,67 (p < 0,0001)	0,73 (p < 0,0001)
Fenólicos totais	-0,55 (p < 0,001)	-0,66 (p < 0,0001)	0,70 (p < 0,0001)
Cafeína	-0,08	-0,14	0,34 (p < 0,05)

Esses dados são inteiramente consistentes com relatos da literatura sobre os compostos individuais: ácidos clorogênicos (KHALLOUKI *et al.*, 2015a), flavonoides (KHALLOUKI *et al.*, 2015b), xantonas (BARRETO *et al.*, 2008) e cafeína (ATAWODI *et al.*, 2007). Além disso, as correlações entre os três diferentes testes antioxidantes aplicados também foram excelentes (Tabela 26).

Tabela 26- Correlação entre os ensaios antioxidantes.

Ensaio antioxidante	Correlação
DPPH vs FRAP	r = 0,84 (p < 0,0001)
FRAP vs ORAC	r = -0,82 (p < 0,0001)
DPPH vs ORAC	r = -0,71 (p < 0,0001)

6.5 Ensaio de inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA)

Produtos naturais têm ganhado importância na procura de fitoterápicos com atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA), ou seja, com atividade antihipertensiva. Várias classes de compostos oriundos de plantas foram identificadas como possuindo atividade inibidora da ECA, como taninos hidrolisáveis, fenilpropanoides, proantocianidinas, flavonoides, xantonas, ácidos graxos, terpenoides, alcaloides, oligossacarídeos, peptídeos/aminoácidos, entre outros (NYMAN *et al.*, 1998).

A hipertensão, uma das doenças mais comuns em todo o mundo, é uma doença crônica em que a pressão sanguínea elevada pode afetar a saúde. Essa doença está associada a vários fatores de risco, como acidentes vasculares cerebrais, doenças do coração, insuficiência renal e aneurisma (GUYTON; HALL, 2006). A ECA é peça chave no controle da pressão sanguínea: o sistema renina-angiotensina, que controla o volume extracelular e a vaso-constricção arterial (GANTEN *et al.*, 1984). A ECA é um decapeptídeo que pode aumentar a pressão arterial através da conversão da angiotensina I no potente vasoconstritor angiotensina II (octapeptídeo) e pela degradação de um peptídeo hipotensor, a bradicinina (OWEN *et al.*, 1956). Por isso, a inibição da atividade da ECA é considerada uma abordagem terapêutica útil contra a hipertensão. Além disso, descobertas recentes mostram que IECAs podem ser utilizados no tratamento do câncer e que evitam a angiogênese, podendo também ser utilizados como quimiopreventivos no tratamento do câncer (ARAFAT *et al.*, 2007; HERR *et al.*, 2008).

O ensaio de inibição de enzima conversora de angiotensina I foi realizado com oito extratos metanólicos, dois extratos representando cada localidade (Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica). O ensaio também foi realizado com as substâncias puras mangiferina, ácido clorogênico, rutina e cafeína. A Tabela 27 apresenta as taxas de conversão do substrato hipuril-histidil-leucina em ácido hipúrico pela ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA), na presença das amostras e substâncias testadas.

Tabela 27- Taxas de conversão do substrato hipuril-histidil-leucina em ácido hipúrico pela ação da enzima conversora de angiotensina I na presença das amostras e substâncias testadas.

Amostra	Taxa de conversão (%)
Controle negativo	65,64
CEG1	55,20
CEG4	66,32
MGP1	63,72
MGP4	55,66
SP1	68,75
SP6	59,54
CR1	73,06
CR3	69,76
Mangiferina	56,55
Ácido Clorogênico	68,41
Rutina	60,90
Cafeína	65,12

Para amostras que apresentem inibição de ECA maior que 60%, faz-se necessário o cálculo do índice de inibição de 50% da ECA (IC_{50}). No caso do controle positivo (Captopril), o composto apresentou $IC_{50} = 8,86$ nM. Esse valor é um pouco maior do que o encontrado por Lahogue *et al.*, 2010 ($IC_{50} = 1,75$ nM) e Vermeirssen *et al.*, 2002 ($IC_{50} = 1.56$ nM). Nenhum dos extratos de folhas de café testados ou substâncias puras apresentaram inibição da ECA maior que 60%. Entretanto, foi possível observar que as amostras CEG1, MGP4 e SP6, além da substância mangiferina, apresentaram maior inibição da ECA quando comparadas ao controle negativo, porém essa atividade não é considerada significativa quando comparada ao controle positivo.

6.6 Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A doença de Alzheimer (AD) é uma patologia progressiva que atualmente não há cura, embora inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) proporcionem uma melhora temporária efetiva dos sintomas em alguns pacientes (JUNIOR *et al.*, 2004). A AChE está envolvida na interrupção da transmissão do impulso nervoso, através de hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina em numerosas vias colinérgicas, nos sistemas nervosos central e

periférico. A inibição da enzima (que pode ser induzida pelos inibidores) conduz à acumulação de acetilcolina no processo de sinapse e conseqüentemente diminuição na progressão dos sintomas da doença (DOOLEY; LAMB, 2000).

O teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado com quatro extratos metanólicos, um extrato representando cada localidade (Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica). Na avaliação qualitativa anticolinesterásica, o aparecimento de halos em tornos dos "spots" das amostras é indicativo de que ocorreu a inibição da enzima AChE. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28- Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos metanólicos de *Coffea arabica*.

Amostra	Tamanho do halo (mm)	Atividade anticolinesterásica
Controle	9	(+)
CEG4	---	(-)
MGP1	---	(-)
SP6	----	(-)
CR3	---	(-)

De acordo com os resultados obtidos, nenhum dos extratos apresentou atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase quando comparados ao controle.

7 CONCLUSÕES

O estudo químico dos extratos metanólicos e infusões das folhas de *Coffea arabica* coletadas no Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica, e da amostra comercial, com a utilização da técnica CLAE-DAD-IES-EM permitiu a identificação de 16 substâncias: Ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, mangiferina, isomangiferina, cafeína, quercetina-3-*O*-glucosídeo, rutina, rutina glucosídeo, quercetina-3-*O*-diglucosídeo, campferol-3-*O*-diglucosídeo ramnosídeo, quercetina-3-*O*-ramnogalactosídeo, campferol-3-*O*-ramnoglucosídeo, sendo que as cinco últimas descritas nunca foram relatadas anteriormente na literatura no gênero *Coffea*. Com a utilização das técnicas de extração em fase sólida (SPE) e CLAE-SP, foi possível isolar os compostos rutina, rutina glucosídeo, quercetina-3-*O*-glucosídeo e quercetina-3-*O*-diglucosídeo, os quais tiveram suas estruturas elucidadas com a técnica de RMN de ^1H e ^{13}C .

A liberação de mangiferinas totais (mangiferina e isomangiferina) do pó de folha de café em infusão mostrou-se fortemente dependente da temperatura, apresentando-se praticamente instantânea (após apenas um minuto) em água fervente, com extração de 53% em comparação com a extração a quente com metanol (soxhlet), sem aumento após 30 minutos.

A quantificação dos compostos mangiferina, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, rutina e cafeína nas folhas de *Coffea arabica* coletadas no Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica permitiu verificar que a produção de metabólitos secundários nas folhas é influenciada por vários fatores, como exposição à radiação solar, fatores mecânicos, adubação do solo, altitude do terreno e idade da folha. Apesar da diferenciação de grupos observada no PCA, é necessária uma maior quantidade de amostra para se inserir uma maior quantidade de resultados.

Os extratos metanólicos das folhas de *Coffea arabica* coletadas no Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Costa Rica apresentaram atividade antioxidante nos ensaios DPPH, FRAP e ORAC, assim como as substâncias puras mangiferina, ácido clorogênico e rutina. No ensaio HX/XO, as quatro amostras testadas (representando as quatro localidades) apresentaram maior potencial em inibir a enzima xantina oxidase do que potencial em inibir o ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico. As três classes polifenólicas mostraram excelentes correlações com os ensaios antioxidantes DPPH, FRAP e ORAC, enquanto a cafeína apresentou correlação negativa com os ensaios DPPH e FRAP e fraca correlação com

o ensaio ORAC. Nenhum extrato metanólico ou substância pura testada apresentou inibição da enzima conversora de angiotensina I maior que 60%, ou seja, nenhuma amostra apresentou atividade significativa para este ensaio.

Nenhum dos extratos metanólicos apresentou atividade anticolinesterásica.

Uma vez que poucos estudos relatam a composição química e o potencial farmacológico de folhas de *Coffea arabica*, o presente estudo contribui para a literatura com um estudo aprofundado das folhas de *Coffea arabica* coletadas no Brasil. Além disso, o presente estudo revelou que o chá de folhas de café pode ser uma excelente bebida funcional, contendo muitos compostos polifenólicos com potencial de exercerem efeitos biológicos positivos, como a alta atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHEEM, I. T. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s.l.], v. 107, n. 3, p. 742–750, 2010.
- AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids: Studies in Organic Chemistry** 39. Amsterdã: Elsevier, 1989, 580 p.
- ALMEIDA, R.F.; ULRICH, C.M.; OWEN, R. W.; TREVISAN, M.T.S. Content and Solvent Extraction in Coffee Leaves from Brazil. *In: Proceedings of ASIC Conferences, 09, 2014, Centro Cultural Metropolitano de Convenciones del Quindío. Anais [...].* Armenia, 2014. P. 42- 45. Disponível em: <https://www.asic-cafe.org/conference/25th-international-conference-coffee-science/content-and-solvent-extraction-coffee>. Acesso em 12 de jan. 2017.
- ALONSO-SALCES R.M.; GUILLOU C.; BERRUETA L.A.; Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionisation, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry for the on-line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.363–383, 2009.
- AQUINO, R.; BEHAR, I.; D'AGOSTINO, M.; DE. SIMONE, F.; SCHETTINO, O.; PIZZA, C. Phytochemical Investigation on *Mercurialis annua*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Grã-Bretanha, v. 15, n. 6, p. 667–669, 1987.
- ARAFAT H.A., Q. GONG, G. CHIPITSYNA, A. RIZVI, C. T. SAA, C. J. YEO. Antihypertensives as Novel Antineoplastics: Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Journal of the American College of Surgeons**, [s.l.], v. 204, n. 5, p. 996-1005, 2007.
- ASHIHARA, H.; MONTEIRO, A.M.; GILLIES, F.M.; CROZIER A. Biosynthesis of Caffeine in Leaves of Coffee Plant *Physiol. Plant Physiology*, [s.l.], v. 111, n. 3, p. 747-753, 1996.
- ATAWODI, S. E., PFUNDSTEIN, B., HAUBNER, R., SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H., & OWEN, R. W. Content of polyphenolic compounds in the Nigerian stimulants *Cola nitida* ssp. *alba*, *Cola nitida* ssp. *rubra* A. Chev, and *Cola acuminata* Schott & Endl and their antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washigton, v. 55, n. 24, p. 9824–9828, 2007.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 608 p.
- BARRETO, J. C.; TREVISAN, M. T. S.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; DE BRITO, E. S.; PFUNDSTEIN, B.; WUERTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R.W. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washigton, v. 56, n. 4, p. 5599- 5610, 2008.
- BASILIO, F.S.; BONFIM, M.V.J.; ALMEIDA, R.J.; ABRANTES, S.M.P. Intralaboratory validation of an analytical method for determining the migration of bis(2-ethylhexyl) adipate

from packaging to fat foods. **Accreditation and Quality Assurance**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 195–204, 2014.

BELGUIDOUM, K.; AMIRA-GUEBAILIA, H.; BOULMOKH, Y.; HOUACHE, O. HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 1314-1320, 2014.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERTRAND, C.; NOIROT, M.; DOULBEAU, S.; DE KOCHKO, A.; HAMON, S.; CAMPA, C. Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae*. Qualitative comparison with leaves. **Plant Science**, [s.l.], v. 165, n. 1, p.1355–1361, 2003.

BRIDSON, D. M. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). **Kew Bulletin**, [s.l.], v. 42, n. 2, p. 453–460, 1987.

CAMPA, C.; MONDOLOT, L.; RAKOTONDRAVAO, A.; BIDEL, L.P.; GARGADENNEC, A.; COUTURON, E.; LA FISCA, P.; RAKOTOMALALA, J.J.; JAY-ALLEMAND, C., DAVIS, A.P. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 110, n. 3, p. 595-613, 2012.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 51, n.1, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, A. C.; GUEDES, M. M.; DE SOUZA, A. L.; TREVISAN, M. T.; LIMA, A. F.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthonoid from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. **Planta Medica**, [s.l.], v.73, n. 13, p.1372-1376, 2007.

CHAVES, J. C. D.; MIYAZAWA, M.; BLOCH, M. F. M. YAMAKI, J. K. Estimativa do teor de cafeína nas sementes de café baseada na sua concentração nas folhas de mudas e de plantas adultas. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 03, p. 287-292, 2004.

CLIFFORD, M.N.; JOHNSTON, K.L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Whashington, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, 2003.

COSTE, R. **Les caféiers et les cafés dans le monde**. Paris: Larose, 1955, 381p.

CUSHMAN, D.W, CHEUNG, H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, Grã-Bretanha v.20, n. 1, p. 1637-1648, 1971.

DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M. F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v. 167, n. 1, p. 357–377, 2011.

DE BEER, D.; JOUBERT, E. Development of HPLC method for *Cyclopia subternata* phenolic compound analysis and application to other *Cyclopia* spp. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 23, n. 3, 289-297, 2010.

DELAROZA, F.; RAKOCEVIC, M.; MALTA, G. B.; BRUNSC, R. E.; SCARMINIO, I. S. Spectroscopic and Chromatographic Fingerprint Analysis of Composition Variations in *Coffea arabica* Leaves Subject to Different Light Conditions and Plant Phenophases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 25, n. 11, p. 1929-1938, 2014.

DELPRETE, P.G.; JARDIM, J.G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges, **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 1, p. 101-128, 2012.

DOOLEY, M.; LAMB, H. M. Donepezil: a review of its use Alzheimer's disease. **Drugs & Aging**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 199-226, 2000.

DUTRA, L. M. U.; CAVALCANTE, I. M.; BRITO, D. H. A.; VIEIRA, Í. G. P.; TREVISAN, M.T. S.; RIBEIRO, M. E. N. P., YEATES, S. G.; RICARDO, N. M. P. S. Synergistic Effect in Drug Solubility by New Binary Micelles of Poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) and F127[®]. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v.28, n. 7, p 1341- 1346, 2017.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY K. D.; ANDRES V. JR.; FEATHERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Grã-Bretanha, v.7, n. 1, p. 88-95, 1961.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FARAH, A.; PAULIS, T.; TRUGO, L.C.; MARTIN, P.R. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washigton, v. 53, p. 1505-1513, 2005.

FELBERG, I., FARAH, A., MONTEIRO, M. C., GODOY, R. L. DE O., PACHECO, S., CALADO, V., & DONANGELO, C. M. Effect of simultaneous consumption of soymilk and coffee on the urinary excretion of isoflavones, chlorogenic acids and metabolites in healthy adults. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 688–699, 2015.

FERNANDES, F.L.; PICANÇO, M.C.; GONTIJO, P.C. FERNANDES, E.S.; PEREIRA, E.J.G.; SEMEAO, A.A. Induced responses of *Coffea arabica* to attack of *Coccus viridis* stimulate locomotion of the herbivore. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s.l.], v. 139, n. 1, p. 120–127, 2011.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 80, n. 1, p.1925-1941, 2000.

GANTEN, D.; UNGER, T., & LANG, R. E. Pharmacological interferences with the renin-angiotensin system. **Arzneimittel-Forschung**, [s.l.], v. 34, n. 10, p. 1391–1398, 1984.

GARCIA, D.; ESCALANTE, M.; DELGADO, R.; UBEIRA, F. M.; LEIRO, J. Anthelmintic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components Vimang and mangiferin. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v.17, n.10, p.1203-1208, 2003.

GIDAY, M., ASFAW, Z., & WOLDU, Z. Ethnomedicinal study of plants used by Sheko ethnic group of Ethiopia. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 132, n.1, p. 75–85, 2010.

GULPINAR, A. R., ERDOGAN ORHAN, I., KAN, A., SENOL, F. S., CELIK, S. A., & KARTAL, M. Estimation of *in vitro* neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. **Food Research International**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 536–543., 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006, 1264 p.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^a ed. Oxford University Press, 2007, 851 p.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, V. G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washigton, v.56, n. 18, p.8394-8403, 2008.

HERR D., M. RODEWALD, H.M. FRASER, G. HACK, R. KONRAD, R. KREIENBERG, C. WULFF. Potential role of Renin–Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer. **Gynecologic Oncology**, [s.l.], v.109, n. 3, p.418-425, 2008.

HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J. A., & PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 16, p. 4437–4444, 2002.

HUBER, W. Basic calculations about the limit of detection and its optimal determination. **Accreditation and Quality Assurance**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 213–217, 2003.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 21, n.8, p. 589–598, 2008.

JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. Radioprotection by mangiferin in DBAxC57BL mice: a preliminary study. **Phytomedicine**, [s.l.], v.12, n.3, p.209-215, 2005.

JESZKA-SKOWRON, M.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. **European Food Research and Technology**, [s.l.], v. 240, n. 1, p.19-31, 2014.

- JUNG-MENDAÇOLLI, S.L. (coord.) Rubiaceae. *In*: MELHEM, T.S., WANDERLEY, M.G.L., MARTINS, S.E., JUNG-MENDAÇOLLI, S.L., SHEPHERD, G.J., KIRIZAWA, M. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto Botânica, 2007, 2007, p. 259.
- JUNIOR, A.P.D.; SHIMIZU, M.M.; 1, MOURA, J.C.M.S.; CATHARINO, R.R.; RAMOS, R.A.; RIBEIRO, R.V. MAZZAFERA, P. Looking for the Physiological Role of Anthocyanins in the Leaves of *Coffea arabica*. **Photochemistry and Photobiology**, [s.l.], v. 88, n. 4, p. 928-937, 2012.
- JUNIOR, C.V.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.
- KHALLOUKI, F.; HAUBNER, R.; HULL, W.E.; ERBEN, G., SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R.W. Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of *Anisophyllea dichostyla* R. Br. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.472-485, 2007.
- KHALLOUKI, F., HAUBNER, R., RICARTE, I., ERBEN, G., KLIKA, K.D., ULRICH, C. M., & OWEN, R. W. Identification of polyphenolic compounds in the flesh of Argan (Morocco) fruits. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 179, n. 1, p. 191–198, 2015b.
- KHALLOUKI, F., SELLAM, K., KOYUN, R., RICARTE, I., ALEM, C., ELRHAFARI, L., & OWEN, R. W. Phytoconstituents and *in vitro* Evaluation of Antioxidant Capacities of *Cotula Cinerea* (Morocco) Methanol Extracts. **Records of Natural Products**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 572-575, 2015a.
- KOKOTKIEWICZ, A.; LUCZKIEWICZ, M. Honeybush (*Cyclopia sp.*) – A rich source of compounds with high antimutagenic properties. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 3-11, 2009.
- KUFA, T; BURKHARDT, M.J. Plant composition and growth of wild *Coffea arabica*: Implications for management and conservation of natural forest resources. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, [s.l.], v. 3, n.4, p. 131-141, 2011.
- KWEON, M.; HWANG, H.; SUNG, H. Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 10, p. 4646–4655, 2001.
- KY, C.-L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 75, n. 2, p.223-230, 2001.
- LAHOGUE, V.; RÉHEL, K.; TAUPIN, L.; HARAS, D.; ALLAUME, P. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 118, n. 3, p. 870-875, 2010.
- LAMORDE, M.; TABUTI, J.R.S.; OBUA, C.; KUKUNDA-BYOBONA, C; LANYERO, H.; BYAKIKA-KIBWIKI, P.; BBOSA, G. S.; LUBEGA, A.; OGWAL-OKENG, J.; RYAN, M.; WAAKO, P.J., MERRY C. Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the

treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 130, n. 1, p. 43-53, 2010.

LIU, H.; MOU, Y.; ZHAO, J.; WANG, J.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, D.; HAN, J.; YU, Z.; YANG, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. **Molecules**, [s.l.], v. 15, n. 11, p. 7933–7945, 2010.

LI, Y.-L.; LI, J.; WANG, N.-L.; YAO, X.-S. Flavonoids and a New Polyacetylene from *Bidens parviflora* Willd. **Molecules**, [s.l.], v. 13, n. 8, p. 1931–1941, 2008.

LIN, Y-S; TSAI, Y-J; TSAY, J-S; LIN, J-K. Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washigton, v. 51, n. 7, p. 1864-1873, 2003.

MAGALHAES, S.T.V.; FERNANDES, F. L.; DEMUNER, A. J.; PICANCO, M. C.; GUEDES, R.N.C. Leaf Alkaloids, Phenolics, and Coffee Resistance to the Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of Economic Entomology**, [s.l.], v.103, n. 4, p. 1438-1443, 2010.

MAHMOUD, A. M. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, [s.l.], v. 64, n. 7, p. 783–789, 2012.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1370–1376, 2009.

MATUTE, A. C.; SANCHEZ, G. M. V.; CAMPOS, E. R.; ALBERTI, A. E.; GOTTLIEB, M., IBARRETXE, B. G. Food products for treating and preventing neurodegenerative diseases and ageing symptoms, contain morin or mangiferin. Spanish patent, ES2277567-A1 WO2007077279-A1, 2007.

MOHAMMED, M.J.; AL-BAYATI, F.A. Isolation, identification and purification of caffeine from *Coffea arabica* L. and *Camellia sinensis* L.: A combination antibacterial study. **International Journal of Green Pharmacy**, [s.l.], v.3, n.1, p. 52-57, 2009.

MONDOLOT, L.; FISCA, P.; BUATOIS, B.; TALANSIER, E.; KOCHKO, A.; CAMPA, C. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. **Annals of Botany**, [s.l.], v.98, n. 1, p.33-40, 2006.

MONTEIRO, M.C.; FARAH, A. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 134, n. 1, p.611-614, 2012.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

MORAIS, T. C.; LOPES, S. C.; CARVALHO, K. M. M. B.; ARRUDA, B. R.; SOUSA, F. T. C.; TREVISAN, M. T. S.. Mangiferin, a natural xanthone accelerates gastrointestinal transit in mice involving cholinergic mechanism. **The World Journal of Gastroenterology**, Rockville Pike, v.18, n. 25, p.3207-3214, 2012.

NETO, L.G. & LOPES. Plantas Mediciniais: Fatores de Influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

NYMAN, U.; JOSHI, P.; MADSEN, L.B.; PEDERSEN, T.B; PINSTRUP, M.; RAJASEKHARAN, S.; GEORGE, V.; PUSHPANGADANA, P. Ethnomedical information and *in vitro* screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v.60, n.3, p. 247-263, 1998.

OLIVEIRA, V.M.; ALDRIGHI, J.M.; RINALDI, J.F. Quimioprevenção do câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v.52, n.6, p. 453-459, 2006.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ (OIC), 2015. Anuall review. [<http://www.ico.org/documents/cy2016-17/annual-review-2015-16-e.pdf>]. Acessado em 25/03/2018.

OWEN, R.W.; GIACOSA, A.; HULL, W.E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSH, H. The antioxidant/anticancerpotential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, [s.l.], v.36, n.10, p.1235-1247, 2000.

OWEN, R.W.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Generation of reactive oxygen species *by the* faecal matrix. **Gut**, [s.l.], v. 46, n.2, p. 225–232, 2000.

OWEN, R.W. SKEGGS, L.T.; KAHN, J.E.; SHUMWAY, N.P. The preparation and function of the angiotensin I-converting enzyme. **Journal of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 103, n. 3, p. 295–299, 1956.

PASHIKANTI, S., DE ALBA, D. R., BOISSONNEAULT, G. A., & CERVANTES-LAUREAN, D. Rutin metabolites: Novel inhibitors of nonoxidative advanced glycation end products. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 48, n. 5, p. 656–663, 2010.

PATAY, É. B., NÉMETH, T., NÉMETH, T. S., FILEP, R., VLASE, L., & PAPP, N. Histological and phytochemical studies of *Coffea benghalensis* B. Heyne ex Schult., compared with *Coffea arabica* L. **Farmacia**, [s.l.], v. 64, n. 1, p. 125–130, 2016.

PFUNDSTEIN, B., EL DESOUKY, S. K., HULL, W. E., HAUBNER, R., ERBEN, G., & OWEN, R. W. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 71, n. 10, p. 1132–1148, 2010.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PUANGPRAPHANT, S.; MEJIA, E.G. Saponins in Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and Quercetin Synergistically Inhibit iNOS and COX-2 in Lipopolysaccharide-Induced Macrophages through NFKB Pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washigton, v.57, n. 59, p. 8873-8883, 2009.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washigton, v. 48, n. 8, p.3396–3402, 2000.

RAJENDRAN, P.; EKAMBARAM, G.; SAKTHISEKARAN, D. Effect of mangiferin on benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in experimental Swiss albino mice. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 22, n.8, p.672-680, 2008.

RAJU, K. I. & GOPAL, N. H. Distribution of caffeine in arabica and robusta coffee plants. **Journal of Coffee Research**, [s.l.], v. 9, n.1, p. 83-90, 1979.

RAO, V. S.; CARVALHO, A. C.; TREVISAN, M. T.; ANDRADE, G. M.; NOBRE-JUNIOR, H. V.; MORAES, M. O.; MAGALHAES, H. I.; MORAIS, T. C.; SANTOS, F. A. Mangiferin ameliorates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity and oxidative stress in ketamine model of schizophrenia. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v.64, n.4, p.848-856, 2012.

RASOOL, M.; SABINA, E. P.; MAHINDA, P. S.; CLARA-GNANASELVI, B. Mangiferin, a natural polyphenol protects the hepatic damage in mice caused by CCl₄ intoxication. Comparative. **Comparative Clinical Pathology**, [s.l.], v.21, n. 5, p.865-872, 2012.

REGAZZONI, L., SALIGARI, F., MARINELLO, C., ROSSONI, G., ALDINI, G., CARINI, M., & ORIOLI, M. Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass spectrometric profiling of components and antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v.20, n. 1, p. 472–485, 2016.

REGO, M.T. **Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso, frações e compostos identificados nos frutos de Hancornia Speciosa Gomes (Apocynaceae)**. 2015. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

RHEE, I.K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, [s.l.], v.915, n. 1-2, p.217-23, 2001.

RHODES, M. J. C. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview **Proceedings of the Nutrition Society**, [s.l.], v. 55, n. 1B, p. 371-397, 1996.

RIVERA, D. G.; BALMASEDA, I. H.; LEON, A. A.; HERNANDEZ, B. C.; MONTIEL, L. M.; GARRIDO, G. G.; CUZZOCREA, S.; HERNANDEZ, R. D. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, [s.l.], v.58, n.3, p.385-392, 2006.

RODRIGUES, N.P.; BRAGAGNOLO, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC-DAD-MSⁿ. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v.32, n. 2, p.105-115, 2013.

ROSS, I.A. **Medicinal plants of the world: Chemical Constituents, Traditional and Modern**. New Jersey: Humana Press Inc, 2005, 623 p.

- SANTOS, N.S.; CASTANHA, R.F.; HABER, L.; MARQUES, M.M.; SCRAMIN, S.; MELO, I.S. Metodologia Científica: Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. **Technical Report**, Jaguariúna, v. 1, p. 1-5, 2011.
- SATISH RAO, B. S.; SREEDEVI, M. V.; NAGESHWAR, R. B. Cytoprotective and antigenotoxic potential of mangiferin, a glucosylxanthone against cadmium chloride induced toxicity in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v.47, n.3, p.592-600, 2009.
- SEUTTER VON LOETZEN, C.; HOFFMANN, T.; HARTL, M. J.; SCHWEIMER, K.; SCHWAB, W.; RÖSCH, P.; HARTL-SPIEGELHAUER, O. Secret of the major birch pollen allergen Bet v 1: identification of the physiological ligand. **Biochemical Journal**, Grã-Bretanha, v. 457, n. 3, p. 379–390, 2014.
- SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.
- SILVA, C.T.; JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 66, n.1, p. 38-42, 2014.
- SILVA, J.P.; AREIAS, F.M.; PROENÇA, F.M.; COUTINHO, O.P. Oxidative stress protection by newly synthesized nitrogen compounds with pharmacological potential. **Life Sciences**, [s.l.], v. 78, n. 11, p. 1256 – 1267, 2006.
- SILVAROLLA, M.B.; BERNADETE, M.; MAZZAFERA, P.; LIMA, M.M.A. Caffeine content of Ethiopian *Coffea arabica* beans. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 213-215, 2000.
- SMALL, E. **Top 100 food plants: The World's Most Important Culinary Crops**. Ottawa: NRC Press, 2009, 636 p.
- SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de Plantas Medicinais Brasileiras**. 2º ed. Fortaleza: Editora UFC, 2004, 445p.
- SOUZA, A.M.; POPPI, R.J. Teaching experiment of chemometrics for exploratory analysis of edible vegetable oils by mid infrared spectroscopy and principal component analysis: a tutorial. part I, **Química Nova**, São Paulo, v.35, n. 1, 2012.
- SOUZA, F.F; SANTOS, J.C.F.; COSTA J.N.M.; SANTOS, M.M. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004, 21 p.
- TANG, S.Y.; WHITEMAN, M.; PENG, Z. F.; JENNER, A.; YONG, E. L.; HALLIWELL, B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional chinese medicines. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v.36, n.12, p.1575-1587, 2004.

TALAMOND, P.; MONDOLOT, L.; KOCHKO, A. G. A.; HAMON, S.; FRUCHIER, A.; CAMPA, C. First report on mangiferin (C-glucosyl-xanthone) isolated from leaves of wild coffee plant, *Coffea pseudozanguebariae* (Rubiaceae). **Acta Botanica Gallica**, [s.l.], v. 155, n. 4, p. 513-519, 2008.

TAO, C.; HUA, Z.; JIARUI, C.; TAYLOR, C.M.; EHRENDORFER, F.; LANTZ, H.; FUNSTON, A.M.; PUFF, C. *Rubiaceae*. In: WU, Z. Y., P. H. RAVEN & D. Y. HONG, Eds. **Flora of China: Cucurbitaceae through Valerianaceae with Annonaceae and Berberidaceae**. St. Louis: Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, 2011, p. 57.

TFOUNI, S.A.V.; CAMARA, M.M.; KAMIKATA, K.; GOMES, F.M.L.; FURLANI, R.P.Z. Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 38, n.4, p. 661- 666, 2017.

TREVISAN, M.T.S.; ALMEIDA, R.F.; SOTO, G.; FILHO, E.M.V.; ULRICH, C.M. OWEN, R.W. 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, p. 2649-2655, 2016.

TRIPATHI, H.; KOSHY, R.; KACHROO, M.; MAYACHARI, A.S.; MURALI, B. Method development and validation for quantification of chlorogenic acid in *Coffea arabica* extract using high performance liquid chromatography. **Der Pharmacia Lettre**, [s.l.], v. 6, n.6, p.89-92, 2014.

VERMEIRSSSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 75–87, 2002.

VIEIRA, M.A.; MARASCHIN, M.; PAGLIOSA, C.M.; PODESTÁ, R. AMBONI, R.D.M.C. Análise de compostos fenólicos, metilxantinas, tanino e atividade antioxidante de resíduo de processamento de erva-mate: uma nova fonte potencial de antioxidantes. In: INTERNATIONAL WORKSHOP – ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 2009, São Paulo, SP. **Anais [...]**. São Paulo: UNIP, 2009. p. 1-11. Disponível em: <http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sessoes/5b/4/m.%20a.%20vieira%20-%20resumo%20exp%20-%205b-4.pdf> . Acesso em 06 de abr. 2016.

VYAS, A.; SYEDA, K.; AHMAD, A.; PADHYE, S.; SARKAR, F. H. Perspectives on medicinal properties of mangiferin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v.12, n.5, p.412-425, 2012.

WADA, M. Foodstuffs compounding agent for treating diabetes comprises glycoside having xanthone structure. **Japanese patent**, JP204462-A, 2007.

WANG, Y.; HO, C.T. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washigton, v.57, n. 18, p.8109-8114, 2009.

YOOSOOK, C.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; BOONYAKIAT, Y.; KANTASUK, C. Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants.

Phytomedicine, [s.l.], v.6, n.6, p.411-419, 2000.

YOSHIMI, N.; MATSUNAGA, K.; KATAYAMA, M.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; QIAO, Z.; HARA, A.; YAMAHARA, J.; MORI, H. The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. **Cancer Letters**,

[s.l.], v.163, n.2, p.163-170, 2001.

ANEXO A- COMPOSTOS QUANTIFICADOS NAS FOLHAS DE CAFÉ DAS QUATRO LOCALIDADES

Compostos quantificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas no estado do Ceará.

Compostos (g/kg peso seco)										
Amostra	I	RG	QG	QdG	QR	CDR	CR	A34	A35	A45
CEP1	0.15	0.07	0.17	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	3.76	0.18
CEG1	0.17	0.20	0.05	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	3.37	0.24
CEG2	0.12	0.10	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	2.77	0.19
CEG3	0.16	0.11	0.11	0.10	0.00	0.00	0.11	1.68	2.48	0.48
CEG4	0.54	0.08	0.14	0.08	0.12	0.02	0.07	1.66	9.62	1.10
CEG4.2	0.57	0.17	0.23	0.13	0.08	0.00	0.18	2.56	6.33	0.93
CEG5	0.45	0.63	0.46	0.34	0.50	0.00	0.18	2.73	3.61	0.65
CEG6	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.95	0.22
CEG7	0.21	0.12	0.28	0.12	0.11	0.00	0.00	0.00	3.81	0.29
CEM1	0.16	0.35	0.14	0.30	0.04	0.00	0.00	0.00	1.52	0.20
CEM2	0.24	0.33	0.24	0.23	0.09	0.00	0.13	0.00	4.23	0.31
CEM3	0.20	0.12	0.05	0.07	0.04	0.00	0.00	0.00	3.84	0.27

I-isomangiferina, RG-rutina glicosídeo, QG-quercetina glicosídeo, QdG- quercetina diglicosídeo, QR- quercetina ramnogalactosídeo, CDR- campferol diglicosídeo ramnosídeo, CR- campferol ramnoglicosídeo, A34- Ácido 3,4-dicafeoilquínico ácido, A35- Ácido 3,5-dicafeoilquínico ácido, A45- Ácido 4,5-dicafeoilquínico ácido

Compostos quantificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas no estado de Minas gerais.

Amostra	Compostos (g/kg peso seco)									
	I	RG	QG	QdG	QR	CDR	CR	A34	A35	A45
MGBS1	0.70	1.13	0.54	0.64	0.43	0.12	0.07	1.24	1.36	0.37
MGBS1.2	0.18	0.39	0.17	0.25	0.11	0.11	0.00	0.74	0.72	0.24
MGM1	0.19	0.22	0.08	0.17	0.04	0.06	0.00	1.27	1.26	0.29
MGP1	1.56	0.72	1.32	0.62	0.49	0.00	0.24	0.00	7.57	0.72
MGP2	0.68	0.51	0.36	0.45	0.13	0.07	0.12	0.00	3.84	0.41
MGP2.2	1.45	0.83	1.17	0.58	0.62	0.08	0.25	0.00	5.67	0.44
MGP3	1.51	1.06	1.67	0.82	0.69	0.08	0.24	0.00	7.89	0.73

I-isomangiferina, RG-rutina glicosídeo, QG-quercetina glucosídeo, QdG- quercetina diglicosídeo, QR- quercetina ramnogalactosídeo, CDR- campferol diglicosídeo ramnosídeo, CR- campferol ramnoglucosídeo, A34- Ácido 3,4-dicafeoilquínico ácido, A35- Ácido 3,5-dicafeoilquínico ácido, A45- Ácido 4,5-dicafeoilquínico ácido.

Compostos quantificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas no estado em São Paulo.

Amostra	Compostos (g/kg peso seco)									
	I	RG	QG	QdG	QR	CDR	CR	A34	A35	A45
SP1	1.38	1.64	0.72	0.47	1.02	0.29	0.78	0.00	17.26	1.19
SP2	1.43	1.36	0.38	0.32	0.76	0.09	0.17	0.00	15.64	1.07
SP3	0.84	0.86	1.50	0.63	0.74	0.09	0.32	0.00	14.17	0.64
SP4	0.19	0.33	0.18	0.11	0.21	0.07	0.17	0.00	3.06	0.17
SP4.2	0.34	0.53	0.42	0.22	0.45	0.13	0.38	0.00	4.83	0.40
SP5	0.38	0.56	0.42	0.20	0.11	0.13	0.42	0.00	5.19	0.46
SP5.2	0.29	0.87	0.32	0.28	0.46	0.20	0.38	0.00	4.25	0.30
SP5.3	0.25	0.54	0.19	0.16	0.31	0.12	0.27	0.00	3.45	0.25
SP5.4	0.48	1.00	0.25	0.28	0.49	0.17	0.31	0.00	4.45	0.34
SP6	2.05	1.33	1.08	0.48	1.21	0.27	0.84	0.00	27.46	1.47
SP7	0.27	0.40	0.18	0,15	0.25	0.09	0.16	0.00	4.94	0.34
SP8	0.16	0.20	0.27	0,14	0.16	0.05	0.00	0.00	2.76	0.16
SP9	0.44	0.00	0.77	0,93	0.23	0	0.18	0.00	4.60	0.25
SP9.2	0.22	0.18	0.10	0,08	0.13	0,03	0.08	0.00	1.55	0.10
SP9.3	0.58	0.33	0.41	0,24	0.48	0.07	0.25	0.00	8.87	0.48
SP9.4	0.38	0.32	0.42	0,22	0.31	0,07	0.29	0.00	5.54	0.39
SP9.5	0.19	0.14	0.15	0,09	0.17	0.00	0.13	0.00	2.77	0.16
SP10	0.27	0.22	0.15	0,11	0.17	0.08	0.16	0.00	5.59	0.34
SP10.2	0.21	0.18	0.12	0,09	0.14	0.06	0.14	0.00	4.08	0.22
SP10.3	0.78	0.78	0.29	0,25	0.49	0.14	0.30	0.00	15.71	0.75

I-isomangiferina, RG-rutina glicosídeo, QG-quercetina glicosídeo, QdG- quercetina diglicosídeo, QR- quercetina ramnogalactosídeo, CDR- campferol diglicosídeo ramnosídeo, CR- campferol ramnoglucosídeo, A34- Ácido 3,4-dicafeoilquínico ácido, A35- Ácido 3,5-dicafeoilquínico ácido, A45- Ácido 4,5-dicafeoilquínico ácido.

Compostos quantificados nas folhas de *Coffea arabica* coletadas na Costa Rica.

Amostra	Compostos (g/kg peso seco)									
	I	RG	QG	QdG	QR	CDR	CR	A34	A35	A45
CR1	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.68	0.23
CR2	0.16	0.11	0.11	0.10	0.00	0.00	0.11	1.68	2.48	0.48
CR3	0.17	0.23	0.21	0.16	0.07	0.08	0.15	1.17	3.23	0.58
CR4	0.47	0.06	0.05	0.05	0.00	0.00	0.21	1.10	2.12	0.46
CR5	0.42	0.24	0.18	0.12	0.12	0.07	0.16	1.61	3.70	0.54

I-isomangiferina, RG-rutina glicosídeo, QG-quercetina glucosídeo, QdG- quercetina diglicosídeo, QR- quercetina ramnogalactosídeo, CDR- campferol diglicosídeo ramnosídeo, CR- campferol ramnoglucosídeo, A34- Ácido 3,4-dicafeoilquínico ácido, A35- Ácido 3,5-dicafeoilquínico ácido, A45- Ácido 4,5-dicafeoilquínico ácido.