



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

**GERLAN OLIVEIRA DO NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA INIBIÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -  
GLICOSIDASE PRESENTE NO CHÁ DAS FOLHAS DE *Coffea arabica***

**FORTALEZA**

**2019**

GERLAN OLIVEIRA DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA INIBIÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -  
GLICOSIDASE PRESENTE NO CHÁ DAS FOLHAS DE *Coffea arabica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan

FORTALEZA

2019

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)

---

- N195a Nascimento, Gerlan Oliveira do.  
Avaliação da atividade antioxidante e da inibição da enzima alfa-glicosidase presente no chá das folhas de Coffea arabica. / Gerlan Oliveira do Nascimento. – 2019.  
109 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.
1. Coffea arabica. 2. Chá. 3. Diabetes. 4. Antioxidante. 5. alfa-glicosidase. I. Título.

CDD 540

---

GERLAN OLIVEIRA DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA INIBIÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -  
GLICOSIDASE PRESENTE NO CHÁ DAS FOLHAS DE *Coffea arabica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha amada esposa, Maria Helena de Oliveira Viana, que sempre me incentiva a buscar o melhor em mim.

## AGRADECIMENTOS

À minha amada esposa Maria Helena de Oliveira Viana, pelo amor, incentivo, compreensão e por todas as palavras de conforto sempre que precisei durante esta jornada. Você é o motivo da realização deste mestrado.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan pela oportunidade, ensinamentos, compreensão, parceria e contribuição na realização deste trabalho. Agradeço por toda orientação e a oportunidade de aprendizagem.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI) e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PGQUIM) pela oportunidade da realização deste mestrado.

Aos todos os docentes que contribuíram compartilhando seus conhecimentos.

À FUNCAP pelo incentivo e a concessão da bolsa de estudos durante todo o período do mestrado.

Aos meus colegas de laboratório Sâmia, Lucas, Carlos, Anderson, Ana Maria, Samuel e Felipe por todo suporte, apoio, palavras de incentivo e momentos divertidos e em especial à Írvila por toda paciência, ensinamentos e contribuições para a realização deste trabalho.

À todas as outras pessoas que, embora não citadas, contribuíram indiretamente para a consolidação deste trabalho.

## RESUMO

Diabetes é uma desordem metabólica caracterizada pela deficiência da produção e/ou ação da insulina sendo a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase uma das formas de tratamento. Estudos mostram que fenólicos presentes nas folhas de café da espécie *Coffea arabica* possuem propriedades antioxidantes e anti-diabéticas. Este trabalho avalia o potencial farmacológico do extrato aquoso das folhas de *C. arabica* utilizando o forno de micro-ondas. A análise química teve início com a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A etapa seguinte consistiu na investigação, *in vitro*, do teor de fenólicos totais (TFT), da atividade antioxidante (AA) e do efeito sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase. As folhas de café apresentaram, em média, os resultados iguais a  $53,74 \pm 0,02$  mg EAG/g e  $46,65 \pm 0,002$  mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, para o TFT e para AA, sendo estes resultados satisfatórios quando comparado a outros chás comumente consumidos. Quanto a enzima  $\alpha$ -glicosidase, a mangiferina, a rutina e o extrato aquoso inibiram, respectivamente, 90,42%, 85,71% e 85,92% de sua atividade. O IC<sub>50</sub> do extrato aquoso foi igual a 0,086 mg.mL<sup>-1</sup> sendo este valor 62 vezes menor que o IC<sub>50</sub> da acarbose. Este alto poder inibitório pode ser atribuído ao sinergismo dos fenólicos presentes e por se tratar de um produto natural, não apresenta os indesejáveis efeitos colaterais. Por fim, os resultados apontam que o chá das folhas de café da espécie *C. arabica*, além de uma bebida antioxidante é, também, potencialmente útil para a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*. Chá. Diabetes. Antioxidante.  $\alpha$ -glicosidase.

## ABSTRACT

Diabetes is a metabolic disorder characterized by insulin production deficiency or/and its action, being inhibition of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme one of the forms of treatment. Studies have shown that the coffee leaves of the *Coffea arabica* species possesses antioxidant and anti-diabetic properties. This work evaluates the pharmacological potential of *C. arabica* leaves aqueous extract prepared from microwave oven. The chemical analysis began with the identification and quantification of the phenolic compounds of tea by High-Performance Liquid Chromatography. The next step was to investigate, *in vitro*, the total phenolic compounds (TPC), the antioxidant activity (AA), the effect on the  $\alpha$ -glucosidase enzyme assays, in relation to acarbose and finally evaluate the ability to inhibit 50% of activity ( $IC_{50}$ ). In general, the coffee leaves presented results equal to  $53.74 \pm 0.02$  mg EAG/g and  $46.65 \pm 0.002$  mg.mL<sup>-1</sup> respectively for TPC and AA which were satisfactory when compared to other commonly consumed teas. As to the  $\alpha$ -glucosidase enzyme, mangiferin, rutin and aqueous extract, they inhibited, respectively, 90.42%, 85.71% and 85.92% of their activity. Aqueous extract  $IC_{50}$  was  $0.086$  mg.mL<sup>-1</sup> 62 times lower than the  $IC_{50}$  of acarbose. This high inhibitory power can be attributed to the synergism of the phenolics present and since it is a natural product, it does not present undesirable side effects. Thus, the results indicate that the tea of coffee leaves of *C. arabica* species, besides an antioxidant beverage, is also potentially useful for the inhibition of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme.

**Keywords:** *Coffea arabica*. Tea. Diabetes. Antioxidante.  $\alpha$ -glucosidase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo de ação dos antioxidantes naturais .....	18
Figura 2 -	Estrutura química da mangiferina .....	24
Figura 3 -	Provável rota biossintética para mangiferina .....	25
Figura 4 -	Síntese da mangiferina .....	26
Figura 5 -	Estrutura química dos precursores do ACG e do 5-ACQ: a) ácido quínico; b) ácido ferúlico; c) ácido p-cumárico; d) ácido cafeico e e) ácido 5- cafeoilquínico (ácido clorogênico).....	29
Figura 6 -	Estrutura da Rutina.....	31
Figura 7 -	Flavonol (2-fenil-benzo-alfa-pironas).....	31
Figura 8 -	Formação da rutina a partir da quercetina.....	32
Figura 9 -	Fórmulas estruturais da xantina e de seus três derivados naturais .....	34
Figura 10 -	Estrutura química da acarbose (a), voglibose (b) e miglitol (c).....	39
Figura 11 -	Estrutura dos compostos fenólicos.....	44
Figura 12 -	Estrutura química do radical DPPH e sua estabilização .....	49
Figura 13 -	Espectro de DAD para um padrão de ácido clorogênico .....	59
Figura 14 -	Espectro de DAD para um padrão de cafeína .....	59
Figura 15 -	Espectro de DAD para um padrão de mangiferina .....	60
Figura 16 -	Espectro de DAD para um padrão de rutina .....	60
Figura 17 -	Representação estrutural dos metabólitos majoritários.....	66
Figura 18 -	Perfil do cromatograma, obtido em HPLC, do extrato aquoso das folhas de <i>C. arabica</i> . Metabólitos detectados: ácido clorogênico (1), cafeína (2), mangiferina (3) e rutina (4).....	67
Figura 19 -	Cromatograma do padrão ácido clorogênico (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> ) em 340 nm obtido em HPLC .....	68
Figura 20 -	Comparação dos espectros de DAD dos padrões com os obtidos nas folhas .....	69
Figura 21 -	Padrão mangiferina (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> ) em 257 nm .....	100
Figura 22 -	Padrão rutina (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> ) em 340 nm .....	100
Figura 23 -	Padrão cafeína (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> ) em 278 nm .....	100

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curva padrão da concentração de ácido gálico ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em função da absorbância (a 705 nm) .....	72
Gráfico 2 -	Curvas da média das concentrações dos extratos aquosos das folhas de <i>C. arabica</i> versus percentuais de captura de DPPH.....	75
Gráfico 3 -	Curva analítica da ácido clorogênico (340 nm) .....	101
Gráfico 4 -	Curva analítica da mangiferina (257 nm).....	101
Gráfico 5 -	Curva analítica da cafeína (278 nm) .....	102
Gráfico 6 -	Curva analítica da rutina (340 nm).....	102
Gráfico 7 -	Curva dose-resposta para a acarbose. $\text{Log IC}_{50} = 3,730$ . $\text{IC}_{50} = 5,353$ $\text{mg.mL}^{-1}$ .....	106
Gráfico 8 -	Curva dose-resposta da mangiferina. $\text{Log IC}_{50} = 2,424$ . $\text{IC}_{50} = 0,265$ $\text{mg.mL}^{-1}$ .....	107
Gráfico 9 -	Curva dose-resposta da rutina. $\text{Log IC}_{50} = 2,573$ . $\text{IC}_{50} = 0,374$ $\text{mg.mL}^{-1}$ .....	108
Gráfico 10 -	Curva dose-resposta do chá. $\text{Log IC}_{50} = 1,932$ ppm. $\text{IC}_{50} = 0,0855$ $\text{mg.mL}^{-1}$ .....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividades farmacológicas da mangiferina .....	27
Tabela 2 -	Atividades farmacológicas da rutina .....	33
Tabela 3 -	Classificação dos compostos fenólicos segundo o esqueleto principal....	44
Tabela 4 -	Teor de metabólitos obtidos pelo chá em diferentes tempos de preparo.....	54
Tabela 5 -	Quantidades de metabólitos extraídos por infusão e por forno de micro-ondas.....	54
Tabela 6 -	Sistema de eluição para a análise em HPLC .....	61
Tabela 7 -	Metabólitos identificados em HPLC-DAD dos extratos aquosos de <i>C. arabica</i> .....	66
Tabela 8 -	Equações da reta para cada padrão.....	70
Tabela 9 -	Quantificação dos metabólitos das folhas de <i>C. arabica</i> feitas em forno de micro-ondas .....	70
Tabela 10 -	Quantificação dos compostos fenólicos de <i>C. arabica</i> por soxhlet e QuEChERS.....	71
Tabela 11 -	Teor de Fenólicos Totais de chás comuns em relação ao chá de <i>C. arabica</i> .....	73
Tabela 12 -	Percentuais médios da atividade antioxidante dos extratos aquosos das folhas de <i>C. arabica</i> em diferentes concentrações .....	74
Tabela 13 -	Resultado da inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase em porcentagem .....	77
Tabela 14 -	Poder de inibição da $\alpha$ -glicosidase (%) em diferentes concentrações.....	77
Tabela 15 -	Teor de metabólitos, em g/kg, obtidos por forno de micro-ondas e tolerância à ferrugem ( <i>Hemileia vastatrix</i> ) .....	98
Tabela 16 -	Teor de fenólicos, em g/kg, obtidos em extração soxhlet e QuEChERS .	99
Tabela 17 -	Dados utilizados para a confecção do gráfico 1 .....	103
Tabela 18 -	Dados utilizados para a confecção do gráfico 2.....	103
Tabela 19 -	TFT (em mg EAG/g) das 16 cultivares do chá das folhas de <i>C. arabica</i>	104
Tabela 20 -	Inibição percentual $\pm$ desvio padrão das 16 cultivares do chá das folhas de <i>C. arabica</i> .....	105
Tabela 21 -	Dados utilizados para a confecção do gráfico da acarbose .....	106
Tabela 22 -	Dados utilizados para a confecção do gráfico da mangiferina.....	107

Tabela 23 -	Dados utilizados para a confecção do gráfico da rotina.....	108
Tabela 24 -	Dados utilizados para a confecção do gráfico do chá das folhas de <i>C. arabica</i> .....	109

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Fracionamento do extrato obtido a partir das folhas de *C. arabica* ... 57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ACQ	Ácido 5-cafeoilquínico
ABS	Absorbância
ACG	Ácido clorogênico
ACQ	Ácido cafeoilquínico
AFQ	Ácido feruloilquínico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
diACQ	Ácido dicafeoilquínico
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalente em ácido gálico
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPLC-DAD	High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector
min	Unidade de tempo (minutos)
<i>p</i> -NPG	<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol
ppm	Partes por milhão
TFT	Teor de Fenólicos Totais
UV-VIS	Ultravioleta – Luz Visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

%AA	Porcentagem de atividade antioxidante
IC <sub>50</sub>	Capacidade inibitória que neutraliza 50% dos radicais livres
nm	Nanômetros
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlação
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitro
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	20
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	20
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	21
<b>3.1</b>	<b>História do café</b> .....	21
<b>3.2</b>	<b>O cafeeiro</b> .....	21
<b>3.3</b>	<b>Resíduos do beneficiamento do café</b> .....	22
<b>3.4</b>	<b>Metabólitos secundários e atividades farmacológicas presentes nas folhas de café</b> .....	22
<b>3.4.1</b>	<i>Metabólitos majoritários</i> .....	23
<b>3.4.1.1</b>	<i>Mangiferina</i> .....	23
<b>3.4.1.2</b>	<i>Ácidos clorogênicos</i> .....	28
<b>3.4.1.3</b>	<i>Rutina</i> .....	30
<b>3.4.1.4</b>	<i>Cafeína</i> .....	34
<b>3.5</b>	<b>Diabetes mellitus</b> .....	36
<b>3.5.1</b>	<i>Histórico</i> .....	36
<b>3.5.2</b>	<i>Classificação</i> .....	38
<b>3.5.3</b>	<i>Epidemiologia</i> .....	39
<b>3.5.4</b>	<i>Estresse oxidativo e diabetes mellitus</i> .....	40
<b>3.5.5</b>	<i>Folhas de café e a prevenção do diabetes mellitus</i> .....	41
<b>3.6</b>	<b>Determinação dos fenólicos totais</b> .....	43
<b>3.6.1</b>	<i>Ensaio folin-ciocalteu</i> .....	46
<b>3.7</b>	<b>Determinação da atividade antioxidante</b> .....	47
<b>3.7.1</b>	<i>Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)</i> .....	48
<b>3.8</b>	<b>Determinação da inibição enzimática</b> .....	49
<b>3.8.1</b>	<i>Ensaio da inibição da enzima <math>\alpha</math>-glicosidase</i> .....	51
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
<b>4.1</b>	<b>Matéria prima</b> .....	52
<b>4.2</b>	<b>Reagentes</b> .....	53
<b>4.3</b>	<b>Obtenção dos extratos</b> .....	53

4.3.1	<i>Extração em forno de micro-ondas</i> .....	55
4.3.2	<i>Extração em soxhlet</i> .....	56
4.3.3	<i>Extração em quechers</i> .....	57
4.4	<b>Identificação e quantificação dos compostos fenólicos</b> .....	59
4.4.1	<i>Determinação qualitativa</i> .....	60
4.4.2	<i>Determinação quantitativa</i> .....	61
4.5	<b>Análise dos extratos</b> .....	62
4.5.1	<i>Método folin-ciocalteu</i> .....	62
4.5.2	<i>Método DPPH</i> .....	63
4.5.3	<i>Inibição da enzima <math>\alpha</math>-glicosidase</i> .....	64
4.6	<b>Análise estatística</b> .....	65
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	66
5.1	<b>Identificação dos metabólitos</b> .....	66
5.2	<b>Quantificação dos metabólitos</b> .....	70
5.3	<b>Determinação do teor de fenólicos totais</b> .....	72
5.4	<b>Atividade antioxidante</b> .....	74
5.5	<b>Avaliação da inibição enzimática</b> .....	76
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
	<b>APÊNDICE A – QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS PRESENTES NAS 16 CULTIVARES E AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À FERRUGEM</b> .....	98
	<b>APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS COM OS TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES MANGIFERINA, RUTINA E CAFEÍNA OBTIDOS EM HPLC</b> .....	100
	<b>APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS PADRÕES USADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS</b> .....	101
	<b>APÊNDICE D – VALORES USADOS NA CONSTRUÇÃO DE GRÁFICOS</b> .....	103
	<b>APÊNDICE E – TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT)</b> .....	104
	<b>APÊNDICE F – CURVA DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH</b> ....	105

**APÊNDICE G – INIBIÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -GLICOSIDASE E  
CURVAS DOSE RESPOSTA .....**

**106**

## 1 INTRODUÇÃO

Os maus hábitos alimentares aliado ao sedentarismo e ao estresse da vida urbana estão diretamente relacionados ao surgimento do diabetes (SBD – SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada por hiperglicemia, que altera o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, além de provocar uma série de complicações cardiovasculares, renais, neurológicas e oculares (ADA – AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). Entre os diferentes tipos, o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é a forma mais comum (SILVA et al., 2010a). Estudos têm apontado a influência dos radicais livres e outros oxidantes no surgimento de várias doenças, dentre elas o DM2 (BESERRA et al., 2015).

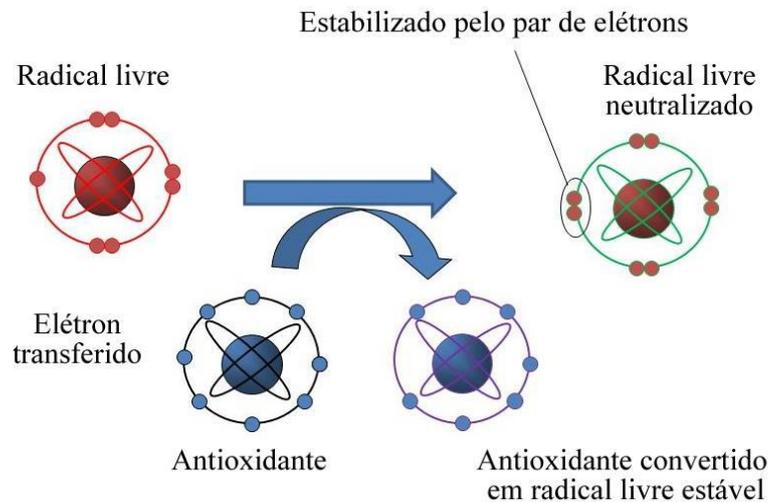
Para o controle do DM2 os antidiabéticos orais são os mais utilizados. Estes medicamentos apresentam diferentes tipos de mecanismo de ação, sendo um deles a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase. Estes fármacos têm como efeito controlar e/ou reduzir a glicemia e mantê-la normal, no entanto, eles apresentam alguns efeitos colaterais desagradáveis como náusea, diarreia e dor abdominal acometendo até um terço dos pacientes (ADA, 2018).

A busca por alternativas que possam auxiliar na prevenção e/ou tratamento do DM2 tem motivado a população, e também a comunidade científica, na procura de produtos naturais que possibilitem uma vida mais saudável. Uma estratégia usada consiste na pesquisa por substâncias presentes na natureza e nesta categoria se destacam as plantas com seus compostos fenólicos que são antioxidantes naturais. Os antioxidantes podem agir retardando ou prevenindo a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos impedindo a formação de radicais livres (SANTOS et al., 2018).

Os radicais livres, no passado, foram classificados como um grupo de átomos ou de moléculas que possuem elétrons livres desemparelhados em seu nível eletrônico mais externo, o que justifica sua instabilidade. Além disso, outras características físico-químicas destas espécies são: o tempo de meia-vida curto e também a capacidade de reagir com outras moléculas a fim de alcançar sua estabilidade, custando a oxidação de biomoléculas. Atualmente, radical livre não é a designação ideal para o conjunto de agentes reativos patogênicos, pois alguns deles apresentam elétrons emparelhados em seu último nível e mesmo assim participam das reações de oxirredução. Assim, os termos *reactive oxygen species* (ROS) (ou espécies reativas de oxigênio – ERO) e *reactive nitrogen species* (RNS) (espécies reativas de nitrogênio – ERN) são considerados mais apropriados por descreverem melhor esses agentes químicos (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Na Figura 1, podemos observar o mecanismo

simplificado de ação dos antioxidantes.

Figura 1 - Mecanismo de ação dos antioxidantes naturais



Fonte: SUNSHINE, 2018.

De forma geral, os antioxidantes podem ser classificados em sintéticos e naturais. Os sintéticos, por possuírem algum potencial tóxico, são muitas vezes questionados em estudos, o que faz com que os antioxidantes naturais passem a serem os alvos alternativos para minimizar e retardar os processos de deterioração oxidativa (SANTOS et al., 2018).

A medicina popular desperta o interesse de pesquisadores em estudos multidisciplinares que enriquecem o conhecimento a respeito do uso terapêutico de plantas medicinais. Quanto à eficácia e a segurança, já foram comprovadas cientificamente o que permitiu seu uso frequente como recurso terapêutico benéfico e indispensável à humanidade (REBOUÇAS, 2009).

Atualmente, existe um grande número de plantas medicinais cujo potencial terapêutico tem sido estudado em uma variedade de modelos experimentais, dentre eles o mecanismo de inibição enzimática. Com este intuito, extratos vegetais e suas frações têm sido objeto de pesquisa constante (VIEIRA et al., 2015).

Entre os compostos antioxidantes naturais, destacam-se as folhas de café africana da espécie *Coffea arabica* que é uma fonte significativa de compostos fenólicos, dentre eles a mangiferina, que é um composto com atividade antioxidante comprovada além de possuir ação hipoglicêmica, diminuindo o risco relativo de DM2 (BATOOL et al., 2018). No entanto, a aplicação das folhas de café para fins medicinais na forma de chá bem como seu preparo ainda foi pouco investigada (CHEN; MA; KITTS, 2018), sendo necessária pesquisas relacionando

sua atividade antioxidante, sua atividade enzimática dentre outras, permitindo assim catalogar suas propriedades farmacológicas.

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo devido ao seu aroma e sabor agradável, além de apresentar várias propriedades farmacológicas. Os benefícios do chá para a saúde têm sido amplamente estudados. Existem evidências científicas de que a ingestão de chá pode reduzir os níveis de colesterol; reduzir o risco de desenvolver hipertensão, distúrbios imunológicos e doença de Parkinson; e proteger contra o câncer, doenças cardiovasculares e do sistema nervoso. Além disso, apresenta efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antialérgicos, anti-diabetes e anti-obesidade (GRAMZA-MICHAŁOWSKA et al., 2016; RASHID et al., 2016).

Neste sentido, este trabalho investiga se o chá caseiro (extrato aquoso) obtido a partir das folhas de *Coffea arabica*, extraído em forno de micro-ondas, pode apresentar atividade antioxidante satisfatória quando comparado com outros chás comumente consumidos e, também, se é capaz de inibir, de forma significativa, a enzima  $\alpha$ -glicosidase em relação ao fármaco acarbose, permitindo assim validar seu emprego como uma possível bebida nutracêutica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade antioxidante e a atividade inibitória da enzima  $\alpha$ -glicosidase *in vitro* a partir dos compostos fenólicos presentes no chá das folhas de *Coffea arabica*.

### 2.1 Objetivos específicos

- Realizar a extração dos metabólitos;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes em todos os extratos das folhas de *Coffea arabica*.;
- Determinar o Teor de Fenólicos Totais (TFT) do chá das folhas de *C. arabica*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *C. arabica*;
- Avaliar o efeito da inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase a partir do chá das folhas de *C. arabica*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 História do café

Muitas lendas existem sobre a origem do café, no entanto, a mais difundida é a lenda de Kaldi, um pastor que reconhece as qualidades do fruto como fonte de vigor e ânimo. Na província de Kaffa (atual Etiópia), reino de Abissínia, por volta do ano 1000 d.C., o pastor percebeu que as suas cabras, após ingerirem grãos e folhas de um determinado arbusto (pés de cafeeiro), ficavam tão agitadas que não dormiam durante a noite. Com essa observação, Kaldi torrou e triturou os frutos, misturando o produto final com manteiga, fazendo uma espécie de massa gordurosa. Ao consumi-la, o pastor sentiu-se mais disposto e ficava alerta em suas noites de vigília (ICO – INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2018).

Já no ano de 1500, Gemaledin, um chefe mulçumano, vindo do Iêmen realizou uma longa viagem até a Kaffa e durante sua prece à Alá, ele adormeceu. Essa falta grave, fez com que ele pedisse aos seus guerreiros que buscassem uma cura para essa fadiga. Estes encontraram Kaldi, que por sua vez contou-lhes dos frutos vermelhos “revigorantes”. Quando Gemaledin experimentou os frutos ficou impressionado com seus efeitos e levou consigo várias sementes de volta do Iêmen. Não demorou muito para que o café passasse a ser largamente consumido pelos árabes (ICO, 2018).

A Arábia foi o país responsável pela propagação da cultura do cafeeiro, chegando na Europa em meados de 1500, na América Central e do Sul por volta de 1700 e, finalmente, em nosso país em 1727 (OLIVEIRA et al., 2012).

Por fim, o nome “café” não é originário da Kaffa, mas sim da palavra árabe *qahwa*, que significa vinho. Por esse motivo, o café foi chamado de vinho da Arábia quando chegou à Europa (DELTA, 2018).

#### 3.2 O cafeeiro

O cafeeiro é um arbusto tropical com folhas verdes da família *Rubiaceae*, pertencente ao gênero *Coffea*, que cresce, em áreas de umidade moderada, de 600 a 1200 metros. Este gênero compreende muitas espécies, aproximadamente 100, no entanto as mais cultivadas são *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café conilon ou robusta), sendo que a primeira ocupa 74% do parque cafeeiro do Brasil, enquanto que a segunda 26% (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018).

Os cafés arábicos são caracterizados pela sua acidez, que se acentua à medida que a altitude de cultivo aumenta. São cafés mais aromáticos e de corpo moderado, descrevendo-se como cafés suaves, com um teor de cafeína baixo, entre 0,8 e 1,5 %. Já o café robusta apresenta características organolépticas diferentes da anterior: tem um bom corpo, baixa acidez e é um pouco mais amargo dado apresentar um teor de cafeína mais elevado, podendo atingir os 2,5 % (DELTA, 2018).

### **3.3 Resíduos do beneficiamento do café**

Fundamental para a economia e política de muitos países em desenvolvimento e sua produção, o café, bem como seu consumo em larga escala levam a geração de uma enorme quantidade de resíduos, como folhas e cascas, que necessitam de um destino adequado (ICO, 2018).

Em relação as cascas, elas podem ser utilizadas como matérias-primas para a produção de bioprodutos de maior valor agregado como etanol, enzimas e ácidos. Pesquisas para buscar formas de utilização deste material devem-se basicamente a sua grande disponibilidade nas regiões cafeeiras (GOUVEA et al., 2009).

Quanto as folhas, elas podem ser utilizadas como uma bebida nutracêutica, em função dos metabólitos presentes. A infusão feita a partir das folhas de *C. arabica* apresenta um alto potencial farmacológico (MURTHY; NAIDU, 2012). Existem poucos estudos sobre sua utilização como planta medicinal (GIDAY; ASFAW; WOLDU, 2010), apesar de já ter sido evidenciado um alto conteúdo de substâncias fenólicas, responsáveis por exercer diversas funções no organismo, dentre elas, a atividade antioxidante (CAMPA et al., 2012; TREVISAN et al., 2016; DE ALMEIDA, et al., 2019).

### **3.4 Metabólitos secundários e atividades farmacológicas presentes nas folhas de café**

A ausência de movimentos é o que diferencia as plantas da maioria dos animais. Desta forma elas não podem se deslocar quando são submetidas a situações menos favoráveis ou estressantes (ocasionados por fatores bióticos e/ou abióticos). Assim, ao longo de sua evolução, os vegetais foram buscando outras estratégias para sua defesa, como a síntese de um enorme número de produtos químicos de diversas estruturas e classes. Estes compostos são chamados de metabólitos e podem ser divididos em primários e secundários. Açúcares, ácidos graxos, aminoácidos e ácidos nucléicos, bem como produtos químicos considerados

onipresentes em todas as plantas para seu crescimento e desenvolvimento são os metabólitos primários (WU; CHAPPELL, 2008). Já os metabólitos secundários são compostos geralmente relacionados a respostas de defesa na planta contra herbívoros, micróbios, vírus ou plantas competidoras bem como atividades antibacterianas e antifúngicas. Além disso, os metabólitos secundários desempenham um papel importante em outros processos, por exemplo, incorporando substâncias atrativas para acelerar a polinização, coloração para camuflagem, proteção contra radiação ultravioleta e atividade oxidante (EDREVA et al, 2008).

Embora os produtos secundários possuam uma variedade de funções nas plantas, é provável que a sua importância ecológica tenha alguma relação com potencial efeito medicinal para os seres humanos. Por exemplo, produtos secundários envolvidos na defesa das plantas através de citotoxicidade para patógenos microbianos podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos, se não forem demasiadamente tóxicos. Da mesma forma, produtos secundários envolvidos na defesa contra herbívoros através de atividade neurotóxica podem ter efeitos benéficos em seres humanos (ou seja, como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos) através de sua ação no sistema nervoso central. O desenvolvimento de estruturas similares entre produtos secundários de plantas e substâncias endógenas de outros organismos pode ser chamado de “modelagem molecular evolucionária” (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: os componentes contendo nitrogênio, terpenos e os compostos fenólicos (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010) sendo este último predominante nas folhas de café.

### **3.4.1 Metabólitos majoritários**

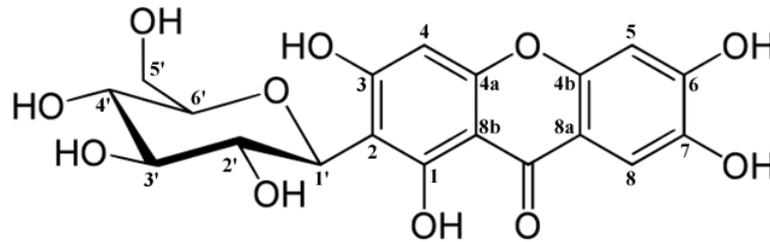
#### **3.4.1.1 Mangiferina**

A mangiferina é uma xantona C-glicosilada amplamente distribuída em vegetais superiores das famílias *Gentianaceae* e *Anacardiaceae* (SANTOS, 2010), incluindo *Coffea arabica*, onde está presente em várias partes da planta como cascas do caule, nos frutos, nas raízes e também nas folhas (TALAMOND et al., 2008).

Em 1956, a mangiferina (Figura 2) foi isolada pela primeira vez na manga, por Shun Iseda, utilizando reagentes colorimétricos específicos e espectroscopia na região do infravermelho para identificação química (ISEDÁ, 1966). Dez anos depois, por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), sua estrutura foi confirmada por Haynes e Taylor

e, finalmente, em 1968, Axel Prox obteve o primeiro espectro de massas da mangiferina, em um estudo de caracterização espectrométrica de compostos naturais C-glicosilados (SANTOS, 2010).

Figura 2 - Estrutura química da mangiferina



Fonte: Elaborado pelo autor.

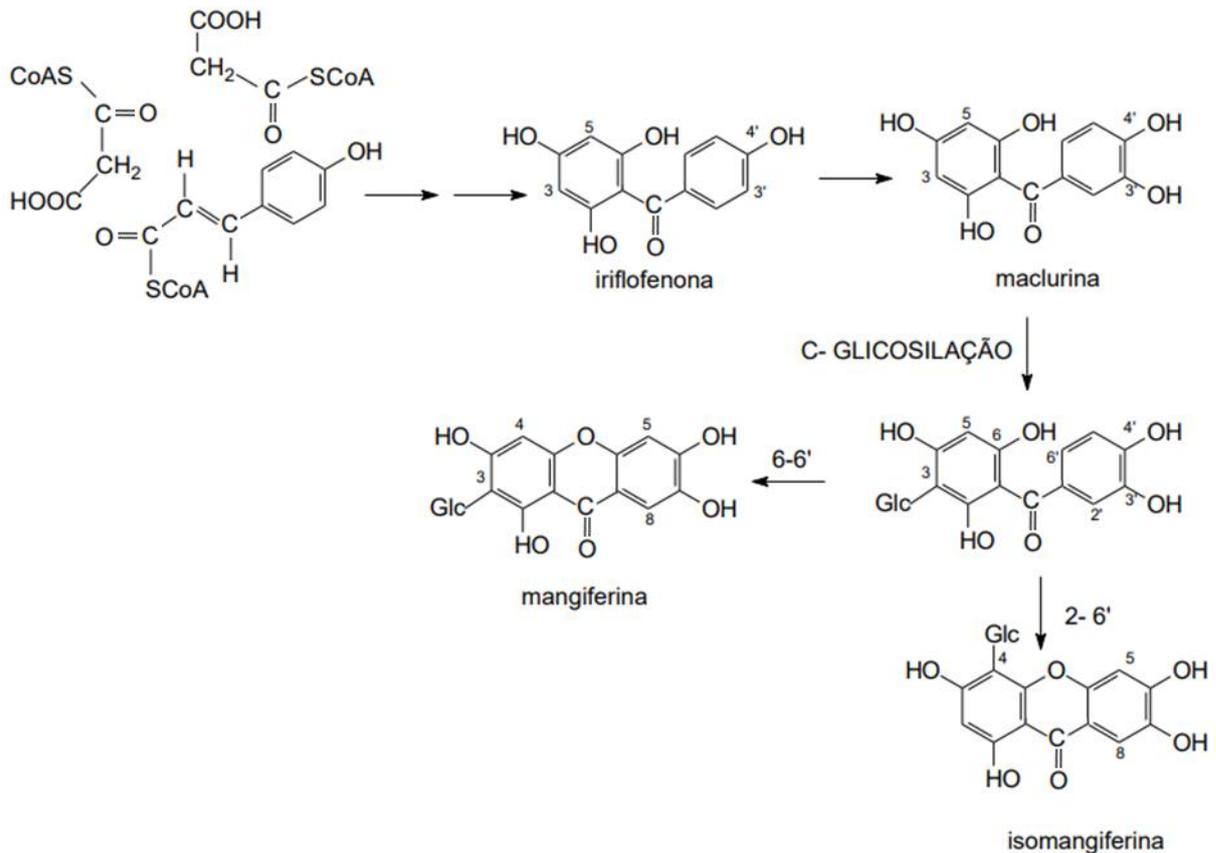
A mangiferina (1,3,6,7-tetra-hidroxixantona-C2-beta-D-glicose; de fórmula molecular:  $C_9H_{18}O_{11}$ ; e massa molecular:  $422,35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) é um sólido de coloração amarelada e apresenta ponto de fusão acima dos  $260 \text{ }^\circ\text{C}$ . Alguns estudos espectroscópicos de UV-VIS e RMN foram realizados para avaliação da sua estabilidade, em solução com diferentes valores de pH. Os resultados indicaram que ela possui quatro constantes de dissociação ( $\text{pK}_{a1} = 6,52$ ;  $\text{pK}_{a2} = 7,97$ ;  $\text{pK}_{a3} = 9,44$  e  $\text{pK}_{a4} = 12,10$ ), sendo este um parâmetro muito importante para investigações farmacocinéticas (GÓMEZ-ZALETA et al., 2006).

Quanto a estrutura da mangiferina, determinada por difração de raios-X, foi visto que ela apresenta duas moléculas da xantona ligadas a cinco de água de cristalização, sendo estabilizada pela formação de ligações de hidrogênio intermoleculares. Outro ponto importante no que cerne a estrutura, ela se mostra mais resistente à hidrólise ácida ou alcalina ou, ainda, a enzimática em relação a dos O-heterosídeos. Tudo isso se deve a ligação heterosídica que ocorre através de uma ligação carbono-carbono. (SANUGUL et al., 2005).

Foi proposto, e posteriormente comprovado biossinteticamente, que mangiferina é formada a partir de um precursor flavônico, em razão de C-glicosilxantonas serem encontradas em associação com C-glicosilflavonas. Assim, mangiferina é produzida pelo acoplamento de *p*-hidroxi-cinamato com duas moléculas de malonato, resultando na benzofenona iriflofenona, a qual é oxidada na posição C-3' e posteriormente glicosilada no carbono C-3. Finalmente, a xantona é gerada pelo acoplamento oxidativo dos carbonos C-6 e C-6', como é possível observar na Figura 3. Aparentemente, o ácido benzoico não está envolvido na rota biossintética da mangiferina, sendo diferente das demais xantonas. A distribuição e a biogênese da

mangiferina está mais relacionada aos flavonoides do que às demais xantonas (BENNETT; LEE, 1989).

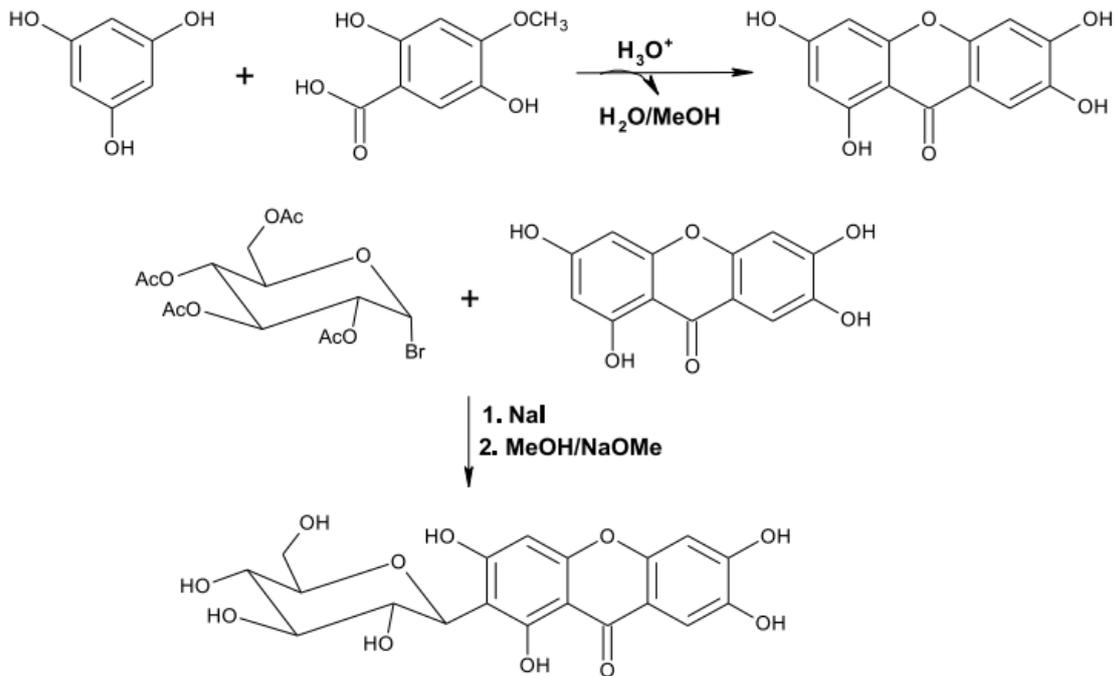
Figura 3 - Provável rota biossintética para mangiferina



Fonte: Adaptado de Fujita e Inoue (1977).

A primeira vez que a mangiferina foi obtida sinteticamente ocorreu em 1967 por Nott e Roberts, por meio de uma reação de glicosilação do noratiriol (1,3,6,7-tetra-hidroxixantona) com acetobromoglicose, utilizando-se iodeto de sódio (NOTT; ROBERTS, 1967). No entanto, a primeira síntese total (Figura 4) foi desenvolvida, somente, um ano depois por Bhatia e Seshadri, os quais promoveram a reação de condensação do ácido 2,5-di-hidroxi-4-metoxibenzóico com floroglucinol anidro, seguida por desmetilação, gerando a xantona noratiriol. O passo seguinte, reação de glicosilação, foi semelhante à proposta original (BHATIA; SESHADRI, 1968).

Figura 4 - Síntese da mangiferina



Fonte: Bhatia e Seshadri (1968).

Atualmente, tanto em análises qualitativas, quanto quantitativa da mangiferina têm sido efetuadas através de várias técnicas cromatográficas modernas como Eletroforese Capilar de Alta Resolução (HPCE), Cromatografia em Contra-Corrente de Alta Velocidade (HSCCC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Espectroscopia na região do infravermelho próximo e método colorimétrico com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) têm sido propostos por E. Joubert e colaboradores como métodos alternativos de quantificação (CANUTO, 2009).

Diversas atividades farmacológicas da mangiferina têm sido amplamente documentadas (Tabela 1). As faixas terapêuticas da mangiferina, de acordo com os estudos *in vivo*, variaram de 10 a 250 mg/kg, dependendo do modelo experimental e dos parâmetros avaliados. Quanto ao estudo preliminar de toxicidade aguda em ratos saudáveis, a administração intraperitoneal de doses únicas (250-1000 mg/kg) de mangiferina, por 28 dias, não produziu efeitos letais ou sinais clínicos de toxicidade, indicando que a  $\text{LD}_{50}$  (dose letal média) estaria acima de 1000 mg/kg (PRADO et al., 2015).

Tabela 1 - Atividades farmacológicas da mangiferina

<b>Atividades farmacológicas</b>	<b>Referência(s)</b>
Analgésica	ISLAM et al., 2010; DUANG et al., 2011; MEENAKSHI et al., 2018; BENITES et al., 2019.
Antibacteriana	MUTUA et al., 2017; DISO et al., 2017; BODIBA et al., 2018; SULEMAN et al., 2019.
Antidiabética	BARKAOUI et al., 2017; MOHAMMED; RIZVI, 2017; NGO et al., 2019; SEKAR et al., 2019.
Anti-inflamatória	SEOL et al., 2016; MILENKOVIĆ et al., 2017; ROCHA et al., 2018; STOHS et al., 2018.
Antimicrobiana	DORTA et al., 2016; MUAZU et al., 2017; OLASEHINDE et al., 2018; ARAÚJO et al., 2019.
Antioxidante	SEPTEMBRE-MALATERRE et al., 2016; ABBASI et al., 2017; VEIGA et al., 2018; ZAPATA et al., 2019.
Antitumoral	SIEGEL et al., 2017; GANOGPICHAYAGRAI et al., 2017; LIANG et al., 2019; YANG et al., 2019.
Atividade lipolítica	RICCI et al., 2014; GURURAJA et al., 2017; UDEM; DAHIRU; ETTEH, 2018; ZHANG et al., 2019
Imunomodulatória	MATKOWSKI et al., 2013; SHAILAJAN et al., 2016; KUMOLOSASI et al., 2018; AL RAWI; AL DULAIMI; AL RAWI, 2019.
Neuroprotetiva	KAWPOOMHAE et al., 2010; KASBE, P.; JANGRA, A.; LAHKAR, 2015; XI et al., 2018; FENG et al., 2019.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A mangiferina demonstra atividades farmacológicas em diferentes órgãos e tecidos, exercendo efeito preventivo e terapêutico contra uma considerável gama de doenças. Basicamente por meio de uma ação removedora de radicais livres (“*scavenger*”), ela protege neurônios, coração, fígado, rins e estômago contra os efeitos nocivos de radicais livres, prevenindo ou retardando o surgimento de doenças neurodegenerativas, processos inflamatórios e até mesmo de neoplasias. No entanto, a ação antioxidante não explica integralmente as propriedades farmacológicas da mangiferina, principalmente no tocante às suas atividades imunomoduladora e antidiabética, nas quais o seu mecanismo de ação é mais

complexo (CANUTO, 2009).

### 3.4.1.2 Ácidos clorogênicos

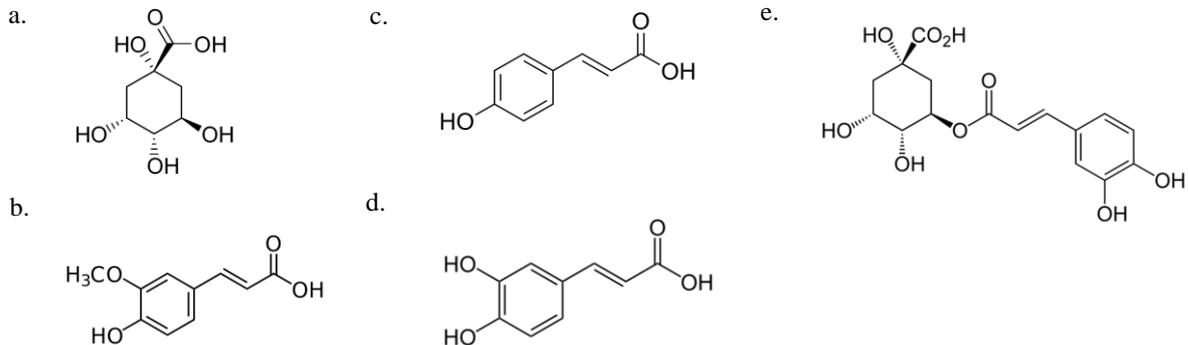
O ácido clorogênico (ACG), um dos compostos fenólicos mais abundantes na dieta humana, é um grupo de metabólitos secundários produzidos por certas espécies de plantas e também um componente importante do café (MENG et al., 2013). ACG é um termo atribuído a uma família de ésteres formados entre determinados ácidos trans-cinâmicos, como os ácidos cafeico e ferúlico, e o ácido quínico. Este último, junto ao ácido cafeico, forma um éster chamado ácido clorogênico, que é um polifenol junto com a quercetina, rutina, catequina, epicatequina entre outros (OZDAL et al., 2016).

No ano de 1846, Payen foi o primeiro cientista a identificar o ACG. Ele designou este nome a um composto fenólico com função ácida e estrutura química desconhecida, que conferia cor verde, em meio ligeiramente alcalino, quando exposto ao ar. Já em 1907, ele foi isolado pela primeira vez na forma de complexo cristalino, denominado clorogenato de cafeína, e com sua estrutura química posteriormente estabelecida por Fisher (1932), como sendo o ácido 3-cafeoilquínico, hoje conhecido como ácido 5-cafeoilquínico (MENG et al., 2013).

Dentre os compostos da família dos ACGs, o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) é o mais comum e conhecido fenol dietético biologicamente ativo, possuindo atividades antibacterianas, antioxidantes e anticarcinogênicas, particularmente efeitos hipoglicêmicos e hipolipemiantes (MENG et al., 2013). Na natureza, a maioria dos ácidos em plantas é esterificada para outros compostos poli-hidroxilados, como ácido quínico, ácido tartárico e glicose. No caso do 5-ACQ, ele é produzido pela formação de uma ligação éster entre o grupo carboxílico do ácido cafeico e a hidroxila na posição 5 do anel aromático do ácido quínico. (PARK, 2015).

Mesmo sendo o composto mais encontrado desta classe e o único disponível comercialmente, suas propriedades físico-químicas ainda não são totalmente conhecidas. Sua fórmula molecular e massa molar são, respectivamente,  $C_{16}H_{18}O_9$  e  $354,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , com faixa de fusão entre 205 a 206 °C. É estável em pH ácido, a temperaturas moderadas, e pode ser facilmente oxidado em pH alcalino. A solubilidade em água (25°C) é de 4%, sendo mais solúvel em água quente e levemente solúvel em acetato de etila (GIL; WIANOWSKA, 2017). As estruturas químicas dos precursores dos ACGs, bem como a do 5-ACQ estão representadas na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura química dos precursores do ACG e do 5-ACQ: a) ácido quínico; b) ácido ferúlico; c) ácido p-cumárico; d) ácido cafeico e e) ácido 5- cafeoilquínico (ácido clorogênico)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Há um interesse crescente na suplementação dietética de ACG como agente nutracêutico em formulações alimentícias devido às suas diversas propriedades medicinais. Fontes alimentares naturais de ACG são café, frutas cítricas, maçãs, pêras, frutas silvestres, alcachofra e berinjela (NALLAMUTHU; DEVI; KHANUMA, 2015). O consumo de ácidos fenólicos pode atingir 800 mg por dia dependendo do alimento ou bebida ingeridos. Uma xícara de café de 400 mL, por exemplo, apresenta um teor de ACG que pode variar de 420 a 780 mg (MARTINI; DEL BO'; TASSOTTI, 2016). A ingestão diária média de compostos fenólicos (1 g/dia) é consideravelmente maior do que a ingestão diária de outros antioxidantes dietéticos, como os carotenoides (9,4 mg/dia) e as vitaminas C e E (110 mg/dia), representando 90% do total de ingestão de antioxidantes. Além disso, os compostos fenólicos apresentam uma capacidade antioxidante maior em relação as vitaminas e carotenoides (CORRÊA et al., 2015).

O consumo destes antioxidantes, carotenoides juntamente com os ACG, está associado a uma diminuição no risco de Alzheimer e diabetes *mellitus* tipo 2, além de outras doenças degenerativas (FARAH, 2012).

Apesar das altas quantidades de ACG ingeridas ao longo do dia, uma quantidade extremamente baixa desses compostos é absorvida no intestino delgado, sendo que a maioria alcança o cólon, onde podem ser metabolizados pela microbiota local. No cólon, por exemplo, os ACGs podem inativar os radicais livres reativos e, como resultado, ajudam a prevenir o câncer de cólon (LUDWIG et al., 2014). Os metabólitos são então absorvidos, posteriormente conjugados no fígado e distribuídos aos tecidos (MARTINI; DEL BO'; TASSOTTI, 2016).

Os efeitos protetores e deletérios do ACG, particularmente o 5-ACQ, sobre células de espécies do reino animal, foram abordados em diferentes trabalhos. Alguns autores

mostraram que o 5-ACQ foi um agente indutor de alterações no DNA de mamíferos. Nos estudos de Ohnishi e sua equipe foi verificado seu efeito antioxidante na redução da hemólise e da peroxidação de hemácias de ratos, induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essa ação antioxidante é devida à presença de um grupamento orto-di-hidroxila no anel aromático do ácido cafeico (Figura 5d), que atuaria como um aceptor de radicais livres. De fato, a oxidação *in vitro* de LDL (lipoproteína de baixa densidade) humana foi retardada na presença de ácido cafeico. O ACQ pode ser facilmente oxidado por polifenoloxidasas a O-quinonas, que poderiam interagir com grupamento NH<sub>2</sub> de aminoácidos proteicos reduzindo o valor nutricional dos alimentos. Em outro trabalho, foi relatado que o 5-ACQ inibiu as enzimas  $\alpha$ -amilases, tripsina e lisozima, através da formação de ligação covalente com resíduos de triptofano e cisteína. Este isômero mostrou também propriedades anti-inflamatórias devido a sua capacidade de inibição do processo inflamatório mediado por citocinas. Já o consumo de altas doses de 5-ACQ, presentes na bebida de café, aumentou os níveis de homocisteína (aminoácido que está relacionado com o surgimento de doenças cardiovasculares como AVC) no plasma de humanos (ALVES et al., 2009).

As folhas do cafeeiro apresentam quantidades elevadas de ácidos clorogênicos, sendo os principais os ácidos cafeoilquínico (ACQ), o feruloilquínico (AFQ) e o dicafeoilquínico (diACQ), que apresentam comprovada ação antioxidante. Destaca-se o ACQ, principalmente o isômero 5-ACQ nessa espécie (CAMPA et al, 2012).

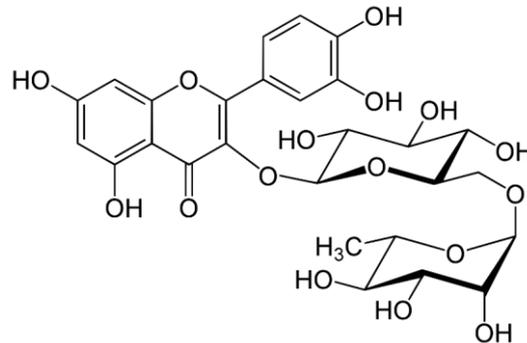
#### 3.4.1.3 Rutina

Rutina (3,3',4',5,7-penta-hidroxiflavona-3-ramnoglicosídeo, Fig. 6) é um bioflavonóide pertencente ao sub-grupo dos flavonóis, de cor amarelada, abundantemente encontrado no trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum Moench*, *F. tataricum (L.) Gaertn.*, *Polygonaceae*), em cebolas e em chás. Outras fontes alimentares incluem frutas como maçã, maracujá, laranja, limão e uva – incluindo também o vinho (GANESHPURKAR; SALUJA, 2016) e também em algumas plantas, como é o caso da *Coffea arabica* (PATAY et al., 2016a). No Brasil, principalmente no cerrado e na caatinga, a rutina pode ser encontrada nos frutos do faveiro (*Dimorphandra mollis*) e na fava danta (*Dimorphandra gardneriana*) (PAULA et al., 2018).

Em 1842, a rutina foi primeiramente identificada na arruda (*Ruta graveolens*) como um pigmento amarelo na forma de cristais em agulha e isolada, posteriormente, da alcaparra (*Capparis spinosa*), como ácido rutínico, denominação essa empregada devido à solubilidade

em soluções alcalinas, sendo, portanto, parcialmente solúvel em água. Sua fórmula definitiva,  $C_{27}H_{30}O_{16}$ , foi estabelecida em 1896 (OLIVEIRA, 2014).

Figura 6 - Estrutura da Rutina

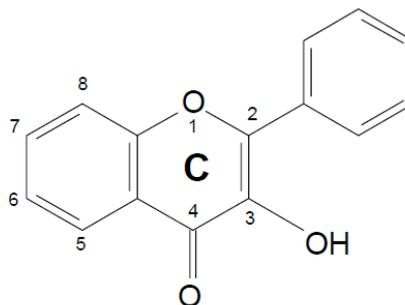


Fonte: Elaborado pelo autor.

Já em 1930, esta substância foi isolada por Albert Szent-Gyorgi, um cientista húngaro, a partir de laranjas sendo classificada como vitamina, mais tarde denominada vitamina P. Porém, estudos posteriores demonstraram não se tratar de uma vitamina, mas sim de um flavonoide. Desde então, mais de quatro mil flavonoides já foram identificados (NASIARA et al., 2018).

A rutina é um importante flavonoide glicosídico e se difere da quercetina por possuir um dissacarídeo (raminose + glicose) ou rutinose na posição 3 do anel pirano (Figura 7) e por esse motivo recebe algumas vezes o nome de rutinosídeo da quercetina (OLIVEIRA, 2014).

Figura 7 - Flavonol (2-fenil-benzo-alfa-pironas)

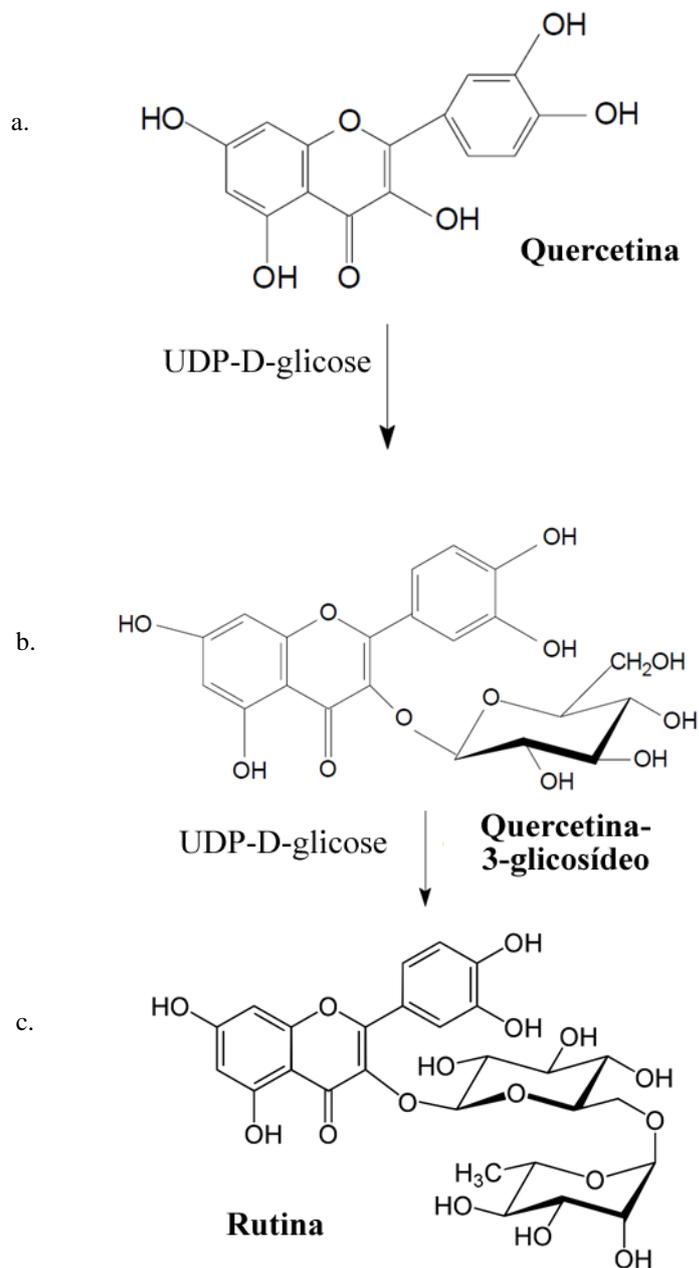


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os flavonoides ocorrem como glicosídeo, agliconas ou derivados metilados. A

estrutura básica é aglicona e sua classificação depende do grau de oxidação do anel pirano central (unidade C3). Para os flavonóis há uma hidroxila ligada na posição 3 deste anel. A reação a seguir (Figura 8), mostra a formação da rutina (Figura 8c) a partir da quercetina (Figura 8a). Podemos observar que a rutina, o representante escolhido desta sub-classe, apresenta uma ligação glicosídica na posição 3 do anel pirano. Foi descoberto que alguns carboidratos como D-glicose, galactose, glicoramnose e arabinose se ligam aos flavonoides nas posições 3 e 7 (NASIARA et al., 2018).

Figura 8 - Formação da rutina a partir da quercetina



Fonte: Adaptado de Barber e Behrman (1991).

A rutina é também conhecida e amplamente estudada por apresentar múltiplas atividades farmacológicas, dentre elas a atividade antioxidante que foram exploradas na medicina e nutrição humana. A sua atividade antioxidante se deve ao fato de poder atuar como sequestradora de O<sub>2</sub> e quelante de íons metálicos como, por exemplo, o ferro. Convencionalmente, ela é utilizada como agente antimicrobiano, antifúngico e antialérgico. No entanto, pesquisas atuais mostraram benefícios farmacológicos multiespectrais para o tratamento de várias doenças crônicas, como câncer, diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia (AL-DHABI et al., 2015). Além dessas, outras propriedades farmacológicas da rutina podem ser conferidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividades farmacológicas da rutina

<b>Atividades farmacológicas</b>	<b>Referência(s)</b>
Anti-Alzheimer	JAVED et al., 2012; QU et al., 2014; SOUZA et al., 2019; ZENGIN et al., 2019.
Anticarcinogênica	LIN et al., 2012; ALONSO-CASTRO et al., 2013; NAFEES et al., 2018; PRASAD; PRASAD, 2018.
Anticonvulsivante	NASSIRI-ASL et al., 2013; NIEOCZYM et al., 2014; MUHAMMAD et al., 2018; AL-MAJMAIE et al., 2019.
Antidiabética	NITURE et al., 2014; HSU et al., 2014; RIAZ et al., 2018; SUNDARRAJAN et al., 2019.
Antihiperlipidêmica	PATIL et al., 2012; SIKDER et al., 2014; OKUR et al., 2018; ELSAWY et al., 2019.
Anti-inflamatória	CHOI et al., 2014; YOO et al., 2014; SONG; KIM; LEE, 2018; GABR et al., 2018.
Antioxidante	MAMAT et al., 2013; MOTAMEDSHARIATY et al., 2014; PENG et al., 2018; SHAFI et al., 2019.
Cardioprotetora	CHAN; HEGDE; CHEN, 2009; OLALEYE et al., 2013; LINA et al., 2018; SUNDARAM; SALI; VASANTHI, 2018.
Hepatoprotetora	PATTANAYAK et al., 2011; OLALEYE et al., 2014; RAVI et al., 2018; QURESHI et al., 2019.
Vasoprotetora	NASSIRI-ASL et al., 2010; MENDES-JUNIOR et al., 2013; ČERVENKA et al., 2018; OYAGBEMI et al., 2018.

Os dados presentes na Tabela 2 nos mostra que a rutina é uma substância com múltiplas atividades farmacológicas. Como dizia o antigo ditado: “uma maçã por dia, mantém o médico afastado” parece ser verdade, pois a rutina, um dos componentes importantes das maçãs, tem uma ampla gama de atividades biológicas. Portanto, é necessário estudar extensivamente a rutina para estabelecer um perfil de segurança eficaz em humanos e assim obtermos todos os seus benefícios terapêuticos.

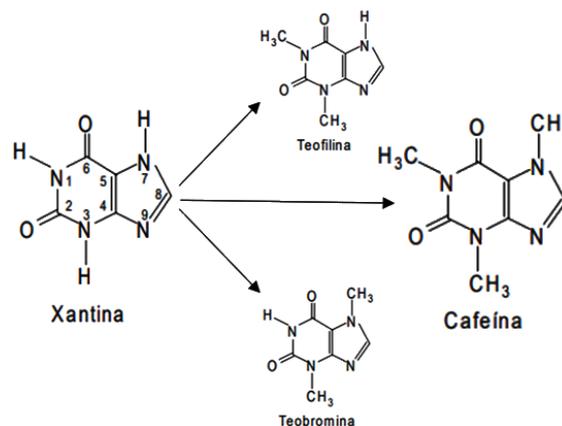
#### 3.4.1.4 Cafeína

A cafeína é um alcaloide identificado como 1,3,7-trimetilxantina, sendo um derivado da xantina. Está naturalmente presente nas sementes, folhas e frutos de mais de 63 espécies de plantas (KUMAR et al., 2018) e também naturalmente presente em vários alimentos. De acordo com uma revisão de consumo de cafeína, ela é um dos ingredientes alimentares mais consumidos no mundo sendo o chá e o café as principais fontes. A ingestão média diária de cafeína no Brasil é de 300 mg (TFOUNI et al., 2018).

A cafeína tem a capacidade de melhorar o humor, a atenção, o desempenho, o estado de alerta, a velocidade na qual a informação é processada e o tempo de reação (TFOUNI et al., 2018). Ela é rapidamente absorvida pelo organismo e atinge o cérebro dentro de cinco minutos após o seu consumo. Sua eliminação ocorre após cinco horas (KUMAR et al., 2018).

Além da cafeína, outros derivados da metilxantina são a teofilina (1,3-dimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina) como podem ser vistos na Figura 9. As metilxantinas são alcaloides relacionados pela potência na ação estimulante sobre o sistema nervoso central (MONTEIRO et al., 2016).

Figura 9 - Fórmulas estruturais da xantina e de seus três derivados naturais



Fonte: Adaptado de Rang, Dale e Ritter (2001).

Sua fórmula molecular e massa molecular são, respectivamente, iguais a  $C_8H_{10}N_4O_2$  e  $194,19 \text{ g.mol}^{-1}$ , possui cor branca com a forma de cristais prismáticos. É inodora, com sabor ligeiramente amargo. Estudos epidemiológicos descobriram que a ingestão de café está associada a redução de biomarcadores do estresse oxidativo e ajuda na redução da morbidade da artrite reumatoide, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, colite ulcerativa, diabetes, tipo de doenças neurodegenerativas e aterosclerose (GEETHAVANI; RAMESWARUDU; REDDY, 2014).

Acredita-se que a cafeína tenha sido descoberta pelo homem paleolítico por meio das plantas. A seguir este teria passado a ingeri-la sob diversas formas de bebidas. Foi separada do chá e do café no início da década de 1820 (ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008).

A cafeína é encontrada em todas as partes do cafeeiro, porém com mais abundância nas flores, nas sementes e nas folhas mais novas (PATAY et al., 2017). Das 63 espécies de plantas, a cafeína também pode ser encontrada, particularmente, no cacau (*Theobroma cocoa*), no guaraná (*Paullinia cupana*) e na erva-mate (*Ilex paraguayensis*). A maior parte deste alcaloide é ingerida na forma de bebidas, muito embora uma parcela pequena da população consuma cafeína na forma de fármacos, como antigripais, por exemplo. Nestes produtos, o teor de cafeína varia de 16-200 mg. Uma xícara de café pode conter em média cerca de 80 mg de cafeína, enquanto uma lata de coca em torno de 30-60 mg (WOLDE, 2014).

Provavelmente, a cafeína é a substância, psicoativa, mais ingerida no mundo (WIERZEJSKA, 2012). Quanto sua ação farmacológica, ela é variada provocando, dentre outros efeitos, alterações no sistema nervoso central, sistema cardiovascular e homeostase de cálcio. Os efeitos da cafeína sobre o comportamento humano têm sido objeto de estudos a algumas décadas. Esses efeitos podem ser descritos como redução da fadiga e aumento da capacidade de alerta, com concomitante melhora no desempenho de atividades que requeiram maior vigilância e também não reduz o efeito do álcool, embora algumas pessoas ainda acreditem neste efeito (WOLDE, 2014). Em 1981, foi descoberta sua atuação no bloqueio dos receptores de adenosina. Este bloqueio promove efeitos estimulantes que por muitas ocasiões são exigidos pelos seus consumidores. Possui também efeito diurético (GODOY et al., 2012).

Em um estudo, de longo prazo, sobre a relação entre o consumo de bebidas cafeinadas e a incidência de diabetes tipo 2, os autores acompanharam mais de 41.000 participantes em dez anos, avaliando o consumo de café a cada dois ou quatro anos. Os resultados sugerem que a ingestão de cafeína do café, e também de outras fontes, está associada a um risco, significativamente, menor de diabetes tipo 2 (WOLDE, 2014). A cafeína pode auxiliar também na queima de gordura corporal (ação lipolítica), aumentando a sensibilidade

da insulina de indivíduos obesos (SCHARDT, 2008).

Em contrapartida, o consumo de cafeína pode afetar negativamente o controle motor e a qualidade do sono, bem como causar irritabilidade em indivíduos com quadro de ansiedade. Ainda é motivo de grande controvérsia o efeito da ingestão de cafeína sobre o sistema cardiovascular. Seu consumo regular parece elevar a pressão arterial de forma persistente e, desta forma, indivíduos com hipertensão, doença coronariana e arritmia cardíaca deveriam ser encorajados a reduzir seus níveis de ingestão de cafeína (WOLDE, 2014).

Por fim, o consumo de cafeína pode ajudar a reduzir o risco de várias doenças crônicas, incluindo diabetes, doença hepática e câncer, bem como melhorar a função imunológica, no entanto, a ingestão de cafeína em excesso (acima de 300 mg por dia) pode causar vários distúrbios no organismo, como risco de desenvolver doença arterial coronariana, osteoporose, gastrite, anemia por deficiência de ferro e natimortos. A cafeína pode causar depleção de alguns nutrientes importantes, como a vitamina B6, e interferir na absorção de minerais essenciais, incluindo cálcio, ferro e magnésio. Por outro lado, algumas pesquisas revelaram que a ingestão de cafeína em excesso (acima de 300 mg por dia) pode causar vários distúrbios no organismo, como dores de cabeça, irritabilidade e insônia (WOLDE, 2014).

### **3.5 Diabetes *mellitus***

#### **3.5.1 *Histórico***

*Diabetes mellitus* (DM) é uma doença cujo conhecimento já data vários séculos. Por volta do ano 1500 a.C. os gregos já descreviam seus sintomas. Ela era caracterizada como uma estranha doença em que carne e ossos fluíam juntos pela urina levando o indivíduo a morte. No século II da era cristã, o médico Areteu da Capadócia deu a esta afecção o nome de diabetes, que em grego significa sifão. Ele observou que apesar dos diabéticos comerem muito (polifagia), terem muita sede (polidipsia), beberem muita água e produzirem muita urina (poliúria), ficavam cada vez mais fracos e edemaciados (poliastenia) e entravam quase sempre em coma antes da morte. Era uma doença grave e misteriosa, porque apesar da fartura de alimentos que entravam pela boca, as energias corporais desfaziam-se e saíam pela urina, fazendo do corpo humano um verdadeiro sifão ou diabetes (KARAMANOU et al., 2016).

Em 1679, o médico inglês Thomas Willis, considerado um dos maiores médicos do século XVII, foi quem fez uma descrição magistral do diabetes, ficando desde então reconhecida por sua sintomatologia como entidade clínica. Foi ele que deu o nome de diabetes

*mellitus* (sabor de mel), referindo-se ao sabor doce da urina. Na verdade, foi uma redescoberta, pois no século 7 a.C., o médico indiano Sushruta mencionou o sabor doce da urina desta doença, mas este trabalho, aparentemente, era desconhecido para Willis. Em 1815, o médico Michael Chevreul confirmou que o açúcar específico na urina dos diabéticos era a glicose (KARAMANOU et al., 2016).

Em 1869, o cientista alemão Paul Langerhans, enquanto estudava a estrutura do pâncreas através de um microscópio, descreveu a existência de estruturas celulares espalhadas pelo tecido exócrino, cujas formações anatômicas diferiam do resto do tecido pancreático. Essas estruturas formavam pequenas ilhas celulares espalhadas pelo tecido pancreático não apresentando, no entanto, comunicação direta com os ductos excretores. A função dessa pequena porção de células, mais tarde denominada “ilhas de Langerhans”, era desconhecida, mas Edouard Laguesse, posteriormente, sugeriu que tais células poderiam produzir algum tipo de secreção que participasse do processo de digestão (ZAJAC et al., 2010; KARAMANOU et al., 2016).

A evidência dessa função veio no final do século XIX, na Alemanha, quando Oskar Minkowski e Joseph von Mering realizaram experimentos com cães pancreatectomizados evidenciando o surgimento dos sinais e sintomas do DM nesses animais. Este diabetes induzido em animais era muito semelhante à forma aguda e mais severa do diabetes humano, inclusive produzindo morte nos animais quando todo o pâncreas era removido. No entanto, quando parte do pâncreas era deixada no animal, ou ainda quando fragmentos do órgão eram implantados sob sua pele, a morte dos cães não era observada. Este fato levantou a hipótese de que as alterações metabólicas produzidas após a retirada do pâncreas poderiam não estar associadas com a ausência da secreção de suco pancreático para o intestino, mas talvez à perda de alguma outra função do pâncreas (ZAJAC et al., 2010).

Entre 1916 e 1920, o fisiologista romeno Nicolas Paulesco realizou e publicou uma série de experiências com extrato de pâncreas provando que a injeção desse composto tinha a capacidade de diminuir a glicemia. Porém, o principal achado aconteceu em 1921, na Universidade de Toronto, Canadá, quando o cirurgião Frederic Grant Banting em colaboração com John James Rickard Macleod, James Bertram Collip e Charles Herbert Best isolaram extratos pancreáticos bovino com posterior administração em cães pancreatectomizados e eles perceberam que houve diminuição da concentração de glicose sanguínea. Esse fato rendeu o prêmio Nobel de Medicina a Banting e J. J. R. Macleod que era o professor responsável pelos laboratórios de pesquisa. Esta hormona mais tarde foi chamada de insulina (ZAJAC et al., 2010).

Depois desta descoberta os pacientes diabéticos puderam ter uma melhor qualidade de vida, com a diminuição da morbidade e da mortalidade associadas a esta doença. Por exemplo, em 1922, a insulina purificada foi administrada pela primeira vez a um paciente diabético, Leonard Thompson, com 14 anos de idade, e o resultado foi uma diminuição da hiperglicemia, permitindo assim melhorar sua condição. A partir desse caso de sucesso, em 1923, desenvolveu-se um processo de extração de insulina comercialmente viável, tornando-se amplamente disponível na América do Norte e na Europa (ZAJAC et al., 2010).

### 3.5.2 Classificação

O DM é uma síndrome metabólica hereditária de etiologia múltipla, caracterizada por um estado de hiperglicemia persistente; o qual resulta de uma deficiência na produção de insulina ou da resistência dos tecidos à ação deste hormônio. De acordo com o Comitê Executivo para Diagnóstico e Classificação do DM da “*American Diabetes Association*” (ADA, 2018) a síndrome pode surgir de forma secundária a alguma doença que cause destruição das ilhotas pancreáticas como: tumores, patologias endócrinas, defeitos genéticos e funcionais das células  $\beta$  ou na ação da insulina. No entanto, as formas mais comuns de DM resultam de distúrbios primários no sistema sinalizador da insulina. Tais distúrbios podem ser divididos em duas categorias: DM tipo 1 e DM tipo 2.

DM tipo 1, era anteriormente denominada DM insulino-dependente ou diabetes juvenil, sendo caracterizada pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas (responsável pela produção de insulina), por mecanismo de auto-imunidade. A reação imunológica pode ser de origem genética somente ou ainda decorrer de um evento ambiental que afete as características imunogênicas das células pancreáticas. Estudos epidemiológicos sugerem que infecções virais também podem desencadear o processo auto-imune característico do DM tipo 1 (ADA, 2018).

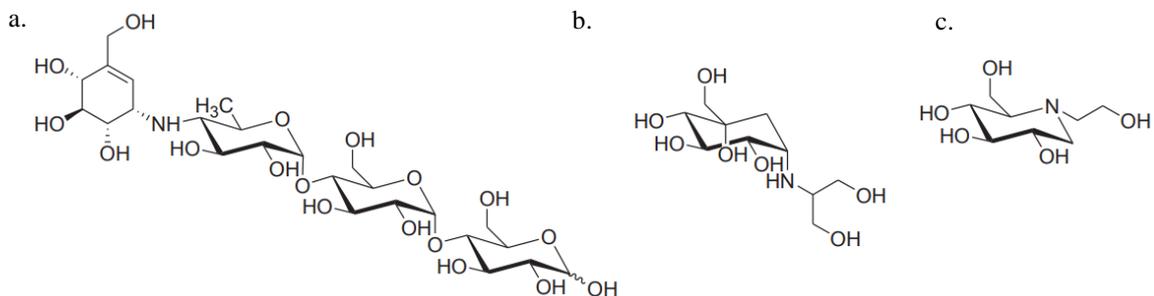
DM tipo 2, é a forma da doença anteriormente denominada DM insulino-independente ou diabetes da maturidade, a qual afeta aproximadamente 90-95% da população diabética. Caracteriza-se por ser um distúrbio multifatorial que geralmente resulta de graus variáveis de resistência tecidual à insulina e de uma deficiência relativa na secreção do hormônio pelas células pancreáticas. O risco de desenvolver DM tipo 2 aumenta com a idade, com a obesidade e a falta de atividade física. Sabe-se que a maioria dos pacientes com DM tipo 2 está com sobrepeso ou obesidade. O excesso de peso por si só causa algum grau de resistência à insulina. A resistência à insulina pode melhorar com a redução de peso e/ou com o tratamento farmacológico da hiperglicemia, mas raramente é restaurada ao normal. Nos estágios iniciais,

o paciente, muitas vezes, não nota os sintomas clássicos do DM tipo 2 o que dificulta seu diagnóstico (ADA, 2018).

Algumas estratégias terapêuticas para o tratamento do DM tipo 2 incluem a redução da demanda de insulina, a estimulação da secreção endógena de insulina, o aumento da ação da insulina nos tecidos alvo, a inibição da degradação de carboidratos com medicamentos que inibem a enzima  $\alpha$ -glicosidase dentre outras. (SALES et al., 2012).

A acarbose (Glucobay®), o miglitol (Diastabol®) e voglibose (Figura 10) são fármacos que inibem  $\alpha$ -glicosidase em pacientes com DM2 agindo como antagonistas enzimáticos da  $\alpha$ -glicosidase diminuindo a absorção intestinal de glicose. É interessante ressaltar que estes fármacos interferem na secreção de insulina, diminuindo a liberação da mesma e, conseqüentemente, evitando a hiperglicemia pós-prandial (CHOUDHURY et al., 2016).

Figura 10 - Estrutura química da acarbose (a), voglibose (b) e miglitol (c)



Fonte: Adaptado de Ghani (2015).

Contudo, estes inibidores, não específicos, causam efeitos secundários, tais como distensão abdominal, flatulência, meteorismo, diarreia por causa do excesso de inibição de  $\alpha$ -glicosidase. Assim os esforços têm sido dirigidos para encontrar inibidores naturais e seguros com o mínimo de efeitos secundários (ADA, 2018).

### 3.5.3 Epidemiologia

A DM é um problema crescente a nível mundial. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes – IDF (2017), os dados apontam que 425 milhões de adultos no mundo têm diabetes e que a estimativa é que no ano 2045 cerca de 629 milhões de pessoas terão diabetes, sendo 12 milhões em nosso país. Essa estimativa inclui pessoas com e sem o

diagnóstico da doença. O aumento da prevalência da DM é atribuído às rápidas mudanças culturais e sociais verificadas a nível global, nas últimas décadas, sobretudo relacionadas com a adoção de estilos de vida de risco, mas também como ao aumento da esperança de vida (SBD, 2017).

No Brasil, segundo estimativas do Ministério da Saúde, o diagnóstico da enfermidade aumentou 61,8% em 10 anos, segundo dados da pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Entre 2006 e 2016, o número de pessoas que dizem saber do diagnóstico de diabetes passou de 5,5% para 8,9%. As mulheres lideram o ranking: 9,9% da população feminina declarou possuir a doença contra 7,8% dos homens (VIGITEL, 2017).

#### **3.5.4 Estresse oxidativo e diabetes mellitus**

As complicações do DM são divididas em duas: microvasculares que incluem a retinopatia, nefropatia e neuropatia e as macrovasculares, como por exemplo, doença cardiovascular, cerebrovascular e doença arterial periférica, sendo a doença cardiovascular a principal causa de morte entre diabéticos (ADA, 2018). O controle intensivo da glicemia apresenta benefícios significativos para a saúde, diminuindo a incidência, prevenindo ou reduzindo o risco do aparecimento (ou ainda retardando a progressão) das complicações microvasculares (NETTO et al., 2009).

A hiperglicemia crônica representa o fator primário desencadeador do estresse oxidativo e, conseqüentemente, das complicações do DM. Entende-se por estresse oxidativo qualquer alteração fisiológica que cause aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) e nitrogênio (RNS - *Reactive Nitrogen Species*) com conseqüente diminuição da neutralização destas por mecanismos de defesa antioxidantes. Fisiologicamente, há uma relação de equilíbrio entre produção de ROS e RNS e sua neutralização, sendo assim, este desbalanço causa disfunção e danos celulares (JEONG; KING, 2011).

Por definição, ROS e RNS são compostos químicos com um elétron desemparelhado, respectivamente, nos átomos de oxigênio (O•) e nitrogênio (N•) possuindo propriedade reativa de acomodar ou doar elétrons para uma gama de moléculas biológicas. Estes compostos são produzidos pelas células eucarióticas normalmente, como conseqüência do metabolismo aeróbico. As principais ROS são distribuídas em dois grupos: as radicalares, formadas principalmente pelo ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), radical hidroxila (OH•) e radical

hidroperoxila ( $\text{HO}_2\bullet$ ) e as não radicalares, dentre as quais se destaca o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). As RNS mais importantes são  $\bullet\text{NO}$  e os peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (BARBOSA et al., 2016).

Os eventos que culminam nas complicações do DM iniciam-se a partir do acúmulo de ânion superóxido produzido durante a hiperglicemia, o qual inibe parcialmente a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fazendo com que os intermediários da via glicolítica se acumulem e sejam desviados para outras vias. Em outras palavras, este desvio resulta no aumento da conversão de diidroxiacetona fosfato (DHAP) para diacilglicerol (DAG), e de triose fosfato para metilglioxal, o principal precursor intracelular dos AGEs (BARBOSA et al., 2016).

Muitos indivíduos já apresentam o DM2 por muitos anos antes de ser diagnosticado, pois a hiperglicemia se desenvolve gradualmente e, nos estágios iniciais, não é grave o suficiente para que qualquer um dos sintomas clássicos da doença, tais como a poliúria, polidipsia ou a polifagia, seja notado. No entanto, esses indivíduos com diagnóstico tardio possuem risco aumentado de desenvolver complicações micro e macrovasculares. O risco de desenvolvimento dessa forma de diabetes além dos fatores citados anteriormente, como idade, obesidade e falta de exercício físico, ocorre também em indivíduos hipertensos e dislipidêmicos (ADA, 2018).

De fato, eventos consequentes da hiperglicemia como autooxidação da glicose, glicação não-enzimática de proteínas e consequente formação de produtos terminais de glicação avançada (AGEs) culminam com a produção de radicais livres, os quais causam alterações na estrutura de proteínas, inativação de enzimas, alterações nos sistemas de defesas antioxidantes e acentuado aumento nos níveis de peroxidação lipídica em vários tecidos (BARBOSA et al., 2016).

### ***3.5.5 Folhas de café e a prevenção do diabetes mellitus***

Os produtos naturais são a principal fonte para a descoberta de candidatos promissores, que desempenham um papel importante em futuros programas de desenvolvimento de fármacos. A facilidade de disponibilidade, menos efeitos colaterais e o baixo custo fazem com que as preparações à base de plantas sejam o principal elemento chave de todas as terapias disponíveis, especialmente nas áreas rurais. Desde tempos remotos, as plantas medicinais, com seus vários princípios ativos e propriedades, têm sido usadas no tratamento do DM. Muitas pesquisas sobre a atuação de produtos naturais nos diversos

mecanismos da fisiopatologia do DM têm sido realizadas nas últimas décadas (ARYA; GUPTA; RANJEET, 2011).

Na Medicina Tradicional Chinesa (MTC), muitas plantas medicinais têm sido usadas como medicamentos naturais para o tratamento de inúmeras doenças incluindo o diabetes e suas complicações. O uso da fitoterapia baseada na MTC vem ganhando crescente aceitação em todo o mundo. Estima-se que um terço dos adultos nos países desenvolvidos e mais de 80% das pessoas em muitos países em desenvolvimento usam medicamentos fitoterápicos para doenças que variam desde um simples resfriado a doenças crônicas (LIM et al., 2018).

A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas ao serem avaliadas farmacologicamente demonstraram ter atividade hipoglicemiante e também constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes. Algumas destas substâncias podem ter potencial terapêutico, enquanto outras podem produzir hipoglicemia como efeito colateral devido à sua toxicidade, especialmente hepatotoxicidade (LIM et al., 2018). Isto constitui a principal força para encontrar alternativas, principalmente do reino vegetal que são menos severas ou até mesmo sem efeitos colaterais, visto que os hipoglicemiantes orais sintéticos, juntamente com a insulina, embora sejam a principal via para o controle do diabetes, estes apresentam efeitos colaterais proeminentes e não sendo possível reverter o curso de suas complicações (ARYA; GUPTA; RANJEET, 2011).

Os compostos fenólicos extraídos de plantas, como por exemplo, ácidos fenólicos e flavonoides, podem promover inúmeros benefícios à saúde inclusive no tratamento do diabetes, visto que alguns destes compostos podem inibir uma considerável absorção de carboidratos e por consequência aumenta a sensibilidade à insulina e secreção da mesma, reduzir a captação intestinal de glicose e regular o metabolismo da glicose (AKASH; REHMAN; CHEN, 2014). As folhas do cafeeiro apresentam elevadas quantidades de compostos fenólicos fundamentais para a proteção do vegetal contra pragas e outros agentes nocivos, pois exercem efeitos antioxidantes e antibacterianos. Dentre as substâncias fenólicas descritas, os ácidos clorogênicos são as mais representativas, estando presentes em quantidades superiores nas folhas da variedade *C. arabica*, em comparação com outras espécies (CAMPA et al., 2012).

O conteúdo fenólico presente nas folhas de *C. arabica* justifica os efeitos benéficos do seu consumo na forma de chá, pois exercem ação protetora contra os radicais livres, que estão associados ao aparecimento de diversas doenças crônicas não transmissíveis. No entanto, o consumo predominante no nosso país é a bebida obtida a partir dos grãos torrados (café),

sendo a infusão das folhas pouco difundida. A infusão das folhas é mais comum em países da África e Ásia. A atividade antioxidante já foi comprovada, além do efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica utilizando extrato etanólico das folhas de *C. arabica* (CAMPA et al., 2012; LUDWIG et al., 2014; TREVISAN et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2019).

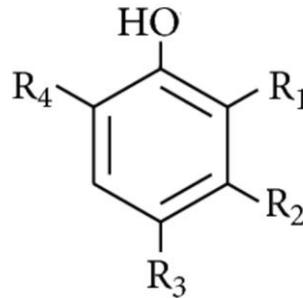
Além dos ácidos clorogênicos presentes nas folhas de *C. arabica*, outros compostos fenólicos, como a mangiferina e rutina, são importantes para a proteção do vegetal contra pragas e doenças, em função dos efeitos antioxidante e antimicrobiano encontrado em ambos. Tanto a mangiferina quanto a rutina têm despertado o interesse da comunidade científica por apresentarem efeitos benéficos no controle e prevenção do diabetes (BARRETO et al., 2008; CAMPA et al., 2012).

A pesquisa dos benefícios das folhas de café arábica é uma tendência crescente, pois a partir de suas propriedades, ela pode ser uma fonte para o desenvolvimento de múltiplas modalidades terapêuticas orientadas à prevenção e ao tratamento do diabetes.

### **3.6 Determinação dos fenólicos totais**

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza onde mais de 8000 desses compostos já foram detectados e se encontram largamente distribuídos nas plantas. Este grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais e frutas. Podem ser pigmentos, que dão aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivados de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente. Esses compostos atuam como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também pelos seus radicais intermediários estáveis, impedindo a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (SILVA et al., 2010b). Devido à funcionalidade dos compostos fenólicos sobre a saúde humana, o interesse por alimentos de origem vegetal tem crescido anualmente. Sua fórmula química apresenta pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. Sua estrutura básica é apresentada na Figura 11.

Figura 11 - Estrutura dos compostos fenólicos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma classificação direta tenta dividir a ampla categoria de fenólicos em fenóis e polifenóis simples, baseados exclusivamente no número de subunidades de fenol presentes, mas muitos compostos fenólicos de plantas são polimerizados em moléculas maiores. Assim, o termo “fenólicos vegetais” engloba fenóis simples, ácidos fenólicos (benzoico e derivados do ácido cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, lignanas e ligninas, os quais se encontram na natureza em pequena ou grande escala, sendo os flavonoides, e derivados, e os ácidos fenólicos de grande escala (GOLENIOWSKI et al., 2013).

Atualmente, os principais relatórios de pesquisa envolvendo compostos fenólicos são do ácido gálico, do ácido protocatecuico, do aldeído protocatecuico, da catequina, do ácido clorogênico e do galato de epigallocatequina (CAO et al., 2019). Na Tabela 3, é apresentada a classificação segundo o esqueleto da cadeia principal dos fenólicos.

Tabela 3 - Classificação dos compostos fenólicos segundo o esqueleto principal

<b>Esqueleto básico</b>	<b>Classe de compostos</b>
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas, benzofenonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides, isoflavonóides e chalconas

(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanais
(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Diflavonóides
(C6) <sub>n</sub>	Melaninas vegetais
(C6-C3) <sub>n</sub>	Ligninas
(C6-C1) <sub>n</sub>	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Taninos condensados

---

Fonte: Tiveron (2010).

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas. O mecanismo de ação mais comum é a quebra das cadeias de reação: as moléculas antioxidantes interagem com os radicais ativos para formar radicais de baixa atividade. A oxidação também é retardada na presença de substâncias que destroem hidroperóxidos (sulfetos de dialquila, etc.). Neste caso, a taxa de formação de radicais livres diminui. Mesmo em uma pequena quantidade, os antioxidantes reduzem a taxa de oxidação, portanto, durante um certo período de tempo (o período de inibição), os produtos de oxidação não são formados. Suas atividades antioxidantes e sequestradoras de radicais livres são excelentes para a saúde, pois sua ingestão está relacionada à menor incidência de doenças crônico-degenerativas, como câncer, diabetes, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares. Cereais, frutas e vegetais são ricas fontes de compostos fenólicos. De fato, os benefícios para a saúde de sua ingestão alimentar têm sido relacionados, pelo menos em parte, ao conteúdo de compostos fenólicos (KEKELIDZE et al., 2018).

Nas folhas de café, os ACG constituem os principais compostos fenólicos não voláteis encontrados. Apresentam propriedades funcionais relevantes na neutralização de radicais livres. Dentre os ácidos fenólicos, o ácido cafeico é considerado um dos mais importantes, pois faz parte do ácido-5-cafeoilquínico, um dos isômeros mais representativos do café (CAMPA et al., 2012).

Também presente nas folhas de café, a mangiferina é outro composto fenólico eficaz no combate ao estresse oxidativo (CAMPA et al., 2012; TREVISAN et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2019). Este metabólito foi primeiramente caracterizado em pesquisas realizadas com extratos das folhas de manga, sendo purificado, isolado e testado frente a diversos ensaios antioxidantes, como o sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e o poder de redução do ferro (FRAP). Os resultados demonstraram que a mangiferina apresentou atividade antioxidante superior em comparação com outras substâncias fenólicas,

em todos os sistemas antioxidantes testados, atribuindo-se, portanto, a atividade antioxidante desses extratos, principalmente ao alto teor de mangiferina, um dos compostos fenólicos majoritários nas folhas dessa planta (BARRETO et al, 2008).

A atividade antioxidante do café também é atribuída à presença de rutina. Há séculos, alimentos ricos em rutina já haviam sido usados pela medicina tradicional chinesa e, mais recentemente, demonstrou-se que a rutina possui propriedades benéficas para prevenir patologias que envolvam radicais livres. Ela pode inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios: reagindo com o íon superóxido e radicais peroxilas lipídicos, e formando um complexo com o ferro, que é um catalisador da formação de radicais de oxigênio ativo (MUÑIZ-MOURO et al., 2018).

A quantidade significativa destes compostos fenólicos, presentes nas folhas de *C. arabica*, bem como o sinergismo entre eles é o que torna crescente o interesse em suas propriedades farmacológicas.

### 3.6.1 Ensaio folin-ciocalteu

O ensaio Folin-Ciocalteu é um dos mais antigos métodos de quantificação de fenóis em amostras de produtos naturais. Este ensaio, que também é conhecido como fenólicos totais, foi originalmente designado para a análise de proteínas por reação entre o reagente e o grupo fenol da tirosina. O reagente Folin-Ciocalteu oxida fenóis e produz um produto colorido com um máximo de absorção à 745-750 nm. Singleton e colaboradores adotaram este ensaio para a análise de compostos fenólicos no vinho. Desde então, esse método vem sendo utilizado em muitos estudos para medir a quantidade de compostos fenólicos em diversos tipos de extratos (GÜLÇIN, 2012).

O reagente Folin-Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (complexo,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , de coloração amarela). Porém, em presença de compostos fenólicos formam-se os complexos molibdênio-tungstênio azuis  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$ , nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras. Deve-se ressaltar que os complexos azuis formados são independentes da estrutura dos compostos fenólicos, descartando, portanto, a possibilidade de complexos de coordenação formados entre o metal e os compostos fenólicos (GÜLÇIN, 2012).

Geralmente, o ácido gálico é amplamente utilizado como composto padrão de referência, e os resultados são expressos como mg EAG/ g de extrato (miligrama de equivalente

em ácido gálico por grama de extrato) (GÜLÇİN, 2012).

### **3.7 Determinação da atividade antioxidante**

Um antioxidante é uma substância que, quando presente em baixa concentração em comparação com a de um substrato oxidável no meio, inibe a oxidação do substrato. Sob esta classificação, os compostos fenólicos, derivados do metabolismo secundário das plantas, protegem múltiplos órgãos da oxidação e, portanto, os compostos fenólicos devem ser considerados como antioxidantes naturais. Os antioxidantes têm se apresentado como uma maneira alternativa de prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e, também, minimizar os danos oxidativos nos seres vivos. Devido ao fato do emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos ser alvo frequente de questionamentos quanto à inocuidade, havendo a possibilidade desses antioxidantes apresentarem alguma toxidez, várias pesquisas têm sido desenvolvidas de modo a buscar compostos naturais que também possuam esta propriedade funcional (GRANATO et al., 2018).

Os antioxidantes são categorizados com base em sua função (sequestradores de radicais livres, removedores de agentes oxidantes não radicais, compostos que inibem a geração de oxidantes, agentes quelantes de metais de transição e compostos que são capazes de estimular a produção de compostos antioxidantes endógenos), polaridade (solúvel em água e lipossolúvel), fonte (exógena ou endógena) e mecanismo (os antioxidantes podem neutralizar a ação deletéria de espécies reativas de membranas celulares, principalmente por três vias: transferência de átomos de hidrogênio, transferência única de elétrons e a capacidade de quelar metais de transição) (GRANATO et al., 2018).

O uso de antioxidantes na saúde humana tem promovido diversas pesquisas nas áreas de ciências alimentares e plantas medicinais para avaliar seu potencial como antioxidantes. Estudos epidemiológicos, bem como ensaios de intervenção clínica, sugerem que os antioxidantes apresentam um papel fundamental na prevenção ou desaceleração da progressão de doenças cardíacas e algumas formas de câncer. Quando o equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes é perdido, resulta em estresse oxidativo que, através de uma série de eventos, desregula as funções celulares que levam a vários tipos de câncer (SHIVANI; ANJALI, 2018).

Os principais antioxidantes que podem ser encontrados nos vegetais são os compostos fenólicos e a vitamina C (hidrossolúveis), bem como os carotenoides e vitamina E (lipossolúveis). Esses antioxidantes absorvem radicais livres e inibem o início da reação em

cadeia ou interrompem a propagação de reações em cadeia das reações oxidativas promovidas pelos radicais (GÜLÇİN, 2012).

As características químicas dos antioxidantes incluem sua solubilidade, habilidade regenerativa, relação estrutura/atividade e biodisponibilidade, que são fatores importantes quando se considera o papel destes compostos na saúde humana (GÜLÇİN, 2012).

A produção de alimentos com antioxidantes naturais, para além de proteger a oxidação dos alimentos, também contribui para um consumidor mais saudável. No entanto, é importante estar ciente que os benefícios dos produtos naturais, como o café, são reconhecidos majoritariamente pelos efeitos sinérgicos de toda a sua matriz e não tanto pela presença de substâncias específicas (STELMACH; POHL; SZYMCZYCHA-MADEJA, 2015).

Algumas críticas relacionadas a esses ensaios *in vitro* são baseadas na ausência de radicais livres (DPPH e ABTS) em organismos vivos, particularmente no corpo humano, e no mecanismo de complexidade da reação. Além disso, a alta atividade antioxidante *in vitro* não pode ser exatamente traduzida em “prevenção, tratamento ou cura” de doenças não transmissíveis em humanos. Por exemplo, no ensaio FRAP, como a reação é realizada em pH ácido (3,6), há muitas críticas sobre a tradução desse método em eficácia *in vivo*, sugerindo que ele deve ser usado apenas como um método de triagem, fornecendo uma ideia da capacidade antioxidante (GRANATO et al., 2018).

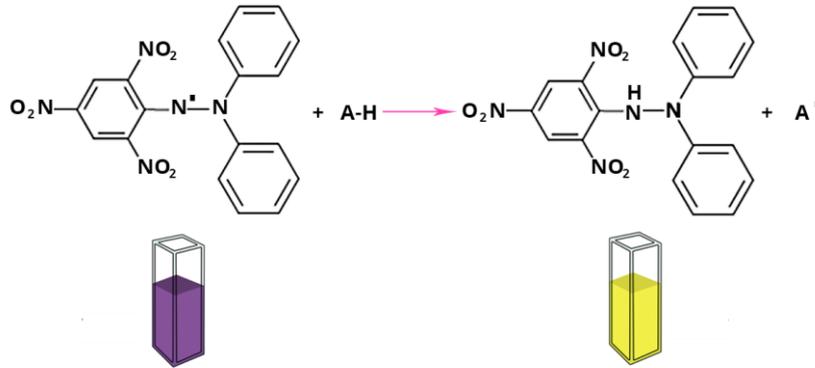
Sem dúvida, ensaios como esses são de baixo custo, fáceis de executar e não requerem equipamentos ultra-sensíveis. Eles são usados para avaliar compostos isolados e extratos mistos de matrizes complexas de origem vegetal. A atividade antioxidante de não nutrientes com benefícios de saúde tem sido estudada usando uma ampla variedade de métodos, incluindo protocolos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Geralmente, os autores encontram um alto grau de correlação entre a atividade antioxidante *in vitro* e o conteúdo fenólico total e/ou fenólicos individuais (GRANATO et al., 2018).

### **3.7.1 Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)**

Devido a complexa composição da maioria dos alimentos, a separação de cada antioxidante e o estudo individual dos mesmos seria altamente dispendioso e provavelmente ineficiente, devido a possíveis sinergismos entre os mesmos e com a matriz. Uma das técnicas desenvolvidas para contornar esta situação é o ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) que mede a capacidade antioxidante total da amostra através da conversão do radical livre DPPH, que apresenta forte coloração violeta, a sua forma reduzida de cor amarela (Figura 12).

Quanto maior o caráter antioxidante da amostra, maior a redução da coloração (GÜLÇIN, 2012).

Figura 12 - Estrutura química do radical DPPH e sua estabilização



Fonte: Chimactiv (2018).

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável e que possui absorção na faixa de 515-520 nm. A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação (GÜLÇIN, 2012).

Este método tem sido muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de material vegetal. Ele apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos, e por ser um radical livre estável está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas (como ocorre com o método ABTS), além de facilitar seu uso (GÜLÇIN, 2012).

### 3.8 Determinação da inibição enzimática

A prospecção de alternativas terapêuticas, principalmente de origem vegetal, apresenta-se como opção promissora para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos, visto que a grande diversidade de espécies vegetais ainda não estudadas representa um vasto campo de moléculas a serem descobertas. Nesse contexto, alvos moleculares como enzimas e receptores têm sido estudados para a busca de medicamentos, baseados no mecanismo de inibição enzimática que ocasiona alterações benéficas no metabolismo e no tratamento de doenças (PEREIRA et al., 2011).

As enzimas  $\alpha$ -glicosidases participam de processos bioquímicos fundamentais do metabolismo, como degradação dos polissacarídeos provenientes da alimentação, tornando

disponíveis unidades de monossacarídeos para geração de glicogênio e glicoproteínas celulares, biossíntese e modificação de  $\alpha$ -glicoproteínas, catabolismo de peptidoglicanos e outros glicoconjugados. A região oligossacarídica destes glicoconjugados desempenha funções fundamentais nos processos biológicos, como resposta imune, reconhecimento intercelular, proliferação e diferenciação celular, enovelamento, estabilidade e solubilidade das proteínas, além de processos patológicos, como câncer e inflamação (FIGUEIREDO-GONZALEZ et al., 2016).

Somente os monossacarídeos podem ser absorvidos pela mucosa intestinal, desta forma, inibidores dessas enzimas presentes em plantas oferecem uma estratégia promissora para o controle da hiperglicemia associada ao DM tipo 2, visto que a concentração de glicose sanguínea diminui, reduzindo assim a demanda por insulina (EL-MANAWATY; GOHAR, 2018).

Alguns fármacos antidiabéticos atualmente disponíveis, como a acarbose e voglibose, atuam inibindo a atividade da  $\alpha$ -glicosidase. A acarbose é um sacarídeo e apresenta uma inibição competitiva sobre a  $\alpha$ -glicosidase. Já a voglibose é um derivado de valiolamina e possui uma maior atividade de inibição sobre a enzima, sendo 20 a 30 vezes mais potente que a acarbose (LORDAN et al., 2013).

Contudo, eles estão associados com efeitos colaterais gastrointestinais, como dores abdominais, flatulência, meteorismo e diarreia. Desse modo, estudos têm sido direcionados para a descoberta de produtos naturais que possuem substâncias capazes de inibir essas enzimas digestivas, devido ao seu baixo custo, segurança e baixa incidência de efeitos colaterais indesejáveis (FIGUEIREDO-GONZALEZ et al., 2016).

Diferentes compostos fenólicos têm efeitos positivos sobre o diabetes, uma vez que eles são responsáveis pela inibição da atividade da  $\alpha$ -glicosidase intestinal e, conseqüentemente, podem reduzir a glicemia após refeições ricas em carboidratos (BEDEKAR; SHAH; KOFFAS, 2010).

As folhas de café apresentam, dentre outros metabólitos, a mangiferina, que por sua vez demonstrou atividade antidiabética em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, droga supressora de insulina por destruição de células  $\beta$ -pancreáticas. Os efeitos de mangiferina sobre a hiperglicemia de ratos diabéticos foram observados através da diminuição significativa dos níveis de glicemia bem como pelo decréscimo nas concentrações séricas de triglicerídios, colesterol totais e LDL. A mangiferina inibiu a enzima  $\alpha$ -glicosidase retardando a absorção de glicose e suprimindo a hiperglicemia pós-prandial (DINESHKUMAR; MITRA; MANJUNATHA, 2010).

Assim, a inibição da atividade das enzimas envolvidas na digestão de carboidratos, como a  $\alpha$ -glicosidase, por meio do uso terapêutico de inibidores naturais encontrados nas folhas de café, representa um grande potencial para o desenvolvimento de novas estratégias com o objetivo de prevenir e/ou controlar a hiperglicemia pós-prandial.

### 3.8.1 *Ensaio da inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase*

A  $\alpha$ -glicosidase é uma enzima ligada à membrana localizada no epitélio do intestino delgado, catalisando a clivagem de dissacarídeos para formar glicose. Os inibidores podem retardar a absorção de carboidratos na dieta e suprimir a hiperglicemia pós-prandial. Portanto, a inibição da  $\alpha$ -glicosidase pode ser uma das abordagens mais eficazes para o controle do diabetes. Glicosidases não são apenas essenciais para a digestão de carboidratos, mas também vitais para o processamento de glicoproteínas e glicolipídios (HOSSAIN et al., 2008).

O ensaio de inibição da  $\alpha$ -glicosidase é realizado utilizando enzimas de diferentes fontes, como  $\alpha$ -glicosidase de leveduras, de acetona intestinal em pó obtida de ratos e, em alguns casos,  $\alpha$ -glicosidase microbianas também são usadas. Devido à sua acessibilidade e baixo custo,  $\alpha$ -glicosidase obtida a partir de leveduras é a enzima mais amplamente utilizada (BOATH; STEWART; MCDUGALL, 2012).

O *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) é o substrato mais utilizado em ensaios colorimétricos para inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase. O ensaio baseia-se no princípio da interação entre a enzima e o reagente *p*-NPG a qual resultará num cromógeno medido espectrofotometricamente a 405 nm (BOATH; STEWART; MCDUGALL, 2012). Para bloquear a atividade enzimática residual ou não desencadeada, o carbonato de sódio é usado (KIM et al., 2008).

A acarbose é o controle positivo mais amplamente utilizado nos ensaios de inibição da  $\alpha$ -glicosidase. Alguns estudos mostraram que o fármaco é um inibidor relativamente fraco da  $\alpha$ -glicosidase microbiana, no entanto, apresenta forte atividade contra a  $\alpha$ -glicosidase de mamíferos (UDDIN et al., 2012).

O conteúdo fenólico presente nas plantas tem sido alvo de diversas pesquisas científicas para melhor elucidar dos possíveis mecanismos de ação e a comprovação dos seus efeitos sobre a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase. Logo, podemos concluir que os extratos vegetais ricos em polifenóis são possíveis inibidores (KUMAR et al., 2011). O conhecimento da composição fenólica da amostra vegetal ajuda na identificação de potenciais candidatos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos do teor de fenólicos totais, da atividade antioxidante e da inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará – LPNBio/DQOI/UFC.

### 4.1 Matéria prima

As folhas do cafeeiro, de 16 cultivares, da espécie *Coffea arabica* foram coletadas nas plantações localizada na Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) em novembro de 2017. As cultivares em questão são: Catiguá MG1, Catiguá MG3, Rubi, Aranãs, Sacramento MG1, Oeiras, Acaiá Cerrado, Arapongas MG1, Travessia, Pau Brasil MG1, Paraíso 2 MG5, Paraíso MG419-1, Sarchimor, Pau Brasil 2, Arapongas MG52 e Topázio MG1190. Foram coletadas folhas novas (cor verde clara) e maduras (cor verde escura) situadas em diversas partes do cafeeiro.

As folhas foram lavadas, higienizadas e depositadas em bandejas para secagem a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 96 horas (dados não apresentados) em estufa com circulação de ar. Após a secagem, todo material foi armazenado em sacos de papel (para evitar a formação de fungos) e transportado até o Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica na Universidade Federal do Ceará (LPNBio/DQOI/UFC).

Em seguida, todas as amostras foram trituradas (Moinho Moulinex, DP700) até obter um pó fino. As folhas trituradas foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos herméticos resultando numa massa total de 306,08 g.

Apesar de todos os cultivares serem da mesma espécie, cada um possui características particulares, como por exemplo, maior teor de fenólicos, maior resistência a *Hemileia vastatrix* (também conhecida como ferrugem do cafeeiro), dentre outras. Alguns destes dados podem ser conferidos no Apêndice A.

Por fim, os ensaios que serão realizados nos permitirão avaliar o potencial antioxidante das folhas de café, bem como sua possibilidade de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase. Além disso, também será possível verificar se existe alguma diferença na atividade entre as 16 cultivares, buscando assim, se houver, aquela ou aquelas que obtiverem os melhores resultados em todos os experimentos.

## 4.2 Reagentes

Hexano (Sigma-Aldrich, USA), metanol (Sigma-Aldrich, USA), ambos de grau analítico e água destilada foram empregados como solventes nos processos de extração.

Reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica, Brasil), padrão ácido gálico (Sigma-Aldrich, USA) e carbonato de sódio anidro (Synth, Brasil) foram utilizados no método Folin-Ciocalteu para determinação do teor de fenólicos totais.

DPPH (Sigma-Aldrich, USA) e metanol grau analítico (Sigma-Aldrich, USA) foram usados na metodologia DPPH para avaliação da atividade antioxidante.

Metanol (padrão HPLC, Sigma-Aldrich, USA) e ácido acético (padrão HPLC, Êxodo, Brasil) foram utilizados nas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Enzima  $\alpha$ -glicosidase *Saccharomyces cerevisiae* (750 U, Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (Sigma-Aldrich, USA), fosfato de sódio monobásico (Dinâmica, Brasil), fosfato de sódio dibásico dodecahidratado (Dinâmica, Brasil), bicarbonato de sódio (Synth, Brasil) e acarbose (Glucobay<sup>®</sup>) foram utilizados para o ensaio da inibição enzimática.

## 4.3 Obtenção dos extratos

A extração dos compostos fenólicos das folhas de café (*Coffea arabica*) foi obtida em forno de micro-ondas durante 4 minutos na potência máxima. Para esse estudo, primeiramente, foram realizados ensaios prévios, variando apenas o tempo de preparo do chá (2, 4 e 6 minutos), buscando conciliar a melhor combinação entre o preparo feito em casa com a maior extração possível de metabólitos.

De acordo com os resultados cromatográficos obtidos, em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a extração em 6 minutos, como já era esperado, apresentou a maior quantidade de metabólitos obtidos. No entanto, todo este tempo de produção do chá foge muito da realidade do preparo caseiro. A fim de conciliar a melhor extração com o melhor tempo de preparo, foi feita uma avaliação dos resultados obtidos, em g/kg, na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor de metabólitos obtidos pelo chá em diferentes tempos de preparo

<b>Tempo de preparo (min)</b>	<b>Metabólitos (g/kg)</b>			
	<b>Ácido Clorogênico</b>	<b>Cafeína</b>	<b>Mangiferina</b>	<b>Rutina</b>
2	19,05	10,68	10,79	8,40
4	27,83	16,74	17,19	16,93
6	31,05	19,16	19,11	18,37

Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar com os dados da Tabela 4 que existe diferença na quantidade de metabólitos obtidos de acordo com o tempo de extração. Uma maior diferença é vista entre o primeiro e segundo preparo, cerca de 50% a mais é obtido em 4 minutos de extração. No entanto, essa diferença já não é tão significativa, em relação à anterior, quando comparamos o segundo e terceiro modo de preparo (cerca de 15% dos metabólitos são obtido a mais em 6 minutos).

Com base nesses dados, foi decidido que a extração para a realização dos ensaios deveria ocorrer em 4 minutos, visto que o tempo de preparo médio de chás varia entre 3 a 5 minutos. É importante lembrar que quando a extração ocorre a 100 °C, por um período prolongado (acima de 10 minutos), muitos de seus compostos podem ser degradados (SAFDAR et al., 2016).

Outro ponto importante a ser destacado é que a grande maioria da população prepara chá na forma de infusão. Portanto, foi realizado um novo ensaio, desta vez para comparar o teor de extração feita por infusão em relação a extração feita em forno de micro-ondas. Tempo de preparo foi de 4 minutos e os resultados podem ser conferidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Quantidades de metabólitos extraídos por infusão e por forno de micro-ondas

<b>Tipo de preparo</b>	<b>Metabólitos (g/kg)</b>			
	<b>Ácido Clorogênico</b>	<b>Cafeína</b>	<b>Mangiferina</b>	<b>Rutina</b>
Micro-ondas	27,83	16,74	17,19	16,93
Infusão	25,43	15,88	15,22	14,19

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como é possível observar na Tabela 5, a diferença de extração dos compostos entre

as duas formas preparo não é tão grande, sendo a diferença cerca de 15% a mais no preparo feito por forno de micro-ondas. Estudos apontam que dentre alguns métodos de preparo de chá (infusão, ultrassom e micro-ondas), o aparelho de micro-ondas é capaz de extrair a maior quantidade de compostos fenólicos (ÍNCE et al., 2013).

A escolha desta extração feita por forno de micro-ondas foi baseada na praticidade e rapidez de produção do chá. Além disso, sua preparação não exige técnicas laboratoriais específicas, sendo que qualquer pessoa, mesmo em ambiente doméstico, possa prepará-lo sem nenhuma dificuldade, desde que possua o aparelho.

Além do chá, foram feitas também extrações por soxhlet e QuEChERS cujo objetivo foi apenas comparar o teor de compostos fenólicos presentes no chá (extração por forno de micro-ondas) em relação aos outros dois métodos. Esta comparação permitirá avaliar se a quantidade de metabólitos extraídos pelo chá é relevante em relação as quantidades extraídas pelos métodos, necessariamente, laboratoriais. A concentração dos extratos proposta neste estudo foi de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

#### **4.3.1 Extração em forno de micro-ondas**

A extração utilizando o forno de micro-ondas é uma técnica recente de extração que pode oferecer alta reprodutibilidade em menor tempo, manipulação simplificada, reduzido consumo de solvente e baixa energia empregada sem diminuição do rendimento dos compostos alvos (SILVA, AZEVEDO; REZENDE, 2016). A extração de compostos fenólicos por irradiação de micro-ondas surgiu em 1986 com a pesquisa de Ganzler e seus colaboradores. Desde então, a técnica alcançou desenvolvimento e tem sido muito utilizada em Química Analítica. Diversas aplicações para extração de compostos orgânicos em amostras de alimento e ambientais têm sido publicadas (RAMALHOSA et al., 2014).

O processo de extração faz uso da energia das micro-ondas para aquecer solventes de forma rápida e eficiente. O material vegetal já contém uma quantidade significativa de água que absorve fortemente energias micro-ondas (radiação eletromagnética não-ionizante na frequência de 300-300000 MHz), com conseqüente superaquecimento interno, o que causa rompimento da célula, facilitando o processo de extração (GAROFULIC et al., 2013).

O procedimento de extração dos compostos fenólicos (ácido clorogênico, mangiferina e rutina) foi realizado em um forno de micro-ondas da marca Electrolux, modelo MTO30-220. Foram preparados chás de cada cultivar das folhas de *C. arabica*, em triplicata, pesando-se 100 mg de cada amostra, transferindo-as para tubos de Falcon de 15 mL e a cada

uma delas foi adicionado 10 mL de água destilada. Em seguida, 1,0 mL de cada amostra, filtrada, foi transferida para eppendorfs de 2,0 mL e, após resfriamento, foram centrifugadas, em rotação máxima, por 3 minutos à 22 °C. Finalmente, 100 µL do sobrenadante foram extraídos, de cada extrato aquoso, e transferidos para *vials* para posterior análise em HPLC.

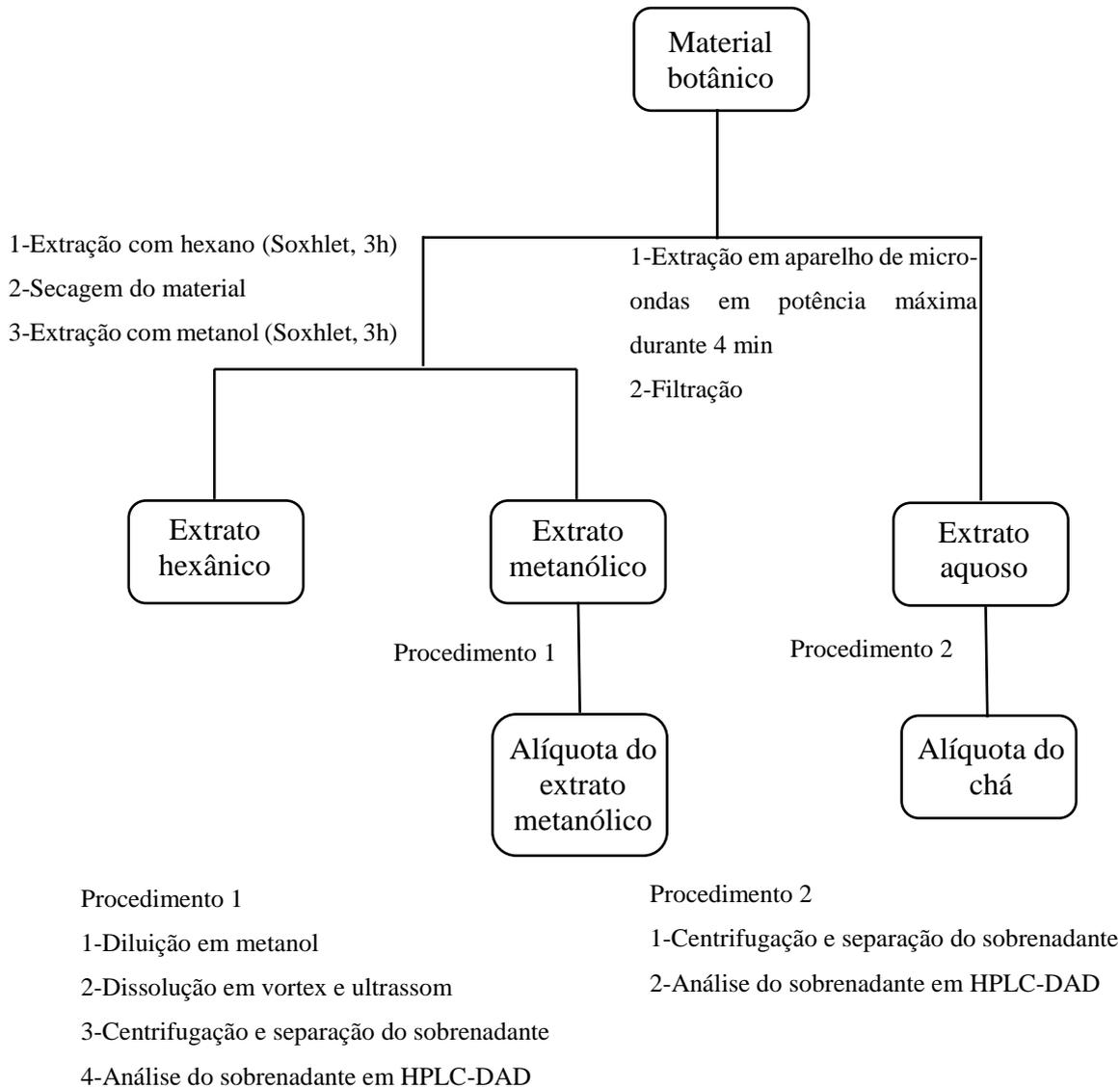
#### 4.3.2 *Extração em soxhlet*

Essa extração é bastante utilizada em escala laboratorial, principalmente em extrações de matrizes sólidas, como é o caso das extrações de material vegetal. Apesar de uma técnica de extração antiga, ela permanece como referência com a qual os novos métodos são comparados (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

A extração soxhlet acontece de forma contínua. Primeiramente, o material botânico é imerso no solvente, em seguida existe um equipamento que fornece calor para o sistema até que a solução atinja o ponto de ebulição a uma pressão reduzida (ou também à pressão atmosférica). O solvente extrai o material orgânico presente na mistura de acordo com a sua afinidade e polaridade. No entanto, o extrato é separado do solvente que é evaporado do extrato e mais uma vez é posto em contato com matriz sólida (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

A extração com soxhlet, foi realizado pelo método descrito por BARRETO e colaboradores (2008), em que são realizadas três extrações com 200 mL de solvente para 5,0 g de material seco. Os extratos obtidos foram concentrados em rotaevaporador (BUCHI, modelo V700) e armazenados em geladeira. Os solventes utilizados foram o hexano e o metanol, visto sua ampla diferença de polaridade.

Para esta extração foram adicionados 5,0 g de cada cultivar em cartuchos de extração e colocados em um aparelho soxhlet. Realizou-se três extrações com 200 mL de hexano durante três horas para remoção de compostos apolares. Após evaporação do hexano, o material foi extraído por três horas com 200 mL de metanol (repetido 3 vezes). O solvente foi evaporado a pressão reduzida em evaporador rotatório a 40 °C. Foi realizada uma análise qualitativa e quantitativa das alíquotas dissolvendo-as em metanol de grau HPLC e injetando um volume de 10 µL em HPLC-DAD. O Fluxograma 1 ilustra os procedimentos desenvolvidos nesta extração como também na realizada por forno de micro-ondas.

Fluxograma 1 - Fracionamento do extrato obtido a partir das folhas de *C. arabica*

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3.3 Extração em quechers

O método de extração QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*, ou em português, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) foi originalmente desenvolvido para aplicação em alimentos, mas atualmente é uma das técnicas mais comuns de preparo de amostras para análise de agrotóxicos e de compostos fenólicos (MACHADO et al., 2017).

Essa metodologia foi publicada pela primeira vez, em 2003, por Anastassiades e seus colaboradores visando um novo procedimento de preparo de amostra para extração de

resíduos de pesticidas. O QuEChERS foi desenvolvido para a análise de resíduos de pesticidas em produtos com baixo teor de gordura. O método tornou-se popular devido ao uso mínimo de etapas analíticas tradicionais, solventes e vidrarias (ANASTASSIADES et al., 2003). Esse método, como o próprio nome indica, tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro.

Durante seu desenvolvimento foi dada ênfase para a obtenção de um procedimento dinâmico, possível de ser aplicado em qualquer laboratório e adequado as instrumentações analíticas modernas. O método original é baseado em uma extração com acetonitrila, seguida de partição líquido-líquido (adição de  $\text{MgSO}_4$  – sulfato de magnésio e  $\text{NaCl}$  – cloreto de sódio) e posterior etapa de purificação com extração em fase sólida dispersiva (adição de PSA – amina primária secundária e  $\text{MgSO}_4$ ). Após a limpeza do extrato o mesmo é levado à análise por técnica cromatográfica (OBUSENG et al., 2013).

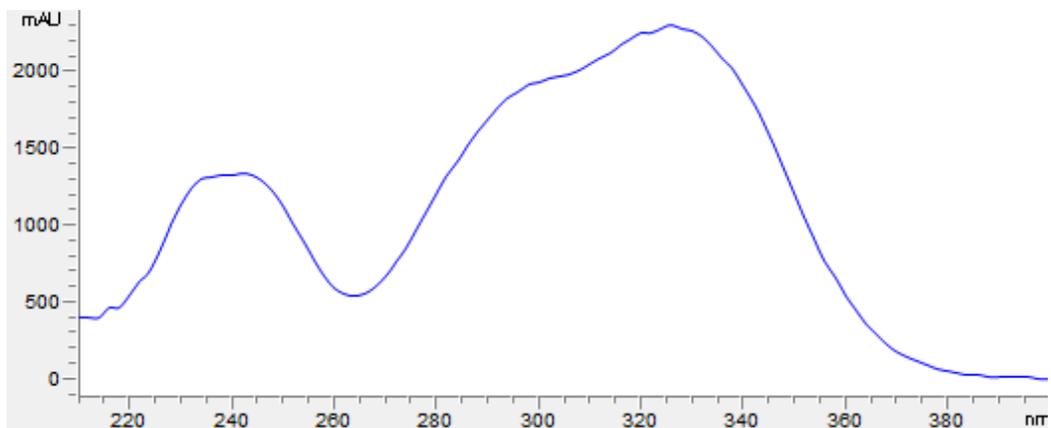
Amostras de *C. arabica* foram homogeneizadas em um triturador comercial. Para cada cultivar, pesou-se uma porção de 1,0 g para um tubo de Falcon de 50 mL. O padrão interno, triclorobenzeno, foi então adicionado a uma concentração de  $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (0,5 ppm). Elas foram cuidadosamente misturadas e deixadas em repouso por pelo menos 30 minutos antes da extração. Adicionou-se de 10 mL de acetonitrila como solvente de extração e o pH foi ajustado para 5,0 com ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). O tubo foi bem fechado e agitado vigorosamente em vortex durante 1,0 minuto. Em seguida, adicionou-se 1,5 g de cloreto de sódio, 6,0 g de sulfato de magnésio anidro, 1,5 g de citrato tri-sódio di-hidratado ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e 0,75 g citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ ) à mistura que foi imediatamente agitada durante mais 1,0 minuto. O extrato foi centrifugado a 5.000 rpm por 3,0 min e  $10^\circ\text{C}$ . Após centrifugação, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo de Falcon contendo 50,0 mg de PSA e 300,0 mg de sulfato de magnésio anidro. O tubo foi agitado em vortex, novamente, durante 1,0 min e centrifugado, mais uma vez, a 3.000 rpm durante 5,0 min. O extrato final foi armazenado em frascos de vidro a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os parâmetros quantidade de amostra (18,0 g), volume de solvente (10,0 mL), pH (5,0) e temperatura de extração ( $10^\circ\text{C}$ ) foram predeterminados por análises de otimização realizadas por meio de delineamento experimental multivariado.

Este procedimento foi realizado no Centro Alemão de Pesquisa do Câncer (DKFZ), localizado na cidade de Heidelberg-Alemanha, pela Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan e pelo Prof. Dr. Robert Wyn Owen.

#### 4.4 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

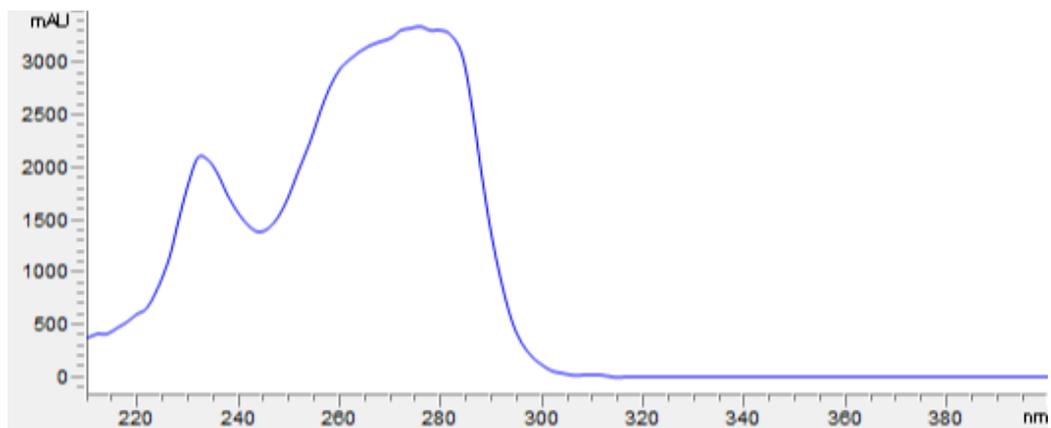
A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foi realizada em aparelho de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) ou HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com detector DAD (*Diode Array Detector*) de marca Agilent operando na faixa de ultravioleta com uma coluna analítica C-18 Latek (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm). O detector DAD foi fixado em comprimentos de onda de 257, 278, 325 e 340 nm, sendo nestes comprimentos de onda onde os metabólitos: ácido clorogênico, cafeína, mangiferina e rutina, têm maiores picos de absorção no UV-VIS (Figuras 13, 14, 15 e 16).

Figura 13 - Espectro de DAD para um padrão de ácido clorogênico



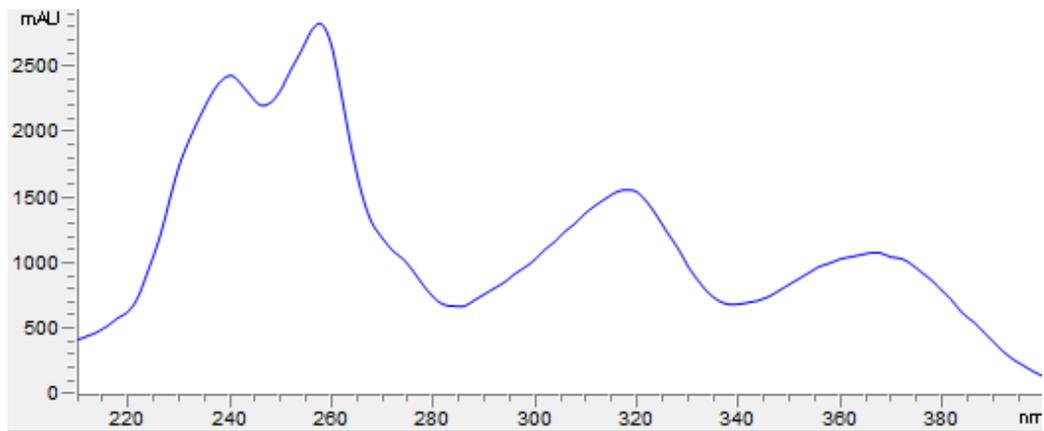
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Espectro de DAD para um padrão de cafeína



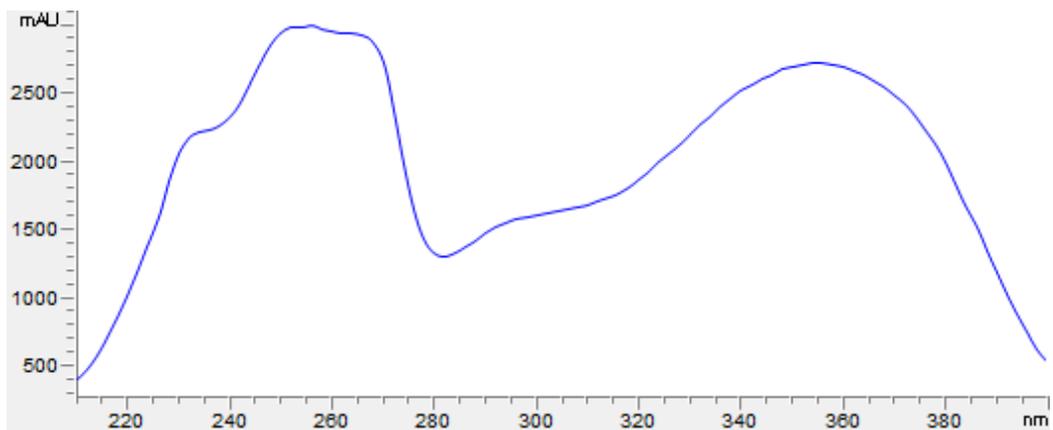
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Espectro de DAD para um padrão de mangiferina



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - Espectro de DAD para um padrão de rutina



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4.1 Determinação qualitativa

A análise das amostras foi feita a partir dos extratos obtidos em forno de micro-ondas, soxhlet e QuEChERS conforme procedimento descrito nos tópicos 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3. Os extratos, com exceção do aquoso, foram dissolvidos em metanol de grau HPLC e a concentração final obtida foi de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As amostras foram colocadas em *vials* e um

volume de 10  $\mu\text{L}$  foi injetado no HPLC-DAD sendo analisados nos comprimentos de onda 257, 278, 325 e 340 nm à temperatura ambiente.

O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel de metanol, solvente A, e de ácido acético em água a 2,0 %, solvente B, (grau HPLC obtida a partir de água destilada usando sistema Milli-Q - Millipore, Waters, Milford, MA, EUA) operada num fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , seguindo o método descrito na Tabela 6.

Tabela 6 - Sistema de eluição para a análise em HPLC

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	95,0	5,0
2,0	75,0	25,0
4,0	60,0	40,0
6,0	50,0	50,0
8,0	0,0	100,0
10,0	95,0	5,0
15,0	95,0	5,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

A identificação dos metabólitos foi feita a partir da comparação dos espectros de DAD de cada amostra e também dos tempos de retenção em relação aos padrões preparados em laboratório.

#### 4.4.2 Determinação quantitativa

Os compostos foram quantificados a partir de curvas analíticas construídas com padrões autênticos puros: mangiferina, ácidos clorogênicos, rutina e cafeína. Os padrões foram preparados em nove diferentes concentrações, variando de  $0,0025$  a  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , baseadas nas faixas esperada dos extratos. Cada solução preparada teve um volume de  $10 \mu\text{L}$  injetado em HPLC-DAD pelo método de eluição descrito no item anterior e os dados obtidos no cromatograma foram introduzidos no *software* Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft®) para a obtenção do gráfico que relaciona a área do pico da substância com a concentração da solução correspondente em cada comprimento de onda utilizado na análise.

## 4.5 Análise dos extratos

Todos os extratos aquosos foram avaliados quanto ao teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH e quanto a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, sendo a análise dos dois primeiros em duplicata e do último em triplicata. Todos esses ensaios foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (LPNBio) da Universidade Federal do Ceará.

### 4.5.1 Método folin-ciocalteu

A determinação do conteúdo total de fenólicos presentes nos chás obtidos a partir das folhas de *C. arabica* foi realizado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e colaboradores (GÜLÇİN, 2012). O método consiste, basicamente, no preparo de uma solução aquosa de carbonato de sódio,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , a 20 % em massa, uma solução de ácido gálico,  $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$ , a  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  e as soluções das amostras dos chás na concentração de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Foram pesados 4,0 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , em seguida foi transferido para um béquer e logo após foram adicionados 20 mL de água destilada. Agitou-se até completa solubilização. A solução de ácido gálico foi preparada a partir do padrão puro e sólido (a temperatura ambiente). Foram pesados 10 mg do ácido gálico e, em seguida, essa amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, originando uma solução de ácido gálico com concentração de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  (1000 ppm). O próximo passo foi a diluição para 500, 250, 125, 100 e 50 ppm para a construção da curva de calibração.

Após a preparação das soluções reacionais, em duplicata, utilizou-se 0,25 mL dos chás obtidos em 4.3.1 e a eles foram adicionados 2,0 mL de água destilada com 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, à temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de carbonato de sódio. Essa solução foi agitada adequadamente e, finalmente, mantida em repouso durante 40 minutos à temperatura ambiente protegidos da exposição direta de luz. A absorbância foi determinada a 725 nm em espectrofotômetro (FEMTO 700 Plus). A água destilada foi utilizada como branco e a curva padrão de ácido gálico foi construída através do gráfico de absorbância (ordenada) em função da concentração de ácido gálico (abscissa) em  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

A partir da equação (regressão linear) gerada através da calibração com o ácido gálico, foi possível quantificar o poder antioxidante das amostras a partir de um referencial

(ácido gálico). Os valores de absorvância obtidos para cada uma das amostras foram correlacionados com a curva padrão de ácido gálico, e o teor de fenólicos total (TFT) foram expressos em miligrama equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra de chá.

#### 4.5.2 Método DPPH

O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm. Este método foi modificado por Sánchez-Moreno e colaboradores para medir os parâmetros cinéticos (GÜLÇİN, 2012).

Foram utilizados 3,9 mL de solução de DPPH (0,06 mM) em metanol e 0,1 mL dos extratos aquosos das amostras em cinco concentrações (1000, 500, 250, 100 e 50 ppm). No lugar da amostra foi utilizado 4,0 mL de DPPH (que corresponde ao branco). Depois que a solução de DPPH já estava em contato com os extratos, os tubos foram homogeneizados em vortex (Kasvi, modelo K40-1020) e mantidos em repouso, ao abrigo da luz, por 16 minutos. As soluções de DPPH e os extratos foram preparadas no dia da análise. Após esse período, cada amostra foi individualmente transferida para uma cubeta, de quartzo, e sua atividade antioxidante foi medida em um espectrofotômetro (FEMTO 700 Plus) em comprimento de onda de 515 nm.

O equipamento foi previamente calibrado com metanol puro. Os resultados obtidos foram expressos como: atividade antioxidante da amostra (% AA), em porcentagem, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% AA = \frac{(ABS_{branco} - ABS_{amostra})}{ABS_{branco}} \times 100$$

Sendo ABS a absorvância obtida.

Com os resultados obtidos da capacidade antioxidante dos extratos aquosos de *C. arabica*, foi possível traçar uma curva linear entre a capacidade inibitória (ordenada) dos extratos, em porcentagem, e sua concentração (abscissa) em  $mg \cdot mL^{-1}$  de forma que permitiu realizar o cálculo para determinação do IC<sub>50</sub>.

### 4.5.3 Inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase

O chá obtido a partir das folhas de café da espécie *Coffea arabica*, a mangiferina e a rutina, ambas isoladas, foram analisadas em relação à sua capacidade em inibir a atividade da enzima  $\alpha$ -glicosidase segundo a metodologia de Shinde e colaboradores (2008) com algumas adaptações. A inibição enzimática ocorre através da estimativa do *p*-nitrofenol (*p*-NP) liberado a partir do *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG). A formação do *p*-NP produz uma solução de coloração amarela que é medida em espectrofotômetro a 405 nm. O *p*-NPG é utilizado como substrato para uma maior especificidade do método de determinação da atividade da  $\alpha$ -glicosidase.

Para este ensaio, primeiramente, foi preparado um tampão fosfato com concentração de 24 mM e pH 6,9 pesando-se 1,77 g de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e 3,28 g de fosfato de sódio dibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ). Foram dissolvidos em água Milli-Q suficiente e transferidos para um balão volumétrico de 1,0 litro e seu volume foi completado. A etapa seguinte consistiu em preparar uma solução de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 10 %. Pesou-se 5,0 g deste sal e foi adicionada água destilada suficiente para sua dissolução. Logo após, a solução foi transferida para um balão de 50 mL e completou-se o volume restante.

Tanto a enzima, quanto o substrato foram dissolvidos em tampão fosfato. O preparo do substrato foi feito pesando-se 30,1 mg de *p*-NPG. A solução preparada foi transferida para um balão de 100 mL com concentração final de 1 mM. Quanto a enzima, foi adicionada a ela 3,0 mL do tampão, sendo que 300  $\mu\text{L}$  desta solução foram transferidos para um eppendorf de 1,5 mL e seu volume foi completado para 1,0 mL, resultando numa solução de 75 U/mL. A partir desta solução preparada foram feitas outras diluições da enzima nas concentrações 1, 2, 5, 10 e 25 U/mL. Para os ensaios realizados foi utilizado a solução de  $\alpha$ -glicosidase com concentração de 1 U/mL.

A última solução preparada foi a de acarbose. Com auxílio de um pistilo, foram triturados 2 comprimidos de Glucobay<sup>®</sup> em um almofariz até se obter um pó fino. Em seguida, esse material foi transferido para um eppendorf de 2,0 mL e a ele foi adicionado 1,0 mL de tampão fosfato. Esta solução foi dissolvida em vortex (Kasvi, modelo K40-1020) e por fim foi centrifugada, em velocidade máxima a 22 °C, durante 3 minutos, para a retirada do sobrenadante. A concentração da solução resultante foi de 100,0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . As amostras de chá foram preparadas em água destilada e as de mangiferina e rutina em tampão, sendo a concentração ajustada para 1,0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Para o ensaio da inibição da enzimática, foram transferidos para eppendorfs de 1,5 mL, 20 µL de cada amostra com 10 µL da enzima α-glicosidase. Essa primeira etapa do ensaio é chamada de pré-incubação e foi realizada durante 5 minutos a 25 °C. Já a etapa seguinte, a incubação, foi iniciada pela adição de 40 µL do substrato (solução de *p*-NPG) e mantida em repouso durante 30 minutos a 37°C, em um agitador Thermomixer comfort (Eppendorf®, Alemanha). Apesar desta etapa ser realizada em um agitador, em nenhum momento as soluções foram agitadas. O único propósito de trabalhar com este equipamento foi apenas praticidade, visto que podemos configurar, além da agitação e duração do ensaio, a temperatura desejada. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de bicarbonato de sódio.

Finalmente, 100 µL de cada amostra foram transferidos para microplacas de 96 poços e a absorbância foi lida a 405 nm em leitor de microplacas Elisa (TP-READER® Thermo Plate). Visando eliminar variações relacionadas à coloração característica das amostras e possíveis variações relacionadas à absorbância da coloração do *p*-NP, todos os ensaios foram realizados com e sem enzima.

O branco foi realizado substituindo as amostras analisadas por tampão fosfato de sódio, nas mesmas quantidades. Já a acarbose (100 mg, equivalente a dois comprimidos de Glucobay®) foi utilizada como solução controle. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O resultado é dado em porcentagem de inibição da α-glicosidase, calculado por meio da seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{ABS}_{\text{branco}} - \text{ABS}_{\text{amostra}})}{\text{ABS}_{\text{branco}}} \times 100$$

Sendo ABS absorbância lida a 405 nm.

As curvas dose-resposta para a mangiferina, rutina e o chá das folhas de *C. arabica* foram construídas com concentrações variando entre 1000 até 31,25 ppm, já para a acarbose a faixa de concentração foi maior, variando de 100000 até 31,25 ppm (Apêndice G).

#### 4.6 Análise estatística

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão, e percentual de inibição considerado amostras individuais testadas em triplicata para cada uma das soluções testadas. Utilizou-se o *software* Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft®) como suporte para tabulação e análise dos dados. As curvas dose-respostas foram construídas com o auxílio do *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad®).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação dos metabólitos

As amostras de chá das 16 cultivares das folhas de *C. arabica* foram obtidas por forno de micro-ondas conforme descrito no item 4.3.1. A identificação dos metabólitos foi determinada pela comparação dos tempos de retenção dos extratos aquosos com o do banco de dados do HPLC e também pelos espectros de DAD.

As análises obtidas pelo chá das folhas foram realizadas através do aparelho HPLC-DAD em condições descritas no item 4.4. O detector DAD está fixado nos comprimentos de onda de 257, 278, 325 e 340 nm.

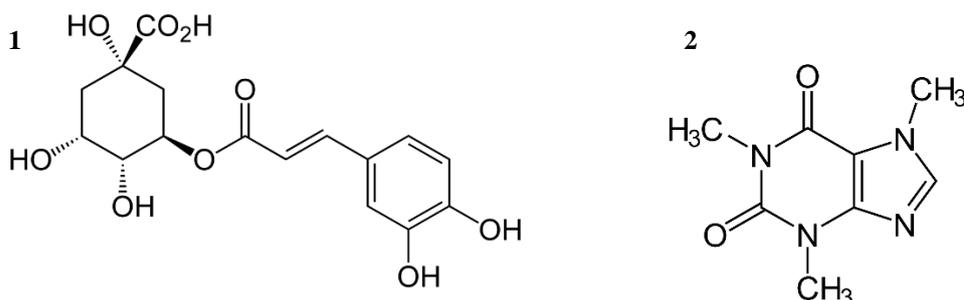
A Tabela 7, reúne dados como nomenclatura e outras informações de cada substância. A representação estrutural de cada um dos metabólitos é apresentada logo após a Tabela 7, de acordo com a numeração proposta, conforme é mostrado na Figura 17.

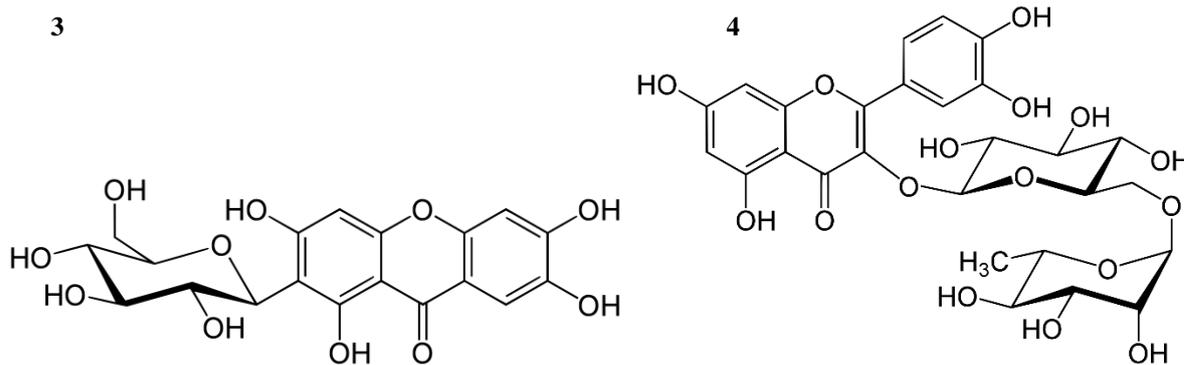
Tabela 7 - Metabólitos identificados em HPLC-DAD dos extratos aquosos de *C. arabica*

Nº	Composto	Fórmula Molecular	Tempo de retenção (min)	$\lambda$ (nm)
1	Ácido clorogênico	$C_{16}H_{18}O_9$	6,60	325/340
2	Cafeína	$C_8H_{10}N_4O_2$	7,12	278
3	Mangiferina	$C_9H_{18}O_{11}$	7,64	257
4	Rutina	$C_{27}H_{30}O_{16}$	9,49	325/340

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 - Representação estrutural dos metabólitos majoritários

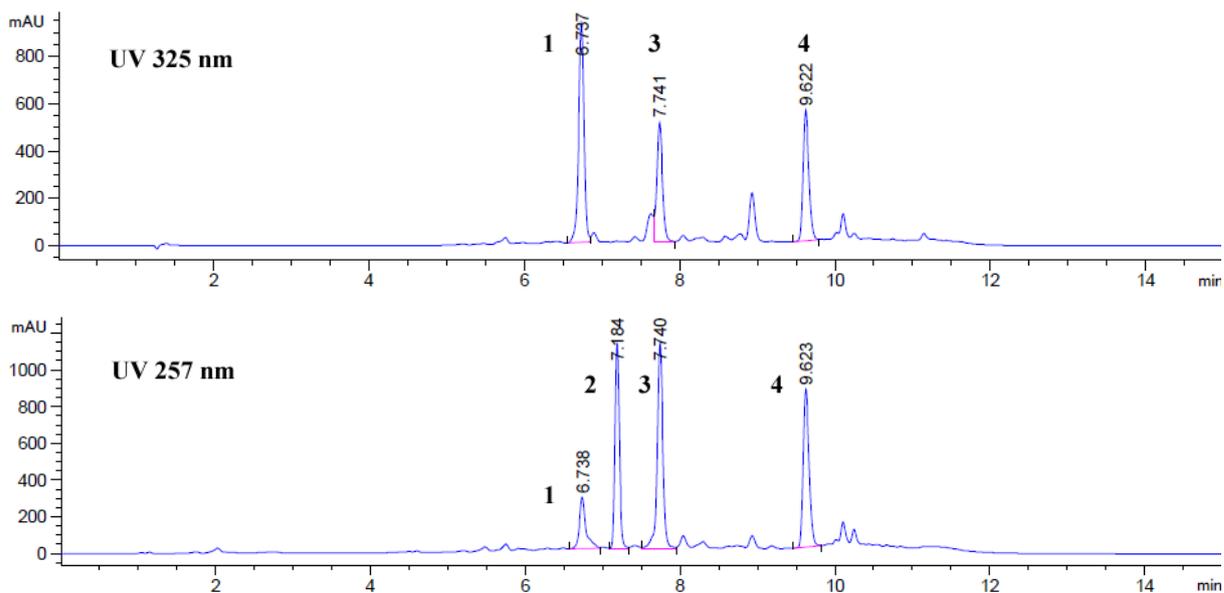


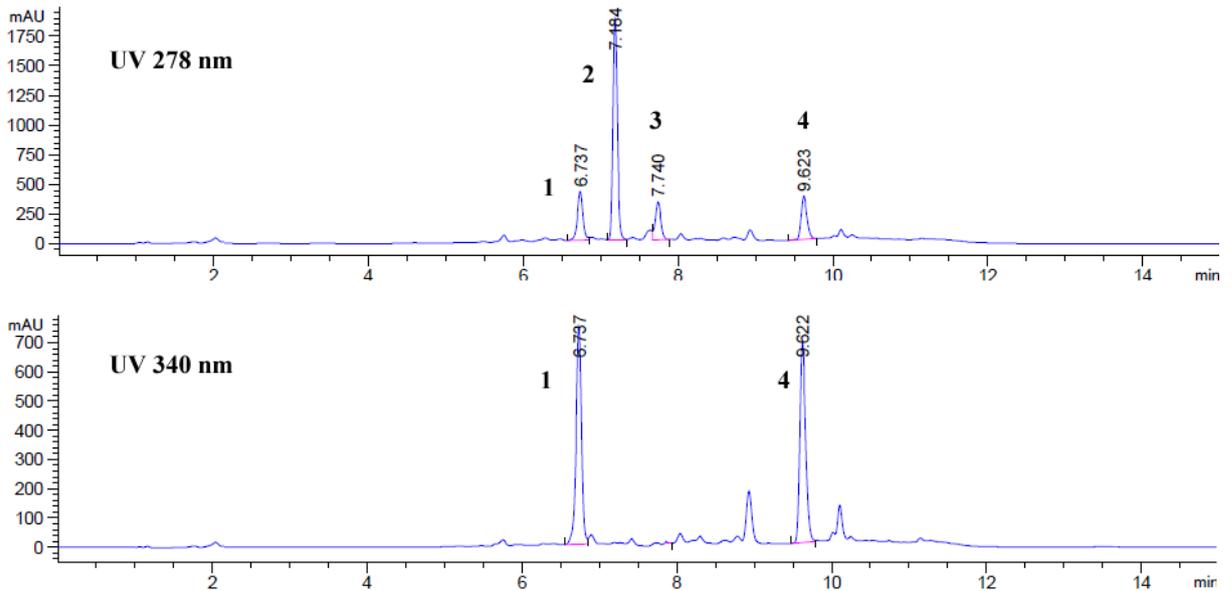


Fonte: Elaborado pelo autor.

A mangiferina foi identificada em 257 nm, já o ácido clorogênico e rutina em 325 nm e também em 340 nm e, finalmente, a cafeína em 278 nm. Os extratos aquosos das 16 cultivares de *C. arabica* foram analisados em triplicata e apresentaram um perfil semelhante. A Figura 18, mostra o perfil de cromatograma, obtido em HPLC, de um dos extratos aquosos das folhas nos seguintes comprimentos de onda 325, 257, 278 e 340 nm.

Figura 18 - Perfil do cromatograma, obtido em HPLC, do extrato aquoso das folhas de *C. arabica*. Metabólitos detectados: ácido clorogênico (1), cafeína (2), mangiferina (3) e rutina (4)

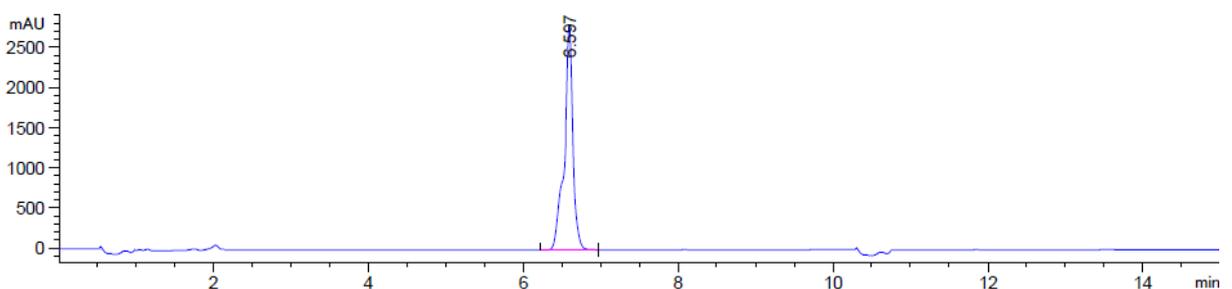




Fonte: Elaborado pelo autor.

A identificação do ácido clorogênico foi facilitada, visto que os tempos de retenção observados foram compatíveis com o da solução padrão inicialmente analisada (Figura 19).

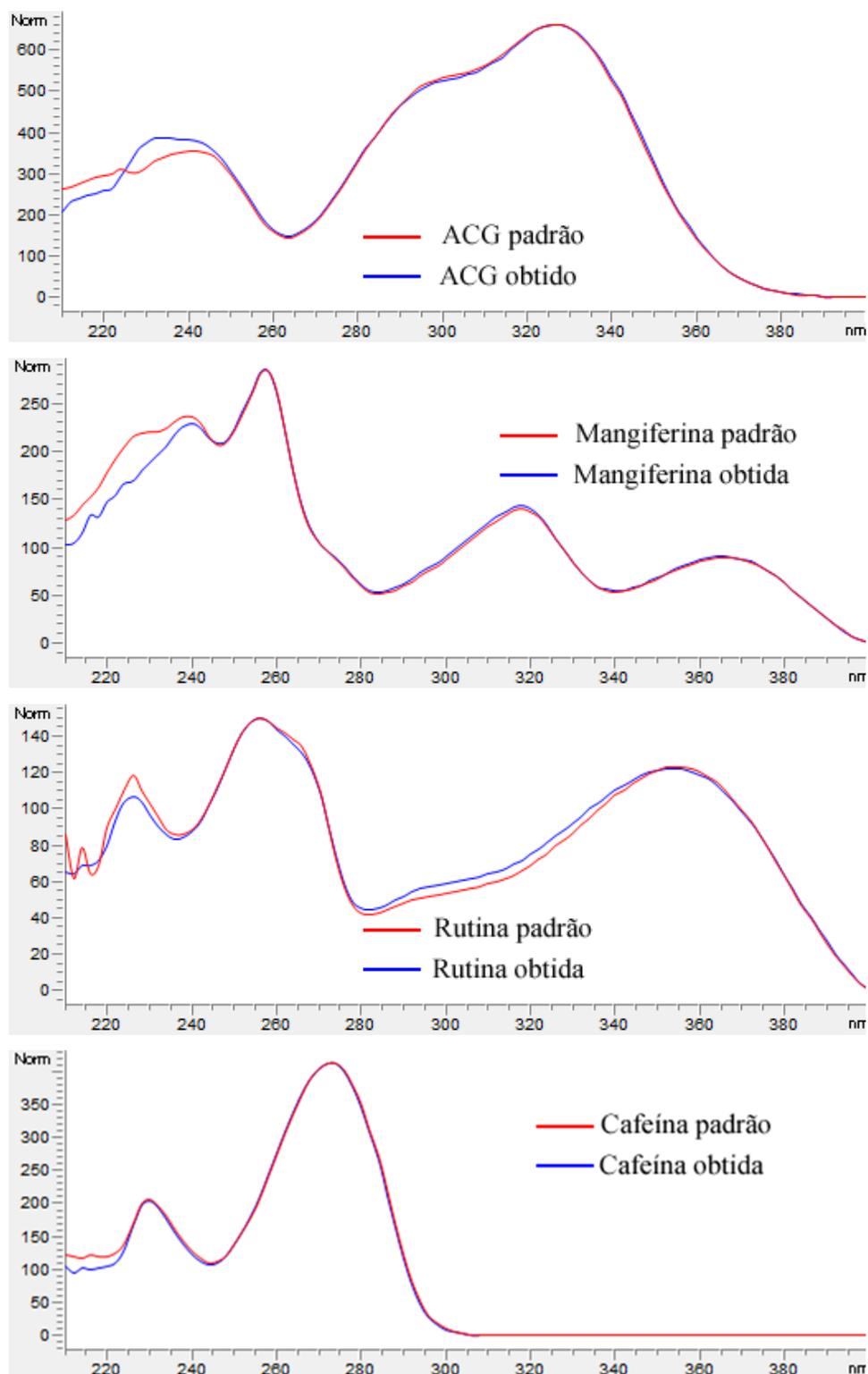
Figura 19 - Cromatograma do padrão ácido clorogênico ( $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em 340 nm obtido em HPLC



Fonte: Elaborado pelo autor.

Contudo, para a caracterização dos demais compostos fenólicos, mangiferina e rutina, e da cafeína foi necessária a comparação do espectro de DAD dos padrões com os obtidos nos extratos aquosos (Figura 20). Nenhum interferente co-eluiu no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse.

Figura 20 - Comparação dos espectros de DAD dos padrões com os obtidos nas folhas



Fonte: Elaborado pelo autor.

O cromatograma com os respectivos tempos de retenção dos padrões mangiferina, rutina e cafeína estão apresentados no Apêndice B.

## 5.2 Quantificação dos metabólitos

A concentração, em  $\text{mg.mL}^{-1}$ , de ácido clorogênico, mangiferina, cafeína e rutina presente nas folhas foi calculada utilizando a curva analítica construída com auxílio do *software* Microsoft Office Excel (Microsoft®), que relaciona a concentração (abscissa) com a área do pico (ordenada). Desta curva, obteve-se quatro equações, uma para cada padrão, conforme é apresentado, juntamente com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na Tabela 8.

Tabela 8 - Equações da reta para cada padrão

<b>Padrão</b>	<b>Equação da reta</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>
Ácido clorogênico	$y = 18221x + 130,63$	0,9965	340
Mangiferina	$y = 24441x + 309,75$	0,9938	257
Cafeína	$y = 20388x + 262,46$	0,9922	278
Rutina	$y = 12445x - 22,806$	0,9998	340

Fonte: Elaborado pelo autor.

As substâncias identificadas foram quantificadas utilizando a curva analítica dos padrões autênticos, que possibilitou a determinação das concentrações (em  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) de cada metabólito. A média das áreas dos picos, das concentrações dos metabólitos e dos rendimentos das 16 cultivares da espécie *C. arabica* estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Quantificação dos metabólitos das folhas de *C. arabica* feitas em forno de micro-ondas

<b>Metabólitos quantificados</b>	<b>Área do Pico (mAU)</b>	<b>Concentração do composto no extrato (<math>\text{g.kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Ácido clorogênico	3.841,71	$20,36 \pm 0,46$	2,04
Mangiferina	2.236,89	$7,885 \pm 0,21$	0,79
Cafeína	2.460,84	$10,78 \pm 0,35$	1,08
Rutina	1.038,30	$8,526 \pm 0,36$	0,85

Fonte: Elaborado pelo autor.

Campa e colaboradores (2012) apresentaram em seus estudos, dados de quantificação de mangiferina em porcentagem de peso na faixa de 0,026-16,359% para 7 diferentes espécies de folhas de café. Isso é equivalente a 0,26-163,6 g/kg sendo os valores mais elevados, encontrados nas folhas da espécie *Coffea salvatrix* (BARRETO et al., 2008). Em relação à espécie *Coffea arabica*, os mesmos autores obtiveram 5,66 g/kg de mangiferina (0,566%) e 32,31 g/kg ácido clorogênico (3,231%). Em outro estudo, foi encontrado 0,16 g/kg de rutina em quantificação das folhas de *C. arabica* (PATAY et al., 2016b). E finalmente, a cafeína foi quantificada, também em folhas da espécie *C. arabica*, por Chaves e colaboradores (2004). Os resultados variaram entre 2,0-8,0 g/kg.

Com exceção do ACG, os demais metabólitos extraídos em aparelho de micro-ondas apresentaram valores superiores aos descritos na literatura. A quantificação das folhas, apresentada como média de todos os resultados  $\pm$  desvio padrão das 16 cultivares de *C. arabica*, também foi realizada pelas extrações soxhlet e QuEChERS conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Quantificação dos compostos fenólicos de *C. arabica* por soxhlet e QuEChERS

<b>Compostos fenólicos</b>	<b>Método de Extração</b>	<b>Concentração do composto no extrato (g/kg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Ácido clorogênico	Soxhlet	29,93 $\pm$ 0,44	2,993
	QuEChERS	4,92 $\pm$ 0,33	0,492
Mangiferina	Soxhlet	27,64 $\pm$ 0,35	2,764
	QuEChERS	2,78 $\pm$ 0,14	0,278
Rutina	Soxhlet	25,20 $\pm$ 0,32	2,520
	QuEChERS	2,73 $\pm$ 0,14	0,273

Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar pelas Tabelas 9 e 10 que a quantidade de fenólicos obtida por forno de micro-ondas foi superior à obtida em QuEChERS. Quanto ao rendimento, a cultivar Pau Brasil 2 apresentou, em geral, o maior conteúdo fenólico extraído, independentemente do método de extração usado. Já a cultivar Rubi, obteve a menor quantidade de rutina obtida, também nos três tipos de extração. Quanto a mangiferina, as cultivares que apresentaram um menor teor foram Pau Brasil MG1, Topázio e Catiguá MG3, respectivamente, para a extração em forno de micro-ondas, soxhlet e QuEChERS. Esses dados podem ser consultados nas

Tabelas 15 e 16 presentes no Apêndice A.

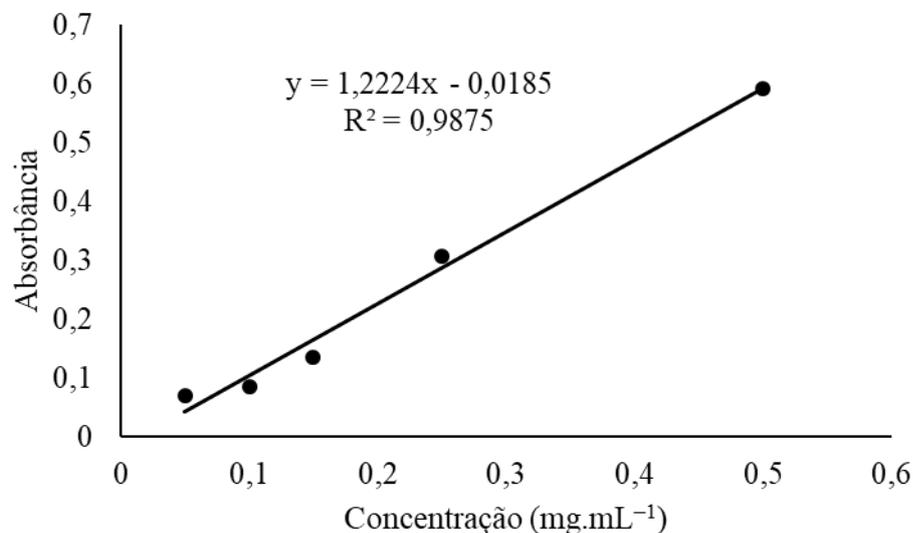
Além dessas extrações, foi também realizado um teste com cafeteira (dados não apresentados) cujos resultados da extração, de compostos fenólicos, foram inferiores a realizada em aparelho de micro-ondas, no entanto seria satisfatória para a realização dos ensaios propostos. Por fim, a extração que usa a energia das micro-ondas foi escolhida para fins laboratoriais por ser um processo de extração eficiente e rápido.

Todas as quantificações foram feitas em triplicata. As curvas analíticas das soluções padrão apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,99. No Apêndice C, são apresentadas as curvas analíticas dos compostos padrões.

### 5.3 Determinação do teor de fenólicos totais

Este método estima a quantidade de compostos fenólicos existentes nos extratos aquosos analisados. Em produtos naturais, este método apresenta uma boa estimativa desta propriedade (KEKELIDZE et al., 2018). A curva padrão de ácido gálico, para as diferentes concentrações testadas, está apresentada no Gráfico 1 e os dados usados para a confecção deste gráfico estão no Apêndice D. A equação da reta gerada por esta curva foi utilizada para o cálculo do teor de fenólicos totais do chá das 16 cultivares das folhas de *Coffea arabica*.

Gráfico 1 - Curva padrão da concentração de ácido gálico ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em função da absorbância (a 705 nm)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores da absorvância encontrados foram aplicados, substituindo o valor de y, na equação da reta ( $y = 0,0012x - 0,0185$ ) de maneira a encontrar o valor de x, determinado em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os cálculos do teor de fenólicos totais (TFT) foram ajustados a providenciar valores equivalentes ao ácido gálico (EAG) em miligrama por grama do extrato aquoso. Foi calculado também, para todas as concentrações feitas, a média dos resultados de todas as cultivares (53,74 mg de EAG/g) e o desvio padrão (0,02). No Apêndice E são apresentados os resultados obtidos para cada cultivar.

O resultado obtido neste ensaio indica que o teor de fenólicos totais do chá das folhas de *C. arabica* é superior quando comparado a outros chás preparados a partir de ervas mais comumente consumidas. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado para os chás feito com melissa, mate, verde, preto, hortelã, menta, capim-limão e camomila por meio de infusão (temperatura inicial de 100 °C) durante 10 minutos (MORAES-DE-SOUZA, 2007). Pode-se verificar que houve grande variação no teor de compostos fenólicos nas infusões de ervas, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Teor de Fenólicos Totais de chás comuns em relação ao chá de *C. arabica*

Chá	TFT (mg EAG/g)
Folhas de café	53,74 ± 0,02
Melissa	46,46 ± 0,44
Mate	42,45 ± 0,28
Verde	40,02 ± 0,15
Preto	38,22 ± 0,18
Hortelã	33,85 ± 0,06
Menta	23,96 ± 0,25
Capim-limão	20,57 ± 0,51
Camomila	18,07 ± 0,76

Fonte: Elaborado pelo autor.

Diversos fatores podem interferir na concentração de compostos fenólicos das plantas, como por exemplo, as condições de solo e clima onde as mesmas foram cultivadas, as condições fisiológicas das plantas durante seu ciclo de crescimento, a maneira da preparação da planta para a extração, a forma de preparo, o processo de extração, e a metodologia *in vitro* utilizada para a identificação do seu conteúdo (GOLENIOWSKI et al., 2013).

Snoussi e colaboradores (2014), demonstraram em seus estudos que os fenólicos totais são agentes potenciais para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis como a obesidade e o diabetes. Logo, os resultados apresentados neste estudo apontam que a ingestão do chá das folhas de *C. arabica* contribui de forma positiva na prevenção destas síndromes metabólicas.

#### 5.4 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante do chá das folhas *C. arabica* foi avaliada pelo método do sequestro do radical DPPH em diferentes concentrações (1,00; 0,50; 0,25; 0,125 e 0,050 mg.mL<sup>-1</sup>). Na presença de antioxidantes, o DPPH torna-se estável, conseqüentemente, sua absorvância diminui e sua coloração muda. Alguns compostos capazes de reduzir o radical DPPH são o ácido ascórbico, os carotenoides e os compostos fenólicos (GÜLÇIN, 2012). Como padrão de referência para este ensaio, foi utilizada a mangiferina. Durante o ensaio, pode-se observar que as diferentes cultivares das folhas de café apresentaram diferenças significativas na atividade antioxidante, em porcentagem, variando de 32,43 ± 0,006 a 68,63 ± 0,001 na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Foi possível notar que as cultivares com os melhores resultados são aquelas que apresentam resistência a *Hemileia vastatrix* (ferrugem do cafeeiro), o que nos permite supor que exista alguma relação entre a resistência à ferrugem e a atividade antioxidante. O percentual inibitório de todas as 16 cultivares, em diferentes concentrações, estão apresentados no Apêndice F.

Os resultados (expressos em média de todas as cultivares ± desvio padrão) do sequestro do radical DPPH, em porcentagem, dos extratos aquosos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Percentuais médios da atividade antioxidante dos extratos aquosos das folhas de *C. arabica* em diferentes concentrações

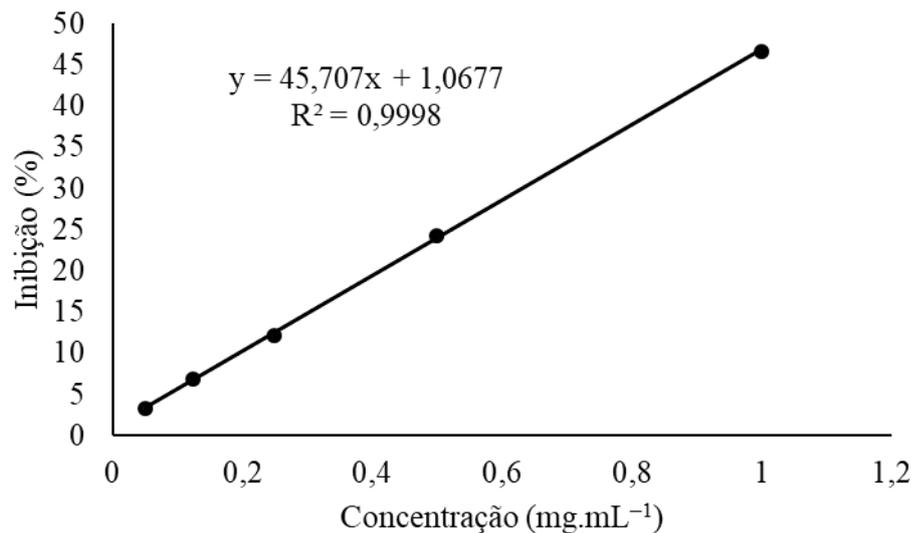
Amostras	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )				
	1,000	0,500	0,250	0,125	0,050
Folhas	46,65 ± 0,002	24,30 ± 0,005	12,20 ± 0,004	6,85 ± 0,003	3,33 ± 0,002

Fonte: Elaborado pelo autor.

As folhas de café da espécie *C. arabica* possuem atividade antioxidante

significativa na concentração de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  com percentual médio de inibição, aproximadamente, igual a 47. O Gráfico 2, que apresenta uma forte correlação de coeficientes ( $R^2$ ) de 0,9979, mostra a curva de concentração dos extratos aquosos *versus* a captura do radical DPPH. Os dados obtidos para a confecção deste gráfico estão no Apêndice D.

Gráfico 2 - Curvas da média das concentrações dos extratos aquosos das folhas de *C. arabica* versus percentuais de captura de DPPH



Fonte: Elaborado pelo autor.

A atividade antioxidante é apresentada em  $IC_{50}$  (capacidade inibitória a 50%) e quanto menor for o seu valor, maior o potencial antioxidante da amostra analisada. Ou seja, uma menor quantidade da amostra é necessária para inibir 50% da atividade dos radicais livres (DPPH). O  $IC_{50}$  do chá das folhas de *C. arabica* foi igual a  $1,07 \text{ mg.mL}^{-1}$ , cerca de oito vezes maior que o padrão mangiferina cujo resultado foi igual a  $0,134 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Souza e colaboradores determinaram o  $IC_{50}$  no chá verde sendo igual a  $0,140 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Contudo, o chá das folhas de *C. arabica* apresentou maior atividade sequestrante do radical DPPH em relação ao chá de boldo ( $2,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), capim santo ( $17,36 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), hortelã ( $17,40 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), cidreira ( $27,29 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), carqueja ( $44,07 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e camomila ( $47,41 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (MORAIS et al., 2009). É válido lembrar que o tipo de solvente utilizado na extração é um fator determinante para a capacidade antioxidante de amostras, sendo a água menos eficiente quando comparada com outros solventes, como etanol ou metanol (BELSCAK-CVITANOVIC et al., 2012).

Os resultados, da atividade antioxidante das folhas de *C. arabica*, estão

relacionados com o alto teor dos compostos fenólicos, apresentados no item 5.3. Segundo estudo apresentado por Granato e seus colaboradores (2018) essas substâncias são as responsáveis pela inibição dos radicais livres presentes no organismo.

### 5.5 Avaliação da inibição enzimática

A atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, obtida a partir de *Saccharomyces cerevisiae* ( $1,0 \text{ U.mL}^{-1}$ ), feita pelo chá das folhas *C. arabica* foi avaliada e os resultados foram positivos, mesmo em baixas concentrações.

Após a finalização dos experimentos, os resultados mostraram que a inibição de todas as cultivares ocorreu de forma semelhante, ou seja, foi obtido praticamente a mesma resposta para aqueles que apresentam maior ou menor teor de mangiferina, bem como para aquelas que possuem o maior ou menor teor de rutina (dados não apresentados). Conclui-se que o sinergismo entre todos os compostos fenólicos é o fator determinante para uma maior inibição do que atribuir todo o resultado a um único metabólito. Sendo assim, independente da cultivar utilizada, todo chá preparado a partir das folhas de *C. arabica* apresentarão propriedades antidiabéticas.

Além dos testes feitos com os chás, foram realizados também ensaios com soluções de mangiferina, de rutina e de acarbose. Nos dois primeiros casos, o objetivo foi avaliar o quão essas substâncias, presentes nas folhas de *C. arabica*, conseguem inibir, isoladamente, a enzima  $\alpha$ -glicosidase. Já a acarbose foi utilizada como solução controle e a partir do seu resultado foi possível relacionar a sua inibição, em porcentagem, com a inibição feita pelas demais amostras.

Para a realização destes ensaios, as concentrações de todas as amostras foi de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , com exceção da acarbose que foi de  $100,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A grande diferença nas concentrações usadas é justificada pela recomendação encontrada na posologia do Glucobay®, que propõe o uso de até 2 comprimidos (de 50 mg cada) 3x ao dia. Segundo o *site Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), a solubilidade da acarbose em água, é na ordem de  $1,0 \times 10^3 \text{ mg.mL}^{-1}$ , logo podemos concluir, com segurança, que todo o princípio ativo estava dissolvido no tampão fosfato.

As soluções de acarbose e mangiferina apresentaram os melhores resultados de inibição, se aproximando da inibição total da  $\alpha$ -glicosidase. Já o chá das folhas de *C. arabica* e a solução de rutina tiveram valores de inibição muito próximos, acima de 80%. As porcentagens de inibição do chá das folhas de *C. arabica*, da mangiferina, da rutina e da acarbose estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultado da inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase em porcentagem

<b>Amostras</b>	<b>% Inibição</b>
Acarbose*	92,70
Mangiferina	90,42
Rutina	85,71
Chá das folhas de café	85,92

\* Solução controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 13 nos mostra que a acarbose apresentou o maior valor de inibição, por outro lado, seu  $IC_{50}$  foi o maior de todos, sendo igual a  $5,353 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As soluções de mangiferina e rutina apresentaram  $IC_{50}$ , respectivamente, iguais a  $0,265 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,374 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Quanto ao chá, seu  $IC_{50}$  foi o menor de todos, sendo igual a  $0,086 \text{ mg.mL}^{-1}$ , implicando que, *in vitro*, esta bebida inibe de forma muito mais eficiente a enzima  $\alpha$ -glicosidase. Um fato interessante é que o  $IC_{50}$  do chá é cerca de 62 vezes menor que o  $IC_{50}$  da solução controle, isto é, a inibição desta enzima pode ser feita com baixas concentrações do extrato aquoso e, conseqüentemente, a probabilidade dos indesejáveis efeitos colaterais praticamente não devem existir.

Para a determinação de todos os  $IC_{50}$  citados anteriormente foram construídas quatro curvas dose-resposta de cada substância testada. Os experimentos foram feitos variando as concentrações entre 1000 e 31,25 ppm para a mangiferina, rutina e o chá de *C. arabica* e de 100000 e 31, 25 ppm para a acarbose. Alguns destes resultados podem ser conferidos na Tabela 14 e o restante, juntamente com os gráficos, no Apêndice G.

Tabela 14 - Poder de inibição da  $\alpha$ -glicosidase (%) em diferentes concentrações

<b>Amostras</b>	<b>% Inibição em</b>			
	<b>1000 ppm</b>	<b>500 ppm</b>	<b>250 ppm</b>	<b>125 ppm</b>
Acarbose	19,99	16,80	12,21	10,05
Mangiferina	90,42	85,48	46,26	20,23
Rutina	85,71	74,64	44,55	37,30
Chá das folhas	85,92	81,86	78,10	64,86

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com os dados da Tabela 14, podemos observar que a solução controle apresentou uma inibição muito baixa, cerca de 20,00 % em 1000 ppm. Este péssimo resultado está relacionado baixa concentração de acarbose que corresponde a 1,0 % da dose recomendada. Já o chá e as soluções de mangiferina e de rutina apresentaram grande inibição da atividade da enzima  $\alpha$ -glicosidase, entre 74 e 90 %, nas duas primeiras concentrações, 500 e 1000 ppm. O resultado do chá das folhas de *C. arabica* é muito impressionante, pois à medida que sua concentração diminui, seu poder inibitório permanece alto em relação as outras substâncias testadas. Isso muito se deve a presença de mangiferina, mas não somente ela, e sim a todo o sinergismo entre os compostos fenólicos presentes nas folhas.

Estudos recentes demonstraram que os compostos fenólicos exercem atividade antidiabética por meio da inibição de enzimas hidrolisantes de carboidratos, como é o caso da  $\alpha$ -glicosidase. Os inibidores naturais desta enzima oferecem uma abordagem atraente para o manejo da hiperglicemia pós-prandial, diminuindo a liberação de glicose na corrente sanguínea e, conseqüentemente, diminuindo a liberação de insulina. Várias descobertas sugerem que a sinergia dos compostos fenólicos pode desempenhar um papel importante na mediação da inibição da  $\alpha$ -glicosidase e, portanto, têm o potencial de contribuir para o controle do DM2. Além disso, os antioxidantes fenólicos têm significativa propriedades de antiglicação *in vitro*. A glicação, a reação não enzimática entre dicarbonilas e proteínas, é um dos principais mecanismos de complicações da diabetes devido à hiperglicemia (SOUSA; CORREIA, 2012).

Na perspectiva da aplicação de bebidas nutracêuticas na melhoria da qualidade de vida de pacientes diabéticos, podemos inferir que o chá das folhas de café *C. arabica*, independente do cultivar preparado, vem como uma alternativa promissora da inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, visto que, com base no seu alto percentual de inibição, ele pode usado como uma fonte para reduzir a hiperglicemia pós-prandial, diminuindo assim os níveis de glicose e insulina na corrente sanguínea. Por ser um produto natural, praticamente não apresenta efeitos adversos. No entanto, é importante lembrar que o excesso ou a utilização inapropriada do chá pode provocar efeitos colaterais no corpo que incluem irritação das vias urinárias e das mucosas do estômago. Além disso, por conter cafeína, o indivíduo pode desenvolver insônia e palpitações. Para grávidas e crianças o seu uso exige maior atenção, como o acompanhamento médico, por exemplo.

Por fim, concluímos que a inibição feita por esta bebida, facilmente produzida em casa, é uma abordagem terapêutica eficaz ajudando na prevenção ou mesmo auxiliando o tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 em sua fase precoce.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que sinergismo dos compostos fenólicos, como a mangiferina e rutina, presentes no chá das folhas de café da espécie *Coffea arabica*, extraído por forno micro-ondas, pode ser considerado como fonte promissora de compostos bioativos, visto que tais compostos influenciam de maneira positiva alguns parâmetros bioquímicos associados ao diabetes.

O chá obtido no forno de micro-ondas, com duração de 4 minutos, conseguiu extrair altas quantidades de compostos fenólicos, muito mais do que em QuEChERS e mais da metade (56%) do que foi extraído por soxhlet. A principal diferença nos resultados de quantificação, entre o que ocorreu em aparelho de micro-ondas e em aparelho soxhlet, foi devida a extração exaustiva realizada por este último método que levou muitas horas (quase um dia inteiro) em relação ao primeiro. No entanto, a quantidade de metabólitos presente no chá das folhas de *C. arabica* foi perfeitamente suficiente, para todos os ensaios propostos, já que os resultados obtidos foram satisfatórios.

Em relação ao teor de fenólicos totais, pelo método Folin-Ciocalteu, o chá das folhas de café apresentou o maior valor,  $53,74 \pm 0,02$  (mg EAG/g extrato), quando comparados a outros chás mais comumente consumidos apresentados neste trabalho. Os compostos fenólicos influenciam diretamente na capacidade antioxidante de tal forma que quanto maior o teor de fenólicos totais, maior será a atividade antioxidante. Isto ocorre, pois tais compostos apresentam correlação direta com a atividade antioxidante e também são responsáveis por exercer efeitos farmacológicos importantes.

Além disso, o chá das folhas de *C. arabica* apresentou ótima atividade antioxidante por meio dos ensaios do sequestro do radical DPPH, em relação a outros chás. Isto já era esperado devido ao grande teor de compostos fenólicos presentes na bebida. Podemos concluir, então, que o chá das folhas de café é uma bebida nutracêutica promissora no que se diz respeito ao controle do estresse oxidativo e, conseqüentemente, nas inúmeras enfermidades associadas a este problema.

Outro resultado importante, foi a forte atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase presente no extrato aquoso quando comparado à solução controle: Glucobay<sup>®</sup> (acarbose). Além destas amostras, a mangiferina e a rutina, ambas com propriedades antidiabéticas, também foram avaliadas. O resultado da atividade de inibição da mangiferina foi próximo ao da acarbose e o da rutina foi praticamente o mesmo do chá. No geral, todas as amostras testadas apresentaram ótima atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase. Portanto, o chá das folhas

de *C. arabica* vem como uma excelente medida profilática do diabetes, visto que independente do cultivar escolhido para prepará-lo, ele sempre contribuirá como uma bebida hipoglicemiante. Contudo, é importante lembrar que o chá das folhas de *C. arabica* não deve ser encarado como um fármaco podendo assim substituir a acarbose, por exemplo. Mas sim, como uma forma de prevenir o diabetes, ou ainda, de auxiliar o(s) fármaco(s) durante o tratamento. A realização de mais ensaios, principalmente *in vivo*, para a confirmação da sua eficiência, bem como a ausência de efeitos colaterais é necessária para determinação de todo seu potencial.

Desta forma, o presente trabalho sugere que a ingestão do chá das folhas de *C. arabica*, independente da cultivar escolhida, associado a uma dieta balanceada e também a prática regular de atividades físicas pode contribuir de forma positiva na diminuição no desenvolvimento de síndromes metabólicas relacionadas a processos oxidativo, como é o caso do diabetes *mellitus* tipo 2.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, A. M.; LIU, F.; GUO, X.; FU, X.; LI, T.; LIU, R. H. Phytochemical composition, cellular antioxidant capacity and antiproliferative activity in mango (*Mangifera indica L.*) pulp and peel. **International Journal of Food Science & Technology**, vol. 52, no. 3, pp. 817–826, 2017.
- AKASH, M.S.H.; REHMAN, K.; CHEN, S. Effects of coffee on type 2 diabetes *mellitus*. **Nutrition**, 30, 755–763, 2014.
- AL-DHABI, N. A.; ARASU, M. V.; PARK, C.H.; PARK, S. U. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. **EXCLI Journal**, 14:59-63, 2015.
- AL-MAJMAIE, S.; NAHAR, L.; SHARPLES, G. P.; WADI, K.; SARKER, S. D. Isolation and antimicrobial activity of rutin and its derivatives from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) growing in Iraq. **Records of Natural Products**, 13:1, 64-70, 2019.
- AL-RAWI, A. A. S.; AL-DULAIMI, H. SH.H.; AL-RAWI, M. A.A. antiviral activity of mangifera extract on influenza virus cultivated in different cell cultures, **Journal of Pure and Applied Microbiology**, 13(1), 455-458, 2019.
- ALONSO-CASTRO, A. J.; DOMÍNGUEZ, F.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. **Archives of Medical Research**, 44 (5), pp. 346-351, 2013.
- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, S. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, v.32, n.8, 2169-2180, 2009.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v.41, 2018.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D. & SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **The Journal of AOAC International**, Vol.86, No.2, pp. 412-431, 2003.
- ARAÚJO, J.; FERNANDES, C.; PINTO, M.; TIRITAN, M. E. Chiral Derivatives of Xanthenes with Antimicrobial Activity, **Molecules**, 24(2), 314, 2019.
- ARYA, V.; GUPTA, V.K.; RANJEET, K. A review on fruits having anti-diabetic potential. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 3:204-212, 2011.
- ASHIHARA, H., SANO, H. e CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, 69, p.841-856, 2008.
- BARBER, G. A.; BEHRMAN, E. J. The synthesis and characterization of uridine 5'-(beta-l-rhamnopyranosyl diphosphate) and its role in the enzymic synthesis of rutin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 288(1):239-42, 1991.

- BARBOSA, JÚNIA H. PORTO; SOUZA, ISIS T.; SANTANA, ANTÔNIO E. G. e GOULART, MARÍLIA O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.XY, n.00, 1-13, 2016.
- BARKAOUI, M.; KATIRI, A.; BOUBAKER, H.; MSANDA, F. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 198, pp. 338–350, 2017.
- BARRETO, J. C.; TREVISAN, M. T. S.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; BRITO, E. S.; PFUNDSTEIN, B.; WÜRTELE, 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**, v.56, n.14, p.5599–5610, 2008.
- BATOOL, N.; ILYAS, N.; SHABIR, S.; SAEED, M.; MAZHAR, R. Mini-Review- A mini-review of therapeutic potential of *Mangifera indica* L. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.31, n.4, p.1441-1448, 2018.
- BEDEKAR, A.; SHAH, K.; KOFFAS, M. Natural products for type II diabetes treatment. **Advances in Applied Microbiology**, v.71, p.21-73, 2010.
- BELSCAK-CVITANOVIC, A.; DURGO, K.; GACINA, T.; HORZIC, D.; FRANKELIC, J.; KOMES, D. Comparative study of cytotoxic and cytoprotective activities of cocoa products affected by their cocoa solids content and bioactive composition. **European Food Research and Technology**, v.234, p.173–186, 2012.
- BENITES, J.; ASUNCIÓN-ALVAREZ, H. D.; YBAÑEZ-JULCA, R. O.; GANOZA-YUPANQUI, M. L.; JACINTO-FERNANDEZ, J. J.; DE LA VEJA, J. B. R.; ZAVALETA-CRUZ, H. Z.; PINEDO-ALCÁNTARA, A. N.; LAVADO-FONSECA, C. M.; MEDINA-MEJIA, C. A.; CATALAN, M.; MORALES, B.; ALBUQUERQUE, R.D.D.G.; ROCHA, L.; MARTINEZ, J. L. Chemical composition by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS: Estrogenic and antioxidant effects of *Mangifera indica* L. cv. “Kent” leave extracts on ovariectomized rats, **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, 18 (3): 336 – 346, 2019.
- BENNETT, G. J.; LEE, H.H. Xanthonenes from Guttiferae. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, p. 967-98, 1989.
- BESERRA, B. T. S.; OLIVEIRA, A. R. S.; FEITOSA, M. M.; CRUZ, K. J. C, LEAL, F. L. T.; MARREIRO, D. N. Participação do selênio no diabetes *mellitus* tipo 2. **Nutrire**. 40(2):237-245, 2015.
- BHATIA, V. K.; SESHADRI, T. R. Synthesis of mangiferin. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 14, p.1741-1742, 1968.
- BOATH, A. S.; STEWART, D.; MCDUGALL, G. J. Berry components inhibit  $\alpha$ -glucosidase *in vitro*: Synergies between Acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. **Food Chemistry**, 135, 929-936, 2012.

BODIBA, D. C.; PRASAD, P.; SRIVASTAVA, A.; CRAMPTON, B.; LALL, N. S. Antibacterial Activity of *Azadirachta indica*, *Pongamia pinnata*, *Psidium guajava*, and *Mangifera indica* and their mechanism of action against *Streptococcus mutans*, **Pharmacognosy Magazine**, 14(53): 76–80, 2018.

CAMPA, C.; MONDOLOT, L.; RAKOTONDRAVAO, A.; BIDEL, L. P. R.; 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**, v.110, n.3, p.595–613, 2012.

CANUTO, K. M. Propriedades químicas e farmacológicas de Mangiferina (*Mangifera indica*): um composto bioativo de manga. **Embrapa**, ISSN 1808-9992, Junho, 2009.

CAO, Q.; LI, J.; XIA, Y.; LI, W.; LUO, S.; MA, C.; LIU, S. Green Extraction of Six Phenolic Compounds from Rattan (*Calamoideae faberii*) with Deep Eutectic Solvent by Homogenate-Assisted Vacuum-Cavitation Method. **Molecules**, 24, 113, 2019.

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**, 51, 15. 2013.

ČERVENKA, L.; HÁJEK, T.; SALEK, R.-N.; ČERNÍKOVÁ, M.; VELICHOVÁ, H.; BUŇKA, F. Addition of rutin/quercetin mixture to spreadable processed cheese: Antioxidant and textural characteristics. **Potravinárstvo**, 12(1):129-134, 2018.

CHAN, E.; HEGDE, A.; CHEN, X. Effect of rutin on warfarin anticoagulation and pharmacokinetics of warfarin enantiomers in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 61 (4), pp. 451-458, 2009.

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**, v.26, n.03, p.287-292, 2004.

CHEN, X. M.; MA, Z.; KITTS, D. Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. **Food Chemistry**. 249:143-153, 2018.

CHIMACTIV. Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH° assay. **Chimactiv**. Disponível em: <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>. Acesso em: 02 jun. 2018.

CHOI, K. S.; KUNDU, J. K.; CHUN, K. S.; NA, H. K.; SURH, Y. J. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. **Arch Biochem Biophys**, 559:38-45, 2014.

CHOUDHURY, L. D.; BASU, R.; BISWAS, T.; MUKHERJEE, A.; DAS, A. K. A comparative study of miglitol and acarbose add on therapy intended for better glycaemic control in type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Current Research and Review**, Vol. 8; Issue 24, 2016.

CORRÊA, V. G.; TURECK, C.; LOCATELI, G.; PERALTA, R. M.; KOEHNLEIN, E. A. Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population. **Revista de Nutrição**, v.28, n.2, 2015.

DE ALMEIDA, R. F.; TREVISAN, M. T. S.; THOMAZIELLO, R. A.; BREUER, A.; KLIKA, K. D.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. Nutraceutical compounds: echinoids, flavonoids, xanthonones and caffeine identified and quantitated in the leaves of *Coffea arabica* trees from three regions of Brazil. **Food Research International**, 115:493-503, 2019.

DELTA, Café. **A história do café**. Disponível em: <http://www.delta-cafes.pt/pt/o-cafe/historia>. Acesso em: 02 jun. 2018.

DINESHKUMAR, B.; MITRA, A.; MANJUNATHA, M. Studies on the anti-diabetic and hypolipidemic potentials of mangiferin (Xanthone Glucoside) in streptozotocin-induced Type 1 and Type 2 diabetic model rats. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, 75-85, 2010.

DISO, S.; ALI, M.; MUKHTAR, S.; GARBA, M. Antibacterial activity and phytochemical screening of *Mangifera indica* (Mango) stem and leaf extracts on clinical isolates of methicillin resistant staphylococcus aureus. **Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences**, vol. 13, no. 1, pp. 1–6, 2017.

DORTA, E.; GONZÁLEZ, M.; LOBO, M. G.; LAICH, F. Antifungal activity of mango peel and seed extracts against clinically pathogenic and food spoilage yeasts. **Natural Product Research (Formerly Natural Product Letters)**, vol. 30, no. 22, pp. 2598–2604, 2016.

DUANG, X. Y.; WANG, Q.; ZHOU, X.D.; HUANG, D.M. Mangiferin: A possible strategy for periodontal disease to therapy. **Medical Hypotheses**, 76:486–488. 2011.

EDREVA, A.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T.; DAGNON, S.; GÜREL, A.L.; AKTAS, L. Stress-protective role of secondary metabolites: Diversity of functions and mechanisms. **General and Applied Plant Physiology**, 34, 67–78, 2008.

EL-MANAWATY, M.; GOHAR, L. *In vitro* alpha-glucosidase inhibitory activity of egyptian plant extracts as an indication for their antidiabetic activity. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.11, Issue:7, 2018.

ELSAWY, H.; BADR, G. M.; SEDKY, A.; ABDALLAH, B. M.; ALZHRANI, A. M.; ABDEL-MONEIM, A. M. Rutin ameliorates carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced hepatorenal toxicity and hypogonadism in male rats. **PeerJ**, 29;7:e7011, 2019.

FARAH, A. Coffee constituents. In: Chu, Y.-F. (Ed.), *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. **IFT Press/Wiley-Blackwell**, p.21–58, 2012.

FENG, S-T.; WANG, Z-Z.; YUAN, Y-H.; SUN, H-M.; CHEN, N-H.; ZHANG, Y. Mangiferin: A multipotent natural product preventing neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's disease models. **Pharmacological Research**, 2;146:104336, 2019.

- FIGUEIREDO-GONZALEZ, M.; GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. alpha-Glucosidase and alpha-amylase inhibitors from *Myrciaspp.*: a stronger alternative to acarbose? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.118, p.322-327, 2016.
- FUJITA, M.; INOUE, T. Biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*: intact incorporation of C6-C3 precursor into xanthone. **Tetrahedron Lett.** 4503–4506, 1977.
- GABR, S.; NIKLES, S.; WENZIG, E. M. P.; WOELKART, K. A.; HATHOUT, R. M.; EL-AHMADY, S.; MOTAAL, A. A.; SINGAB, A.; BAUER, R. Characterization and optimization of phenolics extracts from Acacia species in relevance to their anti-inflammatory activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, 78, 21e30, 2018.
- GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin, **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2016.
- GANOPICHAYAGRAI, A.; PALANUVEJ, C.; RUANGRUNGSI, N. Antidiabetic and anticancer activities of *Mangifera indica* cv. Okrong leaves. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, vol. 8, no. 1, pp. 19–24, 2017.
- GAROFULIC, I. E.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; JAMBRAK, A. R.; JUKIC, M. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *Marasca*). **Journal of Food Engineering**, v.117, p.437-442, 2013.
- GEETHAVANI, G.; RAMESWARUDU, M.; REDDY, R. R. Effect of Caffeine on Heart Rate and Blood Pressure. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v.4, Issue:2, 2014.
- GHANI, U. Re-exploring promising  $\alpha$ -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 103: 133-162, 2015.
- GIDAY, M.; ASFAW, Z.; WOLDU, Z. Ethnomedicinal study of plants used by Sheko ethnic group of Ethiopia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.132, n.1, p.75–85, 2010.
- GIL, M.; WIANOWSKA, D. Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. **Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin-Polonica**, v.2, n.1, p.69–70, 2017.
- GODOY, H. R. V.; GONÇALVES, F. B.; MORAES, C. F. Associação de cafeína ao paracetamol no tratamento da dor. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, p. 69-173, 2012.
- GOLENIOWSKI, M.; BONFILL, M.; CUSIDO, R.; PALAZON, J. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Handbook of Natural Products, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, p.1951-1973, 2013.
- GÓMEZ-ZALETA, B.; RAMÍREZ-SILVA, M.T.; GUTIÉRREZ, A.; GONZÁLEZVERGARA, E.; GÜIZADO-RODRÍGUEZ, M.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A. UV/vis, 1H, and 13C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pKa values. **Spectrochimica Acta Part A**, Amsterdam, v. 64, p. 1002.1009, 2006.

GOUVEA, B. M.; TORRES, C.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, E. S. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnol Lett**, 136:269–275, 2009.

GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A.; KOBUS-CISOWSKA, J.; KMIĘCIK, D.; KORCZAK, J.; HELAK, B.; DZIEDZIC, K.; GÓRECKA, D. Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). **Food Chemistry**, 211, 448-454, 2016.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D.; HIDALGO, F. J.; MIYASHITA, K.; CAMP, J. V.; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A. B.; ELMORE, S.; BIRCH, G. G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; ASTLEY, S. B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods? **Food Chemistry**, 264, 471–475, 2018.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, 86:345–391, 2012.

GURURAJA, G. M.; MUNDKINAJEDDU, D.; KUMAR, A. S.; DETHE, S. M.; ALLAN, J. J.; AGARWAL, A. Evaluation of cholesterol-lowering activity of standardized extract of *Mangifera indica* in albino Wistar rats. **Pharmacognosy Research**, vol. 9, no. 1, pp. 21–26, 2017.

ISEDA, S. The structure of mangiferin. **Nippon Kagaku Zasshi**, Tokyo, v. 77, p. 1629-1630, 1956.

HOSSAIN, S. J.; TSUJIYAMA, I.; TAKASUGI, M. ; ISLAM, A.; BISWAS, R. S.; AOSHIMA, H. A. Total Phenolic Content, Anti-oxidative, anti-Amylase, Anti-Glucosidase and Anti-Histamine release activities of Bangladeshi fruits. **Food Science and Technology Research**, 14:261-68, 2008.

HSU, C.Y.; SHIH, H. Y.; CHIA, Y. C.; LEE, C. H.; ASHIDA, H.; LAI, Y. K.; WENG, C. F. Rutin potentiates insulin receptor kinase to enhance insulin-dependent glucose transporter 4 translocation. **Molecular Nutrition & Food Research**, 58 (6), pp. 1168-1176, 2014.

ICO - INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, **A história do café**. Disponível em: [http://www.ico.org/pt/coffee\\_storyp.asp](http://www.ico.org/pt/coffee_storyp.asp). Acesso em: 02 jun. 2018.

ISLAM, M. R.; MANNAN, M. A.; KABIR, M. H. B.; ISLAM, A.; OLIVAL, K. J. Analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial effects of ethanol extracts of mango leaves. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, vol. 8, no. 2, pp. 239–244, 2010.

İNCE, A. E.; ŞAHİN, S.; ŞÜMNÜ, S. G. Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 37: 69-75, 2013.

JAVED, H.; KHAN, M. M.; AHMAD, A.; VAIBHAV, K.; AHMAD, M. E.; KHAN, A.; ASHAFAQ, M.; ISLAM, F.; SIDDIQUI, M. S.; SAFHI, M. M.; ISLAM, F. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. **Neuroscience**, 17, pp. 340-352, 2012.

JEONG, I. K.; KING, G. L. New perspectives on diabetic vascular complications: the loss of endogenous protective factors induced by hyperglycemia. **Diabetes & Metabolism Journal**, 35(1):8-11, 2011.

KARAMANO, M.; PROTOGEROU, A.; TSOUICALAS, G.; ANDROUTSOS, G.; POULAKOU-REBELAKOU. E. Milestones in the history of diabetes *mellitus*: The main contributors. **World Journal of Diabetes**, v.7, n.1, p.1–7, 2016.

KASBE, P.; JANGRA, A.; LAHKAR, M. Mangiferin ameliorates aluminium chloride-induced cognitive dysfunction via alleviation of hippocampal oxido-nitrosative stress, proinflammatory cytokines and acetylcholinesterase level. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 31:107-12, 2015.

KAWPOOMHAE K, SUKMA M, NGAWHIRUNPAT T, OPANASOPIT P, SRIPATTANAPORN A. Antioxidant and neuroprotective effects of standardized extracts of *Mangifera indica* leaf. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, 34(1):32-43, 2010.

KEKELIDZE, N.; KEKELIDZE, T.; AKHALBEDASHVILI, L.; MAISURADZE, G.; KVIRKVELIA, B.; TSOTADZE, G.; MSKHILADZE, A.; LIPARTIANI, V.; JALAGHANIA, S. The content of antioxidants - Phenolic compounds, in red wines of Georgia “Kindzmarauli” and “Saperavi”. **Applied Food Science Journal**, v.2, n.2, 2018.

KIM, K. Y.; NAMA, K. A.; KURIHARA, H.; KIM; S. M. Potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. **Phytochemistry**, 69:2820-2825, 2008.

KUMAR, R.; PATE, D. K.; PRASAD, S. K.; SAIRAM, K.; HEMALATHA, S. Antidiabetic activity of alcoholic leaves extract of *Alangium lamarckii* Thwaites on streptozotocinnicotinamide induced type 2 diabetic rats. **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**, v.4, n.11, p. 904–909, 2011.

KUMAR, V.; KAUR, J.; PANGHAL, A.; KAUR, S.; HANDA, V. Caffeine: a boon or bane. **Nutrition & Food Science**, v.48 Issue:1, p.61-75, 2018.

KUMOLOASASI, E.; IBRAHIM, S. N. A.; SHUKRI, S. M. A.; AHMAD, W. Immunostimulant activity of standardised extracts of *Mangifera indica* leaf and *Curcuma domestica* rhizome in mice, **Tropical Journal of Pharmaceutical Research January**, 17 (1): 77-84, 2018.

LIANG, J.; LI, F.; LIN, J.; SONG, S.; LIAO, X.; GAO, C.; YANG, B. Host-guest inclusion systems of mangiferin and polyamine- $\beta$ -cyclodextrins: Preparation, characterization and anti-cancer activity, **Journal of Molecular Structure**, volume 1193, pages 207-214, 2019.

LIM, J. W.; CHEE, S. X.; WONG, W. J.; HE, Q. L.; LAU, T. C. Traditional Chinese medicine: herb-drug interactions with aspirin. **Singapore Medical Journal**. 59(5): 230-239, 2018.

LIN, J. P.; YANG, J. S.; LIN, J. J.; LAI, K. C.; LU, H. F.; MA, C. Y.; SAI-CHUEN WU, R.; WU, K. C.; CHUEH, F. S.; GIBSON WOOD, W.; CHUNG, J. G. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model *in vivo*. **Environmental Toxicology**, 27 (8), pp. 480-484, 2012.

- LINA, Q.; CHENA, X.-Y.; ZHANGB, J.; YUANB, Y.-L.; ZHAOA, W.; WEIA, B. Upregulation of SIRT1 contributes to the cardioprotective effect of Rutin against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Functional Foods**, 46, 227–236, 2018.
- LORDAN, S.; SMYTH, T.J.; SOLER-VILA, A.; STANTON, C.; ROSS, R.P. The alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. **Food Chemistry**, v.141, n.3, p.2170-2176, 2013.
- LUDWIG, I. A.; CLIFFORD, M. N.; LEAN, M. E. J.; ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food and Function**, v.5, n.8, p.1695–1717, 2014.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, 1217:2383e9, 2010.
- MACHADO, I.; GÉREZ, N.; PISTÓN, M.; HEINZEN, H.; CESIO, M.V. Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC–MS and LC–MS/MS using the same QuEChERS procedure. **Food Chemistry**, v.227, p.227-236, 2017.
- MAMAT, S. S.; KAMAROLZAMAN, M. F. F.; YAHYA, F.; MAHMOOD, N. D.; SHAHRIL, M. S.; JAKIUS, K. F.; MOHTARRUDIN, N.; CHING, S. M.; SUSANTI, D.; TAHER, M.; ZAKARIA, Z. M. Methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves exerted antioxidant and liver protective activity in rats. *BMC Complement. Alternative Medicine Review*, 13: 326, 2013.
- MARTINI, D.; DEL BO', C.; TASSOTTI, M. Coffee consumption and oxidative stress: A review of human intervention studies. **Molecules**, 21:E979, 2016.
- MATKOWSKI, A.; KUŚ, P.; GÓRALSKA, E.; WOŹNIAK, D. Mangiferin — A bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 13, 439–455, 2013.
- MEENAKSHI, S.; KUMAR, D. D. Mangiferin protects renal impairment against benzo(a)pyrene induced toxicity by regulating mitochondrial and dna integrity, **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, 8(1):92-97, 2018.
- MENDES-JUNIOR, M. M.; MONTEIRO, S.; CARVALHO, A. S.; QUEIROZ, T. M.; BRAGA DE, A. Oral supplementation with the rutin improves cardiovagal baroreflex sensitivity and vascular reactivity in hypertensive rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 38 (11), pp. 1099-1106, 2013.
- MENG, S.; CAO, J.; FENG, Q.; PENG, J.; HU, Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- MILENKOVIĆ, D.; DOROVIĆ, J.; JEREMIĆ, S.; DIMITRIĆ MARKOVIĆ, J. M.; AVDOVIĆ, E. H.; MARKOVIĆ, Z. Free Radical Scavenging Potency of Dihydroxybenzoic Acids. **Journal of Chemistry**, vol. 2017, Article ID 5936239, 9 pages, 2017.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafes/saiba-mais>. Acesso em: 21 jul. 2018.
- MOHAMMED A.; RIZVI, S. I. Anti-diabetic efficacy of young and mature leaf extract of *Mangifera indica*. **Journal of Traditional Medicines**, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- MONTEIRO, J. P.; ALVES, M. G.; OLIVEIRA, P. F.; SILVA, B. M. Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. **Molecules**, 27; 21(8), 2016.
- MORAES-DE-SOUZA, R. A. Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). **Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2007.
- 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**, 19(1B): 315-320, 2009.
- MOTAMEDSHARIATY, V. S.; FARZAD, S. A.; NASSIRI-ASL, M.; HOSSEINZADEH, H. Effects of rutin on acrylamide-induced neurotoxicity. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, 22:27, 2014.
- MUAZU, U.; MUHAMMAD, S.; MUHAMMAD, M. T. Effects of some plant extracts on some selected fungal species. **Journal of Zoological and Bioscience Research**, vol. 3, no. 1, 2017.
- MUHAMMAD, A.; ARTHUR, D. E.; BABANGIDA, S.; ERUKAINURE, O. L.; MALAMI, I.; SANI, H.; ABDULHAMID, A. W.; AJIBOYE, I. O.; SAKA, A. A.; HAMZA, N. M.; ASEMA, S.; ADO, Z. M.; MUSA, T. I. Modulatory role of rutin on 2,5-hexanedione-induced chromosomal and DNA damage in rats: validation of computational predictions. **Drug and Chemical Toxicology**, 10:1-14, 2018.
- MUÑIZ-MOURO, A.; GULLÓN, B.; LÚ-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M.; EIBES, G. Laccase Activity as an Essential Factor in the Oligomerization of Rutin. **Catalysts**, 8, 321, 2018.
- MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, n.3, p.893-903, 2012.
- MUTUA, J. K.; IMATHIU, S.; OWINO, W. Evaluation of the proximate composition, antioxidant potential, and antimicrobial activity of mango seed kernel extracts. **Food Science & Nutrition**, vol. 5, no. 2, pp. 349–357, 2017.
- NAFEES, S.; MEHDI, S. H.; ZAFARYAB, M.; ZEYA, B.; SARWAR, T.; RIZVI, M. A. Synergistic Interaction of Rutin and Silibinin on Human Colon Cancer Cell Line. **Archives of Medical Research**, 49(4):226-234, 2018.

NALLAMUTHU, I.; DEVI, A.; KHANUMA, F. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 10, 203, 2015.

NASIARA, K.; IMRAN, K.; HAROON K.; BABAR A.; HEBA, A. H.; NAVNATH, G. Anxiolytic Potential of Natural Flavonoids. **SM Journal of Steroids and Hormones**. 1(1):1001, 2018.

NASSIRI-ASL, M.; MORTAZAVI, S. R.; SAMIEE-RAD, F.; ZANGIVAND, A. A.; SAFDARI, F.; SAROUKHANI, S.; ABBASI, E. The effects of rutin on the development of pentylenetetrazole kindling and memory retrieval in rats. **Epilepsy & Behavior**, 18, pp. 50-53, 2010.

NASSIRI-ASL, M.; NASERPOUR FARIVAR, T.; ABBASI, E.; SADEGHNIA, H. R.; SHEIKHI, M.; LOTFIZADEH, M.; BAZAHANG, P. Effects of rutin on oxidative stress in mice with kainic acid-induced seizure. **Journal of Integrative Medicine**, 11:337-42, 2013.

NETTO, A. P.; ANDRIOLO, A.; FILHO, F. F.; TAMBASCIA, M.; GOMES, M. B.; MELO, M.; SUMITA, N. M.; LYRA, R.; CAVALCANTI, S. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45, n.1, p.31-48, 2009.

NIEOCZYM, D.; SOCAŁA, K.; RASZEWSKI, G.; WLAŹ, P. Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 54, pp. 50-58, 2014.

NITURE, N. T.; ANSARI, A. A.; NAIK, S. R. Anti-hyperglycemic activity of rutin in streptozotocin-induced diabetic rats: an effect mediated through cytokines, antioxidants and lipid biomarkers. **Indian Journal of Experimental Biology**, 52:720-7, 2014.

NGO, D-H.; NGO, D-N.; VO, T. T. N.; VO, T. S. Mechanism of Action of *Mangifera indica* Leaves for Anti-Diabetic Activity, **Scientia Pharmaceutica**, 87(2), 13, 2019.

NOTT, P. E.; ROBERTS, J. C. Synthesis of mangiferin. **Phytochemistry**, Oxford, V. 6, P. 597-599, 1967.

OBUSENG, V. C.; MOOKANTSA, B. M.; OKATCH, H.; MOSEPELE, K.; TORTO, N. Extraction of Pesticides from Plants using Solid Phase Microextraction and QuEChERS. **South African Journal of Chemistry**, 66, 183–188, 2013.

OKUR, M. E.; ÖZBEK, H.; POLAT, D. Ç.; YILMAZ, S.; ARSLAN, R. Hypoglycemic activity of *Caparis ovata* desf. var. palaestina zoh. methanol extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 54(3):e18031, 2018.

OLALEYE, M.; CROWN, O.; AKINMOLADUN, A.; AKINDAHUNSI, A. Rutin and quercetin show greater efficacy than nifedipin in ameliorating hemodynamic, redox, and metabolite imbalances in sodium chloride-induced hypertensive rats. **Human & Experimental Toxicology**, 33:602-8, 2013.

- OLALEYE, M. T.; AMOBONYE, A. E.; KOMOLAFE, K.; AKINMOLADUN, A. C. Protective effects of *Parinari curatellifolia* flavonoids against acetaminophen-induced hepatic necrosis in rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 21: 486-492, 2014.
- OLASEHINDE, G. I.; SHOLOTAN, K. J.; OPENIBO, J. O.; TAIWO, O. S.; BELLO, O. A.; AJAYI, J. B.; AYEPOLA, O. O.; AJAYI, A. A. Phytochemical and antimicrobial properties of *Mangifera indica* leaf extracts, **Canadian Society of Physician Leaders**, 6(1) 55-63, 2018.
- OLIVEIRA, I. P., OLIVEIRA, L. C., MOURA, C. S. F. T. Cultura de café: histórico, classificação botânica e fases de crescimento. **Revista Faculdade Montes Belos**, v.5, n.4, 2012.
- OLIVEIRA, L. M. N. **Quantificação de rutina, atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de polpas e subprodutos de frutas tropicais**. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- OYAGBEMI, A. A.; OMOBOWALE, T. O.; OLA-DAVIES, O. E.; ASENUGA, E. R.; AJIBADE, T. O.; ADEJUMOBI, O. A.; AFOLABI, J. M.; OGUNPOLU, B. S.; FALAYI, O. O.; AYODEJI, F.; HASSAN, F. O.; SABA, A. B.; ADEDAPO, A. A.; YAKUBU, M. A. Ameliorative effect of Rutin on sodium fluoride-induced hypertension through modulation of Kim-1/NF- $\kappa$ B/Nrf2 signaling pathway in rats. **Environmental Toxicology**, 33(12):1284-1297, 2018.
- OZDAL, T.; SELA, D. A.; XIAO, J.; BOYACIOGLU, D.; CHEN, F.; CAPANOGLU, E. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. **Nutrients**, 8(2): 78-78, 2016
- PARK, J. B. Potential Effects of Chlorogenic Acids on Platelet Activation, in **Coffee in Health and Disease Prevention**, p.709-717, 2015.
- PATAY, E. B.; BENCSIK, T.; PAPP, N. Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 9(12): 1127–1135, 2016a.
- PATAY E.; NÉMETH T.; FILEP R.; VLASE L.; PAPP N. Histological and phytochemical studies of *Coffea enghalensis* B. Heyne ex schult., compared with *Coffea arabica* L. **Farmacia**, v.64, 1, 2016b.
- PATAY, E. B.; FRITEA, L.; ANTONESCU, A.; ANTONESCU, A.; DOBJANSCHI, L. *Coffea arabica*: A Plant with Rich Content in Caffeine. **The Question of Caffeine**, Intechopen, 2017.
- PAULA, R. C. M. (Org.); PAULA, H. C. B. (Org.); FEITOSA, J. P. A. (Org.). Polissacarídeos da Biodiversidade Brasileira. **Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 1a ed., v.200. 335p, 2018.
- PATIL, S. L.; SOMASHEKARAPPA, H.; RAJASHEKHAR, K. Radiomodulatory role of rutin and quercetin in swiss albino mice exposed to the whole body gamma radiation. **Indian Journal of Nuclear Medicine**, 27 (4), pp. 237-242, 2012.

- PATTANAYAK, S.; NAYAK, S. S.; PANDA, D. P.; DINDA, S. C.; SHENDE, V.; JADAV, A. Hepatoprotective activity of crude flavonoids extract of *Cajanus scarabaeoides* (l) in paracetamol intoxicated albino rats. **Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Sciences**, 1: 22-27, 2011.
- PENG, F.; XU, P.; ZHAO, B. Y.; ZONG, M. H.; LOU, W. Y. The application of deep eutectic solvent on the extraction and in vitro antioxidant activity of rutin from *Sophora japonica* bud. **Journal of Food Science and Technology**. 55(6):2326-2333, 2018.
- PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; SÁTIRO, L. C.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, C. A.; SOUZA, S. P. Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado. **Revista Brasileira de Farmácia**, 92(4): 367-372, 2011.
- PRADO, Y.; MERINO, N.; ACOSTA, J.; HERRERA, J. A.; LUQUE, Y.; HERNÁNDEZ, I.; PRADO, E.; GARRIDO, G.; DELGADO, R.; RODEIRO, I. Acute and 28-day subchronic toxicity studies of mangiferin, a glucosyl xanthone isolated from *Mangifera indica* L. stem bark. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, 3 (1), 13-23, 2015.
- PRASAD, R.; PRASAD, S. B. Antitumor activity of rutin-cisplatin in combination and its protective effect against hematotoxicity. **Life Science Informatics Publications**, 4(6) Page No.42, 2018.
- QU, J.; ZHOU, Q.; DU, Y.; ZHANG, W.; BAI, M.; ZHANG, Z.; XI, Y.; LI, Z.; MIAO, J. Rutin protects against cognitive deficits and brain damage in rats with chronic cerebral hypoperfusion. **British Journal of Pharmacology**, 171:3702-15, 2014.
- QURESHI, S. A.; JAHAN, M.; LATEEF, T.; AHMED, D.; RAIS, S.; AZMI, M. B. Presence of gallic acid and rutin improve the hepatoprotective strength of *Withania coagulans*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, 32(1(Supplementary)):301-308, 2019.
- RAMALHOSA, P.; CAMACHO-CRUZ, K.; BASTIDA-ZAVALA, R.; CANNINGCLODE, J. First record of *Branchiomma bairdi* McIntosh, 1885 (Annelida: Sabellidae) from Madeiran Island, Portugal (northeastern Atlantic Ocean). **BioInvasions Records** 3: 235–239, 2014.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RASHID, M. H.; CHOWDHURY, M. A. Z.; FARDOUS, Z.; TANVIR, E. M.; PRAMANIK, M. K.; JAHAN, I.; ALAM, M. K.; MONIRUZZAMAN, M.; GAN, S. H. Microbial decontamination of gamma irradiated black tea and determination of major minerals in black tea, fresh tea leaves and tea garden soil. **Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie**, 73, 185-190, 2016.
- RAVI, G. S.; CHARYULU, R. N.; DUBEY, A.; PRABHU, P.; HEBBAR, S.; MATHIAS, A. C. Nano-lipid Complex of Rutin: Development, Characterisation and In Vivo Investigation of Hepatoprotective, Antioxidant Activity and Bioavailability Study in Rats. **AAPS PharmSciTech**, 19(8):3631-3649, 2018.

- REBOUÇAS, F.S. **Cultivo *in vitro* de plantas medicinais: *Ocimum basilicum L.* e *Cissus sicyoides L.*** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2009.
- RIAZ, H.; RAZA, S. A.; ASLAM, M. S.; AHMAD, M. S.; AHMAD, M. A.; MARIA, P. An Updated Review of Pharmacological, Standardization Methods and Formulation Development of Rutin. **Journal of pure and applied microbiology**, 12(1), 2018.
- RICCI, C.; GAETA, M.; RAUSA, E.; MACCHITELLA, Y.; BONAVINA, L. Early impact of bariatric surgery on type ii diabetes, hypertension, and hyperlipidemia: A systematic review, meta-analysis and meta-regression on 6,587 patients. **Obesity Surgery**, vol. 24, no. 4, pp. 522–528, 2014.
- ROCHA, L. W.; BONET, I. J. M.; TAMBELI, C. H.; DE-FARIA, F. M.; PARADA, C. A. Local administration of mangiferin prevents experimental inflammatory mechanical hyperalgesia through CINC-1/epinephrine/PKA pathway and TNF- $\alpha$  inhibition, **European journal of pharmacology**, 830, 87-94, 2018.
- SAFDAR, N.; SARFARAZ, A.; KAZMI, Z.; YASMIN, A. Ten different brewing methods of green tea: comparative antioxidant study. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.4 (03), p.033-040, 2016.
- SALES, P. M.; SOUZA, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D.  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, 15(1):141-83, 2012.
- SANUGUL, K.; AKAO, T.; LI, Y.; KARIUCHI, N.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glycosyl bond. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, p. 1672-1678, 2005.
- SANTOS, P. G. **Estudo do Mecanismo de Interação de Mangiferina e Mangiferitina com Soroalbumina**. Dissertação (mestrado em Química). Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2010.
- SANTOS, J. A. S.; SENA, T. J. O.; COSTA, M. L. A.; SANTOS, K. C. B. S.; SANTOS, A. F. Estudo do potencial antioxidante da *Anacardium occidentales L.* e determinação de seus compostos fenólicos. **Diversitas Journal**, 3(2), 455-474, 2018.
- SCHARDT, D. Caffeine - The Good, the Bad, and the Maybe. **Nutrition Action**, v.3, p.3-7, 2008.
- SEKAR, V.; CHAKRABORTY, S.; MANI, S.; SALI, V. K.; VASANTHI, H. R. Mangiferin from *Mangifera indica* fruits reduces post-prandial glucose level by inhibiting  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activity, **South African journal of botany**, v.120, pp. 129-134, 2019.
- SEOL, G. H.; KANG, P.; LEE, H. S.; SEOL, G. H. Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome. **BMC Neurology**, vol. 16, no. 1, article no. 17, 2016.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A.; STANISLAS, G.; DOURAGUIA, E.; GONTHIER, M. P. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island. **Food Chemistry**, vol. 212, pp. 225–233, 2016.

SHAFI, W.; MANSOOR, S.; JAN, S.; SINGH, D. B.; KAZI, M.; RAISH, M.; ALWADEI, M.; MIR, J. I.; AHMAD, P. Variability in Catechin and Rutin Contents and Their Antioxidant Potential in Diverse Apple Genotypes. **Molecules**, 7;24(5), 2019.

SHAILAJAN, S.; MENON, S.; KULKARNI, S.; TIWARI, B. Standardized extract of *Mangifera indica* L. leaves as an antimycobacterial and immunomodulatory agent. **Pharmacognosy Communications**, vol. 6, no. 3, pp. 137–147, 2016.

SHINDE, J.; TALDONE, T.; BARLETTA, M.; KUNAPARAJU, N.; HU, B.; KUMAR, S.; PLACIDO, J.; ZITO, S. W. Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydrate Research**, 19; 343(7):1278-81, 2008.

SHIVANI, D.; ANJALI, S. Antioxidant activity and improvement in the yield of antioxidant compounds. **Asian Pacific Journal of Health Sciences**, v.5, Issue: 2, 2018.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K. D.; FEDEWA, S. A.; AHNEN, D. J.; MEESTER, R. G. S.; AFSANEH BARZI, A.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 67, no. 3, pp. 177–193, 2017.

SIKDER, K.; KESH, S. B.; DAS, N.; MANNA, K.; DEY, S. The high antioxidative power of quercetin (aglycone flavonoid) and its glycone (rutin) avert high cholesterol diet induced hepatotoxicity and inflammation in Swiss albino mice. **Food & Function**, 5:1294-303, 2014.

SILVA, L. M. C.; PALHA, P. F.; BARBOSA, G. R.; PROTTI, S. T.; RAMOS, A. S. Aposentados com diabetes tipo 2 na Saúde da Família em Ribeirão Preto, São Paulo–Brasil. **Revista da Escola de Enfermagem–USP**, v.44, n.2, p.462-8, 2010a.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3, p.669-682, 2010b.

SILVA, D. F.; AZEVEDO, E. B.; REZENDE, M. O. O. Optimization of microwave-assisted extraction of a bioherbicide from *Canavalia ensiformis* leaves. **American Journal of Environmental Sciences**, v.12, n.1, p. 27-32, 2016.

SNOUSSI, C., DUCROC, R., HAMD AOUI, M. H., et al. Green tea decoction improves glucose tolerance and reduces weight gain of rats fed normal and high-fat diet. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.25, n.5, p.557-564. 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes**. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>. Acesso em: 13 out. 2018.

SONG, J.; KIM, Y.; LEE, J. Comparison of antioxidant and anti-inflammatory activity of quercetin, isoquercitrin and rutin against alcohol-induced liver injury in HepG2 Cells. **Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 32, No. 1, 2018.

SOUSA, B. A.; CORREIA, R. T. P. Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, n.1, 2012.

SOUZA, W. F. M.; BAPTISTA, A. R. S.; Machado, R. L.; ROCHA, C. B. *In silico* study of the anti-obesity potential of Baccharis trimera phenolic compounds. **Revista brasileira de educação e saúde**, v. 9, p. 32-36, 2019.

STELMACH, E.; POHL, P.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A. The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews. **Food Chemistry**, 182, p.302- 308, 2015.

STOHS, S.J.; SWAROOP, A.; MORIYAMA, H.; BAGCHI, M.; AHMAD, T.; BAGCHI, D. A Review on Antioxidant, Anti-Inflammatory and Gastroprotective Abilities of Mango (*Mangifera indica*) Leaf Extract and Mangiferin, **Journal of Nutrition and Health Sciences**, volume 5, issue: 3, 218.

SULEMAN, M.; ALI, J. S.; UL HAQ, I.; NISA, S.; ZIA, M. Antioxidative, protein kinase inhibition and antibacterial potential of seven mango varieties cultivated in Pakistan, **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 32 issue: 4, p1687-1695, 2019.

SUNDARAM, R. L.; SALI, V. K.; VASANTHI, H. R. Protective effect of rutin isolated from *Spermococe hispida* against cobalt chloride-induced hypoxic injury in H9c2 cells by inhibiting oxidative stress and inducing apoptosis. **Phytomedicine**, 51, 196–204, 2018.

SUNDARRAJAN, T.; VELMURUGAN, V.; MANIKANDAN, K.; JOTHIESWARI, D. A study of In-vitro hypoglycemic and glucose uptake activity of isolated compound from ethanolic leaf extract of *Amaranthus tristis* Linn. **Pharmacognosy Research**, 11(1), 2019.

SUNSHINE. Little-known fruits contain powerful anti-inflammatory and anti-oxidant agents. **Life Ever Changing**, 10 ago. 2018. Disponível em: <https://lifeverchanging.com/2018/08/10/little-known-fruits-contain-powerful-anti-inflammatory-and-anti-oxidant-agents/>. Acesso em: 20 de jun. de 2019.

TALAMOND, P.; MONDOLOT, L.; GARGADENNEC, A.; de KOCHKO, A.; HAMON, S.; FRUCHIER, A.; CAMPA, C. First report on mangiferin (C-glucosyl-xanthone) isolated from leaves of a wild coffee plant, *Coffea pseudozanguebariae* (Rubiaceae). **Acta Botanica Gallica**, 155(4), 513-519, 2008.

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**, 38(4): 661-666, 2018.

- TIVERON, A.P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2010.
- TREVISAN, M. T. S.; ALMEIDA, R. F.; SOTO, G.; VIRGINIO FILHO, E. M.; 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**, v.9, n.9, p.2649-2655, 2016.
- UDDIN, G.; RAUF, A.; AL-OTHMAN, A.M.; COLLINA, S.; ARFAN, M.; ALI, G.; KHAN, I. Pistagremic acid, a glucosidase inhibitor from *Pistacia integerrima*. **Fitoterapia**, 83:1648-1652, 2012.
- UDEM, G. C.; DAHIRU, D.; ETTEH, C. C. *In vitro* Antioxidant Activities of Aqueous and Ethanol Extracts of *Mangifera indica* Leaf, Stem-Bark and Root-Bark, **Pharmacognosy Communications**, 8(3): 119-124, 2018.
- VEIGA, A. A. S.; NETO, A. M. J. C.; SILVA, A. B. F.; HERCULANDO, A. M.; OLIVEIRA, K. R. M.; BORGES, R. S. Sugar moiety has a synergistic effect on hydroxylated xanthone for better antioxidant activity of mangiferin, **Medicinal Chemistry Research**, Volume 27, Issue 4, pp 1276–1282, 2018.
- VIEIRA, L. M.; CASTRO, C.F.S.; DIAS, A.L.B.; SILVA, A.R. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, p.521-527, 2015.
- VIGITEL, 2017. **Ministério da Saúde**. Disponível em <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2018.
- VIZZOTO, M.; KROLOW, C.; WEBER, G. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: **Embrapa** Clima Temperado, 16 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316), 2010.
- WIERZEJSKA, R. Caffeine--common ingredient in a diet and its influence on human health. **Rocz Panstw Zakl Hig**, 63, p.141-147, 2012.
- WOLDE, T. Effects of caffeine on health and nutrition: A Review. **Food Science and Quality Management**, v.30, 2014.
- WU, S; CHAPPELL, J. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. **Current Opinion in Biotechnology**, 19:145–152, 2008.
- XI, J. S.; WANG, Y. F.; LONG, X. X.; MA, Y. Mangiferin Potentiates Neuroprotection by Isoflurane in Neonatal Hypoxic Brain Injury by Reducing Oxidative Stress and Activation of Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) Signaling, **Medical Science Monitor**, 19;24:7459-7468, 2018.

YANG, G.; SHANG, X.; CUI, G.; ZHAO, L.; ZHAO, H.; WANG, N. Mangiferin Attenuated Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinoma in Sprague-Dawley Rats via Alteration of Oxidative Stress and Apoptotic Pathway, **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, 38(1):1-12, 2019.

YOO, H.; KU S. K.; BAEK, Y.D.; BAE, J. S. Anti-inflammatory effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo*. **Inflammation Research**, 63:197-206, 2014.

ZAJAC, J.; SHRESTHA, A.; PATEL, P.; PORETSKY, L. Principles of Diabetes *Mellitus*. 2nd ed. **Poretsky L**, editor. New York: Springer US; 869 p., 2010.

ZAPATA LONDOÑO, M.B.; RAMOS POLO, A.R.; ALZATE ARBELAEZ, A.F.; ROJANO, B.A.; MALDONADO CELIS, M.E. Behavior of bioactive compounds and antioxidant activity of mango (*Azucar cultivar*) juice during storage at 4 °C, **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, 72, 8743, 2019.

ZHANG, Y.; CHEN, Q.; LIU, M-Y.; RUAN, J-Y.; YU, H-Y.; LI, J.; WANG, T. Effects of Benzophenones from Mango Leaves on Lipid Metabolism, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 67, 634–639, 2019.

ZENGIN, G.; BULUT, G.; MOLLICA, A.; NANCY PICOT-ALLAIN, C. M.; MAHOMOODALLY, M. F. *In vitro* and *in silico* evaluation of *Centaurea saligna* (K.Koch) Wagenitz-An endemic folk medicinal plant. **Computational Biology and Chemistry**, 73:120-126, 2019.

**APÊNDICE A – QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS PRESENTES NAS 16  
CULTIVARES E AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À FERRUGEM**

Tabela 15 - Teor de metabólitos, em g/kg, obtidos por forno de micro-ondas e tolerância à ferrugem (*Hemileia vastatrix*)

<b>Cultivares</b>	<b>Ácido clorogênico</b>	<b>Cafeína</b>	<b>Mangiferina</b>	<b>Rutina</b>	<b>Ferrugem</b>
Catiguá MG1	18,76	9,65	5,16	3,33	Resistente
Catiguá MG3	26,41	6,69	9,34	12,52	Resistente
Rubi	18,91	12,84	4,89	8,69	Suscetível
Aranãs	24,80	16,54	9,08	13,58	Resistente
Sacramento MG1	30,46	5,52	14,77	8,84	Resistente
Oeiras	14,11	15,70	3,23	4,76	Resistente
Acaiá Cerrado	12,66	16,96	6,19	5,46	Suscetível
Arapongas MG1	32,68	7,11	13,23	11,29	Suscetível
Travessia	16,36	11,09	5,99	8,91	Suscetível
Pau Brasil MG1	4,36	10,56	1,08	4,46	Resistente
Paraíso 2 MG5	22,24	4,45	10,00	6,02	Resistente
Paraíso MG419-1	21,66	12,72	7,27	8,18	Resistente
Sarchimor	21,02	14,34	10,51	8,10	Resistente
Pau Brasil 2	23,58	10,94	15,29	16,37	Resistente
Arapongas MG52	26,98	7,25	6,50	9,59	Resistente
Topázio MG1190	10,88	10,17	3,65	6,30	Suscetível

Fonte: Elaborado pelo autor.

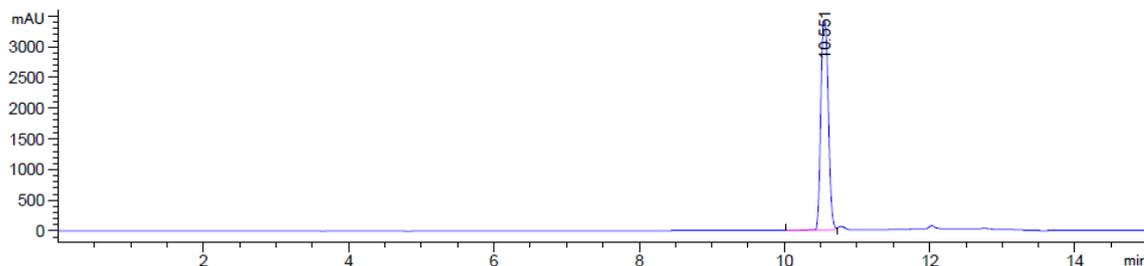
Tabela 16 - Teor de fenólicos, em g/kg, obtidos em extração soxhlet e QuEChERS

Cultivares	Soxhlet			QuEChERS		
	Ácido clorogênico	Mangiferina	Rutina	Ácido clorogênico	Mangiferina	Rutina
Catiguá MG1	23,74	17,76	21,45	3,89	2,02	1,74
Catiguá MG3	28,32	28,99	29,40	3,07	0,88	2,15
Rubi	21,56	23,63	11,17	3,23	1,99	0,50
Aranãs	31,46	29,55	39,69	5,81	2,89	4,64
Sacramento MG1	30,18	29,64	15,30	4,92	2,53	1,79
Oeiras	20,30	16,29	15,54	2,65	1,07	1,45
Acaiá Cerrado	18,59	18,58	28,06	2,81	2,04	2,77
Arapongas MG1	26,30	26,12	19,23	4,11	2,57	2,17
Travessia	23,18	15,28	21,49	4,05	1,72	1,66
Pau Brasil MG1	28,22	23,63	22,80	4,52	2,43	2,79
Paraíso 2 MG5	40,23	46,26	31,48	6,06	4,55	3,04
Paraíso MG419-1	32,82	17,44	21,99	5,49	2,18	2,28
Sarchimor	52,66	55,07	32,79	8,25	5,60	3,55
Pau Brasil 2	53,92	54,65	52,39	12,62	8,13	9,33
Arapongas MG52	27,17	26,75	19,47	4,33	2,68	2,07
Topázio MG1190	20,20	12,63	20,88	2,91	1,23	1,67

Fonte: Elaborado pelo autor.

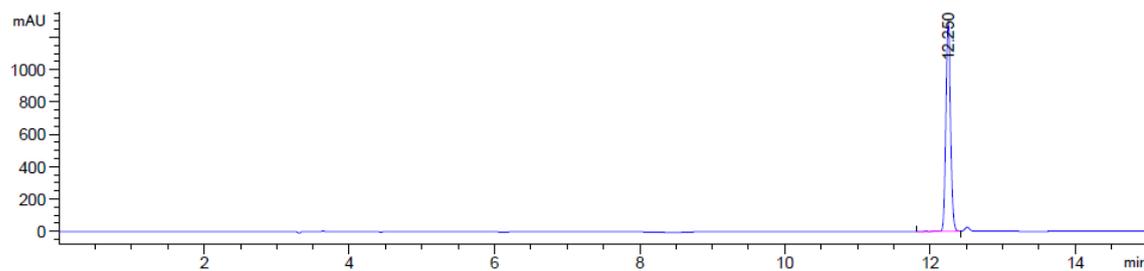
## APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS COM OS TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES MANGIFERINA, RUTINA E CAFEÍNA OBTIDOS EM HPLC

Figura 21 - Padrão mangiferina (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>) em 257 nm



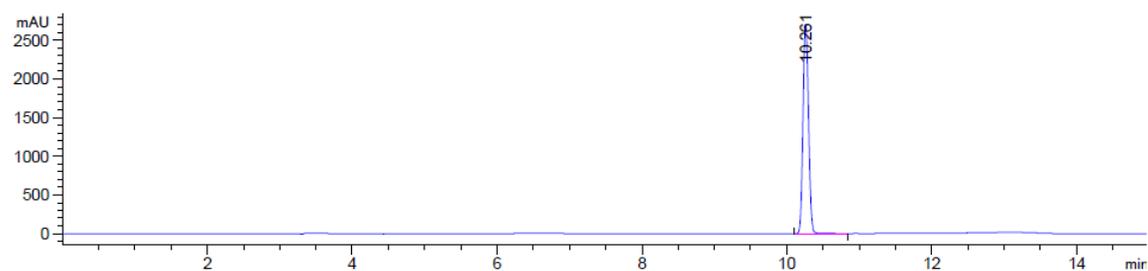
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Padrão rutina (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>) em 340 nm



Fonte: Elaborado pelo autor.

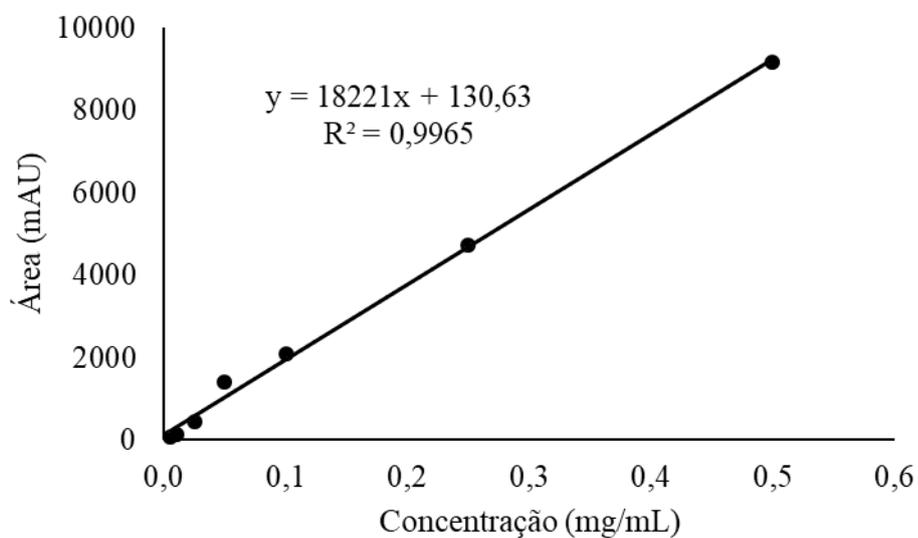
Figura 23 - Padrão cafeína (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>) em 278 nm



Fonte: Elaborado pelo autor.

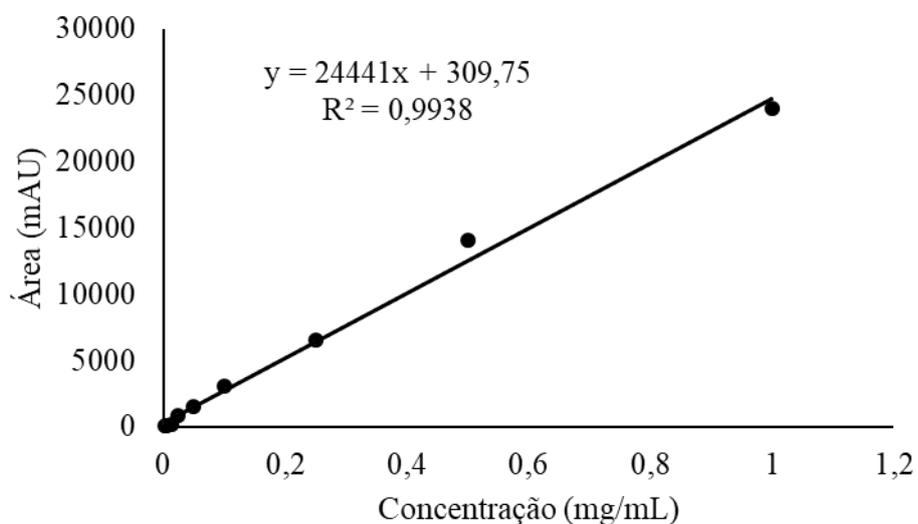
## APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS PADRÕES USADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Gráfico 3 - Curva analítica da ácido clorogênico (340 nm)



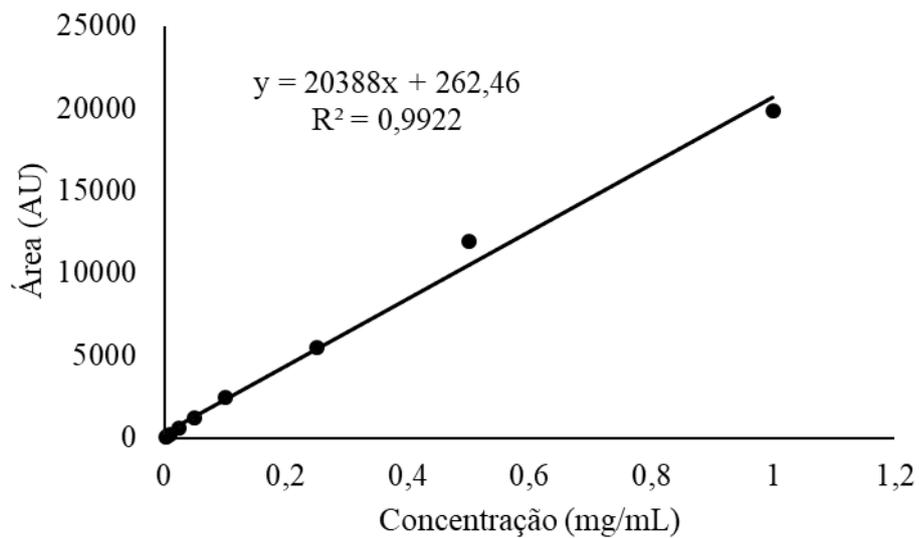
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 4 - Curva analítica da mangiferina (257 nm)



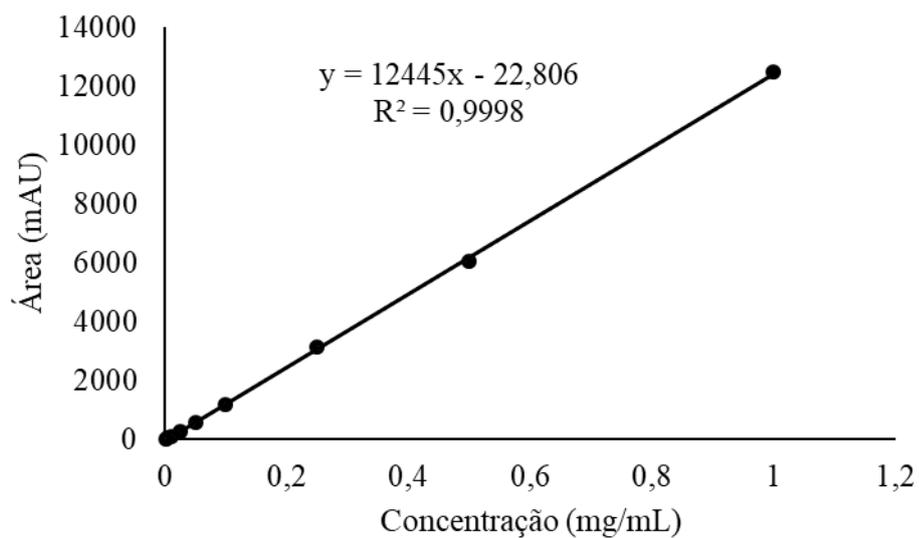
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 5 - Curva analítica da cafeína (278 nm)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 6 - Curva analítica da rutina (340 nm)



Fonte: Elaborado pelo autor.

## APÊNDICE D – VALORES USADOS NA CONSTRUÇÃO DE GRÁFICOS

Tabela 17 - Dados utilizados para a confecção do gráfico 1

<b>Concentração (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Absorbância 1</b>	<b>Absorbância 2</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>
0,50	0,586	0,598	0,592	0,006
0,25	0,315	0,301	0,308	0,007
0,15	0,137	0,133	0,135	0,002
0,10	0,085	0,087	0,086	0,001
0,05	0,090	0,050	0,070	0,020

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 18 - Dados utilizados para a confecção do gráfico 2

<b>Concentração (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Inibição 1 (%)</b>	<b>Inibição 2 (%)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>
1,000	46,72	46,58	46,65	0,07
0,500	24,38	24,22	24,30	0,08
0,250	12,12	12,28	12,20	0,08
0,125	6,89	6,80	6,84	0,04
0,050	3,35	3,30	3,32	0,02

Fonte: Elaborado pelo autor.

## APÊNDICE E – TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT)

Tabela 19 - TFT (em mg EAG/g) das 16 cultivares do chá das folhas de *C. arabica*

<b>Cultivares</b>	<b>Absorbância 1</b>	<b>Absorbância 2</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>TFT</b>
Catiguá MG1	0,64	0,62	0,63	0,01	54,00
Catiguá MG3	0,75	0,76	0,76	0,01	64,63
Rubi	0,53	0,58	0,56	0,02	47,79
Aranãs	0,65	0,64	0,65	0,01	55,46
Sacramento MG1	0,94	0,99	0,96	0,03	81,67
Oeiras	0,54	0,51	0,53	0,02	45,50
Acaiá Cerrado	0,54	0,56	0,55	0,01	47,17
Arapongas MG1	0,93	0,98	0,96	0,02	81,21
Travessia	0,57	0,51	0,54	0,03	46,71
Pau Brasil MG1	0,27	0,27	0,27	0,00	24,17
Paraíso 2 MG5	0,55	0,50	0,53	0,02	45,58
Paraíso MG419-1	0,61	0,65	0,63	0,02	54,38
Sarchimor	0,60	0,66	0,63	0,03	53,92
Pau Brasil 2	0,60	0,61	0,60	0,00	51,88
Arapongas MG52	0,79	0,78	0,78	0,01	66,71
Topázio MG1190	0,44	0,46	0,45	0,01	39,13

Fonte: Elaborado pelo autor.

## APÊNDICE F – CURVA DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH

Tabela 20 - Inibição percentual  $\pm$  desvio padrão das 16 cultivares do chá das folhas de *C. arabica*

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
	1000	500	250	125	50
Catiguá MG1	52,29 $\pm$ 0,001	23,62 $\pm$ 0,001	10,81 $\pm$ 0,001	7,99 $\pm$ 0,001	2,23 $\pm$ 0,001
Catiguá MG3	52,06 $\pm$ 0,001	24,79 $\pm$ 0,001	15,86 $\pm$ 0,001	8,58 $\pm$ 0,001	2,82 $\pm$ 0,001
Rubi	32,43 $\pm$ 0,006	12,57 $\pm$ 0,001	7,17 $\pm$ 0,001	2,35 $\pm$ 0,001	2,70 $\pm$ 0,001
Aranãs	49,59 $\pm$ 0,002	24,09 $\pm$ 0,001	9,87 $\pm$ 0,001	5,99 $\pm$ 0,001	2,94 $\pm$ 0,001
Sacramento MG1	68,63 $\pm$ 0,001	39,25 $\pm$ 0,001	19,74 $\pm$ 0,001	10,46 $\pm$ 0,001	5,88 $\pm$ 0,001
Oeiras	37,02 $\pm$ 0,001	17,16 $\pm$ 0,001	14,10 $\pm$ 0,001	4,35 $\pm$ 0,001	2,00 $\pm$ 0,001
Acaiá Cerrado	38,43 $\pm$ 0,008	19,15 $\pm$ 0,001	13,40 $\pm$ 0,001	8,46 $\pm$ 0,001	4,94 $\pm$ 0,001
Arapongas MG1	53,00 $\pm$ 0,001	20,56 $\pm$ 0,001	14,92 $\pm$ 0,001	10,46 $\pm$ 0,001	4,94 $\pm$ 0,001
Travessia	33,73 $\pm$ 0,002	21,97 $\pm$ 0,001	11,16 $\pm$ 0,001	5,99 $\pm$ 0,001	1,18 $\pm$ 0,001
Pau Brasil MG1	51,82 $\pm$ 0,002	21,50 $\pm$ 0,001	5,99 $\pm$ 0,001	3,88 $\pm$ 0,001	1,88 $\pm$ 0,001
Paraíso 2 MG5	52,53 $\pm$ 0,001	26,79 $\pm$ 0,001	11,87 $\pm$ 0,001	6,23 $\pm$ 0,001	1,53 $\pm$ 0,001
Paraíso MG419-1	48,88 $\pm$ 0,001	23,50 $\pm$ 0,001	13,40 $\pm$ 0,001	8,34 $\pm$ 0,001	5,52 $\pm$ 0,001
Sachimor	56,05 $\pm$ 0,001	23,97 $\pm$ 0,001	13,04 $\pm$ 0,001	8,46 $\pm$ 0,001	5,17 $\pm$ 0,001
Pau Brasil 2	53,11 $\pm$ 0,001	45,83 $\pm$ 0,001	12,57 $\pm$ 0,001	7,52 $\pm$ 0,001	4,70 $\pm$ 0,001
Arapongas MG52	34,43 $\pm$ 0,007	28,79 $\pm$ 0,001	12,81 $\pm$ 0,001	4,82 $\pm$ 0,001	2,47 $\pm$ 0,001
Topázio MG1190	32,43 $\pm$ 0,001	15,28 $\pm$ 0,001	8,46 $\pm$ 0,001	5,64 $\pm$ 0,001	2,35 $\pm$ 0,001

Fonte: Elaborado pelo autor.

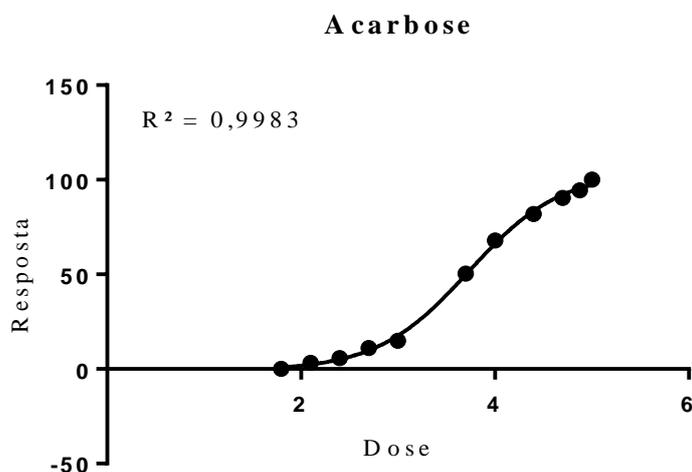
**APÊNDICE G – INIBIÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -GLICOSIDASE E CURVAS DOSE  
RESPOSTA**

Tabela 21 - Dados utilizados para a confecção do gráfico da acarbose

Concentração (ppm)	Log Concentração (Dose)	Resposta 1	Resposta 2	Média	Desvio
100000	5,00	0,9127	0,9270	0,9199	0,007
75000	4,88	0,8718	0,8731	0,8725	0,001
50000	4,70	0,8397	0,8384	0,8391	0,001
25000	4,40	0,7656	0,7668	0,7662	0,001
10000	4,00	0,6484	0,6473	0,6479	0,001
5000	3,70	0,5003	0,5016	0,5010	0,001
1000	3,00	0,1998	0,1999	0,1999	0,000
500	2,70	0,1686	0,1675	0,1680	0,001
250	2,40	0,1228	0,1213	0,1221	0,001
125	2,10	0,0999	0,1011	0,1005	0,001
62,5	1,80	0,0730	0,0743	0,0736	0,001
31,25	1,49	0,9127	0,9270	0,9199	0,007

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 7 - Curva dose-resposta para a acarbose.  $\text{Log IC}_{50} = 3,730$ .  $\text{IC}_{50} = 5,353 \text{ mg.mL}^{-1}$

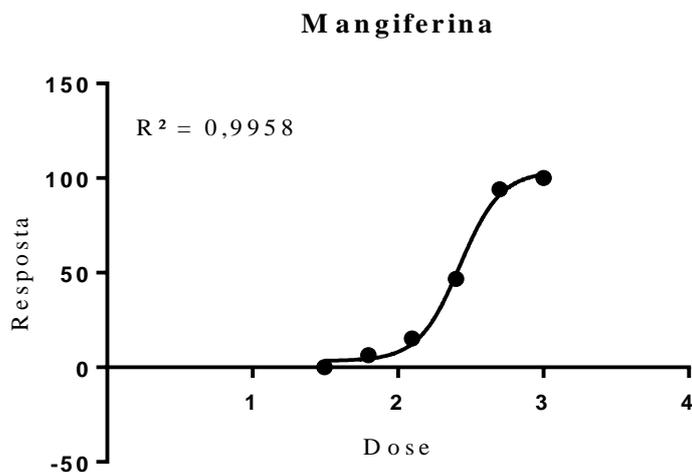


Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 22 - Dados utilizados para a confecção do gráfico da mangiferina

Concentração (ppm)	Log Concentração (Dose)	Resposta 1	Resposta 2	Média	Desvio
1000	3,00	0,9036	0,9048	0,9042	0,0006
500	2,70	0,8542	0,8554	0,8548	0,0006
250	2,40	0,4631	0,4621	0,4626	0,0005
125	2,10	0,2024	0,2022	0,2023	0,0001
62,5	1,80	0,1282	0,1288	0,1285	0,0003
31,25	1,50	0,0763	0,0755	0,0759	0,0004

Fonte: Elaborado pelo autor.

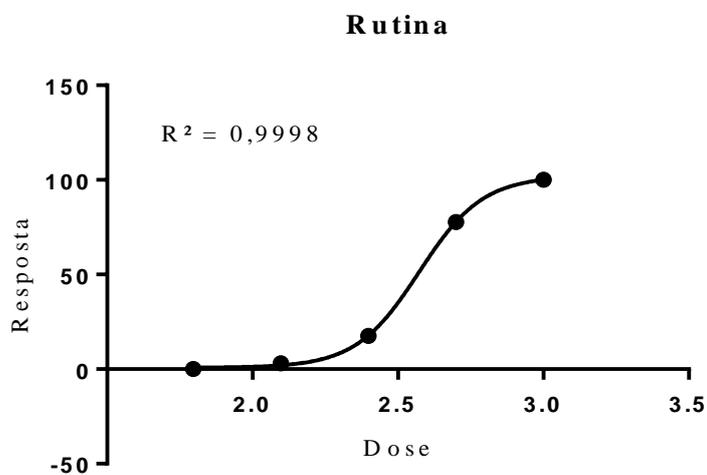
Gráfico 8 - Curva dose-resposta da mangiferina.  $\text{Log IC}_{50} = 2,424$ .  $\text{IC}_{50} = 0,265 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 23 - Dados utilizados para a confecção do gráfico da rutina

Concentração (ppm)	Log Concentração (Dose)	Resposta 1	Resposta 2	Média	Desvio
1000	3,00	0,8573	0,8569	0,8571	0,0002
500	2,70	0,7462	0,7466	0,7464	0,0002
250	2,40	0,4453	0,4457	0,4455	0,0002
125	2,10	0,3748	0,3712	0,3730	0,0018
62,5	1,80	0,3582	0,3574	0,3578	0,0004

Fonte: Elaborado pelo autor.

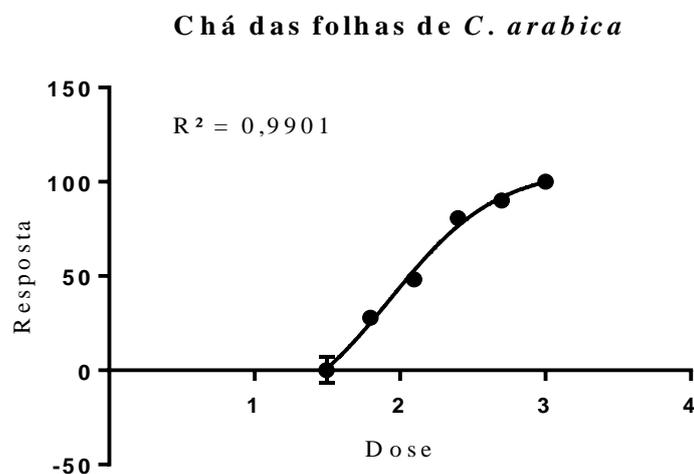
Gráfico 9 - Curva dose-resposta da rutina.  $\text{Log IC}_{50} = 2,573$ .  $\text{IC}_{50} = 0,374 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 24 - Dados utilizados para a confecção do gráfico do chá das folhas de *C. arabica*

Concentração (ppm)	Log Concentração (Dose)	Resposta 1	Resposta 2	Média	Desvio
1000	3,00	0,8588	0,8596	0,8592	0,0004
500	2,70	0,8184	0,8188	0,8186	0,0002
250	2,40	0,7799	0,7821	0,7810	0,0011
125	2,10	0,6491	0,6481	0,6486	0,0005
62,5	1,80	0,5665	0,5659	0,5662	0,0003
31,25	1,50	0,4721	0,4325	0,4523	0,0198

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 10 - Curva dose-resposta do chá. Log IC<sub>50</sub> = 1,932 ppm. IC<sub>50</sub> = 0,0855 mg.mL<sup>-1</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor.