



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

**GERLAN OLIVEIRA DO NASCIMENTO**

**EXTRATOS DAS FOLHAS DE CAFÉ E DE SEUS PRINCIPAIS COMPOSTOS**  
**BIOATIVOS: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

**FORTALEZA**

**2022**

GERLAN OLIVEIRA DO NASCIMENTO

EXTRATOS DAS FOLHAS DE CAFÉ E DE SEUS PRINCIPAIS COMPOSTOS  
BIOATIVOS: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

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

Orientadora: Prof. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

FORTALEZA

2022

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

---

- N195e Nascimento, Gerlan Oliveira do.  
Extratos das folhas de café e de seus principais compostos bioativos: avaliação do estresse oxidativo /  
Gerlan Oliveira do Nascimento. – 2022.  
159 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.
1. Alfa-glicosidase. 2. Lipase pancreática. 3. Zebrafish. 4. ICP-OES. 5. AGEs. I. Título.

CDD 572

---

GERLAN OLIVEIRA DO NASCIMENTO

EXTRATOS DAS FOLHAS DE CAFÉ E DE SEUS PRINCIPAIS COMPOSTOS  
BIOATIVOS: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

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

Aprovada em: 28/11/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Gisele Simone Lopes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Samuel Pedro Dantas Marques  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

A minha esposa, Maria Helena Viana, e ao meu  
filho, Pierre Viana, que tornam minha vida  
incrível todos os dias!

## AGRADECIMENTOS

À minha amada esposa, Maria Helena de Oliveira Viana, pelo amor, incentivo, muita compreensão e por todas as palavras de carinho e conforto sempre que precisei durante toda essa jornada. Sem você nada disso teria dado certo. Ao meu filho, Pierre Viana Oliveira do Nascimento, por toda diversão e novo significado que trouxe para minha vida. Sua presença, durante horas na frente do computador comigo, foi muito divertida.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan pela oportunidade, ensinamentos, compreensão, parceria, paciência e grande contribuição na realização deste trabalho. Agradeço pela orientação e oportunidade de aprendizado. Ao professor Robert Owen pela paciência e por toda ajuda nas análises de dados. Ao Geraldinho (*in memoriam*) pelo fornecimento das folhas de café da cultivar Mundo Novo.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Programa de Pós-Graduação em Química (PGQUIM), aos Departamentos de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI) e de Química Analítica e Físico-Química (DQAFQ) pela possibilidade da realização deste doutorado, bem como a todos os docentes que contribuíram na minha formação compartilhando seus conhecimentos. À Epamig pelo fornecimento das diversas cultivares de folhas de café arábica.

Aos meus colegas de laboratório Anderson, Ana Maria, Felipe, João Felipe, Lucas, Lorão e Samuel por todo suporte, apoio, palavras de incentivo, momentos divertidos e pela troca de ensinamentos e contribuições para a realização deste trabalho.

Ao Luan Fonseca e as professoras Wladiana Matos e Gisele Lopes pela curadoria e validação de dados nas análises quimiométrica, além de todo suporte fornecido pelo Laboratório de Estudos em Química Aplicada (LEQA).

Ao professor Hélcio e sua aluna Emanuela da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) pelas análises em modelo zebrafish com os extratos das folhas de café.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) pela possibilidade da realização de análises de bioacessibilidade e atividades antioxidantes. E à todas as outras pessoas que, embora não citadas, contribuíram indiretamente para a consolidação deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.” (Carl Sagan)

## RESUMO

As folhas de café são uma fonte significativa de compostos polifenólicos que podem ser úteis na redução da hiperglicemia e dislipidemia. O presente estudo se concentrou em investigar as atividades antioxidantes, antiglicantes, a inibição de enzimas digestivas, a bioacessibilidade e o efeito hipoglicemiante. Também foi investigado o teor de biocompostos após diferentes formas de secagem das folhas além da busca de vestígios metálicos, pois estes podem estar relacionados à defesa da planta contra a doença do cafeeiro (ferrugem). A identificação e quantificação dos principais metabólitos dos extratos foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado na determinação do Teor de Fenólicos Totais (TFT) e as atividades antioxidantes pela captura dos radicais DPPH•, O<sub>2</sub>•, ROO• e das moléculas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCl. A extração dos metais Al, Cu, Mg, Mn, Ni, Sn e Zn para posterior quantificação por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) foi realizada usando uma mistura ácida em bloco digestor. Os extratos foram analisados quanto à inibição da  $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática, a atividade antiglicante pela técnica de espectrofluorescência, a bioacessibilidade pela digestão *in vitro* e a hiperglicemia pelo modelo zebrafish. A análise por cromatografia elucidou um perfil químico caracterizado por três classes de polifenóis (xantona, ácido clorogênico e flavonoide) e cafeína. A capacidade antioxidante dos extratos foi maior do que os controles positivos e o TFT foi  $608,70 \pm 0,02$  mg de EAG g<sup>-1</sup>. As folhas de café demonstraram forte inibição da  $\alpha$ -glicosidase (IC<sub>50</sub> = 40,30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) maior que os metabólitos isolados e acarbose, além de inibir a lipase pancreática (IC<sub>50</sub> = 56,43  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) possuindo ainda, efeito hipoglicemiante em zebrafish semelhante a acarbose e metformina. Além disso, foi observado a redução da fluorescência implicando efeito antiglicante. Com exceção da rutina, todos os biocompostos foram detectados em todas as etapas da digestão. A relação entre metais e os biocompostos permitiu discriminar cafeeiros resistentes de suscetíveis. Por fim, os resultados sugerem que os extratos das folhas de *C. arabica* possuem propriedades antidiabética e antiobesidade que podem ser atribuídas aos principais metabólitos e à ação sinérgica entre eles.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ -glicosidase; lipase pancreática; zebrafish; icp-oes; ages.

## ABSTRACT

Coffee leaves are a significant source of polyphenolic compounds that may be useful in reducing hyperglycemia and dyslipidemia. The present study focused on investigating the antioxidant, antiglycemic activities, digestive enzyme inhibition, bioaccessibility and hypoglycemic effect. The content of biocompounds after different ways of drying the leaves was also investigated in addition to the search for metallic traces, as these may be related to the plant's defense against the coffee tree disease (rust). The identification and quantification of the main metabolites of the extracts was done by High Performance Liquid Chromatography. The Folin-Ciocalteu method was used to determine the Total Phenolic Content and the antioxidant activities by capturing the DPPH•, O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, ROO• radicals and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HOCl molecules. The extraction of the metals Al, Cu, Mg, Mn, Ni, Sn and Zn for further quantification by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) was performed using an acid mixture in a digester block. The extracts were analyzed for inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase, antiglycating activity by spectrofluorescence technique, bioaccessibility by *in vitro* digestion and hyperglycemia by zebrafish model. Chromatographic analysis elucidated a chemical profile characterized by three classes of polyphenols (xanthone, chlorogenic acid and flavonoids) and caffeine. The antioxidant capacity of the extracts was higher than the positive controls and the TPC was  $608.70 \pm 0.02$  mg GAE g<sup>-1</sup>. Coffee leaves showed strong inhibition of  $\alpha$ -glucosidase (IC<sub>50</sub> = 40.30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) greater than the isolated metabolites and acarbose, and inhibited pancreatic lipase (IC<sub>50</sub> = 56.43  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) possessing also, hypoglycemic effect in zebrafish similar to acarbose and metformin. In addition, fluorescence reduction was observed implying antiglycemic effect. With the exception of rutin, all biocompounds were detected in all digestion steps. The relationship between metals and biocomposites allowed us to discriminate resistant from susceptible coffee trees. Finally, the results suggest that *C. arabica* leaf extracts possess antidiabetic and anti-obesity properties that can be attributed to the main metabolites and the synergistic action between them.

**Keywords:**  $\alpha$ -glucosidase; pancreatic lipase; zebrafish; icp-oes; ages.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Principais compostos bioativos identificados nas folhas de café da espécie <i>C. arabica</i> .....	21
Figura 2	– Relação entre estrutura e atividade antioxidante de compostos fenólicos com base nos critérios de Bors. ....	34
Figura 3	– Estruturas das moléculas (A) acarbose e (B) orlistat. ....	35
Figura 4	– Representação esquemática da reação de Maillard. ....	38
Figura 5	– Superposição dos espectros de DAD e tempo de retenção do ácido clorogênico puro com aquele obtido nos extratos aquosos. ....	68
Figura 6	– Cromatograma característico obtido em CLAE-DAD das folhas <i>C. arabica</i> ..	69
Figura 7	– Gráfico de <i>Scores</i> de PCA (Fator 2 × Fator 3) de 16 cultivares de <i>C. arabica</i> .....	73
Figura 8	– Gráfico de <i>Loadings</i> de PCA (Fator 2 × Fator 3) de 16 cultivares de <i>C. arabica</i> .....	73
Figura 9	– Análise das cultivares resistentes e suscetível pelo modelo PLS-DA.....	77
Figura 10	– Pontuações PLS-DA de dois componentes para a composição química com as classificações de grupos genealógicos. ....	78
Figura 11	– Correlações dos valores de $IC_{50}^{-1}$ e TFT dos extratos de <i>C. arabica</i> .....	84
Figura 12	– Reação genérica de hidrólise do <i>p</i> -NPG pela $\alpha$ -glicosidase. ....	88
Figura 13	– Atividade inibitória da enzima $\alpha$ -glicosidase dos compostos bioativos isolados, dos extratos aquosos de <i>C. arabica</i> e acarbose. ....	90
Figura 14	– Estrutura química do flavonol (2-fenil-benzo-alfa-pirona).....	91
Figura 15	– Mecanismos de hidrólise da ligação glicosídica. ....	92
Figura 16	– Reação genérica do <i>p</i> -NPB catalisado pela lipase pancreática. ....	94
Figura 17	– Atividade inibitória da enzima lipase pancreática dos compostos bioativos isolados, dos extratos aquosos de <i>C. arabica</i> e orlistat. ....	96
Figura 18	– Atividade antiglicante dos extratos metanólicos das folhas de <i>C arabica</i> .....	98
Figura 19	– Teor dos metabólitos principais dos extratos (A) aquosos e (B) metanólicos de <i>C. arabica</i> após as três etapas da digestão <i>in vitro</i> . ....	101
Figura 20	– Efeito dos extratos aquosos das folhas de café na (A) hiperglicemia e (B) estresse oxidativo hepático em peixe-zebra induzido por D-glicose. ....	103
Figura 21	– Interação do complexo de CtMGAM com ligantes. ....	107

Figura 22 – Cultivar Acaiá Cerrado MG 1474 .....	139
Figura 23 – Cultivar Rubi MG 1192.....	140
Figura 24 – Cultivar Topázio MG 1190.....	141
Figura 25 – Cultivar MGS Travessia.....	142
Figura 26 – Cultivar MGS Arañas .....	143
Figura 27 – Cultivar Araponga MG1.....	144
Figura 28 – Cultivar MGS Ametista.....	145
Figura 29 – Cultivar Catiguá MG1 .....	146
Figura 30 – Cultivar MGS Catiguá 3 .....	147
Figura 31 – Cultivar Oeiras MG 6851 .....	148
Figura 32 – Cultivar MGS Paraíso 2 .....	149
Figura 33 – Cultivar Paraíso MG H 419-1 .....	150
Figura 34 – Cultivar Pau Brasil 2 .....	151
Figura 35 – Cultivar Pau Brasil MG1.....	152
Figura 36 – Cultivar Sarchimor MG 8840.....	153
Figura 37 – Cultivar Sacramento MG1 .....	154

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Cultivares de <i>C. arabica</i> e suscetibilidade à ferrugem. ....	47
Tabela 2	– Compostos majoritários identificados nos extratos de <i>C. arabica</i> .....	51
Tabela 3	– Parâmetros operacionais utilizados no ICP-OES para a determinação de Al, Cu, Mg, Mn, Ni, Sn e Zn em amostras de folhas de café.....	52
Tabela 4	– Concentrações recomendadas de eletrólitos dos Fluidos Sintético Salivar (FSS), Gástrico (FSG) e Intestinal (FSI) com base em dados humanos <i>in vivo</i> .....	61
Tabela 5	– Quantificação dos compostos bioativos majoritários presentes nos extratos de <i>C. arabica</i> obtidos em micro-ondas, soxhlet e quechers.....	70
Tabela 6	– Contagens de falsos positivos e negativos com referência à classificação dos grupos suscetíveis e resistentes à ferrugem pelo modelo PLS-DA. ....	79
Tabela 7	– Análise quantitativa dos principais componentes bioativos das folhas de <i>C. arabica</i> em diferentes métodos de secagem.....	80
Tabela 8	– Valores de TFT e IC <sub>50</sub> para o ensaio de DPPH• dos extratos aquosos de <i>C. arabica</i> , metabólitos secundários isolados e controle positivo.....	83
Tabela 9	– Capacidade de captura de ERO dos extratos de <i>C. arabica</i> e controle positivo.....	85
Tabela 10	– Percentual de inibição e valores de IC <sub>50</sub> referentes à inibição da $\alpha$ -glicosidase dos compostos bioativos isolados, dos extratos aquosos de <i>C. arabica</i> e acarbose.....	89
Tabela 11	– Percentual de inibição e valores de IC <sub>50</sub> referentes à inibição da lipase pancreática dos compostos bioativos isolados, dos extratos aquosos de <i>C. arabica</i> e orlistat. ....	95
Tabela 12	– Teor percentual dos metabólitos majoritários das folhas de café bioacessíveis obtidas pelo método da digestão <i>in vitro</i> .....	100
Tabela 13	– Energia de afinidade e valores de rmsd dos complexos formados após simulações de docagem contra a subunidade C-terminal (CTMGAM) da enzima maltase-glicoamilase. ....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	Dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
ABS	Absorbância
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina sérica bovina
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
CtMGAM	Subunidade C-terminal da enzima maltase-glicoamilase
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH•	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ET	Equivalente de trolox
FSG	Fluido Sintético Gástrico
FSI	Fluido Sintético Intestinal
FSS	Fluido Sintético Salivar
GR	Grupo de cultivares resistentes à ferrugem
GS	Grupo de cultivares suscetíveis à ferrugem
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente
IES	Ionizador <i>Electrospray</i>
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radical superóxido
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -nitrofenil butirato
<i>p</i> -NPG	<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo
PCA	Análise de Componentes Principais
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

TFT	Teor de Fenólicos Totais
RMSD	Desvio médio quadrático
ROO•	Radical peroxila
RPM	Rotações por minuto
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
©	Copyright
®	Marca registrada
™	Marca comercial

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
3.1	Cafeeiro e metabólitos secundários.....	20
3.2	Secagem das amostras vegetais.....	23
3.3	Ferrugem do cafeeiro.....	25
3.4	Quimiometria.....	26
3.5	Estresse oxidativo.....	28
3.6	Diabetes.....	30
3.7	Obesidade.....	32
3.8	Compostos fenólicos e a capacidade antioxidante.....	33
3.9	Enzimas digestivas: $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática.....	35
3.10	Produtos finais de glicação avançada.....	37
3.11	Bioacessibilidade dos compostos bioativos.....	40
3.12	Zebrafish.....	42
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
4.1	Reagentes.....	45
4.2	Preparo de tampões.....	46
4.3	Material botânico.....	46
4.4	Preparação dos extratos.....	48
4.5	Análise dos compostos fenólicos.....	49
4.5.1	<i>Identificação dos compostos bioativos</i> .....	49
4.5.2	<i>Curvas de calibração</i> .....	50
4.6	Análise dos elementos inorgânicos.....	51
4.6.1	<i>Instrumentação</i> .....	51
4.6.2	<i>Técnicas quimiométricas</i> .....	52
4.7	Secagem da amostra vegetal.....	54
4.8	Compostos fenólicos e a capacidade antioxidante.....	55
4.8.1	<i>Teor de Fenólicos Totais</i> .....	55

4.8.2	<i>Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•</i> .....	55
4.8.3	<i>Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical O<sub>2</sub>•</i> .....	56
4.8.4	<i>Atividade antioxidante pelo método de sequestro do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> .....	57
4.8.5	<i>Atividade antioxidante pelo método de sequestro do HOCl</i> .....	57
4.8.6	<i>Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ROO•</i> .....	58
4.9	<b>Análise da atividade enzimática</b> .....	58
4.9.1	<i>Inibição da enzima α-glicosidase</i> .....	58
4.9.2	<i>Inibição da enzima lipase pancreática</i> .....	59
4.10	<b>Avaliação da capacidade antiglicante de extratos metanólicos das folhas de café</b> .....	60
4.11	<b>Digestão <i>in vitro</i> e a bioacessibilidade dos metabólitos majoritários</b> .....	61
4.12	<b>Zebrafish</b> .....	62
4.12.1	<i>Animais</i> .....	62
4.12.2	<i>Hiperglicemia induzida por D-glicose em Zebrafish adulto</i> .....	63
4.12.3	<i>Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) do fígado de Zebrafish</i> .....	63
4.13	<b>Análise estatística</b> .....	64
4.14	<b>Procedimentos Computacionais</b> .....	64
4.14.1	<i>Detalhes computacionais</i> .....	64
4.14.2	<i>Preparação e otimização de ligantes</i> .....	65
4.14.3	<i>Procedimentos gerais de docagem</i> .....	65
5	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	68
5.1	<b>Perfil químico das folhas de <i>C. arabica</i></b> .....	68
5.2	<b>Relação entre os compostos polifenólicos e os metais nas folhas de <i>Coffea arabica</i></b> .....	71
5.2.1	<i>Análise das variáveis</i> .....	71
5.2.2	<i>Análise de Componentes Principais</i> .....	72
5.2.3	<i>Análise PLS-DA</i> .....	76
5.3	<b>Teste de secagem e preservação dos metabólitos principais para infusões</b> ... 80	80
5.4	<b>Teor dos fenólicos totais e a capacidade antioxidante</b> .....	82
5.4.1	<i>Relação entre TFT e o radical DPPH•</i> .....	82
5.4.2	<i>Capacidade de captura de EROS</i> .....	85
5.5	<b>Análise da atividade enzimática</b> .....	88
5.5.1	<i>Ensaio de inibição da enzima α-glicosidase</i> .....	88
5.5.2	<i>Ensaio de inibição da enzima lipase pancreática</i> .....	93

5.6	Atividade antiglicante.....	97
5.7	Bioacessibilidade dos extratos das folhas de <i>C. arabica</i> .....	100
5.8	Hiperglicemia induzida por D-glicose em peixe-zebra adulto .....	102
5.9	Estudos de simulação de computador de inibição de $\alpha$ -glicosidase .....	104
6	CONCLUSÃO .....	108
	REFERÊNCIAS.....	110
	APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS DE CAFÉ.....	139
	APÊNDICE B – QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS EM DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO .....	155
	APÊNDICE C – CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS NAS FOLHAS DE CAFÉ ARÁBICA.....	156
	APÊNDICE D – CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS INORGÂNICOS NAS FOLHAS DE CAFÉ ARÁBICA.....	157
	APÊNDICE E – INTERAÇÕES DE METABÓLITOS E CONTROLE COM CtMGAM.....	158

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como um distúrbio metabólico correspondente ao excesso de gordura corporal e atualmente é uma epidemia global (OTTERBACH et al., 2021) caracterizada por má alimentação, ingestão excessiva de gorduras saturadas, consumo inadequado de fibras alimentares, falta de atividades físicas e, também, fatores genéticos (MSOPA; MWANAKASALE, 2019). Essa enfermidade, por sua vez, prejudica a qualidade de vida das pessoas afetadas, podendo reduzir sua expectativa de vida devido ao desenvolvimento de outras doenças, como é o caso da diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que geralmente está associada à hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina (HAUNER, 2016; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2021; KORAC et al., 2021).

Uma consequência da hiperglicemia é a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, por sua vez, causam peroxidação lipídica, resultando no acúmulo de biomoléculas glicadas conhecidas como produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês, *advanced glycation end-products*) (SWAIN et al., 2020; KORAC et al., 2021). A inibição de hidrolases lipídicas e glicosídicas, bem como a inibição da glicação não enzimática podem atuar na diminuição da hiperglicemia, hiperlipidemia e formação de AGEs, podendo, ainda, auxiliar no tratamento da obesidade e diabetes (FRANCO et al., 2020a).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é uma prática tão antiga quanto à civilização humana. Os povos antigos utilizavam vegetais para o tratamento e prevenção de doenças, bem como a promoção da boa saúde com base no método de tentativa e erro (NUNEZA; RODRIGUEZ; NASIAD, 2021). Compostos polifenólicos, como os flavonoides encontrados em plantas medicinais, são fontes de componentes biologicamente ativos atuando como agentes antioxidantes, hipoglicemiantes e hipolipidêmicos (DINDA et al., 2020; ABDULMALEK; FESSAL; EL-SAYED, 2021) capazes de reduzir a glicação de proteínas e inibir enzimas digestivas como por exemplo, a  $\alpha$ -glicosidase e a lipase pancreática (LIMA JÚNIOR et al., 2021; FRANCO et al., 2020b).

A utilização de plantas, despertou o interesse em pesquisadores, desde o século passado, pois a partir de suas propriedades farmacológicas, alguns princípios ativos foram isolados e são utilizados como fármacos atualmente para o tratamento de várias doenças (MAJUMDAR; SOMANI, 2018, DUTTA et al., 2019), como por exemplo a morfina (*Papaver somniferum* L.) e codeína (*Papaver somniferum* L.) usadas como potentes analgésicos, a quinina, importante fármaco antimalárico, isolada das cascas *Cinchona*

*calisaya* Wedd. e das cascas do salgueiro (*Salix alba*) é extraída a salicina que serviu como modelo para sintetizar a aspirina (AZIZULLAH; TAIMUR; HÄDER, 2021).

O cafeeiro e todas as suas partes já são utilizados como planta medicinal em diversos países, como por exemplo no Brasil para influenza, no Haiti para anemia, edema, astenia e raiva, no México para tratar a febre, no Peru é usado como antitussígenos na gripe e doenças pulmonares, na Tailândia é indicado como cardiotônico e neurotônico para asma na Índia Ocidental (PATAY et al., 2016). O consumo de grãos de café pode ajudar na redução da pressão arterial, o que pode ser atribuído à presença de polifenóis e ácidos clorogênicos (LOADER et al., 2017), além de afetar positivamente a resposta psicoativa (como alerta e alterações de humor) e doenças metabólicas (como diabetes, colelitíase e cirrose hepática). Várias pesquisas sugerem que as mulheres que bebem café são menos propensas a desenvolver colelitíase sintomática (ALASMARI; ZEID; ALATTAR, 2020).

As folhas de café da espécie *Coffea arabica* têm sido amplamente negligenciadas e consideradas de pouco ou nenhuma serventia para os agricultores devido ao alto valor atribuído aos grãos de café (NGAMSUK; HUANG; HSU, 2019), porém essas folhas são uma fonte significativa de compostos polifenólicos que exibem muitos efeitos biológicos positivos (PATAY et al., 2016). Estudos comprovam que os compostos extraídos das folhas de *C. arabica* possuem propriedades antioxidantes (de ALMEIDA et al., 2019; MONTEIRO et al., 2019; de ABREU PINHEIRO et al., 2021), antidiabéticas (BOONPHANG et al., 2021) e antidislipidêmicas (ONTAWONG et al., 2019) principalmente pela presença de compostos polifenólicos, em especial o ácido 5-O-cafeoilquínico e a mangiferina, que são os mais abundantes (de ALMEIDA et al., 2019). Essas propriedades podem auxiliar na perda de peso, bem como reduzir a hiperinsulinemia (SHOKOUH et al., 2019).

Dessa forma, o presente trabalho se propõe a identificar e a quantificar os principais compostos bioativos das folhas de café arábica de diferentes cultivares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) e também avaliar a preservação desses biocompostos após diferentes técnicas de secagem das folhas. Adicionalmente, investigar a possível relação entre os compostos polifenólicos e os elementos inorgânicos como resposta à resistência do cafeeiro ao fungo *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem alaranjada. Por fim, estimar a bioacessibilidade dos metabólitos majoritários através da digestão *in vitro* e, também, analisar as propriedades antioxidantes, antiglicantes, os efeitos inibitórios sobre as enzimas digestivas:  $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática, bem como o efeito hipoglicemiante e o estresse oxidativo dos extratos aquosos em peixe-zebra adulto e realizar o estudo de docagem molecular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a concentração e a bioacessibilidade dos compostos bioativos de extratos das folhas de *C. arabica* de diferentes cultivares e seus efeitos quanto às atividades antioxidantes, antiglicantes, à inibição de enzimas digestivas, ao efeito hipoglicemiante e redução do estresse oxidativo, além de investigar a resistência da ferrugem do cafeeiro, a preservação dos biocompostos a partir de diferentes técnicas de secagem e o estudo *in silico*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos aquosos e metanólicos das folhas de *Coffea arabica*;
- Identificar e quantificar os compostos bioativos;
- Extrair e quantificar os elementos inorgânicos;
- Analisar a relação dos compostos polifenólicos e os elementos inorgânicos;
- Investigar o teor dos biocompostos após diferentes métodos de secagem;
- Determinar o teor de fenólicos totais e avaliar a atividade antioxidante;
- Avaliar a atividade inibitória das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática dos extratos aquosos e, também, dos compostos bioativos isolados;
- Investigar a atividade inibitória dos extratos no combate dos produtos finais de glicação avançada;
- Estimar a bioacessibilidade dos compostos bioativos a partir da digestão *in vitro*;
- Avaliar o efeito hipoglicemiante e o estresse oxidativo *in vivo*;
- Realizar estudo de docagem molecular.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Cafeeiro e metabólitos secundários

O cafeeiro (*Coffea* sp.), inicialmente descoberto no continente africano e, eventualmente, disseminadas por países de todo o mundo, é uma planta de porte arbustivo ou arbóreo, de caule lenhoso pertencente à família Rubiaceae e compreende os gêneros *Coffea* L. e *Psilanthus* Hook, embora este último esteja em processo de transferência para o gênero *Coffea* conforme as novas alterações na taxonomia do café (FERREIRA et al., 2019). Atualmente, estão catalogadas mais de 100 espécies dentro do gênero *Coffea* e apesar de muitas delas terem sido testadas para exploração comercial, apenas três apresentaram características favoráveis ao cultivo: *Coffea arabica* L., *Coffea canephora* Pierre e *Coffea liberica* Bull (ALVES et al., 2021).

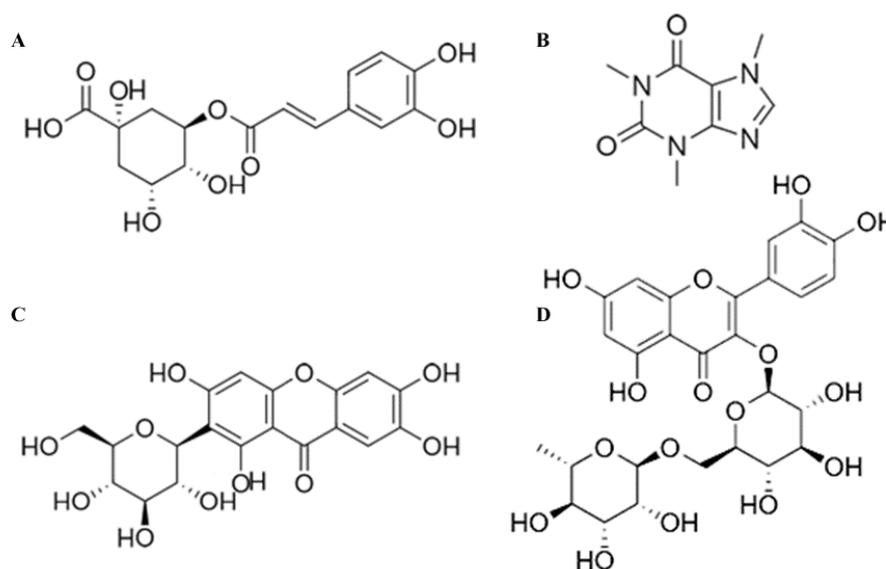
Das três espécies citadas, apenas as duas primeiras têm importância econômica em escala mundial, pois as plantações de *C. liberica* foram dizimadas por uma epidemia de traqueomicose, causada pelo fungo *Fusarium xylarioides*, entre as décadas de 1940 e 1950 (KASAHEN, 2019; FERREIRA et al., 2019). As demais espécies do gênero *Coffea* e *Psilanthus* compõem um magnífico acervo de genes e alelos úteis ao melhoramento genético das plantas cultivadas (GUYOT et al., 2020).

Embora a bebida obtida a partir dos grãos torrados seja a principal forma de consumo no mundo, as folhas de café também merecem atenção, pois, apesar de consideradas como resíduos florestais, são uma importante fonte de compostos bioativos com alto potencial farmacológico (ABALO, 2021; FERREIRA-SANTOS et al., 2020). Estudos anteriores, identificaram 16 metabólitos secundários, sendo seis pertencentes à classe dos ácidos clorogênicos (ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico), cafeína, mangiferina, isomangiferina e os flavonoides: rutina, quercetina-3-O-glicosídeo, rutina glicosídeo, quercetina-3-O-diglicosídeo, campferol-3-O-diglicosídeo ramnosídeo, quercetina-3-O-ramnogalactosídeo e campferol-3-O-ramnoglicosídeo. Desses 16, apenas quatro são majoritários, ácido clorogênico, cafeína, mangiferina e rutina (de ALMEIDA et al., 2019) cujas características serão apresentadas a seguir.

O ácido clorogênico (Figura 1A), também chamado de ácido 5-cafeoilquínico, é formado pelos ácidos cafeico e quínico e é obtido nas plantas pela via do ácido chiquímico

durante a respiração aeróbica (ALCÁZAR MAGAÑA et al., 2021). Essa substância apresenta propriedades antioxidantes (NAVEED et al., 2018), anti-inflamatórias (GIRSANG et al., 2021), hipoglicêmicas (YAN et al., 2020), hipolipidêmicas e, também, apresenta atividade na inibição de enzimas associadas ao metabolismo de glicose e lipídios (HE et al., 2021). Outros trabalhos demonstraram que essa substância inibiu a enzima  $\alpha$ -amilase apresentando efeito semelhante ao da acarbose e inibiu, também, a atividade da  $\alpha$ -glicosidase, embora com efeito muito mais fraco do que o fármaco citado (YAN et al., 2020). Também já foi relatado pela literatura que o ácido clorogênico reduziu significativamente os teores de colesterol, triglicerídeos, ácidos graxos livres, lipoproteínas de alta, baixa e muita baixa densidade e de lipídios no fígado e nos rins (SANTANA-GÁLVEZ; CISNEROS-ZEVALLOS; JACOBO-VELÁZQUEZ, 2017). Extratos de grão de café verde, contendo ácido clorogênico, reduziram a resistência à insulina de maneira dose-dependente em camundongos obesos (SELIEM et al., 2022).

Figura 1 - Principais compostos bioativos identificados nas folhas de café da espécie *C. arabica*.



As estruturas representam (A) ácido clorogênico, (B) cafeína, (C) mangiferina e (D) rutina.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina, Fig. 1B) é um alcaloide, provenientes de bases púricas conhecidas como xantinas, que possui uma variedade de efeitos biológicos potenciais incluindo redução da gordura corporal e o aumento da sensibilidade a insulina (ROSHAN et

al., 2018; SARRIÁ et al., 2018; FARIAS-PEREIRA; PARK; PARK, 2019). A ingestão diária de café (174,4 mg de ácido clorogênico e 175,2 mg de cafeína) reduziu os níveis de glicose pós-prandial nos indivíduos que metabolizaram a cafeína lentamente, mas aumentou os níveis de glicose pós-prandial naqueles que metabolizaram a cafeína rapidamente durante um estudo realizado por 12 semanas (ROBERTSON et al., 2018). Uma revisão sistemática de ensaios clínicos discutiu resultados inconsistentes de diferentes tipos de café no metabolismo da glicose e sugeriu que o ácido clorogênico e outros compostos além da cafeína contribuem positivamente na saúde humana (REIS; DÓREA; COSTA, 2019). Embora a cafeína tenha efeitos benéficos potenciais contra a DM2 sua ingestão deve ser moderada, devido ao aumento da pressão arterial (GROSSO et al., 2017).

A mangiferina (1,3,6,7-tetra-hidroxixantona-C2- $\beta$ -D-glicosídeo, Fig. 1C) é uma xantona C-glicosilada altamente resistente à hidrólise e é encontrada em uma ampla variedade de plantas distribuídas em todo o mundo, incluindo *Mangifera indica* Linn (BARRETO et al., 2008), *Coffea arabica* (CAMPA et al., 2012) entre outras. É um antioxidante promissor (RAO et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; ) que exerce múltiplos benefícios à saúde (SOUZA et al., 2009; SOUZA et al., 2013; SAMPAIO et al., 2015; IMRAN et al., 2017), como efeitos antivirais (ZENDRINI RECHENCHOSKI et al., 2018), anticancerígenos (MOROZKINA et al., 2021), antidiabéticos (SEKAR et al., 2018; BEZERRA et al., 2019), gastroprotetor (CARVALHO et al., 2007), cardioprotetor (JIANG et al., 2020), anti-inflamatórios (BULUGONDA et al., 2017), analgésicos (DU et al., 2018), ação antinociceptiva (LOPES et al., 2013) dentre outros. Seu mecanismo de ação é provavelmente atribuído as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que permitem a mangiferina neutralizar a resistência à insulina causada por ERO e a inflamação resultante do acúmulo excessivo de lipídios (FOMENKO; CHI, 2016). Em relação a inibição de enzimas digestivas, estudos mostraram que a mangiferina apresentou inibição da  $\alpha$ -glicosidase tão significativa quanto a acarbose (SHI et al., 2017; BEZERRA et al., 2019). Segundo LIU et al. (2013), moléculas que tem como base a estrutura das xantonas, como a mangiferina e o noratiriol por exemplo, são potentes inibidores da enzima  $\alpha$ -glicosidase.

A rutina (3,3',4',5,7-penta-hidroxiflavona-3-ramnoglicosídeo, Fig. 1D) é uma das substâncias da classe dos flavonoides glicosilados (flavonóis) mais abundantes de vegetais folhosos, possuindo uma ampla diversidade de efeitos nutracêutico e farmacológicos comprovados em estudos experimentais *in vitro*, *in vivo* e clínicos (DING et al., 2022; HUO et al., 2022; MENG et al., 2022; SACHETTO et al., 2022). Quimicamente, a rutina é composta pela porção fenólica básica ligada à molécula de açúcar, o que reduz sua atividade biológica,

mas torna a molécula mais hidrossolúvel (PATEL; PATEL, 2019). Por outro lado, essa porção glicosídica garante a resistência à hidrólise ácida do estômago que por sua vez, atinge o intestino delgado apresentando, portanto, efeito inibitório de enzimas digestivas (ALPHONSE; KOUBALA; NEGI, 2022). Além disso, a rutina é um antioxidante que atua na inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase com atividade semelhante a acarbose, sendo assim eficaz na redução da hiperglicemia pós-prandial (LIMANTO et al., 2019).

### 3.2 Secagem das amostras vegetais

A secagem de plantas medicinais consiste numa etapa muito importante no processamento da matéria prima tendo em vista a limitar a perda dos componentes bioativos contidos nas plantas. Essa fase consiste na remoção da água ou qualquer outro líquido de um material vegetal para a sua forma gasosa através de um algum mecanismo de vaporização térmica em temperatura inferior à de ebulição do líquido em questão. Alguns estudos, principalmente aqueles que utilizam plantas utilizadas na etnomedicina, preparam extratos de tecidos frescos, no entanto, as plantas secas são usadas com maior frequência devido a conservação o conteúdo fitoquímico, pois na ausência de água o crescimento microbiano é inibido e as atividades enzimáticas de degradação da amostra são cessados (MURZAINI et al., 2020; KRAKOWSKA-SIEPRAWKA et al., 2022).

No entanto, dependendo do tipo composto desejado, secagens em altas temperaturas podem degradar ou levar a perda do conteúdo de compostos voláteis como os óleos essenciais (THAMKAEW; SJÖHOLM; GALINDO, 2021). Se a amostra vegetal for fontes de compostos fenólicos, altas temperaturas (entre 100 e 180 °C) podem ser aplicadas (ROSHANAK; RAHIMMALEK; GOLI, 2016).

Dependendo do mecanismo de transferência de calor, a secagem pode ser classificada como convectiva, condutiva e radiativa (AQUINO; POESIO, 2021). Na primeira, o calor necessário é conduzido ao material vegetal por uma corrente de ar quente. A energia é transferida para a superfície da amostra por convecção e depois para seu interior, aumentando a temperatura do vegetal e, conseqüentemente, ocorrendo a evaporação da água (CASTRO; MAYORGA; MORENO, 2018). Na secagem por condução, a transmissão de energia é feita de uma molécula para outra indo sempre da molécula mais energéticas para a menos energéticas por contato direto. E, finalmente, na secagem por radiação a emissão de energia ocorre na forma de ondas eletromagnéticas entre duas superfícies e na ausência de um meio (KRAKOWSKA-SIEPRAWKA et al., 2022).

Na secagem por forno, a transferência de calor ocorre por convecção, onde o ar e as paredes do equipamento são aquecidos por uma fonte energética e, por sua vez, conduzem o calor ao material vegetal, com conseqüente evaporação da água. Esse processo não é tão demorado e a temperatura é controlada (KRAKOWSKA-SIEPRAWKA et al., 2022).

O micro-ondas é um aparelho doméstico com o objetivo de aquecer rapidamente os alimentos. Esse método permite a remoção rápida de água do material vegetal com contato limitado com o oxigênio. Essa secagem envolve a penetração de um campo eletromagnético de alta frequência (300 MHz – 30 GHz), em todo o volume da amostra, para o interior do material vegetal fazendo com que a água presente na amostra evapore em curto tempo (KRAKOWSKA-SIEPRAWKA et al., 2022).

Outro método é a secagem por Air Fryer, outro aparelho doméstico que tem como premissa fritar e secar os alimentos sem óleo a partir de uma corrente de ar quente. Esse equipamento dispõe de um ventilador de ar embutido que permite uma rápida circulação de ar, combinando altas taxas de convecção com a transferência de calor por radiação. O ar quente é distribuído de forma uniforme devido a sua câmara cilíndrica. Esse método é mais eficiente em termos do curto tempo de trabalho (MURZAINI et al., 2020).

A secagem natural é menos agressiva, do ponto de vista térmico, dentre os métodos testados, porém é o mais demorado levando vários dias até a secagem total (podendo levar até meses dependendo da parte da planta, como as sementes por exemplo). Outra desvantagem do método é que como as folhas são deixadas em um local sombreado e arejado à temperatura ambiente, pode ocorrer, durante a secagem, contaminação das amostras além da exposição a condições de temperatura instáveis (KRAKOWSKA-SIEPRAWKA et al., 2022).

A preparação correta do material vegetal é uma etapa tão importante quanto a seleção do método de extração, tendo em vista que a secagem do material tem como objetivo eliminar toda a água da superfície e interior da amostra mantendo suas características físicas e químicas por mais tempo. Essa etapa da análise é responsável por cessar as alterações químicas dos tecidos vegetais evitando possíveis degradações, bem como o desenvolvimento de fungos e bactérias, durante o seu armazenamento (KRAKOWSKA-SIEPRAWKA et al., 2022).

Cada método de secagem apresenta características próprias que podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais. Outros fatores também podem contribuir para essa alteração, tais como condições de coleta, estabilização e estocagem da amostra vegetal e, conseqüentemente, podem ter grande influência em seu valor terapêutico. Durante a secagem da matéria-prima, seus componentes podem sofrer alterações

químicas irreversíveis, como oxidação, hidrólise ou condensação de componentes, ou seja, a preparação adequada é crucial para obter uma alta eficiência de isolamento de compostos biologicamente ativos (RENARD; WATRELOT; LE BOURVELLEC, 2017).

### 3.3 Ferrugem do cafeeiro

O fungo chamado *Hemileia vastatrix* é um parasita específico das plantações de café que causa uma doença muito destrutiva conhecida como ferrugem do cafeeiro, provocando a queda precoce das folhas e seca dos ramos afetando a produção de frutos. Alguns cafeeiros apresentam uma resistência natural a esse fungo que está principalmente ligada a um gene e a resposta de resistência específica do hospedeiro (LU et al., 2022). Os primeiros sintomas da ferrugem do cafeeiro são pequenas manchas amarelo-pálidas, que aumentam gradativamente de tamanho. Durante uma infecção severa, as folhas ficam cobertas de pústulas, induzindo-as a cair prematuramente, o que reduz a área fotossintética da planta. Infecções repetidas debilitam a planta causando a morte dos ramos (SERA et al., 2022).

Os compostos polifenólicos não apenas contribuem para o sabor, cor, odor, adstringência, estabilidade oxidativa e amargura de diferentes partes da planta, mas também desempenham um papel crítico como defesa química da planta (SINGH; KAUR; KARIYAT, 2021). Por exemplo, as polifenoloxidasas são normalmente encontradas com teores elevados em tecidos infectados ou com algum tipo de dano, pois elas estão relacionadas com os mecanismos de defesa e/ou senescência das plantas (BLASCHEK; PESQUET, 2021). As polifenoloxidasas, que contêm o elemento cobre em suas estruturas, são um conjunto de metaloenzimas responsáveis pela hidroxilação de monofenóis em *o*-difenois e pela oxidação destes a *o*-diquinonas, sendo amplamente distribuídas em plantas superiores (BOECKX et al., 2017; BLASCHEK; PESQUET, 2021).

O ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico), presente nas folhas de café, é considerado o melhor composto polifenólico como substrato da polifenoloxidase (CLIFFORD; KERIMI; WILLIAMSON, 2020). Os níveis desse composto são maiores em extratos de folhas do que em grãos de café da espécie *Coffea arabica* (de ALMEIDA et al., 2018). Atualmente, as funções mais prováveis das polifenoloxidasas são seus envolvimento na resistência das plantas a doenças (RAHAMAN; ZWART; THOMPSON, 2020; KAUR et al., 2020), como por exemplo sua taxa elevada devido à resistência do cafeeiro ao nematoide *Meloidogyne incógnita* (RUDNICK et al., 2020).

Um aumento na produção de compostos polifenólicos pode estar relacionado à resistência a doenças fúngicas, sendo os níveis e os tipos dessas substâncias uma resposta fisiológica precoce à infecção por ferrugem (de OLIVEIRA FASSIO et al., 2016). TONIUTTI et al. (2017) observou em seus estudos um aumento no teor de mangiferina e ácido clorogênico numa cultivar suscetível durante a inoculação, porém essa planta, submetida em alta intensidade luminosa e baixa adubação nitrogenada (ou seja, estado de estresse), foi altamente impactada pela ferrugem. Embora esse resultado fosse esperado, podemos concluir que, de fato, ocorre um aumento na concentração de compostos fenólicos durante o ataque da *H. vastatrix*.

Pode haver também uma forte correlação entre vários fatores que tornam as plantas de *Coffea arabica* suscetíveis à infecção por ferrugem. Por exemplo, a concentração de metais (cofatores essenciais na função de enzimas importantes na desativação de ERO), enzimas oxidativas (como as peroxidases, lipoxigenase e superóxido dismutase), e, também, na concentração dos principais compostos polifenólicos (GHUFRON ROSYADY et al., 2020; SILVA et al., 2022).

Finalmente, alguns autores relataram uma relação entre os minerais, como alumínio, cobre, magnésio, manganês, níquel, estanho e zinco, e os metabólitos secundários, como uma interação associada ao mecanismo de defesa das plantas a condições de estresse ocasionados tanto por fatores bióticos, quanto abióticos (MUSZYŃSKA; LABUDDA, 2019). A avaliação destes elementos inorgânicos pode ser usada como critério para estudos genéticos e de melhoramento do metabolismo secundário, especialmente no que diz respeito às condições de estresse ocasionados por microorganismos, como por exemplo a *H. vastatrix* (CETINKAYA; KOC; KULAK, 2016; FARZADFAR; ZARINKAMAR; HOJATI, 2017; WULANJARI et al., 2020).

### **3.4 Quimiometria**

A quimiometria é uma ciência que pode ser compreendida como uma ferramenta da Química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados, de forma a extrair maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos. A aplicação de métodos quimiométricos surgiu da necessidade da interpretação quantitativa de dados que antes seriam impossíveis de serem analisados em meio a avalanche de resultados produzidos por equipamentos sofisticados, como as análises realizadas na região do infravermelho próximo (FERREIRA, 2015).

O planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e a calibração multivariada são as principais subáreas dentro da quimiometria (BIANCOLILLO et al., 2020). Dentro dessa divisão, a principal linha de pesquisa aplicada à Química Analítica tem sido a construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem, ou seja, dados que podem ser representados através de um vetor para cada amostra, sendo a construção desses modelos denominada de calibração multivariada (MONTEIRO; FEITAL; PINTO, 2021).

Devido a todas essas características, a quimiometria tem demonstrado muitas aplicações na determinação quantitativa e qualitativa de parâmetros químicos para avaliar inúmeros produtos alimentícios (BAJOUB et al., 2018; MILANI et al., 2020). Para esse fim, existem uma diversidade de ferramentas inseridas nas subáreas mencionadas e sua escolha vai depender das características dos conjuntos de dados em análise e do objetivo do experimento. Estas técnicas são responsáveis por identificar as semelhanças e diferenças entre as amostras, a partir do grau de similaridade entre suas propriedades físicas e químicas, comparando-as entre si. As técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrões, promovem agrupamentos dos objetos, possibilitando, inclusive, a identificação de amostras anômalas (ZHANG; TANG; LI, 2018). Essas técnicas podem ser classificadas como não supervisionadas, por exemplo a Análise por Componentes Principais (PCA, do inglês: *Principal Component Analysis*) e as supervisionadas, como a Análise Discriminante pelos Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares - Discriminant Analysis*).

A PCA consiste no principal método de reconhecimento de padrões não supervisionado e esta ferramenta tem como objetivo reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados, de modo a preservar as informações analíticas importantes contidas nos dados originais e facilitar a sua interpretação (GUNASEKARAN; KASIRAJAN, 2017; NOBRE; NEVES 2019).

Para isso, a mesma baseia-se na transformação das variáveis originais possivelmente correlacionadas em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, conhecidas como Componentes Principais (PCs). Essas por sua vez, são ordenadas de forma que a variância presente nas variáveis originais diminui à medida que a ordem da componente principal diminui. Dessa forma, isso significa que a PC1 possui a maior parte da variabilidade, e, portanto, da informação, dos dados originais, e assim sucessivamente (NOBRE; NEVES 2019).

Um modelo PCA pode ser entendido como sendo resultado da combinação linear das variáveis de uma matriz multivariada de dados  $X_{n \times m}$ , seja esta original ou pré-processada,

onde os  $n$  objetos (amostras) encontram-se nas linhas e as  $m$  variáveis nas colunas (BRO; SMILDE, 2014). A matriz  $X$  é decomposta em dois subespaços o de *scores* e o de *loadings*, permitindo a escolha de duas ou três componentes principais, para a obtenção de gráficos bidimensionais ou tridimensionais, para uma melhor avaliação dos conjuntos de dados. O gráfico dos scores ilustra as coordenadas das amostras dadas pelas PCs, possibilitando a identificação de grupos de amostras com comportamento semelhante ou diferenciação das mesmas, enquanto nos gráficos de *loadings*, visualiza-se quais as variáveis são responsáveis pelo agrupamento detectado nas amostras a partir do gráfico de scores (ALESSIO; CANNISTRACI, 2016).

A PLS-DA é um método de reconhecimento de padrões supervisionado para construção de modelos preditivos que buscam relacionar as respostas instrumentais ( $X$ ) com as propriedades de interesse, ou variáveis de resposta ( $y$ ), utilizando os rótulos das classes como um vetor dependente  $y$  (PONTES et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013).

Devido à grande multiplicidade e correlação das variáveis, existe um risco substancial de sobreajuste, isto é, a inclusão de excesso de informação no modelo. Nesse sentido, deve-se aplicar um teste para verificar a significância de cada variável latente. O método de validação cruzada é empregado para indicar o número de variáveis latentes a ser escolhido. Baseia-se em um procedimento de reamostragem (PEREIRA, 2013) e aponta o modelo de menor erro de classificação de validação cruzada (Cross-Validation Classification Error) (PEREIRA et al., 2010; MOBARAKI; HEMMATEENEJAD, 2011), em que não se incluem variáveis latentes não significativas (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001).

### **3.5 Estresse oxidativo**

O desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes, a favor da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou em detrimento da velocidade de remoção das mesmas é chamado de estresse oxidativo (EO). Essa perturbação no equilíbrio oxidativo, de caráter transitório ou permanente, gera consequências fisiológicas dentro das células, dependendo do alvo específico e das concentrações de EROs (MERAHBANI et al., 2020).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) são moléculas, átomos ou íons cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, o que os torna extremamente reativos e instáveis, atuando como receptores ou doadores em reações redox com moléculas vizinhas. Quando produzidas na célula durante o metabolismo celular normal podem reagir quimicamente com biomoléculas celulares, como

ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, causando modificações oxidativas, que levam a alterações em suas composições e possíveis danos as atividades celulares. A autooxidação da glicose, por exemplo, gera os radicais hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ) e o aumento do metabolismo da glicose resulta na produção dos radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (BIGAGLI; LODOVICI, 2019; NANDI et al., 2019).

A produção excessiva de EROs e ERNs seja por fatores endógenos, como deficiência nos sistemas antioxidantes, ou por fatores exógenos, como radiação solar, radiação eletromagnética, luz artificial, tabagismo, poluição, agrotóxicos e má alimentação, instala-se o EO (BELENGUER-VAREA, 2019). No entanto, é importante ressaltar que a homeostase entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, juntamente com os sistemas antioxidantes do organismo são fundamentais em diversas reações no metabólicas, como no sistema imunológico e em células epiteliais e endoteliais onde atuam como mensageiros intracelulares (NANDI et al., 2019; MEHRABANI et al., 2020).

ERO é um termo amplo que contempla espécies radicalares, como a hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e a peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ) e as não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) e o oxigênio singlete (MEHRABANI et al., 2020). O radical  $\text{HO}\cdot$  é considerado o mais nocivo de todos pois, além de ser extremamente reativo e instável, causa danos ao DNA, proteínas e, também lipoperoxidação lipídica e o organismo humano não apresenta antioxidantes endógenos capaz de neutralizá-lo (MARTEMUCCI et al., 2022).

Quanto as ERN podemos destacar o radical óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) que atua em diferentes reações metabólicas como neurotransmissor, vasodilatador na regulação da pressão arterial e participa do sistema imunológico (ABRAHAMS et al., 2019). No entanto, em excesso, reage com o ânion superóxido, formando peroxinitritos que são potentes iniciadores da reação de lipoperoxidação em membranas celulares (MARTEMUCCI et al., 2022).

Diferentes estudos apontam que o estresse oxidativo está envolvido em vários distúrbios metabólicos e neurológicos degenerativos (TABASSUM; JEONG e JUNG, 2020). Doenças degenerativas, em que a função e a estrutura de um tecido ou órgãos se deterioram com o tempo, como na doença de Alzheimer, doença de Parkinson, diabetes, catarata, câncer e doença cardiovascular, foram atribuídas a condições de estresse oxidativo e ao processo de envelhecimento natural. Assim, o estresse oxidativo, o envelhecimento e as doenças degenerativas estão interligados (RANI et al., 2016; TAN; NORHAIZAN e LIEW, 2018; KOPP, 2019; MENDONÇA et al., 2020).

O combate contra o EO é feito com os antioxidantes que podem ser endógenos,

produzidos pelo próprio organismo, ou exógenos (SHARIFI-RAD et al., 2020). No primeiro caso, temos como exemplo as enzimas ascorbato peroxidase, catalase, glutathione redutase, peroxidase e superóxido dismutase (SARKER; OBA, 2018; SHARIFI-RAD et al., 2020). Os antioxidantes exógenos, de origem sintética ou natural, são obtidos a partir da alimentação e/ou suplementação. Os sintéticos são amplamente utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, como por exemplo o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propila (PG) e a terc-butilidroquinona (TBHQ). Entretanto, muitos estudos associam o uso desses antioxidantes a efeitos carcinogênicos e tóxicos para o fígado e pâncreas (XU et al., 2021). Já os antioxidantes naturais podem ser categorizados em vitaminas (C e E), polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas) e grupos terpenoides (ABEYRATHNE et al., 2022). O ácido *p*-cumárico, por exemplo, apresenta potente atividade antioxidante além de efeito hepatoprotetor capaz de inibir a geração de ERO em meio intracelular (SHEN et al., 2019). Os compostos fenólicos são conhecidos pela capacidade de reduzir a formação, bem como, eliminar os radicais livres (GONÇALVES et al., 2022) e, também, atuarem como agentes antidiabéticos (TATIPAMULA; KUKAVICA, 2021).

### 3.6 Diabetes

O termo diabetes corresponde a um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados pelo elevado nível de glicose no sangue (hiperglicemia) e insuficiência na produção ou ação da insulina produzida pelo pâncreas. Indivíduos com diabetes sofrem, também, um risco acrescido de outras enfermidades, incluindo doenças cardíacas, arteriais periféricas e cerebrovasculares, obesidade, cataratas, disfunção erétil e doença hepática gordurosa não alcoólica. Estão também em risco acrescido de algumas doenças infecciosas, tais como a tuberculose (WHO, 2019). Além disso, o risco de internação por COVID-19 é cerca de 3,6 vezes maior, em comparação com aqueles indivíduos sem diabetes (IDF, 2021). A prevalência de diabetes está aumentando rapidamente em todo o mundo e de acordo com a *IDF Diabetes Atlas* (2021) estima-se que, aproximadamente, 6,7 milhões de adultos (entre 20 e 79 anos) morreram como resultado de diabetes ou suas complicações em 2021.

De acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2019-2020), a diabetes, resumidamente, é classificada como tipo 1 (dependente de insulina) que é definida como uma doença autoimune, poligênica, decorrente de destruição das células  $\beta$  pancreáticas, ocasionando deficiência completa. A tipo 2 (não dependente de insulina) é causada pela diminuição da sensibilidade dos tecidos a insulina, que também é denominada de resistência à

insulina. Esta última, corresponde de 90 a 95% de todos os casos de diabetes, sendo a sua etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genético e, também, ambiental.

A hiperglicemia induz a formação de radicais livres que contribui para as complicações desta doença. Além disso, o baixo controle glicêmico pode levar ao aumento do estresse oxidativo (EO), da inflamação, bem como, à diminuição da atividade antioxidante. O EO é definido como o excesso de formação de radicais livres ou a remoção insuficiente dessas espécies. Os radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). A autooxidação da glicose, por exemplo, gera os radicais hidroxil ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) e o aumento do metabolismo da glicose resulta na produção dos radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (BIGAGLI; LODOVICI, 2019).

O combate contra o EO é feito com os antioxidantes que podem ser endógenos, produzidos pelo próprio organismo, ou exógenos (SHARIFI-RAD et al., 2020). No primeiro caso, temos como exemplo as enzimas ascorbato peroxidase, catalase, glutathione redutase, peroxidase e superóxido dismutase (SARKER; OBA, 2018; SHARIFI-RAD et al., 2020). Os antioxidantes exógenos, de origem sintética ou natural, são obtidos a partir da alimentação e/ou suplementação. Os sintéticos são amplamente utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, como por exemplo o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propila (PG) e a terc-butilidroquinona (TBHQ). Entretanto, muitos estudos associam o uso desses antioxidantes a efeitos carcinogênicos e tóxicos para o fígado e pâncreas (XU et al., 2021). Já os antioxidantes naturais podem ser categorizados em vitaminas (C e E), polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas) e grupos terpenóides (ABEYRATHNE et al., 2022). O ácido *p*-cumárico, por exemplo, apresenta potente atividade antioxidante além de efeito hepatoprotetor capaz de inibir a geração de ERO em meio intracelular (SHEN et al., 2019). Os compostos fenólicos são conhecidos pela capacidade de reduzir a formação, bem como, eliminar os radicais livres (GONÇALVES et al., 2022) e, também, atuarem como agentes antidiabéticos (TATIPAMULA; KUKAVICA, 2021).

Diversos fármacos são utilizados para o tratamento da DM2, sendo alguns desses obtidos a partir de plantas ou de microorganismos. A metformina, por exemplo, é um derivado sintético da galegina que é isolada da *Galega officinalis* L. (Fabaceae) (RENA; HARDIE; PEARSON, 2017) e os fármacos acarbose, miglitol e voglibose são obtidos a partir de bactérias (KUMAR, Y.; GOYAL, R. K.; THAKUR, 2018). O estudo de plantas medicinais torna-se interessante devido suas propriedades farmacológicas que podem auxiliar no controle e tratamento da diabetes bem como no combate ao estresse oxidativo.

### 3.7 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica, complexa, de caráter multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal. É uma condição emergente e tem importante participação no desenvolvimento de várias outras doenças como DM2, dislipidemia, hipertensão, câncer dentre outras. A obesidade visceral é um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina, isto é, a redução da sensibilidade à ação da insulina e, conseqüentemente, o desenvolvimento da DM2 (GUNTURIZ; FORERO; CHAPARRO, 2018; CAMARGO ET AL., 2021; LIN, X.; LI, 2021).

A ingestão de uma dieta hipercalórica resulta num estado pós-prandial de elevados níveis de glicose, triglicérides e ácidos graxos livres na circulação sanguínea, gerando um estado de EO (WAGMACKER et al., 2020). O aumento nos níveis de glicose e ácidos graxos livres nos tecidos e na circulação também relaciona a obesidade à produção aumentada de ERO. Ácidos graxos livres são conhecidos como ativadores da produção de superóxido dependente de NADPH oxidases em várias células, inclusive as fagocíticas (ZHOU; LI; XIA, 2021). Quando o estresse oxidativo é induzido por elevadas concentrações de glicose e ácidos graxos livres, característicos da obesidade, acarreta no desenvolvimento da resistência à insulina e na disfunção das células  $\beta$  pancreáticas (EGUCHI et al., 2021).

Assim como nos casos de diabetes, a pandemia da COVID-19 apresenta um grande risco também para pessoas com obesidade. Dos 383 pacientes hospitalizados com coronavírus entre janeiro e fevereiro de 2020 e acompanhados até de março do mesmo ano foi identificado o risco de 1,84 e 3,40 vezes maior de desenvolvimento da COVID-19 grave em pacientes com sobrepeso e obesos, respectivamente, quando comparados aos pacientes com peso normal (CAI et al., 2020). Em suma, a obesidade é uma patologia que provoca prejuízo ao sistema imune e amplifica as respostas inflamatórias. Além disso, os adipócitos podem servir como reservatório viral (RYAN; CAPLICE, 2020).

O tratamento farmacológico com a sibutramina e orlistat, medicamentos aprovados no tratamento contra obesidade, são eficazes contra a perda de peso, desde que associados a uma mudança no estilo de vida (ANAGNOSTIS ET AL., 2012; MARCON; SANCHES; VIRTUOSO, 2022). Tendo em vista os efeitos adversos que a sibutramina pode oferecer ao paciente, esse medicamento é contraindicado para pacientes que possuem doenças cardiovasculares devido ao risco, significativamente, aumentado de infarto do miocárdio não fatal e acidente vascular cerebral (SHAH et al., 2022). Em relação ao Orlistat, os principais efeitos colaterais incluem diarreia, diminuição da absorção de vitaminas lipossolúveis, dores

abdominais, flatulência, incontinência (NICOLAI; LUPIANI; WOLF, 2018).

Compostos fenólicos presente em cascas, sementes, bagaços e outros subprodutos da agroindústria têm diferentes efeitos sobre a obesidade, inibindo as enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídios ou glicose e modulando biomarcadores, genes e microbiota intestinal em modelos animais (ZUÑIGA-MARTÍNEZ et al., 2022). Encontrar medidas alternativas, acessíveis, de baixo custo e, principalmente, eficazes a fim de auxiliar no processo de perda de peso é, portanto, de extrema relevância. Nesse contexto, os produtos naturais através da utilização de chás, aliado à realização de atividades físicas e reeducação alimentar, podem ser aliados importantes no processo de emagrecimento.

### **3.8 Compostos fenólicos e a capacidade antioxidante**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal e desempenham um papel muito importante no crescimento, na reprodução e na defesa das plantas. Apresentam uma correlação direta com a atividade antioxidante, de modo que quanto maior a concentração desses compostos, maior a capacidade na captura de radicais livres (GRANATO et al, 2018; COSME et al., 2020). Por esta razão são responsáveis por exercer importantes efeitos farmacológicos e seu consumo está relacionado a vários efeitos benéficos em questões relacionadas à saúde (COSME et al., 2020).

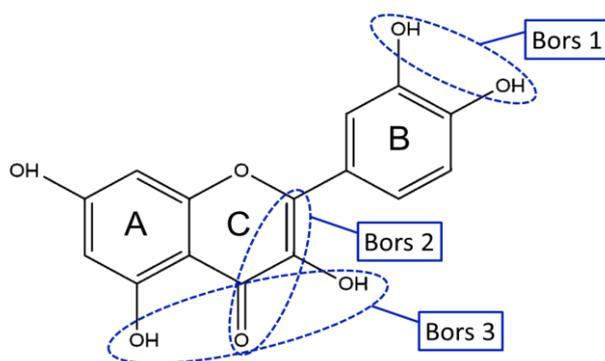
Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio formando, respectivamente, ERO e ERN são produzidos a partir da oxidação do metabolismo celular. Essas espécies estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, imunidade e defesa das células e síntese de substâncias biológicas, entretanto, a produção excessiva destes radicais pode culminar em processo de morte celular por necrose ou apoptose, por meio da interação com lipídeos, proteínas e com o ácido desoxirribonucleico (DNA).

O estado pró-oxidante está relacionado com diversas doenças, incluindo diabetes, obesidade, aterosclerose, diabetes, mal de Alzheimer e Parkinson, carcinogênese e progressão do câncer (MARTEMUCCI et al., 2022). Além dos fatores de risco clássicos dessas enfermidades, diversos biomarcadores têm sido relacionados ao EO, entre eles estão os biomarcadores de ativação imuno-inflamatória específica, com C-proteína reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) sendo os mais comumente avaliados (ALEKSANDROVA; KOELMAN; RODRIGUES, 2021).

A peroxidação lipídica tem sido comumente usada como um indicador de dano mediado por ação de EROS às membranas celulares (KATERJI; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2019). Estudos anteriores, concluíram que a peroxidação lipídica está relacionada com altos níveis de glicose sanguínea em jejum e com o aumento na glicação da hemoglobina, além disso, pode ser atribuída também à redução do consumo de nutrientes antioxidantes, redução da atividade das enzimas antioxidantes e baixas concentrações plasmáticas e eritrocitárias de minerais, como o zinco e selênio (de SOUZA BASTOS et al., 2016; SHENENI VD, ODIBA VA, IDIH, 2018; ITO; SONO; ITO, 2019).

Os compostos fenólicos estão entre os antioxidantes naturais mais importantes e podem ser classificados em diferentes subgrupos com base em suas propriedades estruturais. Além dos compostos de baixo peso molecular, como os ácidos fenólicos, existem vários representantes mais complexos, incluindo o grupo dos flavonoides (PLATZER et al., 2021). A força do efeito antioxidante desses compostos tem sido descrita em inúmeras publicações (KIOKIAS; OREOPOULOU, 2021) e essa característica depende de suas propriedades estruturais, como os critérios descritos por BORS et al. (1990) conforme pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Relação entre estrutura e atividade antioxidante de compostos fenólicos com base nos critérios de Bors.



Fonte: Adaptado de PLATZER (2021).

O primeiro critério (Bors 1) é a presença de um grupo catecol no anel B que aumenta a estabilidade do radical antioxidante. O segundo (Bors 2) é a presença de uma ligação dupla em C-2 e C-3 combinada com uma carbonila em C-4 no anel C, o que facilita a deslocalização de elétrons. E o terceiro critério é a presença de grupos hidroxilas nas posições C-3 e C-5 que em combinação com o grupo 4-oxo permite a deslocalização de elétrons por

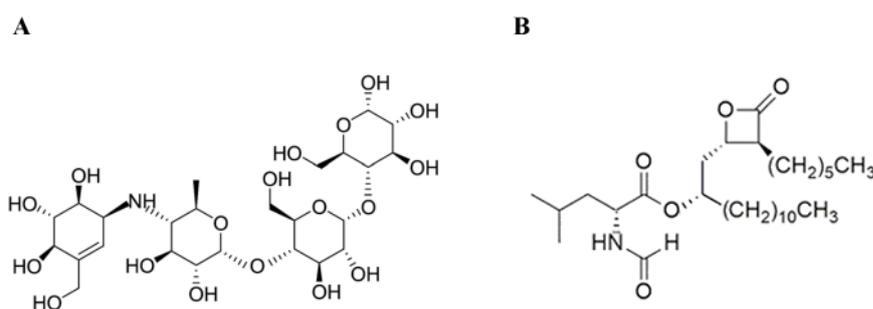
meio de ligações de hidrogênio (PLATZER et al., 2021). Esses critérios foram propostos por BORS et al. (1990) para explicar o efeito antioxidante dos compostos fenólicos.

### 3.9 Enzimas digestivas: $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática

A  $\alpha$ -glicosidase, considerada a enzima mais importante da digestão, se encontra ligada à borda da membrana intestinal e é responsável pela hidrólise de polissacarídeos, oligossacarídeos e dissacarídeos em glicose e outros monossacarídeos, sendo posteriormente absorvida pelo intestino delgado (ABBAS; AL-HARRASI; HUSSAIN, 2017). O metabolismo dos carboidratos apresenta estreita relação com doenças, como a DM2. A inibição desta enzima é uma estratégia interessante para controlar o nível de glicose no sangue pós-prandial (FENG et al., 2022).

O primeiro inibidor de  $\alpha$ -glicosidase, aprovado na Europa e nos Estados Unidos para o tratamento da DM2, foi a acarbose (Figura 3A). Essa molécula é um pseudo-oligossacarídeo produzido, naturalmente, pela bactéria *Actinoplanes* sp. e é clinicamente usada para reduzir os níveis de açúcar pós-prandial, visto que apresenta atividade inibidora sobre dissacaridases intestinais ou, simplesmente, glicosidases (TSUNODA et al., 2022).

Figura 3 - Estruturas das moléculas (A) acarbose e (B) orlistat.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As glicosidases são divididas em duas classes:  $\alpha$  e  $\beta$ . As  $\alpha$ -glicosidases hidrolisam a ligação  $\alpha$ -glicosídica dos dissacarídeos conectados por ligações do tipo  $\alpha$ . As principais representantes desta classe são as enzimas amilases, sacarase e maltase, sendo as duas últimas as mais estudadas como possíveis alvos terapêuticos da diabetes, por hidrolisar, respectivamente, a maltose, liberando duas unidades de glicose, e a sacarose, liberando

frutose e glicose (NAVARRO; ABELILLA; STEIN, 2019; GARCIA-GONZALEZ et al., 2020). Quanto às  $\beta$ -glicosidases, a principal representante é a  $\beta$ -galactosidase (ou lactase) que hidrolisa a ligação  $\beta$  da lactose, liberando unidades de glicose e galactose (ZHANG et al., 2018). A acarbose atua como um adjuvante no tratamento da diabetes, pois ele inibe as enzimas maltase e sacarase impedindo, assim, a quebra dos dissacarídeos e, conseqüente, transporte da glicose para a circulação sanguínea (PYNER; NYAMBE-SILAVWE; WILLIAMSON, 2017). Restringir as ações apenas das  $\alpha$ -glicosidases apresenta-se como uma terapia de interesse, pois não induz uma intolerância à lactose no paciente, por não inibir a lactase (NIVETHA; MOHANASRINIVASAN, 2017; NAVARRO; ABELILLA; STEIN, 2019).

Metabólitos secundários, como flavonoides agliconas e glicosilados, ácidos fenólicos e proantocianidinas, atuam como inibidores das enzimas  $\alpha$ -glicosidases (DI STEFANO; OLIVIERO; UDENIGWE, 2018; JUSTINO et al., 2018). O cafeeiro é uma fonte potencial de compostos polifenólicos que podem reduzir os níveis de glicose no sangue pós-prandial, atuando como substitutos práticos para inibidores farmacológicos de  $\alpha$ -glicosidases para controle glicêmico (TESSEMA et al., 2022).

A mangiferina apresenta atividade inibitória da enzima  $\alpha$ -glicosidase tanto por abordagem *in silico*, quanto *in vitro* (BEZERRA et al., 2019; SEKAR et al. 2018). Moléculas agliconas formadas pela hidrólise da rutina e ácido clorogênico também podem suprimir fortemente a atividade da  $\alpha$ -glicosidase (BLJAJIĆ et al., 2021).

As lipases pancreáticas são enzimas que atuam no intestino delgado digerindo lipídios da dieta, como os triacilgliceróis, produzindo monoacilgliceróis e ácidos graxos para serem absorvidos pelos enterócitos. Sendo, portanto, uma enzima fundamental para a digestão e absorção de gorduras alimentares. Após a absorção, os ácidos graxos penetram nas células onde são reesterificados em triacilgliceróis, armazenando-se, principalmente, nos tecidos adiposos (KO et al., 2020). No entanto, complicações decorrentes do metabolismo lipídico, como as dislipidemias, podem ocasionar doenças cardiovasculares, DM2 e outros distúrbios que caracterizam a síndrome metabólica (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Inibidores de lipase têm atraído muita atenção para reduzir a absorção de lipídios por suas atividades antiobesidade e proteger o pâncreas permitindo que as células  $\beta$  pancreáticas produzam níveis normais de insulina (LIU et al., 2020).

O orlistat (Fig. 3B), também conhecido como tetra-hidroliptatina, é um inibidor potente, específico e irreversível das lipases pancreáticas, sendo um derivado quimicamente sintetizado da lipstatina, cuja produção ocorre naturalmente pela bactéria *Streptomyces*

*toxytricini*. Seu mecanismo de ação impede a hidrólise da gordura dietética (na forma de triglicerídeos) em ácidos graxos livres absorvíveis e monogliceróis. A inibição da lipase induzida pelo orlistat diminui a absorção sistêmica da gordura dietética, contribuindo assim para o déficit calórico (LIU et al., 2020). Embora seja um agente farmacológico clinicamente seguro e aprovado como inibidor de lipase pancreática, a aplicação desta droga sintética está associada a uma variedade de indesejáveis efeitos colaterais, tais como cólicas abdominais, flatulência, urgência para evacuar (MARTÍNEZ INSFRAN, L. A., ALCONCHEL GAGO, F., & PARRILLA PARICIO, 2019).

Uma variedade de compostos bioativos naturais, presentes em plantas, apresenta propriedades antiobesidade. Foi demonstrado, por estudos *in vitro*, que muitos extratos ricos em polifenóis são inibidores eficazes da lipase pancreática (PATEL; KUMAR, 2020) e, também, apresentaram atividade antiobesidade *in vivo* (KIM et al, 2020).

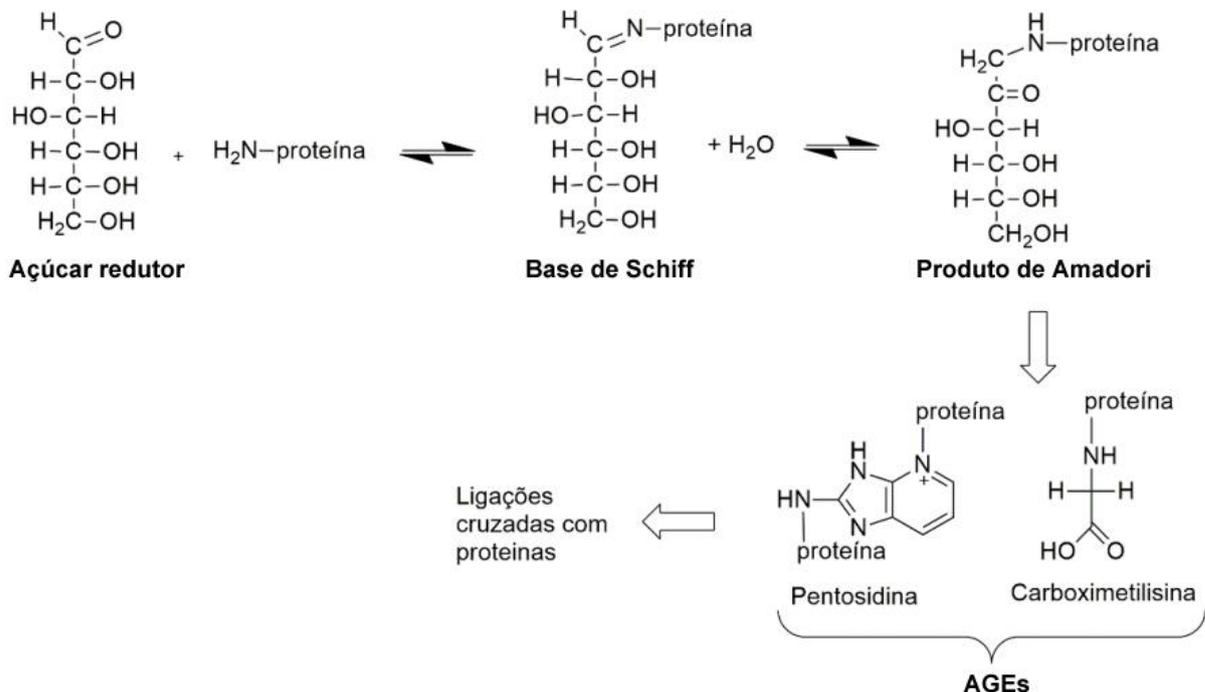
O café é considerado uma das fontes mais ricas de polifenóis na dieta ocidental e tem as propriedades farmacológicas na prevenção de doença hiperlipidêmica, DM2, doenças hepáticas e obesidade (SALVOZA et al., 2022). Em estudos anteriores, foi demonstrado atividade de inibição da lipase pancreática com ácidos clorogênicos isolado *in silico* (SINGH et al., 2021) e combinado em extratos com rutina e outros fenólicos *in vivo* (RAHMAN et al., 2017). Quanto à cafeína, de origem natural e sintética, seus efeitos, *in vivo*, promoveram redução do acúmulo de gordura corporal em animais alimentados com uma dieta rica em gordura e sacarose, estando de acordo com os resultados das análises *in silico* e *in vitro* (ZAPATAA et al., 2020). Extratos de folhas de manga (*Mangifera indica* e *Mangifera foetida*), ricos em mangiferina, se mostraram eficazes na inibição de lipase pancreática, embora extratos brutos sejam ricos em diversos compostos e ação esperada pode estar relacionada a efeitos sinérgicos dos mesmos (ITOH et al., 2016; AJI; HUDAYA; PUTRI, 2021).

### **3.10 Produtos finais de glicação avançada**

A glicação de proteínas é uma reação não enzimática que se dá no meio biológico ou em alimentos e foi descrita pela primeira vez em 1912, pelo bioquímico francês Louis-Camille Maillard em seus estudos sobre o mecanismo de escurecimento dos alimentos aquecidos. Neste processo, conhecido como reação de Maillard, são formados os produtos finais de glicação avançada (AGEs), compostos altamente lesivo à saúde, cuja reação ocorre entre açúcares redutores e proteínas (ou aminoácidos), lipídios ou ácidos nucleicos (PRASAD et al., 2017).

O mecanismo da reação de glicação foi estudado pelo italiano Mario Amadori em 1920. Inicialmente, ocorre uma reação de condensação cujos grupamentos carbonílicos de açúcares redutores ou compostos carbonilados sofrem um ataque nucleofílico do par de elétrons não-ligante de grupos amino, de origem proteica (e/ou resíduos de aminoácidos), produzindo uma carbinolamina intermediária que após sofrer desidratação, origina um composto instável chamado de bases de Schiff. Posteriormente, a Base de Schiff sofre rearranjos moleculares que levam a formação de uma cetoamina, um produto mais estável, denominado de produto de Amadori. Dependendo do pH reacional, a base de Schiff e o produto de Amadori podem entrar em equilíbrio tautomérico, formando enamina e cetoamina, ou podem reagir com outros resíduos de aminoácidos e proteínas por meio de crosslinking (ligações cruzadas) irreversíveis. O resultado da glicação é uma classe de compostos modificados denominados de AGEs como por exemplo a pentosidina e a carboximetilisina, conforme pode ser observado na Figura 4 (FOURNET; BONTÉ; DESMOULIÈRE; 2018; MARQUES et al., 2018; NAKANO et al., 2020).

Figura 4 - Representação esquemática da reação de Maillard.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além da glicação não enzimática na formação de AGEs, existe outra via de formação, conhecida como via do estresse carbonílico, cujo processo de lipoperoxidação de lipídeos gera compostos dicarbonílicos intermediários, como o glioxal, que ao se ligarem a proteínas dão origem aos produtos de glicoxidação ou lipoxidação avançada, chamados de ALEs (do inglês, *advanced lipoxidation end products*) (MOLDOGAZIEVA et al., 2019).

Os AGEs apresentam capacidade de modificar tanto as propriedades químicas, quanto funcionais de várias estruturas biológicas devido à geração de ERO, formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares (THOMA et al., 2020). O receptor RAGE (acrônimo em inglês para *Receptor for Advanced Glycation End-products*) pertence à superfamília das imonuglobulinas (proteínas ligadas a membrana celular) e são responsáveis pela ativação do fator nuclear- $\kappa$ -B que é responsável pela resposta inflamatória. A interação AGE-RAGE, juntamente com o estresse oxidativo, estão associadas a diversas disfunções fisiológicas como aterosclerose, osteoporose, asma, artrite, sarcopenia, doença de Alzheimer, câncer e complicações diabéticas (TWARDA-CLAPA et al., 2022).

Os compostos fenólicos têm sido relatados como substâncias benéficas para a saúde humana devido as suas características, como por exemplo as conhecidas propriedades antioxidantes e, também, as funções antiglicante (SPAGNUOLO et al., 2021). Uma revisão publicada recentemente relata os efeitos inibitórios de polifenóis e extratos de plantas na formação de AGEs (KHAN et al., 2019).

A interação entre os ácidos clorogênicos e seus derivados (isômeros e quinonas) com cadeias laterais de resíduos de aminoácidos reduz, significativamente, a formação de AGEs, possuindo, portanto, ação antiglicante e, também, promovendo a geração de estruturas antioxidantes (FERNANDEZ-GOMEZ et al., 2018). De maneira geral, a ação antiglicante pode ser entendida como compostos que atuam como competidores nucleofílico limitando a primeira etapa da reação de glicação, ou seja, a ligação dos grupamentos carbonílicos dos açúcares redutores aos grupos amina de aminoácidos e proteínas (DIL et al., 2019; EXYMOL 2020) Em muitos casos, a inibição dos produtos finais de glicação avançada promovida pelos ácidos clorogênicos é mais forte do que a aminoguanidina, um agente antiglicante muito conhecido (STAROWICZ; ZIELIŃSKI, 2019).

A atividade antiglicante da aminoguanidina ocorre devido a presença da hidrazina em sua estrutura química, capaz de reagir com produtos intermediários da reação de Maillard como o glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicosona (CINCOTTA et al., 2021). Outros fármacos disponíveis no mercado também apresentam atividade antiglicante, como é o caso da metformina, utilizado no tratamento da diabetes, que é capaz de capturar compostos

dicarbonílicos, como o metilglioxal, além de inibir o crosslinking entre BSA-AGE e glicose-BSA (ABBAS et al., 2016).

O mecanismo de ação para inibir a formação de AGEs, oriundos de metilglioxal, dos extratos da pele de prata do café (película que está diretamente em contato com o grão de café, também conhecido como *silverskin*) envolve várias vias incluindo interações entre os compostos fenólicos, como os ácidos clorogênicos, e proteínas (FERNANDEZ-GOMEZ et al., 2018). Além disso, outros estudos mostraram que a ingestão de café reduziu a formação dos produtos finais de glicação avançada e a agregação plaquetária em modelo experimental com ratos diabéticos. O papel protetor do café pode ser resultado da ação de seus componentes bioativos, como o ácido clorogênico (SILVÉRIO et al., 2021).

A atividade antiglicante do ácido clorogênico tem sido associada às suas características antioxidantes e quelantes, bem como à sua capacidade de capturar compostos dicarbonílicos reativos (FERNANDEZ-GOMEZ et al., 2018). A utilização de folhas café arábico, rico em ácidos clorogênicos (ALMEIDA et al., 2019), é uma alternativa interessante como agente inibidor de AGEs em relação a aminoguanidina, que apesar de segura, tem causado sérias complicações em pacientes com diabetes tipo 1, como anormalidades na função hepática e outros efeitos colaterais associados a sintomas semelhantes aos da gripe, alterações gastrointestinais, vasculite rara e anemia (PASTEN et al., 2021).

A rutina também apresenta efeitos inibitórios dos produtos finais de glicação avançada e também da oxidação de proteínas em modelo de estudo *in vitro*. Isso pode ser parcialmente atribuído à menor ocorrência de interações entre BSA e a rutina, tornando o flavonoide mais disponível para exercer suas atividades antiglicante e antioxidante. Dessa forma, essa substância torna-se uma candidata interessante como uma opção terapêutica complementar contra complicações diabéticas decorrentes do estresse glico-oxidativo (DIAS et al., 2021).

### **3.11 Bioacessibilidade dos compostos bioativos**

A bioacessibilidade é definida como a porção do nutriente liberada da matriz alimentar que será solubilizada no lúmen intestinal e disponibilizada após a digestão gastrointestinal para, posteriormente, ser absorvida no intestino. O termo biodisponibilidade é usado para descrever a proporção de um composto ingerido que atinge a circulação sistêmica (QUAN et al., 2020).

A composição química e atividade biológica dos alimentos estão associadas a presença de compostos fenólicos que por sua vez apresentam diversos benefícios para a saúde (PINTO et al., 2021). Os efeitos fisiológicos destas substâncias fenólicas, quando ingeridas, depende de seu potencial de absorção no trato gastrointestinal e eventual disponibilidade para o metabolismo (RIBAS-AGUSTÍ et al., 2018). É importante destacar que a bioacessibilidade dos compostos fenólicos pode ser influenciada pela concentração no alimento, liberação na matriz alimentar, estrutura química, interação molecular com outros compostos (por exemplo, fibras, proteínas e lipídios), tamanho e peso molecular, grau de polimerização, solubilidade, hidrofobicidade e configuração de isômeros (IGLESIAS-CARRES et al., 2019, QUAN et al., 2020).

Estudar a bioacessibilidade de tais compostos é fundamental para conhecer e compreender as interações que podem afetar seu potencial terapêutico e, assim, traçar estratégias para aumentar seus efeitos biológicos (EDWARDS et al., 2017). A melhor maneira de determinar os benefícios decorrentes da ingestão de alimentos e a sua bioacessibilidade é partir de testes *in vivo* de digestão gastrointestinal, porém estes ensaios são caros e requerem longos períodos de observação, além de envolverem implicações médicas e éticas (MARTÍNEZ-LAS HERAS et al., 2017).

Devido a estas limitações, evidências científicas apoiam positivamente o emprego de modelos *in vitro* para reproduzir com precisão as condições bioquímicas das diferentes fases envolvidas na digestão gastrointestinal (WANG et al., 2021). A simulação da digestão *in vitro* apresenta vantagens adicionais em comparação com ensaios *in vivo*, tais como a possibilidade de amostragem em diferentes momentos do processo de digestão, além de evitar a variabilidade do organismo humano (MARTÍNEZ-LAS HERAS et al., 2017).

Existem vários métodos que simulam a digestão permitindo verificar o que ocorre com os compostos bioativos desde a fase oral, passando pela fase gástrica até a etapa intestinal (WANG et al., 2021) e essa análise é dividida em modelos estáticos e dinâmicos. Os estáticos têm como objetivo simular o trânsito digestivo nas diferentes partes do sistema, ou seja, simulando as condições existentes na boca, estômago e intestino delgado, contudo apresentam limitações, tais como: ignoram a simulação dos movimentos peristálticos e da microbiota intestinal. Já o segundo modelo consegue simular o trânsito digestivo que forma mais gradual, obtendo um resultado mais próximo do real (LEE et al., 2018).

Portanto, a análise da digestão *in vitro* permite estimar a bioacessibilidade dos compostos bioativos das amostras em estudo e é uma aproximação válida do que ocorreria no sistema humano (SENSOY, 2021). Mesmo que parte das substâncias bioativas não sejam

absorvidas pelo organismo, a sua bioatividade, ou seja, ação fisiológica mais específica e obtenção de uma resposta com efeito direto do nutriente à saúde, não é totalmente descartada. Uma vez que esses compostos possuam atividade antioxidante estes ainda podem atuar no estômago e intestino impedindo doenças gastrointestinais relacionadas à geração de ERO durante o processo de digestão (CĂLINOIU; VODNAR, 2018; AGUILERA, 2019).

### 3.12 Zebrafish

O zebrafish (*Danio rerio*), também conhecido popularmente como peixe-zebra ou paulistinha, é usado como um organismo modelo bem estabelecido em várias áreas de pesquisa, como biologia do desenvolvimento (ROPER; TANGUAY, 2018), farmacologia e toxicologia (CANEDO et al., 2021), ecotoxicologia (RIBEIRO et al., 2020), vacinação (BAILONE et al., 2020), segurança alimentar dentre outras (BAILONE et al., 2019).

O uso de modelos experimentais em animais é muito útil para melhor compreender, identificar e desenvolver novos tratamentos para doenças como obesidade e DM2 já que são patologias complexas que envolvem fatores ambientais e genéticos. Dessa forma, o zebrafish é tido como um modelo muito atrativo, devido a conservação funcional do metabolismo lipídico, a estrutura do pâncreas, a homeostase da glicose e, também, sua biologia adiposa (ZANG; MADDISON; CHEN, 2018).

Tanto o pâncreas, quanto as células  $\beta$ -pancreáticas dos peixes-zebra e dos mamíferos são semelhantes e ambos possuem função de manutenção e desenvolvimento de glicose, sendo preservadas em quase todos os zebrafish e funcionalmente conservada durante o desenvolvimento (ZANG; SHIMADA; NISHIMURA, 2017). Estudos anteriores de hiperglicemia induzida em peixe-zebra, foi verificado altos níveis de glicose sanguínea em jejum a partir de uma dieta 6 vezes maior que a do grupo controle (ZANG; SHIMADA; NISHIMURA, 2017). CAPIOTTI e colaboradores (2014) realizaram um estudo semelhante, porém por imersão do peixe-zebra em solução de D-glicose ( $111 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e após 14 dias foi identificado fenótipos diabéticos, em relação ao grupo controle, através da constatação da taxa elevada de glicemia no sangue.

A utilização do zebrafish como sistema de modelo *in vivo* apresenta inúmeras vantagens, tais como: embriões transparentes, alta taxa de reprodução e fertilização, desenvolvimento rápido, ciclo de vida curto, tamanho pequeno, baixo custo, fácil manutenção em condições laboratoriais, genoma sequenciado e mapeado e apresenta homologia genética de 70 % compatível com os seres humanos (MEYERS, 2018). Por esses motivos, muitos

modelos de estudos com ratos e camundongos têm sido adaptados e substituídos por modelos com peixe-zebra (MEYERS, 2018).

Essa substituição de modelos é mais adequada aos princípios dos 3Rs (redução, substituição e refinamento, do inglês *replacement, reduction and refinement* publicado no livro intitulado “*The principles of humane experimental technique*”, por Russel em 1959) na bioética de experimentação animal. Esse princípio recomenda a substituição de vertebrados por animais com menor potencial de percepção da dor, técnicas *in vitro* ou métodos computacionais (*in silico*), reduzindo o número de animais por experimento e utilização de técnicas que minimizam o sofrimento dos animais. A esses princípios foram adicionados outros 7 relacionados aos princípios científicos: registro, relatório, robustez, reprodutibilidade e relevância (do inglês “*registration, reporting, robustness, reproducibility and relevance*”) e aos princípios de conduta: responsabilidade e respeito (do inglês “*responsibility and respect*”) a fim de ajudar aos cientistas a melhorar o bem estar e a saúde dos peixes-zebra utilizados em pesquisa, bem como a integridade e relevância dos experimentos. Os 10 Rs da pesquisa realizada com zebrafish não têm escala de importância, contudo devem ser recomendados para a utilização do peixe-zebra na pesquisa (CANEDO et al., 2022).

Desse modo, testes *in silico* são uma alternativa computacional (relacionando bioinformática e inteligência artificial) utilizada para estimar, numa primeira fase, os potenciais efeitos tóxicos de novas moléculas ou conjunto de substâncias, minimizando o uso de modelos animais (YANG et al., 2018). Nos últimos anos, esses estudos de modelagem molecular têm sido cada vez mais utilizados nas etapas de obtenção e desenvolvimento de novas drogas alavancando as pesquisas pré-clínicas (ALBERTO et al., 2020).

A utilização da modelagem molecular é fundamental na otimização e identificação de moléculas promissoras, reduzindo em até 50 % os custos e tempo gastos para desenvolvimento de um novo medicamento, diminuindo, significativamente, o número de moléculas que precisam ser sintetizadas e/ou testadas experimentalmente (LIN; LI; LIN, 2020). Diferentes estratégias são utilizadas nesse modelo como o planejamento baseado na estrutura do receptor por meio de docagem molecular que consiste na predição da conformação bioativa de micromoléculas (ligantes) no sítio de ligação de uma macromolécula (receptor, por exemplo enzimas e proteínas) (TORRES et al., 2019)

Apesar de suas vantagens, nenhum método sozinho é capaz de definir as propriedades farmacológicas de uma substância ou extrato, devido suas limitações. Por isso a combinação de vários modelos (*in silico, in vitro e in vivo*) nos permite ter uma visão geral sobre os compostos estudados. Esses três tipos de modelagem devem trabalhar juntas,

respeitando os princípios dos 10 R, incluindo a redução de experimentos com animais (WU et al., 2020; ABD-ALGALEEL et al., 2021). Por fim, o modelo zebrafish é uma opção acessível, eficaz e mais ética quando o teste *in vivo* é necessário (LEE; LIN; TSAI, 2021).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

Metanol grau HPLC, ácido acético, hidroxitolueno butilado, sulfato de magnésio anidro (99% m m<sup>-1</sup>), cloreto de sódio (95% m m<sup>-1</sup>), citrato de sódio tribásico dihidratado (98% m m<sup>-1</sup>), sódio citrato dibásico sesquihidratado (95% m m<sup>-1</sup>), cloreto de cálcio dihidratado, cloreto de potássio, cloreto de magnésio hexahidratado, carbonato de amônio, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Enzimas  $\alpha$ -glicosidase, lipase pancreática suína,  $\alpha$ -amilase, pepsina suína, tripsina, quimotripsina, sais biliares, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo, *p*-nitrofenil butirato, 1,1-difenil-2-picril-hidrazil, quercetina-3-O-diglicosídeo, ácido gálico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, albumina sérica bovina, glicose, xantina oxidase, metilglioxal, 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína, Tris-HCl-EDTA, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida, metassulfato de fenazina, nitroazul de tetrazólio, lucigenina, dihidrorodamina 123, fluoresceína, dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano), ácido *p*-cumárico e trolox foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA, Brasil). Padrões puros para quantificação, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, de cafeína, mangiferina, quercetina-3-O-glicosídeo e rutina da Extrasynthese (Lyon Nord, Genay, França), ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido clorogênico da TransMitt (Giessen, Alemanha). Metanol, n-hexano, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, reagente Folin-Ciocalteu, acetonitrila, dimetilsulfóxido e ácido clorídrico da Synth (Brasil). Quercetina ramnogalactosídeo e rutina glicosídeo foram purificados em um estudo anterior por de ALMEIDA et al., 2018. Acarbose (Glucobay<sup>®</sup>, Bayer, Alemanha), orlistat (Lipiblok<sup>®</sup>, Germed, Brasil) e metformina (Glifage<sup>®</sup>, Merck, Alemanha) foram obtidos em uma farmácia local.

O tratamento da amostra para análise da quantificação de elementos inorgânicos, em níveis traço, foi realizado usando HNO<sub>3</sub> (65% p<sup>-1</sup>) (VETEC, Brasil), HCl (37% p<sup>-1</sup>) (Sigma Aldrich, Alemanha), HF (38% p<sup>-1</sup>) (VETEC, Brasil). As soluções de referência foram preparadas após diluições sucessivas de 1000 mg L<sup>-1</sup> de soluções estoque de Al, Cu, Mg, Mn, Ni, Sn e Zn (Acros Organics, Bélgica). As curvas padrão analíticas foram preparadas em meio HNO<sub>3</sub> (1% v v<sup>-1</sup>) e variaram de 1 a 15 mg L<sup>-1</sup> para determinação de oligoelementos.

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm) obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Todas as vidrarias e frascos de polipropileno foram imersos em  $\text{HNO}_3$  (10% v v<sup>-1</sup>) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 24 h e enxaguados com água ultrapura antes do uso.

#### 4.2 Preparo de tampões

Para as atividades antioxidantes foram preparadas as seguintes soluções: a) tampão fosfato de potássio 19 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,4) dissolvendo 0,64 g de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) com 3,84 g fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) em 1000 mL água Milli-Q; b) tampão Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,4) misturou-se 50,0 mL de Tris Base 1,0 mol L<sup>-1</sup> com 42,0 mL de ácido clorídrico 1,0 mol L<sup>-1</sup> diluindo para 1,0 litro; c) tampão fosfato 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,4) dissolvendo 3,39 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  com 20,21 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em 1,0 L de água ultrapura; d) tampão fosfato de potássio 75 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,4) dissolvendo 2,55 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  com 15,16 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em 1000 mL água Milli-Q.

Para o ensaio da inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase foi necessário preparar o tampão fosfato 24 mmol L<sup>-1</sup> (pH 6,9) dissolvendo 1,69 g e 3,15 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , respectivamente, em 1000 mL de água destilada. Para inibição da enzima lipase pancreática foi preparado o tampão fosfato de sódio 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) misturando 136,09 mg de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) com 174,18 mg fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) em 1,0 L de água ultrapura.

Finalmente, para a avaliação da capacidade antiglicante foi preparado o tampão fosfato (pH 6,2) utilizando 73,0 mg de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 32,7 mg de cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), 20,5 mg de hipoxantina ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$ ) e 138,0 mg de ácido salicílico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ ). Estes solutos foram transferidos para um balão volumétrico de 500 mL, adicionando 19,05 mL de uma solução de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0 mol L<sup>-1</sup>) com 30,95 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 mol L<sup>-1</sup>) completando o volume com água bidestilada sob agitação por 3 horas.

#### 4.3 Material botânico

As folhas de café de dezesseis cultivares de *C. arabica* foram obtidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) em Belo Horizonte, Minas Gerais. As amostras foram entregues com as informações sobre resistência ou suscetibilidade ao fungo *Hemileia vastatrix* conforme pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 – Cultivares de *C. arabica* e suscetibilidade à ferrugem.

<b>Cultivar</b>	<b>Reações à ferrugem</b>	<b>Código da cultivar</b>
Acaiá Cerrado MG 1474	Suscetível	S1
Rubi MG 1192	Suscetível	S2
Topázio MG 1190	Suscetível	S3
MGS Travessia	Suscetível	S4
MGS Arañas	Resistente	R1
Araponga MG1	Resistente	R2
MGS Ametista	Resistente	R3
Catiguá MG1	Resistente	R4
MGS Catiguá 3	Resistente	R5
Oeiras MG 6851	Resistente	R6
MGS Paraíso 2	Resistente	R7
Paraíso MG H 419-1	Resistente	R8
Pau Brasil 2	Resistente	R9
Pau Brasil MG1	Resistente	R10
Sarchimor MG 8840	Resistente	R11
Sacramento MG1	Resistente	R12

Fonte: Elaborado pelo autor.

Além dessas, a cultivar Mundo Novo foi obtida em Minas Gerais e a Caturra Vermelho, foi obtida em duas localizações distintas do país, sendo uma também oriunda de Minas Gerais e a outra de São Paulo.

Foram coletadas manualmente diretamente dos cafeeiros, aproximadamente, 500 g de folhas. Em seguida, as folhas foram lavadas, higienizadas e desidratadas em estufa até a obtenção de massa constante. Finalmente, foram moídas e acondicionadas em sacos plásticos herméticos.

#### 4.4 Preparação dos extratos

As folhas de *Coffea arabica* foram submetidas a três diferentes técnicas de extração: micro-ondas, soxhlet e QuEChERS para a determinação dos componentes bioativos e também uma extração em bloco digestor aquecido.

Os extratos aquosos foram preparados pesando-se 100 mg do pó seco de cada cultivar, oriundo da Epamig, e foi adicionado 10,0 mL de água destilada a cada uma. O procedimento de extração foi realizado em forno micro-ondas doméstico (modelo Electrolux MTO30) na potência máxima (1000 W) por quatro minutos. Uma alíquota de cada amostra (1,0 mL) foi transferida para tubos do tipo Eppendorf® de 2,0 mL e, após resfriamento, foram centrifugados a 10.000 rpm, por 3 minutos a 22 °C. Finalmente, 100,0 µL dos sobrenadantes foram transferidos para frascos de vidro do tipo *vials* para análises cromatográficas. Após essa etapa, esses extratos foram submetidos a identificação e quantificação dos metabólitos. Além disso, essas amostras foram utilizadas para as análises do teor de fenólicos totais, da capacidade antioxidante na captura do radical DPPH, da inibição das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática e da avaliação da hipoglicemia e efeito hepatoprotetor no estresse oxidativo induzido por hiperglicemia através da D-glicose a partir do modelo zebrafish.

Os extratos metanólicos foram obtidos por extração exaustiva utilizando o aparelho soxhlet. Inicialmente, foram adicionados 5,0 g das cultivares em cartuchos de celulose e o processo foi iniciado com 250 mL de hexano para promover a remoção da fase lipídica do material vegetal. Posteriormente, o mesmo procedimento foi repetido, porém com 250 mL de metanol, obtendo-se os extratos desejados. As extrações, com ambos solventes, foram realizadas em triplicata com duração de três horas cada uma e os solventes foram removidos por evaporação rotativa e os extratos secos sob um fluxo contínuo de nitrogênio. Dos extratos obtidos, os dois da cultivar Caturra Vermelho, denominados SP, oriundo de São Paulo, e MG, provindo de Minas Gerais, foram utilizados para os ensaios da atividade antiglicante, para avaliar a influência da localização geográfica na resposta desta análise. Os demais extratos metanólicos foram utilizados para atividades antioxidantes e, também, para a digestão *in vitro*.

Também foi realizada a extração do tipo QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*, ou em português, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) para a identificação e quantificação dos compostos polifenólicos e uma última extração em um bloco digestor TECNAL (Piracicaba, São Paulo, Brasil) para a determinação e mensuração dos

elementos inorgânicos, em nível traço, com o objetivo de investigar a relação desses dois grupos quanto à resistências de algumas cultivares contra a doença do cafeeiro, conhecida como ferrugem.

Para a determinação do teor dos compostos polifenólicos por QuEChERS, aproximadamente, 1,0 g de amostra moída foi pesada com precisão, em um tubo de polipropileno de 50 mL, foram adicionados 7,5 mL de água milli-Q. Após hidratação completa por 15 minutos, foram adicionados 10 mL de acetonitrila como solvente de extração e o pH foi ajustado para 5,0 com ácido acético. A amostra foi agitada, vigorosamente, por 1 minuto e uma mistura de sais (6,0 g de sulfato de magnésio anidro, 1,5 g de cloreto de sódio, 1,5 g de citrato de sódio tribásico dihidratado e 0,75 g de citrato de sódio dibásico sesquihidratado), previamente pesada, foi adicionada. Esta mistura foi, novamente, agitada por 1 minuto. Após essa etapa o sistema foi deixado em repouso, por 20 minutos, até a completa decantação e, passado esse período, uma alíquota de 100 µL da camada superior de acetonitrila foram transferidos para frascos do tipo *vials* e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas com Ionizador *Electrospray* (CLAE-DAD-IES-EM).

E para a análise dos metais, 0,200 g das amostras moídas das folhas de café, pesada com precisão, foram colocadas em tubos de Teflon<sup>®</sup> com 5,0 mL de uma mistura contendo os ácidos clorídrico (HCl) e nítrico (HNO<sub>3</sub>) na proporção 3:1. A mistura foi deixada em repouso durante a noite inteira e no dia seguinte foram adicionados 5,0 mL de ácido fluorídrico HF (38 % p<sup>-1</sup>) aos tubos sendo, posteriormente, transferidos para um bloco digestor aquecido durante 3 horas a 150 °C. As soluções resultantes foram diluídas para 20 mL com água ultrapura e analisadas por ICP-OES (acrônimo do inglês para Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado).

## **4.5 Análise dos compostos fenólicos**

### ***4.5.1 Identificação dos compostos bioativos***

A identificação dos compostos fenólicos, dos extratos obtidos em micro-ondas e soxhlet, foi realizada em um cromatógrafo líquido Hewlett-Packard (HP) 1090 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) equipado com uma coluna C18 Gemini de fase reversa

(250 mm, 4,6 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg, Alemanha) acoplado a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) segundo a metodologia proposta por OWEN et al. (2000). As fases móveis foram constituídas por metanol (solvente A) e ácido acético a 2% em água bidestilada (solvente B). Um método de gradiente foi realizado seguindo as proporções: 0 – 2 min, 5 – 25 % B; 2 – 4 min, 25 – 40 % B; 4 – 6 min, 40 – 50 % B; 6 – 8 min, 50 – 100 % B; 8 – 10 min, 100 – 5 % B e finalmente mantido a 5 % B por até 15 minutos.

Para as amostras obtidas por QuEChERS a análise qualitativa foi realizada num cromatógrafo líquido HP série 1100 pertencente ao laboratório de Toxicologia e Fatores de Risco do Câncer do Centro Alemão de Pesquisas do Câncer (Heidelberg, Alemanha), equipado com coluna de fase reversa C18 (Phenomenex Ltd, Aschaffenberg, Alemanha) com dimensões de 250 x 4,6 mm, acoplado a Detector de Arranjo de Diodos e a um Espectrômetro de Massas de Quadrupolo Simples HP série 1101 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) operando com Ionizador *Electrospray* (IES). As fases móveis utilizadas foram uma solução aquosa a 2 % de ácido acético (solvente A) e acetonitrila (solvente B), seguindo gradiente e tempo de eluição total de 45 min: inicialmente 95 % A – 5 % B por dez minutos, 90 % A – 10 % B por um minuto, 85 % A – 15 % B por nove minutos, 60 % A – 40 % B por dez minutos, 40 % A – 60 % B por 10 minutos, 0 % A – 100 % B por 5 minutos e durou até o final do experimento (de ALMEIDA et al., 2018).

Em ambas análises, o controle de instrumentos e o manuseio dos dados foram realizados com o software HP Chemstation. A taxa de fluxo de solvente foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi 10 µL. Os biocompostos foram detectados pela sua absorvância no ultravioleta (UV) a 257, 278 325 e 340 nm à temperatura ambiente e identificados a partir da comparação dos espectros de DAD e do tempo de retenção de cada um dos padrões autênticos comercialmente disponíveis, para os compostos majoritários, e, também, dos compostos purificados para os demais fenólicos.

#### **4.5.2 Curvas de calibração**

A quantificação de compostos polifenólicos dos extratos das folhas de café foi determinada a partir de curvas analíticas, na faixa de concentração de 5 a 1000 µg mL<sup>-1</sup>, dos padrões autênticos comercialmente disponíveis ou purificados a partir das áreas dos picos obtidos pelos cromatogramas nos comprimentos de onda 278, 257, 325 e 340 nm. As

equações obtidas dos principais metabólitos secundários, ácido clorogênico, mangiferina, rutina e cafeína, e os valores dos Limites de Detecção e de Quantificação podem ser conferidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Compostos majoritários identificados nos extratos de *C. arabica*.

Metabólitos	TR	Curva padrão	R <sup>2</sup>	λ	LD	LQ
Ácido clorogênico	6,73	$y = 27468x + 564,45$	0,997	340	0,015	0,045
Cafeína	7,18	$y = 20388x + 262,46$	0,992	278	0,001	0,040
Mangiferina	7,74	$y = 24441x + 309,75$	0,994	257	0,002	0,006
Rutina	9,62	$y = 12445x - 22,806$	0,999	340	0,010	0,066

TR: Tempo de retenção (min); R<sup>2</sup>: coeficiente de correlação; λ: comprimento de onda (nm); LD: Limite de Detecção ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); LQ: Limite de Quantificação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as operações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente em triplicata. O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão das respostas e na inclinação utilizando três curvas analíticas independentes, conforme definido por KACHMAR et al. (2019). LD e LQ foram calculados como  $3,3$  e  $10 \sigma S^{-1}$ , respectivamente, em que a variável  $\sigma$  representa o desvio padrão da resposta e  $S$  é a inclinação da curva de calibração conforme apresentada na Tabela 2. Os dados obtidos na quantificação foram expressos em  $\text{g kg}^{-1}$  de extrato seco.

## 4.6 Análise dos elementos inorgânicos

### 4.6.1 Instrumentação

Para a quantificação de Al, Cu, Mg, Mn, Ni, Sn e Zn utilizou-se um bloco de aquecimento digestor Tecnal TE-007D (Piracicaba, Brasil) equipado com 15 tubos de Teflon® com tampas para o método de preparo das amostras. Um Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) (Perkin Elmer 4200 DV, EUA) foi utilizado para a determinação dos elementos inorgânicos, anteriormente, citados. As amostras foram introduzidas no aparelho através de um nebulizador de fluxo cruzado com uma câmara de

pulverização de dupla passagem. Os parâmetros operacionais empregados no ICP-OES estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros operacionais utilizados no ICP-OES para a determinação de Al, Cu, Mg, Mn, Ni, Sn e Zn em amostras de folhas de café.

<b>Parâmetros operacionais ICP-OES</b>	
Câmara de nebulização	Duplo Passo
Nebulizador	Cross-Flow
Potência de radiofrequência (W)	1100
Taxa de fluxo de argônio para o plasma (L min <sup>-1</sup> )	15,0
Taxa de fluxo de argônio para a nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,8
Taxa de fluxo de gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0,5
Taxa de fluxo de amostra (mL min <sup>-1</sup> )	1,4
Comprimento de onda (nm)	Visão Axial
Al	396,153
Cu	324,752
Mg	285,213
Mn	257,610
Ni	221,648
Sn	189,927
Zn	213,587

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### **4.6.2 Técnicas quimiométricas**

Após a quantificação dos compostos fenólicos e dos elementos inorgânicos presentes nas folhas de café, buscou-se alguma relação entre estas duas variáveis para a compreensão das causas que tornam algumas cultivares resistentes e outras suscetíveis a ferrugem do cafeeiro. A quimiometria faz uso de fundamentos matemáticos e estatísticos aliados a recursos de informática para planejar experimentos e também para avaliar dados de origem Química com o objetivo de obter a máxima quantidade de informações (BROWN, 2017).

No primeiro momento foi utilizada a Análise de Componentes Principais (ACP ou PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) que consiste num método não supervisionado e sua ideia básica é projetar os dados num espaço de dimensão menor em relação ao espaço do conjunto de dados inicial, agrupando-os de acordo com sua similaridade química, sem prejudicar a interação entre os mesmos. A redução da dimensionalidade é realizada através do estabelecimento de novas variáveis ortogonais, denominadas Componentes Principais (CP ou PC, do inglês *Component Analysis*). Portanto, os PC são combinações lineares das variáveis originais organizadas em ordem decrescente de importância.

Os dados foram normalizados usando pré-tratamento de autoescalonamento. O escalonamento automático é um método de normalização usado para análises multivariadas de diferentes naturezas e dados unitários. A diferença entre a medida individual e os valores médios é dividida pelo desvio padrão do conjunto de dados para cada variável, conforme a Equação 1.

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{S_j}$$

Em que  $x'_{ij}$  é o novo valor normalizado,  $x_{ij}$  é o valor original individual,  $\bar{x}_j$  é o valor médio do conjunto de dados e  $S_j$  é o desvio padrão do conjunto de dados.

Para classificar os códigos de acesso nos diferentes grupos, suscetível e resistente à ferrugem, foi utilizada a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares - Discriminant Analysis*). Diferentemente do PCA, o PLS-DA é um método supervisionado que utiliza a resposta desejada (Y) para construir um modelo que classifica uma amostra considerando as variáveis da matriz X e sua respectiva categoria (Y) para um determinado grupo de *C. arabica* suscetível e resistente à ferrugem. O método consiste em modelar a estrutura de variância e covariâncias das variáveis latentes de forma a maximizar a variância multidimensional das variáveis da matriz X na direção da matriz Y. Vale ressaltar que devido à existência de uma correlação entre os compostos químicos, métodos usuais de regressão linear e análise discriminante convencional (*Linear Discriminant Analysis - LDA*) não seriam adequados (MALTA et al., 2021).

Diante dessas especificações, o modelo PLS-DA foi construído para diferenciar grupos de *C. arabica* suscetíveis e resistentes à ferrugem em relação à composição química das folhas. Para avaliar o desempenho do modelo, foi considerada a taxa de erro de

classificação para cada componente do PLS-DA. As contribuições de cada fator para o PLS-DA foram feitas utilizando os menores erros para cada variável em estudo.

#### 4.7 Secagem da amostra vegetal

As folhas de *C. arabica* da cultivar Mundo novo foram submetidas a diferentes técnicas de secagem, sendo elas: natural, forno, micro-ondas e Air Fryer. Em todos os métodos foram utilizados 100 g de folhas e após a secagem foram preparados extratos aquosos na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> para posterior identificação e quantificação dos principais metabólitos por CLAE.

As folhas de café foram secas ao ar, em uma sala ventilada sem exposição a luz solar mantida a temperatura ambiente. Após duas semanas a massa da amostra permaneceu constante indicando que toda água foi eliminada. A secagem natural é a mais lenta entre todas e apesar da folha não sofrer nenhum estresse térmico, a mesma fica suscetível a presença de insetos e/ou micro-organismos devido ao longo tempo de exposição a sua secagem completa. Por outro lado, a secagem natural do ponto de vista de sustentabilidade torna-se um método interessante devido a ausência de gasto de energia.

Um método muito comum para a preparação do material vegetal é a secagem por forno de convecção. Os experimentos foram realizados em um forno de convecção (VWR Scientific Products, Atlanta, EUA) na temperatura de 50 ± 2 °C. As folhas foram uniformemente distribuídas em bandejas de aço inoxidável perfuradas e permaneceram neste equipamento durante 7 horas.

A secagem por micro-ondas também foi avaliada tendo em vista que é um método moderno e muito rápido. A secagem por micro-ondas envolve a penetração de um campo eletromagnético de alta frequência (300 MHz – 30 GHz) no interior da amostra permitindo a remoção rápida de água com contato limitado com oxigênio. As folhas foram inseridas no aparelho de micro-ondas (Electrolux, modelo MTO30-220) na potência máxima durante 90 segundos.

O último método testado para a secagem das amostras de café foi pelo aparelho Air Fryer (Philco, modelo PFR15PG). Apesar de poucos estudos com o esse equipamento, por não ser um método rotineiro de secagem, ele se destaca pelos benefícios de fácil manuseio e acesso por ser um aparelho de uso doméstico. Outro ponto positivo é o tempo de obtenção da

amostra seca, pois para este resultado são necessários apenas 3 minutos na temperatura máxima (200 °C).

#### **4.8 Compostos fenólicos e capacidade antioxidante**

A determinação do Teor de Fenólicos Totais (TFT) e atividades antioxidantes pela avaliação da capacidade desativadora de espécies reativas foram realizadas tanto para os extratos aquosos, quanto metanólicos das folhas de café arábica.

##### ***4.8.1 Teor de Fenólicos Totais***

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por GÜLÇİN (2012) com algumas modificações. Primeiramente, 250 µL dos extratos aquosos de *C. arabica* foram misturados com 2,0 mL de água destilada. Em seguida, 250 mL do reagente Folin Ciocalteu foi adicionado e o conteúdo dos frascos do tipo eppendorf® foi agitado até a completa solubilização. Após 3 minutos, foram adicionados à mistura 250 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 %). As amostras foram mantidas em repouso, protegidas da luz, por 40 minutos à temperatura ambiente. Passado esse tempo, a absorbância foi medida a 725 nm usando um espectrofotômetro (FEMTO 700 Plus). O ácido gálico foi usado como referência para essa análise e uma curva padrão na faixa de 50 – 500 mg mL<sup>-1</sup> foi construída. Todas as medições foram realizadas em triplicata e o TFT foi expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato seco.

##### ***4.8.2 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•***

A atividade antioxidante frente ao radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH•) foi realizada de acordo com o método descrito por GÜLÇİN (2012) com pequenas modificações. Uma alíquota de cada extrato aquoso de 0,1 mL em diferentes concentrações (1000, 500, 250, 100 e 50 µg mL<sup>-1</sup>) foi misturada com 3,9 mL de uma solução de metanol contendo o radical DPPH•. A mistura foi agitada, vigorosamente, e deixada em repouso, em ambiente escuro, por 16 minutos. A redução da porção DPPH• foi determinada medindo a absorção a 515 nm.

Uma solução controle foi preparada na ausência de extratos contendo 4,0 mL de DPPH• e uma curva padrão deste radical foi construída na faixa de 50 – 1000 µg mL<sup>-1</sup> sob condições idênticas. A concentração do extrato proporcionando 50 % de inibição do radical (CI<sub>50</sub> ou IC<sub>50</sub>, do inglês *concentration required for 50 % inhibition*) foi calculada a partir do gráfico de inibição percentual em relação à concentração do extrato. O hidroxitolueno butilado (BHT, do inglês *butylated hydroxytoluene*) foi usado como controle positivo e sua escolha foi devido a sua ampla utilização como antioxidante pelas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e, também, em produtos derivados do petróleo (BOULEBD, 2022). O espectrofotômetro (FEMTO 700 Plµs) foi utilizado nesta análise e uma curva de TFT *versus* IC<sub>50</sub><sup>-1</sup> foi construída.

#### **4.8.3 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical O<sub>2</sub>•**

O radical superóxido foi gerado pelo sistema não-enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida e metassulfato de fenazina (NADH/PMS). Neste ensaio NADH promove a redução do PMS, que é reoxidado pelo O<sub>2</sub> formando O<sub>2</sub>•-. A capacidade de sequestro do radical superóxido foi determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos sobre a redução do nitroazul de tetrazólio (NBT), formado pelo O<sub>2</sub>•-, de acordo com Melo et al. (2015).

Inicialmente, os reagentes NADH (50 µL; 166 µmol L<sup>-1</sup>), NBT (150 µL; 107,5 µmol L<sup>-1</sup>) e PMS (50 µL; 2,7 µmol L<sup>-1</sup>) foram preparados em tampão fosfato de potássio (19 mmol L<sup>-1</sup> e pH 7,4) e os extratos, aquosos e metanólicos, também foram diluídas no mesmo tampão em diferentes concentrações (1000, 500, 250, 100 e 50 µg mL<sup>-1</sup>). Os reagentes e as amostras foram transferidos para microplacas, protegidas da luz, totalizando 300 µL por poço. Uma leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) foi utilizada neste ensaio com temperatura ajustada à 25 °C e passados 5 minutos de reação, foi feita a leitura no modo de absorvância à 560 nm. Os resultados, em triplicata, foram expressos em IC<sub>50</sub> (mg mL<sup>-1</sup>) e o ácido *p*-cumárico, nas mesmas condições dos extratos, foi utilizado como controle positivo. A escolha deste antioxidante é devida sua potente capacidade hepatoprotetora, além de inibir peroxidação lipídica e, também, regular positivamente as enzimas desintoxicantes em modelos *in vivo* (SHEN et al., 2019).

#### **4.8.4 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do $H_2O_2$**

A capacidade de sequestro do peróxido de hidrogênio foi determinada pelo monitoramento dos extratos, aquosos e metanólicos, em inibir a oxidação da lucigenina pelo peróxido de hidrogênio, conforme descrito por CHISTÉ et al. (2011).

Neste ensaio foram transferidos, para cada poço da microplaca, 50  $\mu\text{L}$  dos extratos de café, nas concentrações: 1000, 500, 250, 100 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  diluídos em tampão fosfato (19  $\text{mmol L}^{-1}$  e pH 7,4) juntamente com 100  $\mu\text{L}$  do reagente lucigenina (800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) dissolvido em tampão Tris-HCl (50  $\text{mmol L}^{-1}$  e pH 7,4) e 8,5  $\mu\text{L}$  peróxido de hidrogênio (1 %). Os experimentos foram realizados por meio da leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) com temperatura ajustada à 37 °C e o sinal de quimiluminescência foi detectado durante 5 minutos.

Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da oxidação da lucigenina induzida pelo  $H_2O_2$ . O ácido *p*-cumárico foi utilizado como controle positivo, nas mesmas condições experimentais, e os resultados, em triplicata, foram expressos em  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ )

#### **4.8.5 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do $\text{HOCl}$**

A desativação do ácido hipocloroso, pelos extratos, aquosos e metanólicos, das folhas de café foi determinada pelo monitoramento da inibição da oxidação da dihidrorodamina 123 (DHR 123, não fluorescente) para rodamina 123 (fluorescente), induzida pelo  $\text{HOCl}$ , como o descrito por Melo et al. (2015).

O ensaio foi feito com diversas diluições (1000, 500, 250, 100 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos de café adicionadas aos poços da microplaca juntamente com o tampão fosfato (100  $\text{mmol L}^{-1}$  e pH 7,4) e as soluções de DHR 123 (1,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $\text{HOCl}$  (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). O experimento foi realizado por meio da leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) com temperatura ajustada à 37 °C e a leitura da fluorescência (excitação a 528 nm e emissão a 485 nm) foi feita, imediatamente, após a adição de todas as soluções nos poços da microplaca, totalizando 300  $\mu\text{L}$  por poço.

A capacidade antioxidante dos extratos das folhas de café e do controle positivo, ácido *p*-cumárico, foram testadas em diferentes concentrações, nas mesmas condições experimentais, e os resultados, em triplicata, foram expressos em IC<sub>50</sub> (mg mL<sup>-1</sup>).

#### **4.8.6 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ROO•**

A capacidade de captura do radical peroxila (ROO•) foi avaliada monitorando-se o efeito dos extratos, aquosos e metanólicos, das folhas de café no decaimento da fluorescência, gerada pela oxidação da fluoresceína induzida pela presença do radical ROO• de acordo com o protocolo descrito por Melo et al. (2015).

Inicialmente, uma solução de fluoresceína 508,25 nmol L<sup>-1</sup> e outra de dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) 76 mmol L<sup>-1</sup> foram preparadas em tampão fosfato de potássio (75 mmol L<sup>-1</sup> e pH 7,4). A análise foi feita em microplacas de 96 poços e em cada uma 20 µL dos extratos, em diferentes concentrações (1000, 500, 250, 100 e 50 µg mL<sup>-1</sup>), foi adicionado com 60 µL da solução de fluoresceína e 110 µL de AAPH. A reação foi realizada a 37 °C e a absorção foi medida a cada minuto durante 2 h numa leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) com o par de excitação e emissão de 485 e 528 nm, respectivamente. Neste ensaio, o ácido *p*-cumárico foi utilizado como controle positivo nas mesmas condições dos extratos. Os resultados foram expressos a partir da curva padrão de Trolox (12,5 – 400 mmol L<sup>-1</sup>), expressos em µmol de equivalentes de trolox (ET) mg<sup>-1</sup> extrato. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

### **4.9 Análise da atividade enzimática**

#### **4.9.1 Inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase**

A atividade inibitória da  $\alpha$ -glicosidase dos extratos aquosos foi avaliada de acordo com o método cromogênico descrito por SHINDE et al. (2008) com pequenas modificações. Inicialmente, 10 µL da enzima obtida a partir do micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* (1,0 U mL<sup>-1</sup>) foi misturada com 20 µL de cada amostra em diferentes concentrações: 1000, 500, 250, 125 e 50 µg mL<sup>-1</sup>, com duração de 5 min a 25° C. A reação foi iniciada pela adição de 40 µL do substrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG; 1,0 mmol L<sup>-1</sup>) e essa mistura foi mantida em repouso por 30 minutos a 37 °C. A interrupção da reação ocorreu pela

adição de 100  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de sódio (10 %). Finalmente, 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi transferida para microplacas de 96 poços e a absorbância foi lida a 410 nm em um leitor de microplacas do tipo Elisa (TP-READER<sup>®</sup> Thermo Plate).

Para eliminar variações relacionadas à coloração característica das amostras e possíveis variações relacionadas à absorbância da coloração do produto *p*-nitrofenol (*p*-NP), todos os ensaios foram realizados com e sem enzima. Todas as soluções deste ensaio foram preparadas em tampão fosfato (24  $\text{mmol L}^{-1}$ ; pH 6,9), exceto os extratos aquosos de *C. arabica* e solução de bicarbonato de sódio que foram preparadas em água ultra pura. O branco foi preparado substituindo as amostras com a mesma quantidade de tampão fosfato. O fármaco acarbose foi usado como solução controle nas mesmas concentrações dos extratos. A atividade inibitória de  $\alpha$ -glicosidase foi calculada usando a Equação 2.

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

Em que  $\text{ABS}_{\text{branco}}$  e  $\text{ABS}_{\text{amostra}}$  são absorbâncias do tampão fosfato e das soluções amostra e controle positivo respectivamente.

#### **4.9.2 Inibição da enzima lipase pancreática**

A atividade antiobesidade a partir da inibição da lipase pancreática foi realizada de acordo com a metodologia de JARADAT et al. (2017) com algumas modificações. Inicialmente, foram preparadas as soluções de lipase pancreática (1,0  $\text{mg mL}^{-1}$ ), do substrato *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB; 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e dos extratos aquosos de *C. arabica* (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Todas as soluções foram preparadas com tampão fosfato de sódio (1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ; pH 7,0) com 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) imediatamente antes do uso. O substrato foi preparado diluindo 10  $\mu\text{L}$  da solução concentrada em 11,140 mL de acetonitrila e os extratos de café foram diluídos em quatro concentrações diferentes: 500, 250, 125 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

O início da reação, ou pré-incubação, começou com a mistura de 150  $\mu\text{L}$  das amostras com 50  $\mu\text{L}$  da enzima. Esta solução permaneceu em repouso por 15 minutos a 37 °C. A incubação foi iniciada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de *p*-NPB e a mistura foi agitada a 400 rotações por minuto (rpm) durante 30 min à mesma temperatura. A inibição da enzima foi determinada

medindo a hidrólise de *p*-NPB em *p*-NP a 410 nm usando um leitor de microplacas Elisa (TP-READER® Thermo Plate). O mesmo procedimento foi realizado para uma solução em branco (somente tampão fosfato de sódio) e orlistat (solução controle) nas mesmas concentrações dos extratos. A atividade inibitória da lipase pancreática foi calculada usando a Equação 2.

Todos os ensaios foram conduzidos com e sem enzima pelas mesmas razões do ensaio de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase.

#### **4.10 Avaliação da capacidade antiglicante de extratos metanólicos das folhas de café**

Para avaliar a capacidade antiglicante de extratos metanólicos de folhas de café, foi aplicada a técnica de espectrofluorescência, utilizando o método de formação de produtos finais de glicação avançada, *in vitro*, por acoplamento ao sistema de ensaio hipoxantina-xantina oxidase, descrito por MARQUES et al., 2018. Folhas de café da cultivar Caturra Vermelho foram utilizadas apenas neste ensaio e os extratos metanólicos (SP e MG) obtidos foram preparados como descrito no tópico 4.4.

Diferentes concentrações dos extratos metanólicos (2,5 e 5,0 mg mL<sup>-1</sup>) foram analisadas na reação de capturas de compostos carbonilados utilizando glicose como carbonila reativa na presença de albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*). As soluções dos extratos foram preparadas pesando-se as massas correspondentes em tubos do tipo Eppendorfs® (2,0 mL) e dissolvendo-as em 1,0 mL de tampão fosfato (pH 6,2). A análise foi iniciada pela adição de 94  $\mu$ L de BSA (16 mg mL<sup>-1</sup>), 25  $\mu$ L de glicose (1,67 mol L<sup>-1</sup>) e 10  $\mu$ L de xantina oxidase (18 mU) aos tubos. O sistema foi homogeneizado em agitador votex, por 1 minuto, e a incubação foi realizada na ausência de luz a 37 °C com agitação constante de 450 rpm por 48 horas. Uma solução controle, nas mesmas condições dos ensaios, também foi preparada, porém sem a presença de extratos para posterior avaliação da capacidade antiglicante das amostras testadas. As reações de incubação foram encerradas pela adição de 10  $\mu$ L de ácido clorídrico concentrado, em seguida, alíquotas de 100  $\mu$ L foram transferidas para placas de 96 poços e a intensidade da fluorescência foi medida utilizando detector com excitação e emissão, respectivamente, nas faixas de comprimento de onda entre 300-360 nm e 380-450 nm (MARQUES et al., 2018). Todas as amostras deste ensaio foram produzidas em triplicata e as todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato.

A amostra de São Paulo passou por uma nova avaliação deste ensaio, nas mesmas condições descritas acima, porém substituindo a solução de glicose (25  $\mu\text{L}$ ) por solução de mesmo volume de metilglioxal ( $6,89 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato durante mesmo período de incubação.

#### 4.11 Digestão *in vitro* e a bioacessibilidade dos metabólitos majoritários

Os ensaios foram conduzidos seguindo o protocolo proposto pela rede COST Action INFOGEST FA1005 (MINEKUS et al., 2014), com modificações. A digestão *in vitro* foi dividida em três etapas; oral, gástrica e intestinal, as quais utilizam respectivamente, os Fluidos Sintéticos Salivar (FSS), Gástrico (FSG) e Intestinal (FSI). Em cada fase, os sais  $\text{KCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  e  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  foram utilizados em diferentes concentrações conforme pode ser conferido na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações recomendadas de eletrólitos dos Fluidos Sintético Salivar (FSS), Gástrico (FSG) e Intestinal (FSI) com base em dados humanos *in vivo*

Constituintes	SSF ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	SGF ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	SIF ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
$\text{K}^+$	18,80	7,80	7,60
$\text{Na}^+$	13,60	72,20	123,40
$\text{Cl}^-$	19,50	70,20	55,50
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	3,70	0,90	0,80
$\text{HCO}_3^-$ , $\text{CO}_3^{2-}$	13,70	25,50	85,0
$\text{Mg}^{2+}$	0,15	0,10	0,33
$\text{NH}_4^+$	0,12	1,00	–
$\text{Ca}^{2+}$	1,50	0,15	0,60

Fonte: Elaborado pelo autor.

Além dos fluidos sintéticos, foram utilizadas as enzimas  $\alpha$ -amilase (75  $\text{U mL}^{-1}$ ) para a fase oral, pepsina porcina (2.000  $\text{U mL}^{-1}$ ) para a fase gástrica e tripsina (100  $\text{U mL}^{-1}$ ), quimotripsina (25  $\text{U mL}^{-1}$ ) e lipase pancreática porcina (2.000  $\text{U mL}^{-1}$ ) para a fase intestinal além de sais biliares (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ). As enzimas e o  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  foram adicionados na solução somente no momento do uso.

Inicialmente, 1,0 g dos extratos, aquosos e metanólicos, foram misturados com 1,6 mL de solução de  $\alpha$ -amilase salivar dissolvida em fluido salivar (pH 7,0) seguido de 12  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  e 388  $\mu\text{L}$  de água destilada. As amostras foram incubadas à 37 °C, com leve agitação, por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 1,82 mL de pepsina suína, dissolvida no fluido gástrico, aos extratos submetidos a fase oral juntamente com 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  e 140  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . O pH foi corrigido para 3,0 com adição de  $\text{HCl}$  1,0 mol  $\text{L}^{-1}$  e as amostras foram incubadas à 37 °C, novamente com leve agitação, por 2 horas. Finalmente, as amostras da etapa anterior seguiram o processo de digestão, pela adição de 2,14 mL do fluido intestinal, contendo as enzimas tripsina, quimotripsina e lipase pancreática, juntamente com 334  $\mu\text{L}$  da solução de sais de bile e 5,4  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ . O pH foi corrigido para 7,0 com  $\text{NaOH}$  1,0 mol  $\text{L}^{-1}$  e os extratos foram incubados à 37 °C, com agitação leve, por 2 horas.

Todas as fases contaram com uma solução controle substituindo as respectivas enzimas por água ultrapura de mesmo volume e ao final dos experimentos, uma alíquota de cada etapa foi coletada, centrifugada (5000 rpm, 20 min), filtrada (filtro de 0,42  $\mu\text{m}$ ) e submetida ao ensaio de bioacessibilidade pela extração por QUEChERs e a quantificação dos compostos bioativos majoritários dos extratos de *C. arabica* através da análise em CLAE. A bioacessibilidade foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$\% B = \frac{[\text{TB}]}{[\text{T}]} \times 100$$

Sendo % B o valor da bioacessibilidade, em porcentagem, [TB] o teor dos compostos bioacessíveis após a digestão *in vitro* e [T] é o teor dos metabólitos presente nos extratos das folhas de café não digeridos. Estes ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram apresentados como valores absolutos.

## 4.12 Zebrafish

### 4.12.1 Animais

Zebrafish (*Danio rerio*) (idade de 90 a 120 dias;  $0,4 \pm 0,1$  g,  $3,5 \pm 0,5$  cm), silvestre, de ambos os sexos, foi adquirido em loja local (Fortaleza, CE). Os animais foram mantidos em um aquário de vidro ( $30 \times 15 \times 20$  cm), com água desclorada (ProtecPlus®) e bomba de ar com filtros submersos, sob uma temperatura de  $25 \pm 2$  °C e pH 7,0 e com ciclo

circadiano de 14:10 h (claro/escuro). Os animais receberam ração (Alcon Gold Spirulina Flakes®) duas vezes ao dia. Antes das aplicações dos medicamentos, os animais foram anestesiados em água gelada e após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em banho de gelo (2 a 4 °C) por 1 min até a perda dos movimentos operculares. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; nº 200621/2020), estando de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal.

#### ***4.12.2 Hiperglicemia induzida por D-glicose em Zebrafish adulto***

A indução da hiperglicemia em zebrafish adulto foi realizada baseada na metodologia de CAPIOTTI et al. (2014) com modificações. Os animais (n = 6 por grupo) foram imersos em solução de D-glicose (111 mmol L<sup>-1</sup>) em água desclorada em aquários de vidro de 5 L por sete dias. A solução de glicose foi trocada todos os dias. No 8º dia os animais foram retirados da solução de glicose e mantidos até o 11º dia em água desclorada.

Os grupos de animais que passaram os setes dias submersos na glicose, foram tratados oralmente (usando uma pipeta automática de 20 µL) durante quatro dias (no mesmo horário) com extratos aquosos de *C. arabica* (40 mg kg<sup>-1</sup>; 20 µL), acarbose (300 mg kg<sup>-1</sup>; 20 µL), extrato aquoso combinado com acarbose (40 mg kg<sup>-1</sup> do extrato e em seguida 300 mg kg<sup>-1</sup> de acarbose; 20 µL cada), metformina (200 mg kg<sup>-1</sup>; 20 µL) e DMSO a 3% (dilúente das drogas; controle). Um grupo de peixe-zebra que não foi submetido a hiperglicemia e a nenhum tratamento foi incluso na análise, denominado de Naive. Todos os tratamentos foram feitos após 12 h de jejum.

Os níveis de glicose no sangue foram medidos no quarto dia após quatro horas dos tratamentos. Antes da coleta de sangue, os animais foram eutanasiados (por indução da hipotermia com gelo), em seguida foi realizada uma incisão na cauda e as dosagens de glicose sanguínea foram lidas por meio de glicosímetro (Active, Accu Check).

#### ***4.12.3 Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) do fígado de Zebrafish***

O estresse oxidativo foi avaliado nos animais tratados durante os quatro dias (item 4.12.2). Os animais que foram sacrificados para o teste glicêmico tiveram o fígado removido. Os tecidos hepáticos dos animais, em triplicata, foram macerados em meio contendo Tris-

HCl-EDTA seguido de centrifugação (10.000 g por 10 min). O sobrenadante foi recolhido (50  $\mu$ L) e misturado com 5  $\mu$ L de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Nessa etapa ocorre a oxidação de DCFH-DA em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), produto fluorescente utilizado para a medida de detecção de ERO. A emissão de intensidade de fluorescência do DCF foi registrada a 520 nm, com excitação de 480 nm, 2 horas após a adição do reagente DCFH-DA à amostra. A concentração de proteína foi determinada usando o método de espectrofotometria de luz UV a 280 nm através de uma curva padrão de BSA (LOETCHUTINAT et al., 2005).

#### 4.13 Análise estatística

Todos os dados foram coletados em triplicata e apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados obtidos para as concentrações dos elementos inorgânicos ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco) e compostos polifenólicos ( $\text{g kg}^{-1}$  peso seco) presentes nas amostras de folhas de café foram tratados usando ferramentas quimiométricas. O software Pirouette 4.5 (Infometrix, Washington, EUA) foi utilizado para o tratamento dos dados, empregando a Análise de Componentes Principais como técnica de reconhecimento de padrões. A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais foi aplicada aos dados e o software estatístico R (R-Development Core Team, 2017) foi usado. Os resultados das análises em CLAE, compostos polifenólicos totais, atividade antioxidante e atividade antiglicante foram realizados no software estatístico Microsoft Excel (Microsoft®). A determinação do  $\text{IC}_{50}$  para  $\alpha$ -glicosidase, inibição da lipase pancreática e os testes *in vivo* em zebrafish foram construídos com o auxílio do software GraphPad Prism 7 (GraphPad®). A análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey HSD foi realizada para realizar a análise estatística. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

#### 4.14 Procedimentos Computacionais

##### 4.14.1 Detalhes computacionais

Todas as simulações foram realizadas utilizando códigos livres para uso acadêmico em um sistema operacional de 64 bits. Foram utilizados os seguintes códigos: Autodocktools™ (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012), AutoDockVina™ (TROTT; OLSON,

2010), Avogadro™ (<http://avogadro.cc/>) (HANWELL et al., 2012), Discovery Studio Visualizer™ viewer (BIOVIA et al., 2000), Marvin™ 19.8, 2020, (<http://www.chemaxon.com>) (CSIZMADIA, 1999), Pymol (DELANO, 2002) e UCSF Chimera™ (PETTERSEN et al., 2004).

#### 4.14.2 Preparação e otimização de ligantes

Para realizar as simulações as coordenadas bidimensionais dos ligantes de mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxi-2-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]xanten-9-ona), ácido clorogênico ((1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoil] ácido oxi-1,4,5-trihidroxiciclohexano-1-carboxílico), rutina (2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-tri-hidroxi-6-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-tri-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oximetil]oxan-2-il]oxicromen-4-ona, cafeína (1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona) foram obtidos do repositório PUBCHEM (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (KIM et al., 2019) onde eles foram depositados como os códigos PubChem CID 5281647, 1794427, 5280805 e 2519 respectivamente. As estruturas foram renderizadas usando o plugin disponível no código MarvinSketch (<https://chemaxon.com/products/marvin>) e depois submetidas à otimização estrutural usando o formalismo clássico de campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94) (HALGREN, 1996). Os cálculos de otimização foram realizados usando o código Avogadro® (HANWELL et al., 2012), configurado para realizar simulações de campo de força MMFF94, usando o algoritmo Steepest Descent (MEZA, 2010), 500 passos numéricos e um parâmetro de convergência  $10e^{-7}$  (da SILVA et al., 2019).

#### 4.14.3 Procedimentos gerais de docagem

Para os estudos de docagem molecular foi selecionada a subunidade C-terminal da enzima maltase-glicoamilase (CtMGAM) que está diretamente envolvida na produção de glicose no lúmen humano, sendo assim um excelente alvo para o estudo de medicamentos para DM2 (REN; QIN; CAO, 2011). A estrutura da CtMGAM foi obtida do repositório Protein Data Bank - RCSB (<https://www.rcsb.org/>), onde foi depositada no PDB-codex 3TOP, identificada com o título “*Structural insight into specificity of substrato intestinal humano maltase-glucoamilase*” (REN; QIN; CAO, 2011), classificado como inibidor de hidrolase/hidrolase do organismo *Homo sapiens*, expresso no sistema *Komagataella pastoris*,

obtido pelo método de difração de raios X, com resolução de 2,88 Å e parâmetros de R-Value Free, Work e Observed na ordem de 0,284, 0,218 e 0,222 respectivamente. Na estrutura da proteína (cadeia C e D), encontra-se a estrutura da acarbose (PRD\_900007), um oligossacarídeo que possui atividade inibitória de CtMGAM, que foi cocrystalizado e será utilizado como referência para estudos de docagem molecular.

Para realizar as simulações de docagem molecular, foi escolhido um Algoritmo Genético Lamarkiano implantado no código vna AUTODOCK (TROTT; OLSON, 2010). A caixa de grade foi centralizada em cada uma das proteínas, sendo definida com parâmetros de tamanho 126 Å (x), 82 Å (y) e 124 Å (z), centrado nas coordenadas – 45.828, 21.487 e 17.927 para os eixos x, y e z respectivamente.

Todas as simulações de encaixe e reencaixe foram padronizadas para realizar 50 simulações independentes com 20 poses para cada simulação. Para obter um melhor refinamento parcial dos cálculos de acoplamento individuais, todas as simulações foram realizadas com critério de Exaustividade igual a 64 (MARINHO et al., 2020). Todas as moléculas de água foram removidas, enquanto cargas de Gasteiger e átomos de hidrogênio essenciais foram adicionados (YAN et al., 2014) usando o ADT-AutoDocktools (MORRIS et al., 2009). A estrutura da proteína foi mantida rígida (NGUYEN et al., 2017) e todas as torções e ligações moleculares dos ligantes foram ajustadas para girar.

Para avaliar a estabilidade do complexo proteína/ligante, utilizou-se como parâmetro a energia de afinidade de acordo com a Equação 4. Para esse critério, valores inferiores a – 6,0 kcal mol<sup>-1</sup> são considerados ideais (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014).

$$\Delta G = -RT \ln K_i$$

Para avaliar a afinidade do ligante pela proteína, utilizou-se o valor da constante de inibição (K<sub>i</sub>) calculada pela Equação 5 (KADELA-TOMANEK et al., 2021).

$$K_i = e^{(\Delta G/RT)}$$

Em que ΔG é a energia livre de ligação em kJ mol<sup>-1</sup>, R é a constante dos gases perfeitos, 8,32 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>, T é a temperatura absoluta, 298 K e K<sub>i</sub> é a constante de inibição.

Para validação estatística das simulações, foram realizados procedimentos de redocagem e, em seguida, foram avaliados os valores do Desvio Quadrático Médio (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) sendo o parâmetro ideal, resultados menores que 2 Å (YUSUF et al., 2008). Para avaliar a força da ligação de hidrogênio, foram utilizados os valores da distância entre os átomos doadores e receptores, sendo classificadas como *Forte*, as

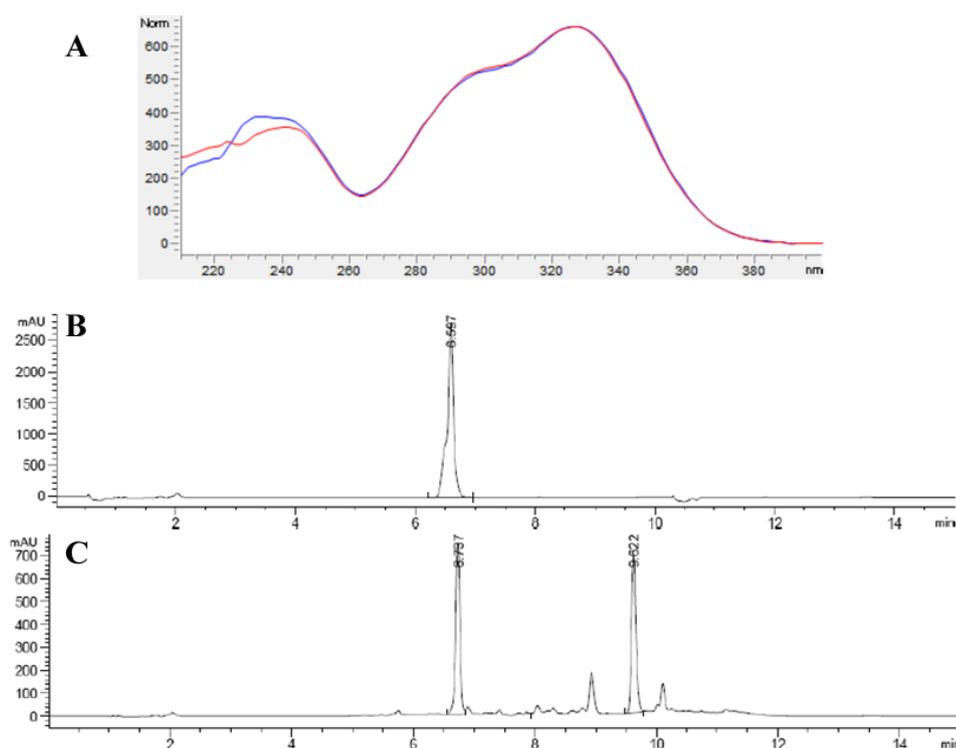
interações que ficaram entre 2,5 Å e 3,1 Å; *Médias* aquelas que ficaram entre 3,1 Å e 3,55 Å; e *Fracas* aquelas com distância maior que 3,55 Å (IMBERTY et al., 1991). Ressaltando que todas as simulações foram com os mesmos parâmetros para obter dados comparativos com o medicamento metformina (3-(diaminometilideno)-1,1-dimetilguanidina; PubChem CID:4091) e com o ligante co-cristalizado acarbose ((2 ~{S},3~{R},4~{R},5~{S},6~{R})-6-(hidroximetil)-5-[(2~{R},3~{R},4~{R},5~{S},6~{R})-6-(hidroximetil)-5-[(2~{R},3~{R},4~{S},5~{S},6~{R})-5-[(1~{S},4~{R},5~{S},6~{S})-3-(hidroximetil)-4,5,6-tris(oxidanil)ciclohex-2-en-1-il]amino]-6-metil 1-3,4-bis(oxidanil)oxan-2-il]oxi-3,4-bis(oxidanil) oxan-2-il]oxi-oxano-2,3,4-triol; PubChem CID: 445421).

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfil químico das folhas de *C. arabica*

Os extratos obtidos das folhas de *Coffea arabica* foram submetidos à análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) seguindo o procedimento descrito do item 4.4.1. A identificação dos metabólitos foi realizada a partir comparação dos espectros de DAD e do tempo de retenção de cada um dos padrões autênticos comercialmente disponíveis durante uma corrida cromatográfica de 15 minutos. Os resultados podem ser observados na Figura 5, tomando como exemplo a identificação do ácido clorogênico obtida a partir dos extratos aquosos e a Figura 6 mostra um exemplo característico de um cromatograma dos extratos aquosos das folhas de *C. arabica*.

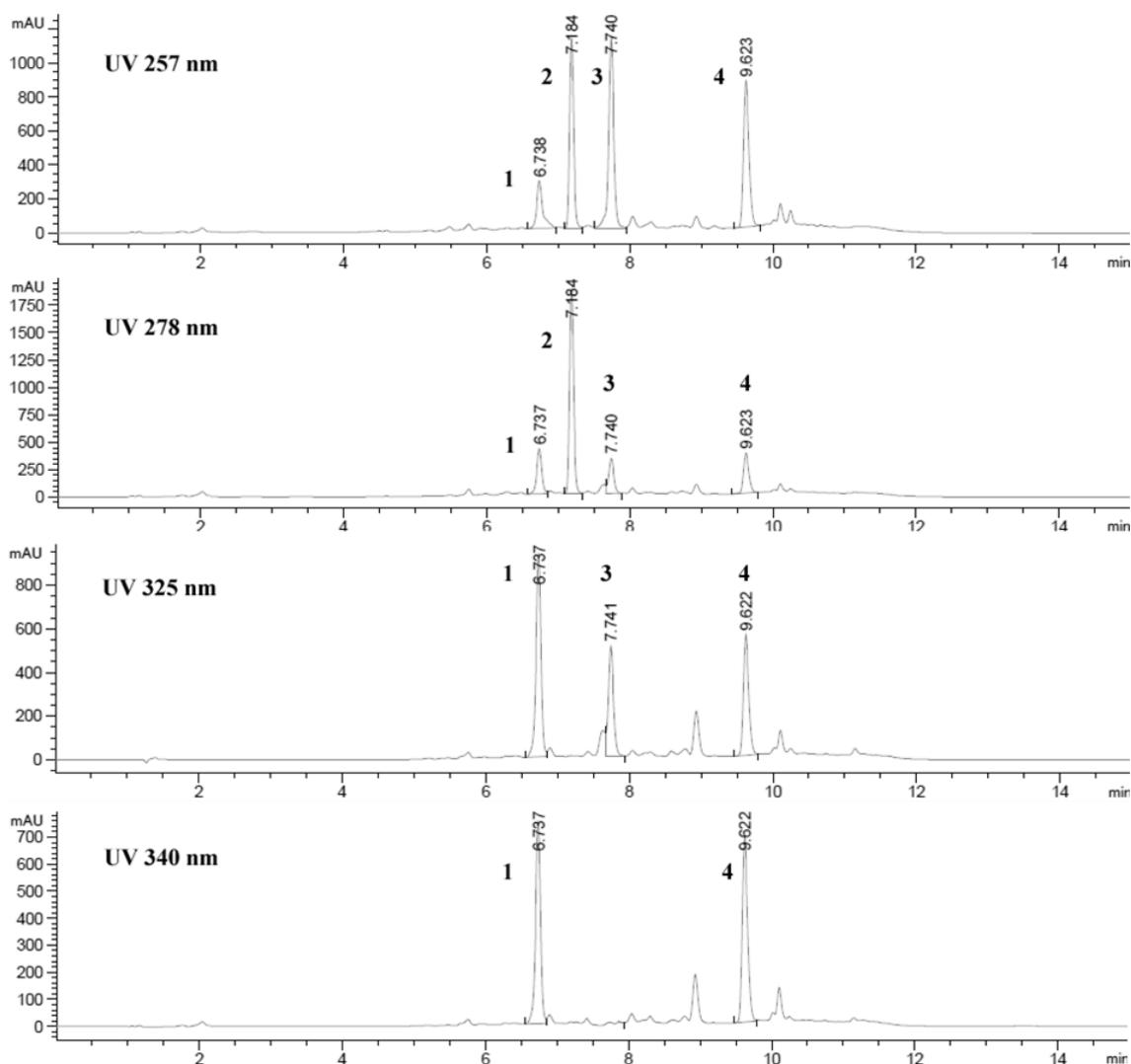
Figura 5 – Superposição dos espectros de DAD e tempo de retenção do ácido clorogênico puro com aquele obtido nos extratos aquosos.



(A) A curva em vermelho representa o composto puro, enquanto a azul indica o obtido nos extratos. (B) Tempo de retenção do ácido clorogênico puro e (C) nos extratos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Cromatograma característico obtido em CLAE-DAD das folhas *C. arabica*.



Os picos correspondem a (1) ácido clorogênico, (2) cafeína, (3) mangiferina e (4) rutina.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se, na Figura 6, picos em 257, 278, 325 e 340 nm, sugerindo a presença de compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides nos extratos aquosos de *C. arabica*. Os compostos fenólicos possuem núcleos aromáticos, muitas vezes conjugados, apresentando, portanto, espectros de absorção característico no ultravioleta (UV), com uma ou mais bandas de absorção entre 200 a 360 nm. Já os flavonoides, geralmente, possuem duas bandas de absorção, sendo a primeira com absorção máxima entre 300 – 400 nm, que está relacionada ao anel A da estrutura química, e a segunda entre 240 – 285 nm, referente ao anel aromático B do arranjo estrutural (Figura 2) (ALEIXANDRE-TUDO; TOIT, 2018). Os cromatogramas de todas as cultivares podem ser conferidos no Apêndice A.

Quanto à quantificação dos compostos bioativos em nesta análise, estas foram feitas a partir das curvas analíticas de cada um dos padrões autênticos puros (Tabela 2). A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos pelas diferentes técnicas de extração.

Tabela 5 - Quantificação dos compostos bioativos majoritários presentes nos extratos de *C. arabica* obtidos em micro-ondas, soxhlet e QuEChERS.

Composto bioativo	Fórmula molecular	Concentração do composto nos extratos (g kg <sup>-1</sup> )		
		Micro-ondas	Soxhlet	QuEChERS
Ácido clorogênico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	17,99 ± 0,43	30,31 ± 0,54	4,92 ± 0,33
Cafeína	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	22,43 ± 0,40	25,11 ± 1,05	ND
Mangiferina	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	10,88 ± 0,28	27,78 ± 0,53	2,78 ± 0,14
Rutina	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	11,73 ± 0,42	25,42 ± 0,49	2,73 ± 0,14

ND = não determinado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode-se observar na Tabela 5 que os extratos obtidos por meio da técnica de micro-ondas apresentaram elevadas quantidades de compostos fenólicos, bem como cafeína, quando comparada aos outros métodos de extração, sendo muito maior do que àquelas obtidas por meio de QuEChERS. Comparando os métodos de micro-ondas e soxhlet pode-se verificar que todos dos extratos, deste último, apresentaram teor de compostos fenólicos e cafeína superior. Isso se deve ao fato de que os extratos metanólicos foram obtidos de forma exaustiva e os aquosos não, uma vez que no soxhlet acontecia a renovação do solvente a cada três horas e na técnica de micro-ondas isso não ocorreu, além disso, o tempo de extração foi apenas de 4 minutos, o que, provavelmente, não levou a saturação do meio. É importante enfatizar que para o consumo humano, o extrato aquoso (ou chá) se apresenta como o método mais seguro, tanto pela praticidade do preparo, quanto pela ausência de solventes tóxicos.

A recuperação dos biocompostos pelo método QuEChERS foi baixa quando comparada com os outros métodos trabalhados. Contudo, devido sua versatilidade, tais como redução no volume de solventes orgânicos e simplicidade de operação, torna esta técnica muito útil que possibilita sua aplicação em qualquer laboratório.

Todas as cultivares, suscetível e resistente a ferrugem do cafeeiro, apresentaram perfil químico semelhante, independentemente do tipo de extração. Observa-se no Apêndice B

que a cultivar Pau Brasil 2 apresentou os maiores níveis de compostos fenólicos em relação as demais. As cultivares Acaiá Cerrado, Topázio e Rubi MG 1192 apresentaram os menores teores, respectivamente, de ácido clorogênico, mangiferina e rutina. Curiosamente, estas três últimas cultivares citadas são suscetível à ferrugem do cafeeiro.

## **5.2 Relação entre os compostos polifenólicos e os metais nas folhas de *Coffea arabica***

### **5.2.1 Análise das variáveis**

Tomou-se como ponto de partida a quantificação de todos os compostos fenólicos (Apêndice C), bem como os metais (Apêndice D) presentes nas folhas de café das cultivares obtidas pela Epamig.

Os extratos obtidos pela técnica QuEChERS foram submetidos a análise de CLAE com detecção de UV e IES para a realização da identificação e quantificação dos compostos ácido clorogênico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, mangiferina, quercetina diglicosídeo, quercetina 3-O-glicosídeo, quercetina ramnogalactosídeo, rutina e rutina glicosídeo. Os ensaios foram feitos em triplicatas e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Os compostos polifenólicos estão relacionados aos mecanismos de defesa das plantas e este ocorre em duas etapas. Na primeira ocorre um rápido acúmulo de fenólicos no local da infecção que retarda o crescimento do patógeno e na segunda ocorre a biossíntese de substâncias específicas relacionadas ao estresse (fenóis simples, fitoalexinas fenólicas, ácidos hidroxicinâmicos etc.) que restringem o patógeno no local infectado. O processo passo a passo do mecanismo de defesa da planta inclui a morte da célula hospedeira, necrose, acúmulo de compostos fenólicos, modificação da parede celular através da deposição de compostos fenólicos ou desenvolvimento de barreiras e, finalmente, síntese de compostos tóxicos específicos para eliminar os patógenos (HAMMERSCHMIDT, 2018; CHOWDHARY et al., 2021).

Quanto aos elementos inorgânicos, estes foram quantificados por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) e os dados, obtidos em triplicata, foram expressos em média com desvio padrão não superiores a 10%, indicando boa precisão. A análise de ICP-OES é muito importante pois muitas proteínas e enzimas estão fortemente ligadas a metais que são cofatores essenciais para o bom funcionamento de

processos bioquímicos (MARTHE; AUGUSTI; COSTA, 2015; OLIVEIRA et al., 2017). Alguns autores relataram uma relação entre compostos polifenólicos e alguns elementos inorgânicos, bem como uma capacidade de elicitar respostas antioxidantes (CETINKAYA; KOC; KULAK, 2016; FARZADFAR; ZARINKAMAR; HOJATI, 2017; MANQUIÁN-CERDA et al., 2018).

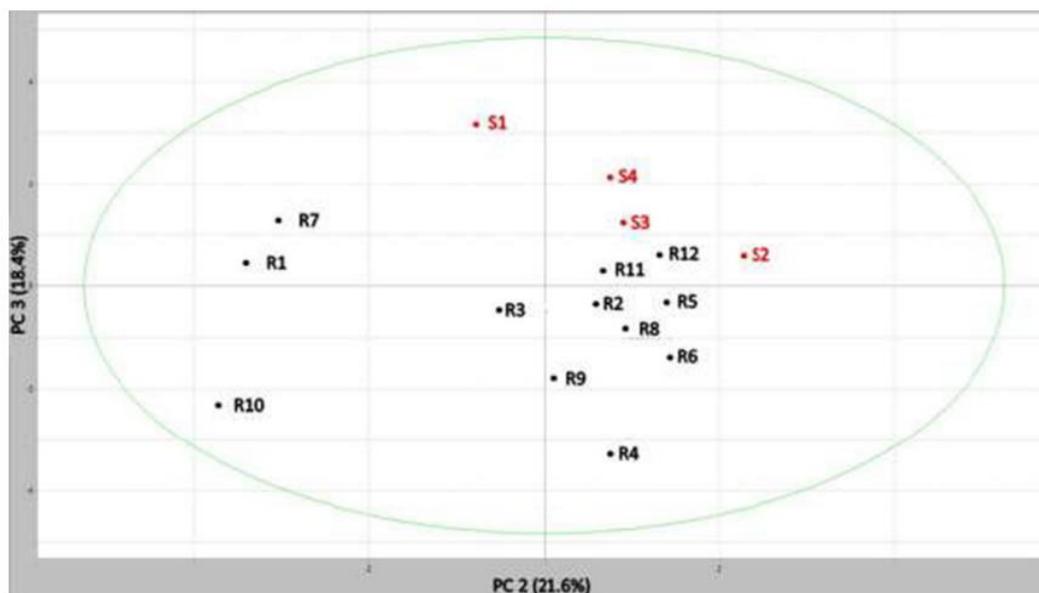
Por exemplo, o alumínio é um elemento tóxico para as plantas vasculares e a biodisponibilidade deste elemento pode aumentar em solos com baixos valores de pH. Uma concentração aumentada de alumínio em plantas vasculares correlaciona-se com níveis mais elevados de compostos polifenólicos (GONZÁLEZ-MENDOZA et al., 2020). O cobre é um elemento traço essencial e atua como cofator em enzimas como superóxido dismutase e polifenoloxidase (BOECKX et al., 2017). O manganês e o magnésio são cofatores nas enzimas terpeno sintases responsáveis pela formação de sesquiterpenos e monoterpênicos. Além disso, o magnésio mostra uma relação com a fotossíntese (FARZADFAR; ZARINKAMAR; HOJATI, 2017). Por fim, o níquel é um eliciador de atividades antioxidantes, envolvido na resposta de superóxido dismutase, catalase, guaiacol peroxidase entre outras enzimas em cafeeiros como indicado na literatura (RIZWAN et al., 2018).

Devido ao grande número de variáveis presentes em um determinado estudo uma avaliação visual dos dados pode trazer contribuições mínimas, portanto a análise multivariada pode ser muito útil na tentativa de reconhecer padrões específicos.

### ***5.2.2 Análise de Componentes Principais***

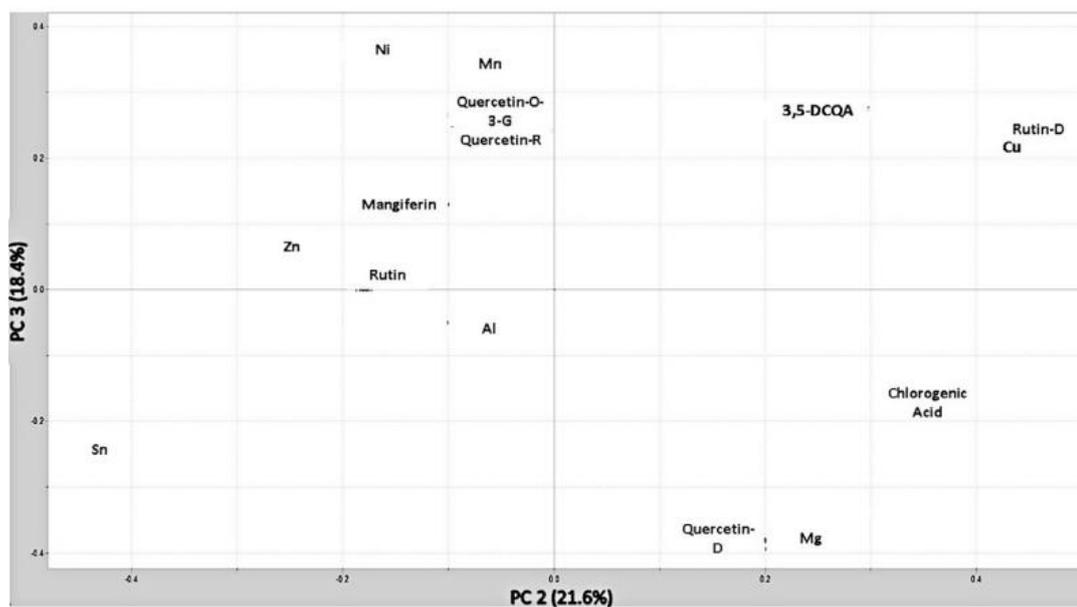
A Análise dos Componentes Principais (PCA) foi realizada com o objetivo de compreender a relação entre a concentração de compostos polifenólicos e os elementos inorgânicos presentes nas amostras foliares dos diferentes cafeeiros. Dois gráficos são úteis para analisar e extrair informações dos dados: um está relacionado às variáveis (*Scores*) e o outro está relacionado às amostras (*Loadings*). Os gráficos de *Scores* e *Loadings* são mostrados nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

Figura 7 – Gráfico de *Scores* de PCA (Fator 2 × Fator 3) de 16 cultivares de *C. arabica*.



Fonte: Elaborador pelo autor.

Figura 8 – Gráfico de *Loadings* de PCA (Fator 2 × Fator 3) de 16 cultivares de *C. arabica*.



Fonte: Elaborador pelo autor.

Foram utilizados seis componentes principais que representam 85 % do conjunto de dados, porém a observação da separação dos dados foi observada em dois componentes principais.

Em relação aos dados do PCA, o primeiro Componente Principal (PC1) apresenta 23,2 % da variância dos dados e a plotagem de PC2 (variância de 21,6 %) versus PC3

(variância de 18,4 %) mostrou-se mais útil para a separação do grupo amostral. O segundo e o terceiro componente principal juntos representam um total de 40 % da variância. Esses dois últimos componentes foram responsáveis pela separação dos grupos no presente estudo.

O gráfico de *Scores* (Figura 7) mostra uma tendência de separação das cultivares de café que apresentam suscetibilidade à ferrugem no PC3. O segundo componente principal mostra a separação de um grupo distinto das cultivares Rubi MG 1192, Topázio MG 1190, MGS Travessia, Sarchimor MG 8840 e Sacramento MG1 (S2, S3, S4, R11 e R12). Dentre essas cultivares, apenas Sarchimor MG 8840 e Sacramento MG1 (R11 e R12) não são suscetíveis à ferrugem, embora apresentem suscetibilidade ao nematoide e à infecção fúngica por *Cercospora coffeicola*, respectivamente. A cultivar Acaiá Cerrado MG 1474 (S1) apresenta suscetibilidade à ferrugem, estando na mesma região do grupo anterior, porém um pouco mais distante, pois é o único de estatura superior.

O gráfico de *Loadings* (Figura 8) apresenta a influência das variáveis para a separação dos grupos. Nesta parcela, pode-se observar que as variáveis: ácido 3,5-dicafeoilquínico, rutina glicosídeo e cobre são as principais responsáveis pela separação das espécies suscetíveis à ferrugem.

A resposta defensiva das plantas a patógenos ou insetos é complexa e pode ser bastante específica (MONTEIRO et al., 2016), entretanto, alguns metabólitos secundários são conhecidos por participarem dos mecanismos de defesa das plantas, entre eles estão compostos polifenólicos, terpenos e compostos contendo nitrogênio/enxofre (ZAYNAB et al., 2018).

Mesmo que os mecanismos sejam distintos, a primeira resposta contra patógenos é a geração de espécies reativas de oxigênio e o acúmulo de compostos fenólicos (MONTEIRO et al., 2016). Como pode ser observado na Figura 8, as cultivares suscetíveis à ferrugem estão principalmente em uma região onde aparecem com 2 compostos fenólicos específicos: rutina glicosídeo e ácido 3,5-dicafeoilquínico. Todos os outros compostos estão distribuídos fora desse quadrante, indicando uma baixa contribuição para a discriminação desses metabólitos nas folhas de café. Isso é um indício de que o teor de compostos polifenólicos é uma variável importante para a compreensão do mecanismo de defesa das plantas contra patógenos.

O elemento cobre é um cofator da enzima polifenoloxidase e esta tem sido relacionada aos mecanismos de defesa das plantas, pois oxida compostos fenólicos formando quinonas que possuem ação fungicida (BOECKX et al., 2017). As plantas suscetíveis à ferrugem apresentam concentrações de cobre 48,75 % superiores às resistentes (valores

médios de 235,28 e 114,71 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Muito provavelmente, devido a uma maior exigência na formação de enzimas para defender a planta contra a infecção por patógenos. Além disso, relatos na literatura correlacionam a concentração de cobre nas folhas com a diminuição tanto do conteúdo polifenólico, quanto da atividade antioxidante.

O ácido clorogênico é comumente relacionado à resistência de plantas a doenças. Alguns estudos relatam a possibilidade deste composto ser ativo na resistência a infecções por ferrugem (CLIFFORD; KERIMI; WILLIAMSON, 2020). Há indicações na literatura de que o ácido clorogênico é antifúngico e antimicrobiano (EL KHOMSI et al., 2022). LIAO et al. (2020), observaram em seus estudos, *in vivo*, um aumento acentuado de ácido clorogênico nas folhas de batata doce após o ataque do gorgulho. O grupo de cultivares suscetíveis tem concentrações mais baixas de ácido clorogênico (teor médio de 3,25 g kg<sup>-1</sup>) do que as cultivares resistentes (teor médio de 4,79 g kg<sup>-1</sup>) no presente estudo. O teor de ácido clorogênico é quase 68 % maior em cultivares resistentes.

A mangiferina é uma xantona com propriedades antimicrobianas e antioxidantes responsáveis além de proteção contra a radiação UV (GUNTER et al., 2020). Alguns relatos na literatura observaram um aumento de xantonas quando a planta é infectada por alguns patógenos (TONIUTTI et al., 2017). A concentração desse composto é 65,60 % menor nas árvores suscetíveis do que nas resistentes (os valores médios são 1,74 e 2,65 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Este composto também é eficaz na eliminação de radicais livres, que é uma das primeiras respostas das plantas quando está sob estado de estresse (GUNTER et al., 2020). Este metabólito é separado dos demais pelo terceiro componente principal.

O magnésio participa de diversas atividades biológicas como fotossíntese, metabolismo energético e de nucleotídeos e há relatos de sua interação com o Mn em plantas. O manganês é um elemento essencial para as plantas, sendo um ativador de várias enzimas, incluindo enzimas de oxidação-redução. Uma alta concentração de Mn está relacionada à deficiência de Mg em plantas superiores (FARZADFAR; ZARINKAMAR; HOJATI, 2017). Como pode ser visto nos gráficos de PCA, esses elementos estão em posições opostas, o que comprova a evidência da literatura, com maior concentração de Mg nas amostras resistentes. Nos estudos de FARZADFAR; ZARINKAMAR; HOJATI (2017), foi observado um aumento nos ácidos polifenólicos quando a concentração de Mg foi aumentada, durante a análise da composição do óleo essencial em *Tanacetum parthenium*. No mesmo estudo, observou-se aumento da atividade polifenoxidase quando há Mn livre. Esses dados explicam o posicionamento do Mg intimamente alinhado às amostras de folhas de café que também

apresentam altas concentrações de ácido clorogênico e Mn intimamente alinhado ao Cu, que está relacionado à atividade polifenoloxidase.

A produção de compostos polifenólicos em plantas, atua alterando a permeabilidade das células contra micróbios o que está relacionado a alterações na produção de ATP (ZAYNAB et al., 2018). Deve-se enfatizar também que o Mg, geralmente, está correlacionado com esta função nas plantas, então é esperado que maiores quantidades desse elemento estejam relacionadas a plantas que são mais resistentes a doenças. Além disso, o aumento do teor de magnésio está relacionado à formação de sesquiterpenos, como as fitoalexinas, compostos conhecidos por prevenir doenças de plantas (FARZADFAR; ZARINKAMAR; HOJATI, 2017; ZAYNAB et al., 2018). O teor de magnésio nas folhas resistentes é 47,10 % maior do que nas suscetíveis (valores médios 1279,25 e 602,44 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente).

O níquel está relacionado à eliciação de respostas antioxidantes (RIZWAN et al., 2018) e diminui a atividade da superóxido dismutase e outras enzimas redox. O zinco é um elemento essencial e sua concentração está relacionada à qualidade do café. LACERDA et al. (2018), relataram que um aumento na concentração de Zn resulta em diminuição do teor de polifenóis totais e ácido clorogênico, justificando a localização desses elementos no PCA. O alumínio, por outro lado, está relacionado ao aumento de compostos polifenólicos como mecanismo de defesa da planta contra a toxicidade desse elemento (MANQUIÁN-CERDA et al., 2018).

Os dados descritos fornecem uma visão sobre a capacidade de compostos polifenólicos e os elementos inorgânicos como participantes nas vias de defesa do cafeeiro e especialmente para a diferenciação potencial de plantas de café suscetíveis e resistentes à ferrugem.

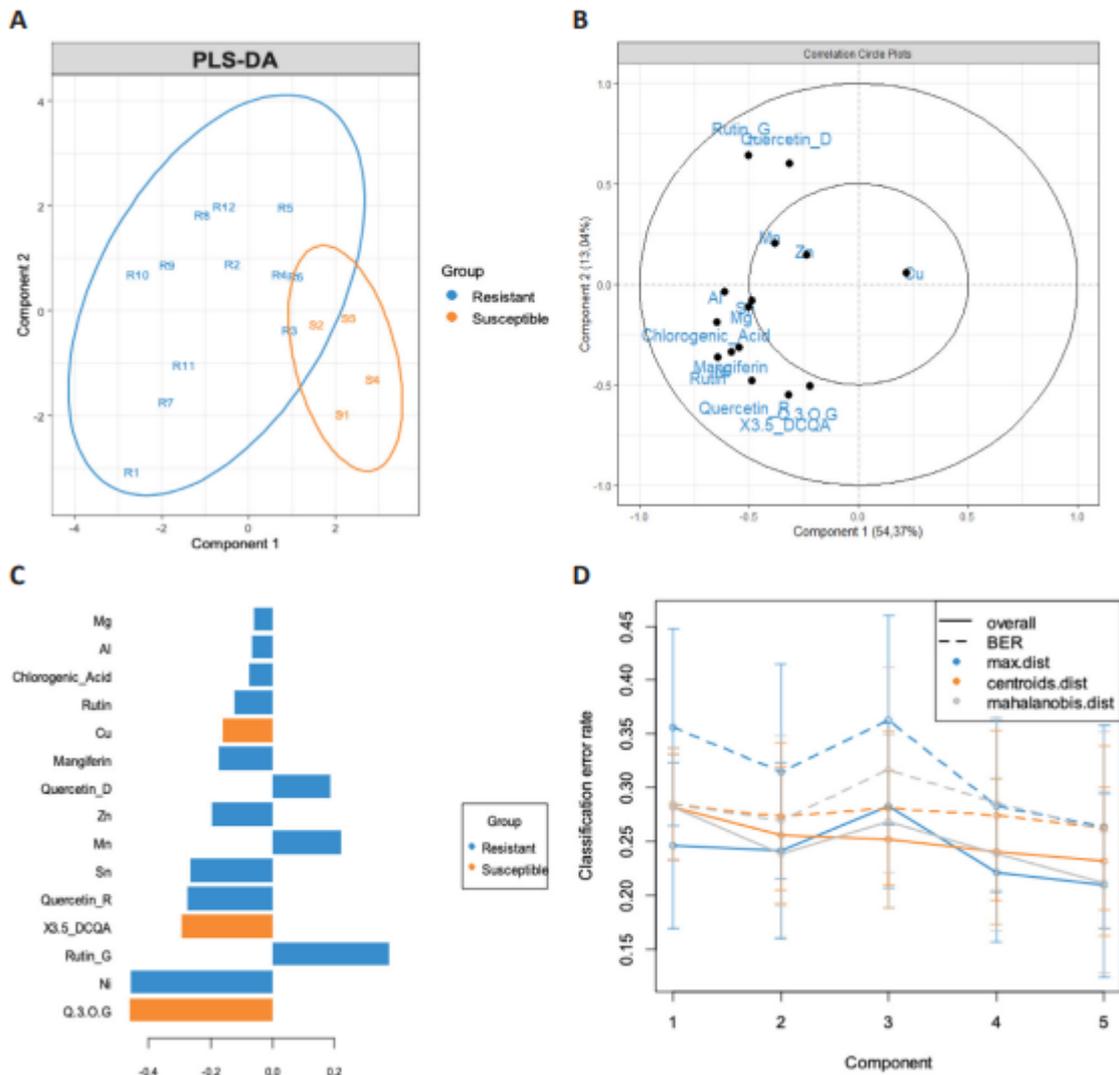
### **5.2.3 Análise PLS-DA**

Dois métodos foram utilizados para avaliar e discriminar grupos de *C. arabica* suscetíveis (GS) e resistentes (GR) à ferrugem quanto à composição química da folha, o método PCA não supervisionado e o método de classificação PLS-DA supervisionado. Pela primeira vez, essas análises foram aplicadas em conjunto para discriminar grupos de *C. arabica* suscetíveis e resistentes à ferrugem quanto à composição química da folha.

A PCA forneceu uma visão geral do comportamento das cultivar de café em relação ao teor de variáveis químicas, mas não foram obtidas informações detalhadas sobre as

diferenças entre os grupos de cultivares resistentes e suscetíveis à ferrugem. Assim, o modelo de classificação PLS-DA foi construído para discriminar grupos de cultivares resistentes e suscetíveis à ferrugem quanto à composição química das folhas de café.

Figura 9 – Análise das cultivares resistentes e suscetível pelo modelo PLS-DA.

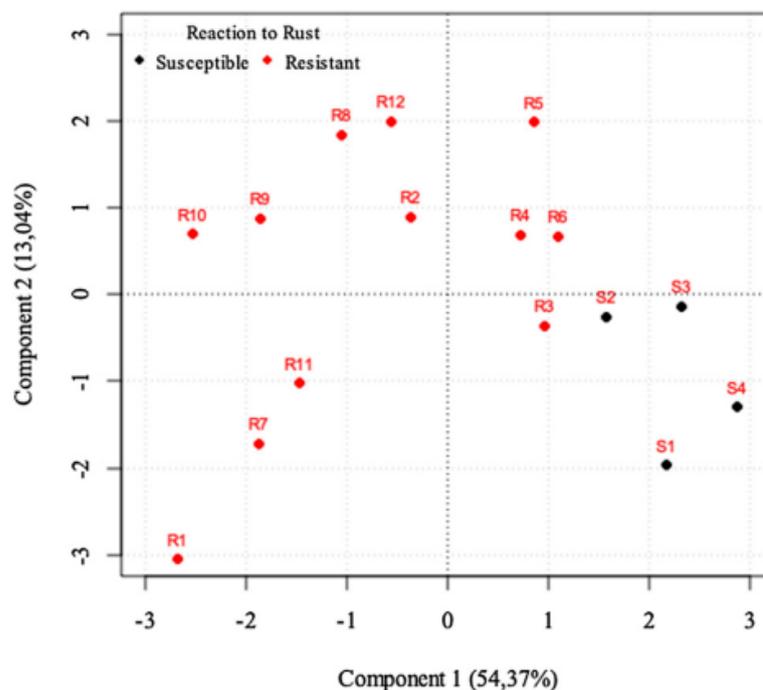


(A) Gráfico de *Scores* de PLS-DA de dois componentes para a composição química que diferencia os grupos de resistência à ferrugem. (•) Resistente, (◐) Suscetível (B) Correlação dos metabólitos com os componentes 1 e 2 com as classes Resistente e Suscetível (C) Cargas do componente 2 do modelo PLS-DA de compostos químicos para cada grupo. (D) A taxa de erro de classificação gerada para os componentes do modelo PLS-DA por meio de procedimento de validação cruzada usando 5 partes (5 vezes) do conjunto de dados para ajustar o modelo e o restante para testá-lo em 100 simulações.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 9A apresenta a projeção das amostras dos códigos de acesso nos 2 componentes do PLS-DA, dada pelas cargas dos respectivos componentes da matriz X. Observou-se uma sobreposição de grupos de cultivares, indicando que há uma região em comum entre os códigos de acesso, como pode ser visto nas elipses de 95 % de confiança (Figura 9A) e a maior evidência de sobreposição pode ser verificada para o grupo de cultivares suscetíveis à ferrugem (GS). O código de acesso é classificado no grupo com maior carga no componente PLS-DA com melhor taxa de erro (Figura 9D). Assim, a Figura 9 mostra as classificações resultantes do modelo PLS-DA e observa-se que foi possível discriminar todos as cultivares suscetíveis e resistentes à ferrugem de acordo com os compostos químicos (Figura 10 e Apêndice C). Os códigos de acesso que obtiveram a melhor taxa de classificação correta foram os classificados no grupo GR por apresentar a menor taxa de erro (16,75 %).

Figura 10 – Pontuações PLS-DA de dois componentes para a composição química com as classificações de grupos genealógicos.



Grupos (• R) resistente e (• S) suscetível.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As Figuras 9B e 9C (Gráfico de Correlação e Cargas de Variáveis no Componente 2 do PLS-DA) mostram as variáveis que mais influenciaram na classificação das cultivares dos grupos GS e GR. As variáveis Al, Mg, Mn, Sn, Ni e Zn (elementos em nível traço) e

compostos polifenólicos como ácido clorogênico, rutina, mangiferina, quercetina-3-O-diglicosídeo, quercetina-3-O-ramnogalactosídeo e rutina glicosídeo foram mais influentes na classificação do grupo GR. Por outro lado, o cobre juntamente com o ácido 3,5-dicafeoilquínico e a quercetina-3-O-diglicosídeo influenciaram ainda mais a classificação do grupo GS.

Para verificar e validar o modelo criado, foi utilizada a taxa de erro de classificação (Figura 9D) e a menor taxa de erro foi encontrada para o componente 5 (31,50 %). A taxa de erro foi obtida pelo procedimento de validação cruzada usando 5 partes (5 vezes) do conjunto de dados para ajustar o modelo e o restante para testá-lo em 100 simulações.

Dentro de cada grupo, resistente e suscetível, é possível identificar as cultivares destacadas para essas variáveis. R1, R7, R9, R10 e R11, S1 e S4 foram corretamente classificadas pelo modelo PLS-DA (Tabela 6) e permaneceram mais distantes dos grupos de regiões, como pode ser visto em comparação das Figuras 9A e 10. Assim, a diagonal formada pelos valores 12 e 4 são as classificações corretas do modelo.

Tabela 6 – Contagens de falsos positivos e negativos com referência à classificação dos grupos suscetíveis e resistentes à ferrugem pelo modelo PLS-DA.

Grupo de cultivares	Classificação pelo modelo PLS-DA		Total
	Resistente (GR)	Suscetível (GS)	
Resistente (GR)	12	0	12
Suscetível (GS)	0	4	4
Total	12	4	
Classificação da taxa de erro	16,75 %	46,25 %	–
Taxa de erro global	31,50 %	–	–

Fonte: Elaborado pelo autor.

Por se tratar de uma análise não supervisionada, o PCA não foi eficiente para agrupar as cultivares de acordo com a resistência à ferrugem a partir de dados químicos analisados em folhas de café. Portanto, o PLS-DA foi necessário como ferramenta útil para esta proposta. Os resultados do modelo PLS-DA mostraram as variáveis que mais

influenciaram na classificação dos grupos e, portanto, foram identificados os possíveis marcadores químicos para as cultivares suscetíveis e resistentes à ferrugem.

No entanto, trabalhos mais elaborados com um número muito maior de amostras de diferentes localidades e submetidas a diferentes níveis de estresse (seca, pluviosidade elevada, contaminação do solo) devem ser analisados para resultados mais consistentes para a previsão de resistência e suscetibilidade à ferrugem em cafeeiros.

### 5.3 Teste de secagem e preservação dos metabólitos principais para infusões

As folhas de café da cultivar Mundo Novo foram desidratadas por quatro diferentes técnicas de secagem: natural, forno, micro-ondas e Air Fryer e os resultados da análise quantitativa, em  $\text{g kg}^{-1}$  de peso seco, dos compostos bioativos majoritários estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Análise quantitativa dos principais componentes bioativos das folhas de *C. arabica* em diferentes métodos de secagem.

Secagem	Metabólitos majoritários ( $\text{g kg}^{-1}$ )			
	Ácido Clorogênico	Cafeína	Mangiferina	Rutina
Natural	8,43	32,26	16,19	2,22
Forno	28,96	27,56	22,11	3,13
Micro-ondas	32,23	28,79	35,02	4,73
Air Fryer	39,78	30,84	20,09	3,52

Fonte: Elaborado pelo autor.

A influência da secagem natural no teor dos metabólitos secundários é notória como podemos observar a Tabela 7. Os compostos polifenólicos apresentaram o menor teor, quando comparado aos demais métodos, principalmente de ácido clorogênico. A cafeína, por outro lado, apresentou o maior rendimento. De todas as técnicas analisadas, esta é a única que não submete as folhas a um estresse térmico e, conseqüentemente, as enzimas oxidativas não são desnaturadas durante a secagem do material.

A secagem por forno, também chamada de convecção, é aquela em que uma corrente de agente secante (gás seco, na maioria das vezes ar) flui ao redor do material vegetal trazendo calor e removendo a umidade. Em relação a secagem natural, esse método conseguiu

preservar o teor de compostos fenólicos e também da cafeína, se apresentando como um método eficiente para a conservação de metabólitos e suas, respectivas, propriedades farmacológicas.

A secagem por micro-ondas também foi avaliada e a análise química das amostras secas mostrou que todos os metabólitos foram preservados e, dentre todos os métodos trabalhados, este apresentou o melhor equilíbrio no teor dos compostos bioativos como presente na Tabela 7. O método de secagem por micro-ondas é uma alternativa eficiente para secar o tecido foliar de *C. arabica*, pois reduz o tempo de secagem para 90 segundos, além de preservar o teor de mangiferina, um metabólito eficaz na inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase (BEZERRA et al., 2019).

Apesar do pequeno espaço para acondicionamento das folhas na Air Fryer, essa secagem apresentou rendimentos semelhantes ao obtido por micro-ondas. Embora o teor de ácido clorogênico e cafeína tenham sido maiores, a mangiferina e rutina foram melhor preservadas pela secagem em micro-ondas. Ainda sobre o ácido clorogênico, seu teor foi superior em comparação a qualquer outro método de secagem.

Dois pontos importantes foram observados quanto a secagem do material vegetal: o efeito térmico e o tempo de secagem. A exposição a altas temperaturas parece ter efeito positivo na preservação dos compostos bioativos, desde que não seja um processo moroso, pois quanto maior tempo de secagem, maior será a degradação dos compostos fenólicos presentes na amostra. As altas temperaturas das micro-ondas geram degradação da parede celular da planta, causando a remoção de água e, por sua vez, a extração de compostos intracelulares, como os polifenóis (JIMENEZ-GARCIA et al., 2020). A atividade antioxidante também é elevada devido a maior preservação dos compostos fenólicos (SNOUSSI et al., 2021). NGAMSUK, HUANG e HSU (2019) em seus estudos, verificaram que o teor dos compostos bioativos e de fenólicos totais, bem como a atividade antioxidante, das folhas de *C. arabica*, aumentaram, significativamente, quando a secagem ocorreu a 50 °C, em relação a temperaturas menores. Além disso, foi evidente uma alta correlação entre o teor de fenólicos totais e a atividade de eliminação de radicais DPPH•.

Os extratos aquosos, presentes nesta análise, foram obtidos por meio da técnica de micro-ondas e posteriormente analisados por CLAE. Os principais metabólitos foram identificados pelos tempos de retenção e pela comparação dos espectros de DAD dos padrões autênticos puros. É importante destacar que métodos diferentes no preparo do extrato podem influenciar na concentração de compostos fenólicos, visto que a solubilidade destas substâncias depende da polaridade dos solventes utilizados (SANTOS; GONÇALVES, 2016).

Plantas medicinais fazem parte do arsenal terapêutico familiar e seu uso seguro e racional através de infusão das folhas, por exemplo, pode ser muito útil na prevenção e/ou tratamento de muitas doenças. Contudo, a preservação dos princípios ativos após o preparo do chá é de muita importância para um tratamento eficaz.

## 5.4 Teor dos fenólicos totais e a capacidade antioxidante

### 5.4.1 Relação entre TFT e o radical DPPH•

A estimativa do TFT e a avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos, dos metabólitos secundários isolados e do controle positivo (BHT) a partir do método de captura do radical DPPH• foram realizadas e relacionadas em busca uma possível correlação entre essas variáveis. Todos esses dados podem ser conferidos na Tabela 8.

Os extratos aquosos de *C. arabica* apresentaram forte atividade antioxidante com valor de  $IC_{50}$  igual a  $32,28 \pm 0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$  (valor referente a média das 16 cultivares), cerca de nove vezes menor em relação ao controle positivo ( $IC_{50} = 289,17 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O BHT foi utilizado como controle positivo neste teste, pois esta substância é comumente utilizada na indústria alimentícia como antioxidante sintético (MIRA-SÁNCHEZ; CASTILLO-SÁNCHEZ; MORILLAS-RUIZ, 2020). A forte atividade antioxidante dos extratos pode ser atribuída à presença de fenólicos que já são estabelecidos como potentes sequestrantes de radicais livres por muitos estudos (MUFLIAH; GOLLAVELLI; LING, 2021) e os extratos aquosos das folhas de café apresentaram valores de TFT iguais a  $608,70 \pm 0,02 \text{ mg EAG g}^{-1}$ , uma quantidade muito expressiva quando comparados aos extratos de plantas medicinais do Parque Estadual do Cocó (MORAIS et al., 2021).

Apesar da determinação de TFT ser simples, reprodutível e barata, uma das limitações na interpretação dos resultados obtidos é o fato de ser um método pouco específico tanto para os fenóis como para os antioxidantes em geral, uma vez que o número de grupos fenol e algumas substâncias presentes na amostra, tais como aminas aromática, metais, como o cobre (I) ou ferro (II), elevados níveis de açúcares, podem atuar como interferentes, que por sua vez, podem reduzir o reagente Folin-Ciocalteu resultando num falso aumento do conteúdo fenólico (XIAOWEI et al., 2021). Contudo é aceitável para tirar as primeiras informações gerais acerca da atividade antioxidante das amostras em estudo.

Tabela 8 - Valores de TFT e IC<sub>50</sub> para o ensaio de DPPH• dos extratos aquosos de *C. arabica*, metabólitos secundários isolados e controle positivo.

Amostras	IC <sub>50</sub> (DPPH, µg mL <sup>-1</sup> )	TFT (mg EAG g <sup>-1</sup> )
Acaíá Cerrado MG 1474	32,91 ± 0,09	471,70 ± 0,01
Araponga MG1	20,95 ± 0,08	812,11 ± 0,02
Catiguá MG1	27,67 ± 0,08	640,00 ± 0,01
MGS Amestista	24,12 ± 0,09	767,10 ± 0,01
MGS Aranas	25,51 ± 0,08	754,60 ± 0,01
MGS Catiguá 3	28,49 ± 0,09	646,30 ± 0,01
MGS Paraíso 2	25,48 ± 0,08	755,80 ± 0,02
MGS Travessia	24,89 ± 0,07	767,10 ± 0,03
Oeiras MG 6851	39,29 ± 0,09	455,00 ± 0,02
Paraíso MG H 419-1	28,99 ± 0,10	543,80 ± 0,02
Pau Brasil H-518	25,56 ± 0,10	718,80 ± 0,01
Pau Brasil MG1	68,50 ± 0,10	241,70 ± 0,01
Rubi MG 1192	44,73 ± 0,10	417,90 ± 0,02
Sacramento MG1	17,79 ± 0,08	816,70 ± 0,03
Sarchimor MG 8840	29,18 ± 0,09	539,20 ± 0,03
Topázio MG 1190	52,39 ± 0,10	391,30 ± 0,01
Média das 16 cultivares	32,28 ± 0,09	608,70 ± 0,02
Mangiferina	27,62 ± 0,02	—
Rutina	40,12 ± 0,02	—
Ácido clorogênico	50,56 ± 0,11	—
Cafeína	NS	—
BHT (controle)	289,17 ± 0,03	—

NS = não significativo.

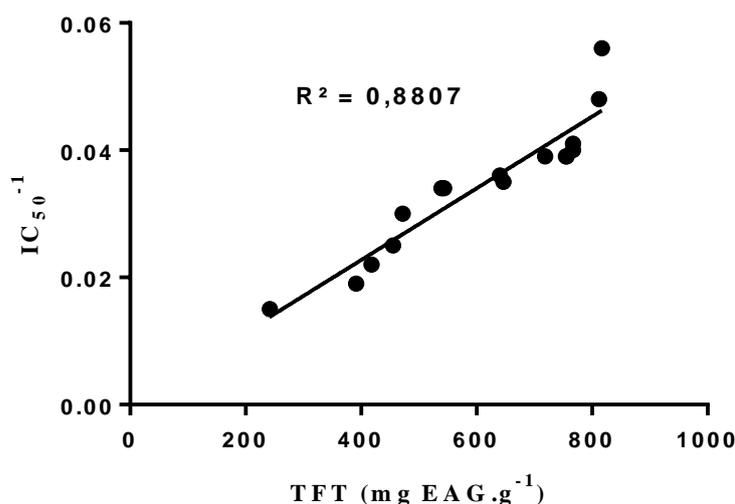
Fonte: Elaborado pelo autor.

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH• dos compostos fenólicos pode ser atribuída a sua estrutura, particularmente do número e da posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos.

Na Figura 11, que representa a correlação entre o inverso da capacidade antioxidante (IC<sub>50</sub><sup>-1</sup>) e o TFT, podemos observar uma ótima correlação (R<sup>2</sup> = 0,8807) entre

concentração de polifenóis e a atividade antioxidante, sugerindo que 88,07 % dessa atividade é devido à contribuição dos compostos fenólicos, principalmente a mangiferina. Essa substância apresenta forte capacidade antioxidante, impedindo a produção de radicais livres devido à sua capacidade quelante de ferro. Estudos anteriores, mostraram que a administração oral de mangiferina ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) diariamente em ratos diabéticos, durante um mês, reduziu, significativamente, as taxas de açúcar no sangue e os níveis elevados de insulina no plasma, além de aumentar enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase nos fígados de ratos diabéticos em comparação com ratos controle (IMRAN et al., 2017). A mangiferina apresentou a melhor atividade antioxidante ( $\text{IC}_{50} = 27,62 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) contribuindo, expressivamente, com os extratos de café na captura do radical DPPH•.

Figura 11 – Correlações dos valores de  $\text{IC}_{50}^{-1}$  e TFT dos extratos de *C. arabica*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Também é notória a contribuição da rutina ( $\text{IC}_{50} = 40,12 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e do ácido clorogênico ( $\text{IC}_{50} = 50,56 \pm 0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Vários mecanismos já foram estudados para justificar a atividade antioxidante da rutina, em modelos *in vitro* e *in vivo*, como por exemplo a sua estrutura química capaz de eliminar diretamente as ERO, o aumento da expressão de inúmeras enzimas antioxidantes e a capacidade de inibir a xantina oxidase, uma enzima que está envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio (ENOGIERU et al., 2018). Quanto ao ácido clorogênico sua atividade antioxidante é atribuída a doação de átomos de hidrogênio pelos para reduzir os radicais livres e inibir as reações de oxidação. Após essa doação, os

ácidos clorogênicos são oxidados aos respectivos radicais fenoxila que são rapidamente estabilizados por ressonância (FARHOOD et al., 2019). E quanto a cafeína, essa substância não apresentou capacidade de eliminação de radicais livres de forma significativa. Estudos anteriores, mostraram que qualquer dosagem de cafeína não teve efeitos antioxidantes positivos ou negativos, *in vivo*, nos níveis de enzimas oxidativas (DEMIR et al., 2016). XU et al. (2020) em suas análises *in vitro*, também verificou que a cafeína não reduziu os níveis de radicais livres corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Os compostos fenólicos são agentes potenciais para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade e diabetes. Considerando os estudos *in vitro* e *in vivo*, os mecanismos envolvidos na perda de peso nos quais os polifenóis podem desempenhar um papel são: ativação de processos de  $\beta$ -oxidação; indução de saciedade; estimulação do gasto energético; inibição da diferenciação de adipócitos; promoção da apoptose dos adipócitos, aumento da lipólise; e melhora do distúrbio do metabolismo lipídico. No entanto, a dosagem ideal de polifenóis capaz de maximizar os benefícios à saúde sem levantar problemas de toxicidade ainda precisa ser elucidada (BOCCCELLINO; D'ANGELO, 2020).

#### 5.4.2 Capacidade de captura de EROS

Os extratos, aquosos e metanólicos, das folhas de café foram capazes de desativar as espécies reativas de oxigênio conforme pode ser observado Tabela 9. O ácido *p*-cumárico foi utilizado como controle positivo nessas análises.

Tabela 9 – Capacidade de captura de ERO dos extratos de *C. arabica* e controle positivo.

Amostras	IC <sub>50</sub>			ROO• ( $\mu\text{mol ET mg}^{-1}$ )
	O <sub>2</sub> • (mg mL <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	HOCl (mg mL <sup>-1</sup> )	
Extratos aquosos	24,90 ± 1,32	0,18 ± 0,12	0,29 ± 2,90	5008 ± 2,98
Extratos metanólicos	44,99 ± 1,94	0,27 ± 0,75	0,44 ± 4,66	3036 ± 1,20
ácido <i>p</i> -cumárico	42,68 ± 5,79	0,21 ± 0,04	3,94 ± 4,98	4595 ± 4,30

ET: equivalentes de trolox. Resultados, em triplicatas, expressos como média ± desvio padrão. ANOVA one-way seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Elaborado pelo autor.

Os extratos aquosos de folhas de café foram mais eficazes na eliminação do radical superóxido e do ácido hipocloroso em relação aos extratos metanólicos e ao controle positivo justificado pelos menores valores de  $IC_{50}$  presentes a Tabela 9. A eficácia das folhas de café pode ser confirmada pela comparação do estudo realizado por SOARES et al. (2019). Em seus trabalhos, foi investigada a atividade antioxidante de frutas brasileiras não convencionais e os resultados de  $IC_{50}$ , dos seus ensaios, variaram de 68,33 a 1447,94  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a captura de  $O_2^{\bullet-}$  e 4,41 a 41,11  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o sequestro do  $HOCl$ .

Ambos extratos de café, ( $IC_{50} = 0,18 \pm 0,12$  e  $0,27 \pm 0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ ), foram eficazes na captura do peróxido de hidrogênio, muito semelhante ao controle positivo ( $0,21 \pm 0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Os dados obtidos para os extratos de *C. arabica* são comparáveis com os resultados para extratos de limão ( $0,14 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e açaí ( $0,26 \text{ mg mL}^{-1}$ ) segundo os estudos de VISSOTTO et al. (2013). Além disso, a atividade de eliminação do radical  $ROO^{\bullet}$  demonstrada pelos extratos metanólicos de folhas de café ( $3036 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) foram mais eficazes que o ácido *p*-cumárico ( $4595 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) e o resultado dos extratos aquosos ( $5008 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) foi comparável ao do ácido ascórbico ( $5400 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) segundo o ensaio de MASSARIOLI et al. (2022).

O radical superóxido é produzido na membrana interna da mitocôndria participando do mecanismo que reduz o oxigênio a água, além disso pode existir como hidroperoxila, capaz de penetrar as membranas biológicas. É considerado um radical primário, pois é capaz de produzir ERO de forma direta, através da interação com outras moléculas ou de forma indireta, por meio de enzimas ou reações catalisadas por enzimas (IFEANYI, 2018). O ânion superóxido pode ser convertido em outras espécies reativas, como radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e ânions hidroxila ( $OH^-$ ) por meio da reação de Haber-Weiss (NEHA et al., 2019).

O peróxido de hidrogênio é considerado uma espécie reativa de oxigênio devido a sua capacidade de reagir com biomoléculas e através de reações enzimáticas, é capaz de atravessar facilmente a membrana nuclear, devido sua alta solubilidade em soluções aquosas, e induzir danos no DNA (IFEANYI, 2018). Além disso o  $H_2O_2$  também inativar algumas enzimas, oxidar moléculas como piruvato e  $\alpha$ -cetogluturato, degradar proteínas como mioglobina, hemoglobina e oxidar o DNA, nuclear e mitocondrial, e lipídeos (ARANDA-RIVERA et al., 2022). Embora o peróxido de hidrogênio apresente baixa reatividade, ele pode ser convertido a radicais altamente reativos, como  $OH^{\bullet}$  e ao ácido hipocloroso (ANDRÉS et al., 2022).

O ácido hipocloroso, é considerado um forte potente agente oxidante para diferentes biomoléculas, sendo capaz de atravessar membranas e causar danos a proteínas e lipídios de membrana ou de moléculas intracelulares. No meio extracelular, essa espécie reativa é capaz de inibir enzimas proteolíticas, além de reagir com outros compostos, como tiois e ascorbato, e causar fragmentação de proteínas por uma variedade de mecanismos. Além disso, também, é capaz de reagir com o peróxido de hidrogênio para formar o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) (TVRDÁ; BENKO, 2020).

Os radicais peroxila são capazes de reagir entre si atacando as proteínas da membrana ou quebrando os átomos de hidrogênio das cadeias de ácidos graxos vizinhas, levando à progressão da reação em cadeia da peroxidação lipídica. Na última etapa da peroxidação lipídica, esses radicais se autodestroem, passando a formar produtos não radicalares, como o malondialdeído, que podem causar danos a biomoléculas, reagindo com proteínas de membrana vizinhas ou se difundindo com moléculas distantes, como o DNA (YAMAN; AYHANCI, 2021).

Antioxidantes de fontes naturais apresentam compostos bioativos valiosos com potencial farmacológico. Seu uso como fonte alternativa em relação aos seus homólogos sintéticos, proporcionam benefícios à saúde combatendo os danos celulares causados pelos radicais livres no organismo (XU et al., 2017; LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019). Essas atividades biológicas estão associadas a presença dos compostos bioativos, que promovem respostas fisiológicas capazes de modular o processo metabólico de inflamação, estresse oxidativo, atividades anti-hipertensiva, antimicrobiana e antimutagênica, e, conseqüentemente, reduzir o risco de doenças crônicas (ABREU; ROLIM; ALMEIDA, 2021).

O EO é um dos fatores que pode levar ao diabetes, portanto a busca por compostos com propriedades antidiabéticas deve também incluir a análise da captura de espécies reativas (AHANGARPOUR; SAYAHI; SAYAHI, 2019). A atividade antioxidante dos polifenóis se deve principalmente às suas propriedades redox, que lhes permitem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio e inibidores de oxigênio singleto (DUMANOVIC et al., 2021). Em geral, os consumidores preferem antioxidantes naturais por serem considerados seguros e ecologicamente corretos (PATAY et al., 2016).

Portanto, os resultados apresentados neste estudo indicam que os extratos de *C. arabica* confirmam o potencial das como um ingrediente funcional com benefícios à saúde em relação a sua atividade antioxidante, independentemente da cultivar trabalhada.

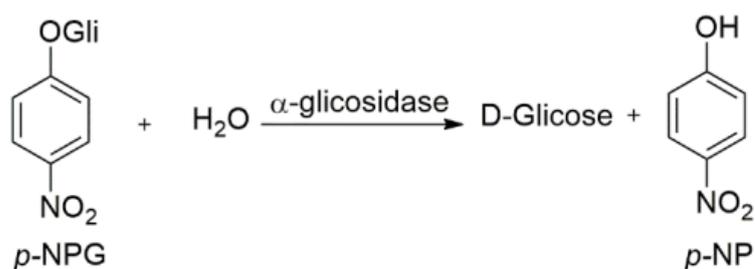
## 5.5 Análise da atividade enzimática

A capacidade de inibição, em porcentagem, das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática dos extratos aquosos, dos compostos bioativos isolados e dos controles positivos, acarbose e orlistat, foram avaliadas. Além disso, para as amostras que apresentaram percentuais de inibição superior a 50 % foi determinado o valor de IC<sub>50</sub>.

### 5.5.1 Ensaio de inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase

A capacidade de inibir a enzima  $\alpha$ -glicosidase foi realizada com o intuito de avaliar o potencial dos extratos aquosos, bem como dos principais compostos bioativos como possíveis agentes antidiabéticos utilizando a acarbose como controle positivo. O ensaio colorimétrico é utilizado como estratégia clássica e é amplamente utilizado para detecção tanto da atividade da  $\alpha$ -glicosidase, quanto na triagem de inibidores desta enzima devido à sua praticidade e simplicidade. Neste método, o substrato *p*-NPG é hidrolisado na presença da  $\alpha$ -glicosidase, formando D-glicose e *p*-NP (QURRAT-UL-AIN et al., 2017) como mostra a reação na Figura 12.

Figura 12 – Reação genérica de hidrólise do *p*-NPG pela  $\alpha$ -glicosidase.



Fonte: Adaptado de QURRAT-UL-AIN (2017).

Os resultados, presentes na Tabela 10 e Figura 13, mostraram que os extratos aquosos, preparados em diferentes concentrações, apresentaram forte inibição ( $85,92 \pm 0,06$  %; IC<sub>50</sub> = 40,30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) da enzima  $\alpha$ -glicosidase. Independente da cultivar trabalhada, todas apresentaram um perfil de inibição semelhante. O fato da cultivar ser resistente ou não a *H. vastatrix*, não influenciou neste ensaio devido ao perfil fitoquímico ser praticamente o mesmo. Anteriormente, foi citado que o aumento no teor dos metabólitos secundários só

ocorre mediante a condições de estresse da planta devido ao mecanismo de defesa e nenhuma das amostras estava sob tal condição.

Tabela 10 – Percentual de inibição e valores de IC<sub>50</sub> referentes à inibição da  $\alpha$ -glicosidase dos compostos bioativos isolados, dos extratos aquosos de *C. arabica* e acarbose.

<b>Amostras*</b>	<b>% de inibição</b>	<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>
Extratos aquosos	85,92 $\pm$ 0,06	40,30
Mangiferina	90,39 $\pm$ 0,04	247,90
Rutina	85,71 $\pm$ 0,03	193,20
Ácido clorogênico	15,48 $\pm$ 0,09	–
Cafeína	12,96 $\pm$ 0,06	–
Acarbose	90,38 $\pm$ 0,25	224,80

\* Todas as amostras foram analisadas na mesma concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Fonte: Elaborado pelo autor.

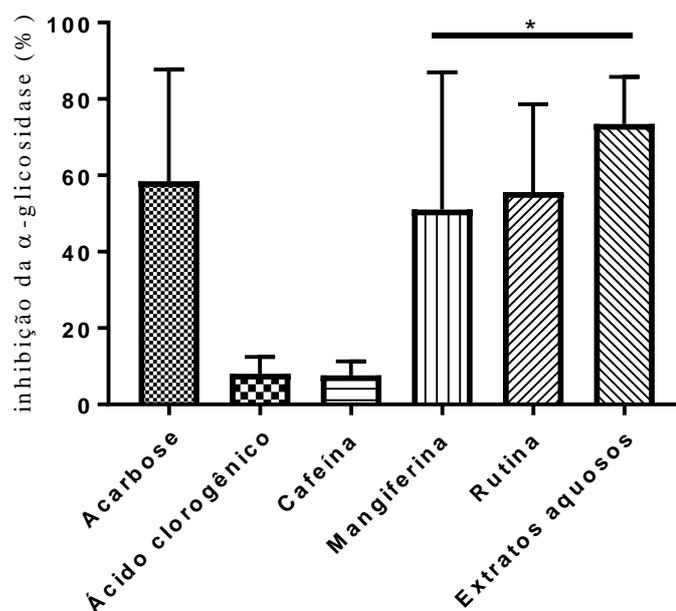
Em estudos anteriores, foi demonstrado que o tratamento de ratos (*Rattus norvegicus*) com diabetes tipo 2 induzida com extratos etanólicos das folhas de *C. arabica* (150 mg/kg/dia por animal, durante 13 dias) apresentaram diminuição nos níveis de glicose sanguínea ao final da administração e a conclusão deste estudo sugeriu que este efeito foi devido ao teor de polifenol, principalmente de mangiferina, presente nas amostras (MARTINA et al., 2021). Estes achados estão de acordo com os resultados presentes na Tabela 10.

Quanto aos principais compostos bioativos, pode-se destacar a mangiferina que apresentou o melhor resultado de inibição da  $\alpha$ -glicosidase (90,39  $\pm$  0,04 %; IC<sub>50</sub> = 247,90  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dentre todos os compostos analisados sendo semelhante a inibição do controle positivo, acarbose (90,38  $\pm$  0,25 %; IC<sub>50</sub> = 224,80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Do ponto de vista prático, moléculas derivadas de xantona atuam como inibidoras desta enzima e podem servir como uma estratégia promissora como agentes antidiabéticos (SANTOS; FREITAS; FERNANDES, 2018).

Anteriormente, demonstraram que a mangiferina apresentou efeito na redução da glicemia pós-prandial em modelos de camundongos hiperglicêmicos (SHI et al., 2017; SEKAR et al., 2018; CHEWCHINDA et al., 2020). Esses dados apontam que a mangiferina

pode retardar a absorção de glicose sanguínea, reduzindo significativamente o nível de hiperglicemia pós prandial podendo atuar como adjuvante no controle do DM2.

Figura 13 – Atividade inibitória da enzima  $\alpha$ -glicosidase dos compostos bioativos isolados, dos extratos aquosos de *C. arabica* e acarbose.

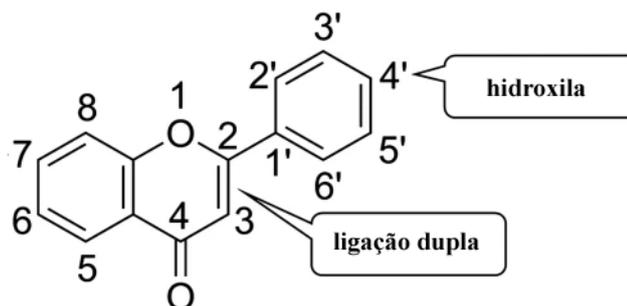


\* Denota que a inibição da  $\alpha$ -glicosidase foi, significativamente, efetiva com mangiferina, rutina e extrato aquoso *versus* acarbose entre as concentrações avaliadas ( $P < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de dados triplicados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A rutina também demonstrou excelente atividade de inibição ( $85,71 \pm 0,03$  %;  $IC_{50} = 193,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) semelhante ao extrato aquoso. Os flavonoides da dieta desempenham um papel importante na prevenção de doenças degenerativas e está associado a menor incidência de DM2 (XU et al., 2018; TEOH; DAS, 2018). De acordo com ŞÖHRETOĞLU e SARI (2020) em sua revisão de flavonoides como potenciais inibidores de  $\alpha$ -glicosidase, mostrou que uma dupla ligação entre C-2 e C-3 e um grupo hidroxila livre em C-4', característicos da rutina, são cruciais para a inibição dessa enzima (Figura 14).

Figura 14 – Estrutura química do flavonol (2-fenil-benzo-alfa-pirona)



Fonte: Adaptado de ŞÖHRETOĞLU e SARI (2020).

Em estudos *in vivo*, a rutina também apresentou atividade antidiabética reduzindo a absorção de glicose do intestino delgado pela inibição de  $\alpha$ -glicosidase (CALZADA et al., 2017) além de melhorar significativamente o atraso na cicatrização de feridas em ratos hiperglicêmicos devido as suas excelentes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (CHEN et al., 2020).

Estudos anteriores demonstraram, tanto em modelo humano (SARRIÁ et al., 2018), quanto em modelo de rato (BUDRYN et al., 2017), que o consumo de café levou à redução de glicose no sangue. Dessa forma, há evidências significativas de que os compostos polifenólicos presentes no café estão associados a propriedades antidiabéticas via modulação do metabolismo da glicose e por outros mecanismos, incluindo a inibição do transporte intestinal de glicose.

No que se refere ao ácido clorogênico e a cafeína, pode-se verificar pela Tabela 10 que a inibição da  $\alpha$ -glicosidase foi muito baixa ( $15,48 \pm 0,09$  e  $12,96 \pm 0,06$  %, respectivamente), na concentração de estudo, sendo inferior a 50 %. Por esse motivo, o valor de  $IC_{50}$ , para essas duas substâncias, não foi calculado.

Nos estudos de NYAMBE-SILAVWE e WILLIAMSON (2018) quanto à inibição das atividades de sacarase e maltase humana e de rato foi observado que o ácido clorogênico se demonstrou como um inibidor muito fraco para o modelo com ratos e ainda menor em modelo humano, concluindo, portanto, que os efeitos antidiabéticos do consumo de café não se devem a ação do ácido clorogênico. ALONGI e ANESE (2018) verificaram em seus estudos, que a cafeína afeta negativamente a atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase, *in vitro*, corroborando com os resultados presentes neste estudo.

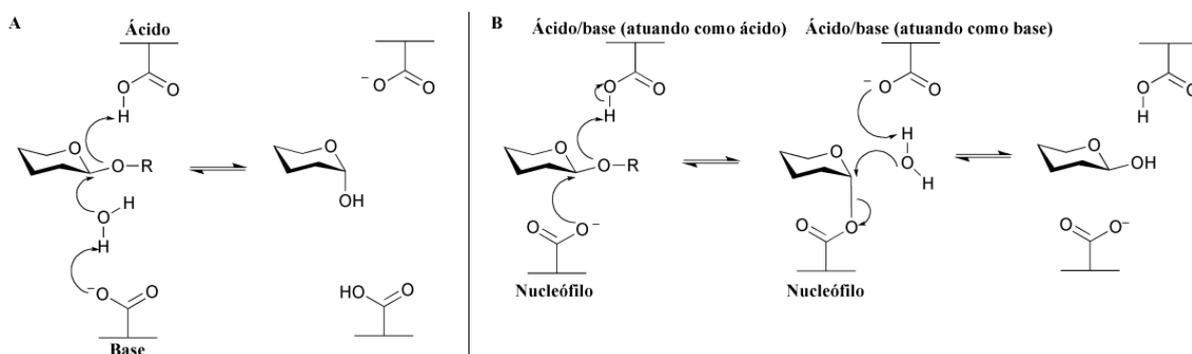
Os compostos polifenólicos desempenham um papel muito importante na saúde humana e isso se deve as suas propriedades antioxidantes (HU et al., 2022), capacidade de

inibir enzimas digestivas (GONÇALVES et al., 2017) e atividade antiglicante (ASGHARPOUR-DIL; RANJKESH; GOODARZI, 2019). As análises realizadas por CLAE-DAD deste trabalho demonstraram que os extratos de folhas de café contêm quantidades significativas de mangiferina e rutina (Tabela 5 e Apêndice B) o que justifica a forte inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase (Figura 13).

A mangiferina é um potente agente antidiabético porque possui alta atividade inibitória da  $\alpha$ -glicosidase, característico das xantonas (SEKAR et al., 2018), e é capaz de melhorar a tolerância oral à glicose em ratos saudáveis carregados de glicose sem induzir um estado hipoglicêmico (MURUGANANDAN et al., 2005). A rutina também se apresenta como um bom inibidor da atividade da  $\alpha$ -glicosidase, podendo sendo eficaz na redução da hiperglicemia pós-prandial (LIMANTO et al., 2019).

A  $\alpha$ -glicosidase é uma enzima chave que catalisa a clivagem hidrolítica de dissacarídeos em monossacarídeos e, portanto, a inibição da atividade da  $\alpha$ -glicosidase pode reduzir a elevação do açúcar no sangue e suprimir a hiperglicemia pós-prandial (PAPOUTSIS et al., 2021). Os mecanismos clássicos de hidrólise da ligação glicosídica promovido por esta enzima ocorre através da inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico (Figura 15).

Figura 15 - Mecanismos de hidrólise da ligação glicosídica.



(A) Mecanismo por inversão da configuração e (B) Mecanismo por retenção da configuração.

Fonte: Adaptado de Gloster e Davies (2010).

No primeiro caso, o substrato e uma molécula de água são ligados simultaneamente em uma única etapa da reação. Um dos resíduos catalíticos atua como ácido e outro como base, a protonação do oxigênio glicosídico ativa a clivagem da ligação glicosídica que é acompanhada pelo ataque do nucleófilo  $\text{HO}^-$  obtido através da

desprotonação da molécula de água pela base residual (Figura 15A). Já no segundo, ocorre um mecanismo de duplo deslocamento em que um dos resíduos catalíticos atua como nucleófilo e outro como ácido/base. No primeiro passo o resíduo ácido/base protona o oxigênio glicosídico e concomitantemente ocorre o ataque nucleofílico no carbono anomérico. No segundo passo, o resíduo ácido/base desprotona uma molécula de água e o nucleófilo HO<sup>-</sup> ataca o carbono anomérico, eliminando o grupo residual e retendo a configuração inicial (Figura 15B) (GLOSTER; DAVIES, 2010).

Muitos estudos abordam ensaios clínicos de curto prazo a relação entre o consumo de café e o DM2, porém a maioria é muito abrangente no que se diz respeito a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose (ALSHAWI, 2020). Cada xícara adicional de café tradicional (174,4 mg de ácido clorogênico e 175,2 mg de cafeína) ou descafeinado consumida por dia está associada a uma redução de 9 e 6 %, respectivamente, o risco de DM2. Porém, a expressão uma “xícara de café” pode diferir de muitas maneiras a depender do preparo. Ensaios clínicos de ingestão de café e início de DM2 são impraticáveis e, embora tenham sido realizados vários ensaios de ingestão de café sobre alterações nos biomarcadores da doença, poucos foram ensaios clínicos randomizados e com durações maiores que quatro semanas (CORNELIS, 2020). O chá das folhas de café, apresentam alta concentração de ácido clorogênico e cafeína ( $17,99 \pm 0,43$  e  $22,43 \pm 0,40$  g kg<sup>-1</sup> de folhas secas, respectivamente) se tornando uma alternativa promissora na prevenção da DM2, pois além destes metabólitos citados, as amostras foliares de café contam com a presença, significativa, de mangiferina e rutina ( $10,88 \pm 0,28$  e  $11,73 \pm 0,42$  g kg<sup>-1</sup> de folhas secas, respectivamente).

É notório que a mangiferina e a rutina, apresentam propriedades antidiabéticas e a combinação dessas duas substâncias presentes nas folhas de *C. arabica* contribuem, significativamente, na inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase e, conseqüentemente, na ameaça de desenvolver DM2. O uso de bebidas a partir das folhas de café pode ser um método prático, eficaz e ecologicamente amigável para aumentar a sensibilidade à insulina e reduzir a hiperglicemia pós-prandial.

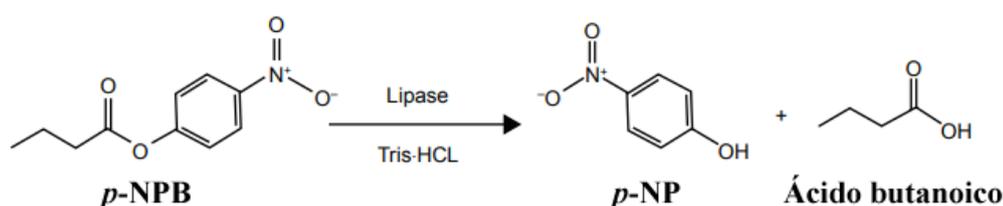
### **5.5.2 Ensaio de inibição da enzima lipase pancreática**

A enzima lipase pancreática desempenha um importante papel na digestão e metabolismo dos lipídios provenientes da dieta, pois neste processo os triglicerídeos (presentes em 90-95 % das gorduras alimentares) são convertidos em monoglicerídeos e ácidos graxos livres. O excesso de ácidos graxos livres devido a uma má alimentação

associado ao sedentarismo são fatores que contribuem para o desenvolvimento da obesidade, sendo também responsável pela resistência à insulina, que conseqüentemente, contribuirá para o desenvolvimento da DM2 (SOBCZAK; BLINDAUER; STEWART, 2019).

A inibição desta enzima pode ser considerada como uma forma de evitar ou tratar a obesidade e suas complicações. Essa análise é feita por um procedimento conhecido que utiliza ésteres de *p*-nitrofenil, como por exemplo o *p*-NPB, sendo hidrolisado pela lipase pancreática liberando o substrato *p*-NP, de coloração amarela, além de ácido butanoico (ou butírico) (ZAID et al., 2017), conforme pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 – Reação genérica do *p*-NPB catalisado pela lipase pancreática.



Fonte: Adaptado de ZAID et al. (2017).

Os extratos aquosos das folhas de *C. arabica* e os metabólitos isolados foram avaliados em relação a capacidade de inibição da lipase pancreática utilizando o orlistat como controle positivo. A porcentagem de inibição das enzimas foi determinada juntamente com os valores de IC<sub>50</sub>. Estes resultados estão apresentados na Tabela 11 e também na Figura 17.

Em relação aos extratos aquosos, não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares analisadas do mesmo modo como ocorreu na inibição da  $\alpha$ -glicosidase. A inibição da lipase pancreática das amostras de café ( $96,07 \pm 1,90$  %; IC<sub>50</sub> =  $56,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi maior do que o observado no controle positivo ( $80,09 \pm 0,34$  %; IC<sub>50</sub> =  $514,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e pelos valores de IC<sub>50</sub>, pode-se observar que os extratos aquosos demonstraram ser muito eficazes, pois com uma concentração nove vezes menor que o orlistat os extratos apresentaram maior inibição (Tabela 11). Os principais responsáveis pela forte inibição da lipase pancreática é o ácido clorogênico juntamente com a cafeína e essa afirmação é baseada na alta inibição de ambas substâncias (Figura 17). Estudos anteriores, já comprovaram a eficácia destas duas substâncias quanto as propriedades antidiabética e antiobesidade (KONG et al., 2021).

Tabela 11 – Percentual de inibição e valores de IC<sub>50</sub> referentes à inibição da lipase pancreática dos compostos bioativos isolados, dos extratos aquosos de *C. arabica* e orlistat.

Amostras*	% de inibição	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Extratos aquosos	96,07 ± 1,90	56,43
Mangiferina	47,67 ± 2,29	–
Rutina	34,75 ± 0,44	–
Ácido clorogênico	94,49 ± 0,33	97,69
Cafeína	95,27 ± 0,23	62,38
Orlistat	80,09 ± 0,34	514,20

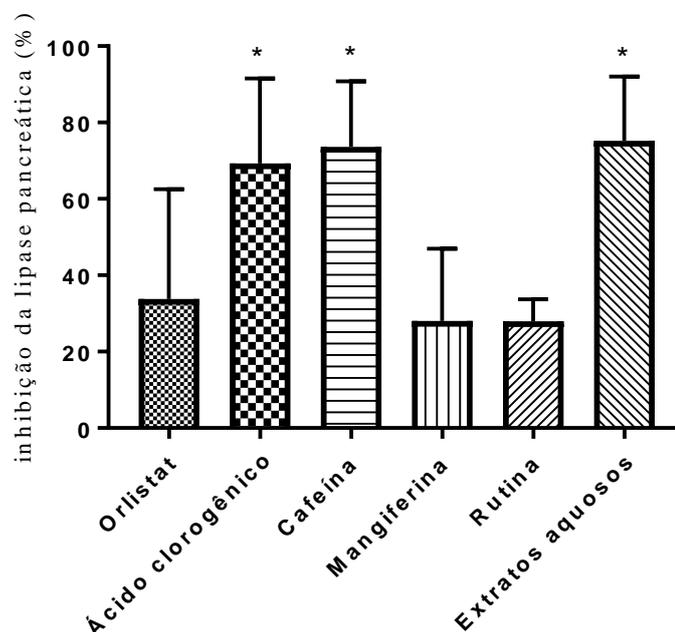
\* Todas as amostras foram analisadas na mesma concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O ácido clorogênico é conhecido por seus efeitos benéficos para a saúde e são muito eficazes na prevenção de síndromes metabólicas e seu mecanismo de ação tem sido associados as suas características anti-inflamatórias e antioxidantes (NAVEED et al., 2018). Além disso, o consumo diário de café solúvel enriquecido com ácido clorogênico diminuiu, significativamente, a área de gordura visceral, área de gordura abdominal total, índice de massa corporal, peso corporal e circunferência da cintura após oito meses de observação (WATANABE et al., 2019). Esses resultados estão associados as características dos compostos polifenólicos eficazes na inibição da lipase pancreática e, também, por reduzir os níveis de glicose no sangue pós-prandial através da inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase (ZHENG et al., 2019; NEMZER; KALITA; ABSHIRU, 2021).

A cafeína, presente em nossa dieta, pode impedir, significativamente, a hidrólise lipídica catalisada pela lipase pancreática mesmo em baixas dosagens. É também capaz de inibir a lipólise de triacilglicerídeos de cadeia curta de forma mais eficiente do que substratos de cadeia longa e o mecanismo de sua ação depende da interação com a proteína, mas não da emulsificação do substrato (TAM et al., 2019; KUMAR; CHAUHAN, 2021). Um recente estudo investigou o efeito da suplementação de cafeína no perfil lipídico e pressão arterial em homens com sobrepeso e obesidade durante oito semanas de treinamento aeróbico. De acordo com achados, a cafeína melhorou o perfil lipídico e diminuiu a pressão arterial média dos indivíduos envolvidos (AGHAJARI; KHAJEHLANDI; MOHAMMADI, 2020).

Figura 17 – Atividade inibitória da enzima lipase pancreática dos compostos bioativos isolados, dos extratos aquosos de *C. arabica* e orlistat.



\* Indica que a inibição da lipase pancreática foi, significativamente, maior com ácido clorogênico, cafeína e extrato aquoso *vs.* orlistat entre as concentrações avaliadas ( $P < 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de determinações em triplicata.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudos anteriores, mostraram que extratos da pele de prata do café (*silverskin*, um subproduto da indústria alimentar assim como as folhas), ricos em ácido clorogênico e rutina (IRIONDO-DEHOND et al., 2017), estão associados a efeitos antidiabético e antiobesidade, apresentando um grande potencial para o tratamento de ambas enfermidades, bem como suas complicações. Esses efeitos podem ser parcialmente atribuídos à inibição das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática. Mais estudos estão sendo realizados para obter conhecimento sobre o mecanismo de ação desses extratos na patogênese dessas doenças crônicas e determinar a contribuição de seus componentes bioativos para efeitos promotores da saúde (DEL CASTILLO et al., 2019; KLINGEL et al., 2020).

Por fim, os resultados destes ensaios sugerem que as folhas de café são potenciais agentes ativos naturais nas complicações ocasionadas pela obesidade, principalmente pela ação do ácido clorogênico e cafeína. A mangiferina e rutina não apresentaram inibição tão expressiva e por esse motivo os valores de  $IC_{50}$  não foram determinados. Os efeitos inibitórios da lipase estão mais associados à cafeína ( $95,27 \pm 0,23$  %;  $IC_{50} = 62,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) do que ao

ácido clorogênico ( $94,49 \pm 0,33 \%$ ;  $IC_{50} = 97,69 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Muitas questões sobre os mecanismos no metabolismo lipídico ainda precisam ser respondidas e, talvez, com o uso de tecnologias ômicas, possamos entender e validar os efeitos do café na saúde humana no futuro.

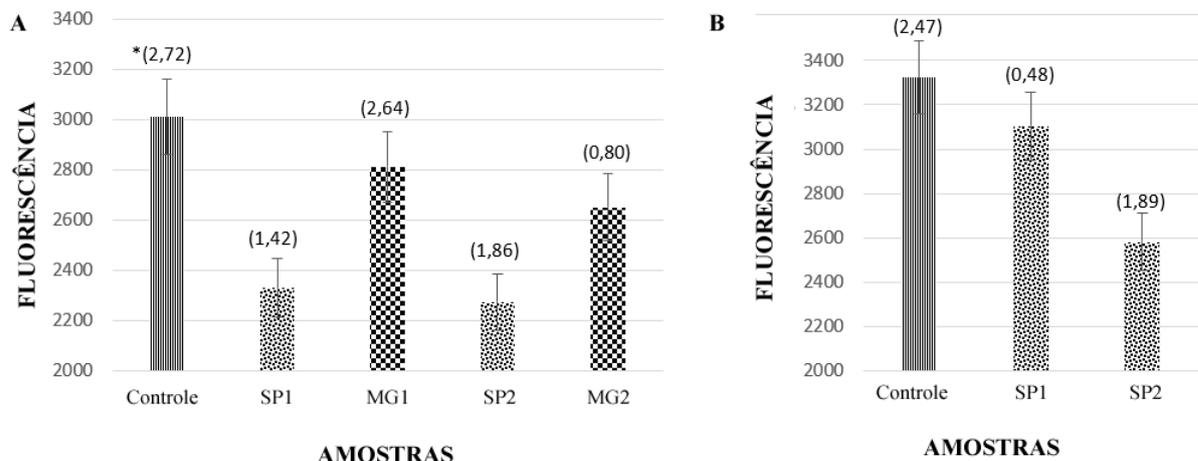
## 5.6 Atividade antiglicante

A produção dos AGEs é obtida através da reação entre proteínas (ou aminoácidos) com açúcares ou compostos dicarbonílicos e sua formação pode ser demonstrada pelo aumento da intensidade de fluorescência, enquanto a capacidade antiglicante de um inibidor (extratos ou compostos puros) pode ser avaliada pela redução desta intensidade. Em outras palavras, quanto maior for a diminuição da intensidade de fluorescência provocada pela ação da amostra testada, em relação ao controle, maior será a sua capacidade em combater a formação de AGEs fluorescentes (MUIR et al., 2021).

A capacidade antiglicante dos extratos metanólicos de *C. arabica*, em diferentes concentrações, foi investigada devido suas propriedades antidiabéticas e antiobesidade anteriormente encontradas. Os resultados das intensidades de fluorescência obtidas nesta análise tanto dos extratos metanólicos de folhas de café, quanto da solução controle, em meio contendo glicose e metilglioxal, estão ilustrados na Figura 18.

Na Figura 18A, apresenta-se os resultados da ação antiglicante dos extratos da cultivar Caturra Vermelho de São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG) em duas concentrações distintas, sendo a primeira a  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  referente aos extratos SP1 e MG1 e a segunda a  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$  referente aos extratos SP2 e MG2 num meio reacional contendo glicose. Pode-se observar que houve a redução da fluorescência, em ambos extratos, na concentração de  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , em relação ao controle. Ao dobrar a concentração, a intensidade da fluorescência diminuiu ainda mais e nota-se que o extrato das folhas obtido em São Paulo apresentou melhor atividade antiglicante do que o extrato obtido em Minas Gerais, apesar de serem a mesma cultivar.

Figura 18 – Atividade antiglicante dos extratos metanólicos das folhas de *C arabica*.



(A) Intensidade da fluorescência, em meio contendo glicose, dos extratos metanólicos de folhas de café nas concentrações de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> (SP1 e MG1) e 5,0 mg mL<sup>-1</sup> (SP2 e MG2). (B) Intensidade da fluorescência, em meio contendo metilglioxal, dos extratos metanólicos de folhas de café nas concentrações de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> (SP1) e 5,0 mg mL<sup>-1</sup> (SP2). \* Desvio padrão relativo

Fonte: Elaborado pelo autor.

Isso se deve porque as folhas foram obtidas regiões distintas e, conseqüentemente, o teor fitoquímico é diferente. Por exemplo, a temperatura governa os processos físicos e químicos que, por sua vez, controlam os processos biológicos. Quanto maior a temperatura, maior é o metabolismo microbiano e isso está associado a isso uma mineralização menos eficaz e, conseqüentemente, maior competição por nutrientes (HEINZE et al., 2017). O uso de fertilizantes e outras práticas agrícolas interferem diretamente na produção de compostos bioativos (SABRI et al., 2018). Alguns estudos demonstraram a relação entre a captura de espécies dicarbonílicas e o conteúdo de compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos e flavonoides, presentes nos extratos de plantas (LEAL et al., 2019), então uma diferença na capacidade antiglicante nas amostras analisadas já era esperada.

O segundo ensaio, utilizando metilglioxal no meio reacional ao invés de glicose, realizado foi feito apenas com a cultivar SP por ter apresentado melhor desempenho na primeira análise. A utilização do metilglioxal, composto dicarbonílico extremamente reativo, é devido a sua característica na formação de AGEs e, também, por envolvido na patogênese de diversas doenças, como por exemplo DM2 (GROENER et al., 2019). Estudos anteriores demonstraram o aumento dos níveis dessa espécie dicarbonílica, pós-prandial, em plasma de pacientes diabéticos (ALOUFFI; KHAN, 2020; MAASEN et al., 2022). O metilglioxal, especialmente quando em níveis elevados, pode formar AGEs. Neste contexto, foi relatado

que os AGEs derivados do metilglioxal encontram-se elevados na DM2. Na Figura 18B, podemos observar que o valor de intensidade da fluorescência, da solução controle, foi maior do que no ensaio anterior, contendo glicose, mostrando então a capacidade do metilglioxal na maior formação de AGEs. Essa reatividade mais intensa do metilglioxal é devido ao maior número de carbonilas, em relação a glicose, e seu menor impedimento espacial ao ataque nucleofílico do átomo de nitrogênio oriundo da proteína (MARQUES et al., 2018).

Os extratos metanólicos SP1 e SP2 apresentaram uma redução significativa na fluorescência em comparação com o controle, frente ao metilglioxal, conforme mostrado na Figura 18B. Na concentração mais elevada ( $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), o extrato promoveu uma redução na intensidade de fluorescência muito significativa, acima de 60 %, quando comparado a solução controle.

Essas reduções da fluorescência, observadas em ambos os sistemas estudados, podem ser explicadas devido à reação dos compostos carbonílicos reativos (glicose e metilglioxal) presentes no meio reacional, com as espécies polifenólicas presentes na mistura dos extratos SP e MG, principalmente pela presença de rutina dando origem a diferentes espécies químicas na forma de adutos, mono e dissubstituídos, que minimizam a glicação em BSA (MARQUES et al., 2018).

A rutina é capaz de inibir a formação de AGEs usando um modelo experimental, *in vitro*, e formação de adutos fluorescentes ligados ao colágeno induzida por hiperglicemia, além de retardar o aparecimento de complicações diabéticas em modelos de ratos (AMJADI et al., 2021; TUNG et al., 2021). Os mecanismos propostos para esse efeito incluem inibição da absorção intestinal de carboidratos, diminuição da gliconeogênese, aumento da captação tecidual de glicose, estimulação da secreção pancreática de insulina e proteção da ilhota de Langerhans contra a degeneração. Considerando a relação negativa entre risco de complicações diabéticas e controle de glicemia e lipídios, a rutina pode ser recomendada como suplemento alimentar para prevenção de complicações do diabetes (GHORBANI, 2017; RAGHEB et al., 2020; CHEN et al., 2021; SIVAKUMAR et al., 2022).

Portanto, estes resultados confirmam a ação antiglicante dos extratos analisados, tanto em meio contendo glicose, quanto metilglioxal, promovendo a minimização da glicação de proteínas.

### 5.7 Bioacessibilidade dos extratos das folhas de *C. arabica*

As quantidades bioacessíveis dos principais compostos bioativos dos extratos de *C. arabica* foram determinadas a partir da digestão *in vitro* conforme descrito no tópico 4.11. Em cada etapa da digestão foi recolhida uma alíquota para a quantificação dos metabólitos majoritários por análise em CLAE e os resultados, em valores absolutos em porcentagem, estão apresentados na Tabela 12.

Os valores apresentados na Tabela 12 correspondem aos teores, em porcentagem, dos metabólitos quantificados após a digestão *in vitro* em relação àqueles não digeridos (Apêndice B), ou seja, representa o quanto destas substâncias restaram após a digestão oral, gástrica e intestinal, isto é, quanto estão bioacessíveis em cada etapa.

Tabela 12 - Teor percentual dos metabólitos majoritários das folhas de café bioacessíveis obtidas pelo método da digestão *in vitro*.

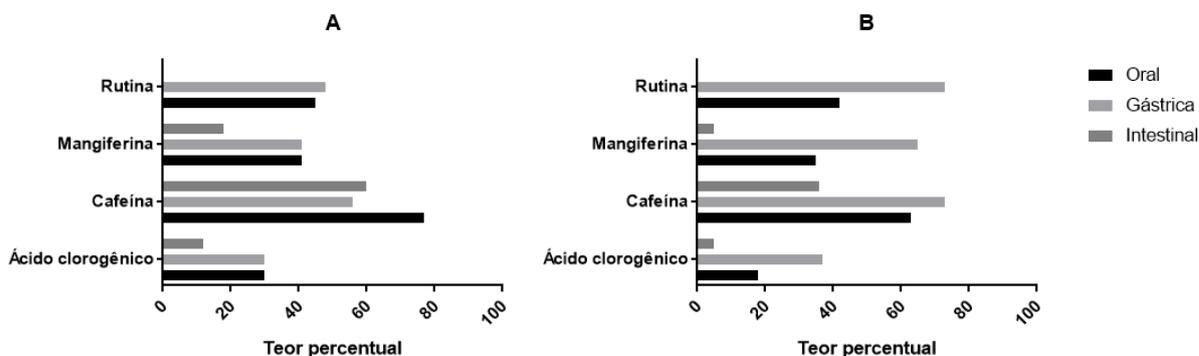
Metabólitos	Extrato aquoso (%)			Extrato metanólico (%)		
	Oral	Gástrica	Intestinal	Oral	Gástrica	Intestinal
Ácido clorogênico	30	30	12	18	37	5
Cafeína	77	56	60	63	73	36
Mangiferina	41	41	18	35	65	5
Rutina	45	48	ND	42	73	ND

ND: não detectado.

Elaborado pelo autor.

Pode-se observar na Figura 19 que a bioacessibilidade de todos os compostos bioativos presentes nos extratos aquosos foi maior em relação aos metabólitos dos extratos metanólicos tanto na digestão oral, quanto na intestinal. Quanto à digestão gástrica, o conteúdo de polifenóis e cafeína dos extratos metanólicos atingiram um nível maior demonstrando maior estabilidade desse extrato em meio gástrico. Esses dados sugerem que os extratos obtidos em micro-ondas tiveram um desempenho relativamente melhor na digestão de polifenóis e cafeína do que àqueles obtidos em soxhlet. É importante salientar que na digestão *in vitro* os extratos metanólicos foram secos e redissolvidos em etanol 70 % tintura que podem ser utilizados para tratamento.

Figura 19 - Teor dos metabólitos principais dos extratos (A) aquosos e (B) metanólicos de *C. arabica* após as três etapas da digestão *in vitro*.



Os gráficos correspondem aos valores percentuais após a conclusão de cada etapa da digestão *in vitro*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando a bioacessibilidade de cada composto bioativo, pode-se observar que o ácido clorogênico foi bastante degradado em relação aos demais compostos, principalmente na fase intestinal para ambos extratos. Quanto à mangiferina e rutina, ambas foram, também, bastante degradadas na última etapa da digestão, inclusive a rutina não foi detectada tanto nos extratos aquosos, quanto nos metanólicos.

Os polifenóis dietéticos são altamente sensíveis a condições alcalinas do intestino sendo, portanto, vulneráveis à degradação quando incubados em pH elevado (6-8) e, conseqüentemente, uma grande parte desses compostos pode ser convertida em outras substâncias de formas estruturais desconhecidas e/ou não detectadas com diferentes propriedades químicas e atividades biológicas após a digestão *in vitro* (YE et al., 2022).

A bioacessibilidade dos polifenóis é influenciada por muitos fatores, como o estado químico do composto, a matriz alimentar, interações com outros componentes ou a presença de supressores ou cofatores, etc. Estima-se que 48 % de todos os polifenóis são digeridos no intestino delgado e 42 % no intestino grosso. Apenas 10 % não são digeridos e permanecem intactos dentro da matriz alimentar. Apenas as agliconas são capazes de atravessar membranas biológicas por serem altamente lipofílicas (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020).

A cafeína demonstrou um perfil um pouco diferente em relação aos demais metabólitos. Apresentou bioacessibilidade elevada na fase intestinal nos extratos aquosos (60 % em relação a cafeína não digerida) e o mesmo se repetiu na fase gástrica nos extratos metanólicos (73 % comparada com a mesma substância não digerida). Em estudos anteriores,

foi relatado que a absorção de cafeína ocorre tanto pela mucosa oral quanto pelo trato gastrointestinal (MORRIS et al., 2019). Em nossos resultados, a cafeína foi detectada em altas quantidades em todas as etapas da digestão *in vitro*.

Por fim, a digestão dos compostos polifenólicos e cafeína é um processo complexo e a bioacessibilidade dessas substâncias depende das características da matriz (planta ou alimento), da interação dos fitoquímicos com outros componentes da amostra e das condições fisiológicas encontradas nos diversos compartimentos do trato gastrointestinal, além das propriedades físico-químicas dos próprios metabólitos que, também, são parâmetros importantíssimos a serem considerados (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020). Essas análises sugerem que nossos resultados estão alinhados com as propriedades de digestão dos metabólitos secundários.

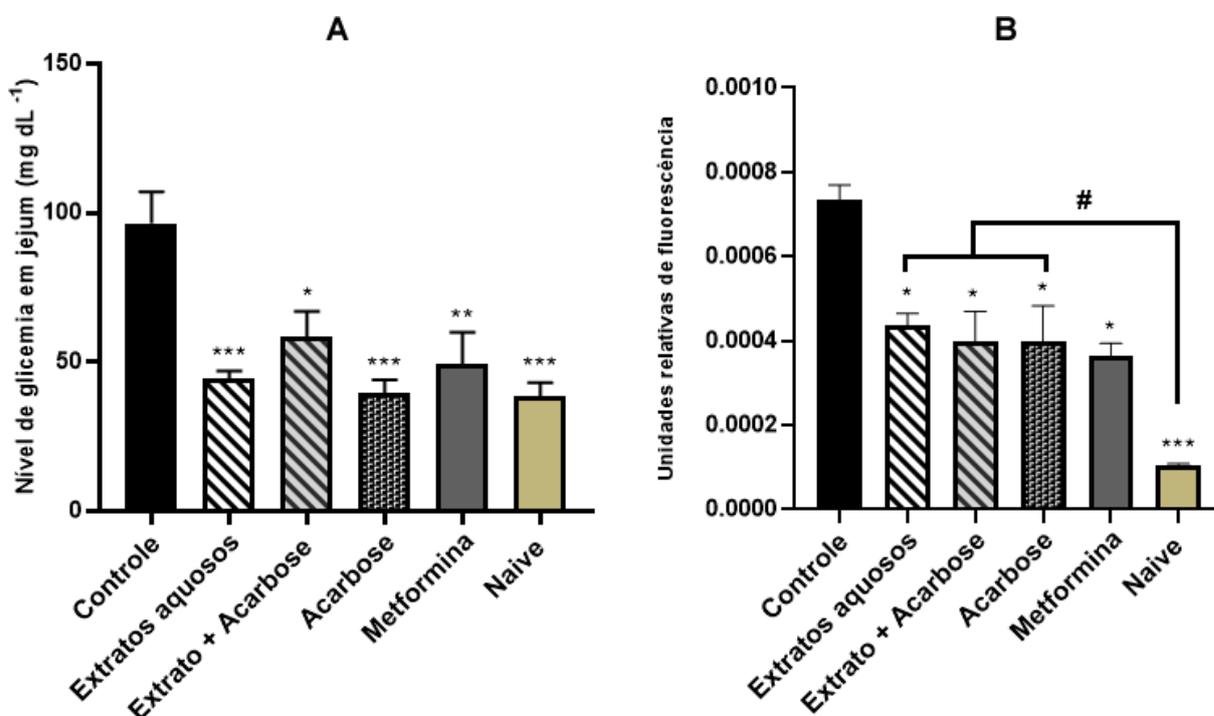
### **5.8 Hiperglicemia induzida por D-glicose em peixe-zebra adulto**

O peixe-zebra foi utilizado como modelo para avaliar o efeito dos extratos aquosos de *C. arabica* na hiperglicemia induzida por D-glicose ( $111 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A concentração de açúcar escolhida para induzir os efeitos diabéticos é devido à menor taxa de mortalidade de peixes em relação a outras utilizadas (CAPIOTTI et al., 2014).

Após quatro dias da retirada dos animais do aquário contendo glicose, o grupo controle, tratados com a solução de DMSO a 3 %, permaneceram hiperglicêmicos quando comparado ao grupo de referência (Naive) conforme pode ser observado na Figura 20A. A exposição do peixe-zebra adulto à alta concentração de glicose é capaz de induzir alterações metabólicas persistentes, supostamente causado por um estado hiperinsulinêmico, que compromete o metabolismo periférico da glicose e, conseqüentemente, exibe complicações oriundas do DM2 (GHADDAR; DIOTEL, 2022).

Ao final dos quatro dias de tratamento, os extratos aquosos, a acarbose e a metformina reduziram, significativamente, o nível de glicose sanguínea dos animais quando comparado ao controle, resultado similar ao Naive. A combinação dos extratos aquosos com a acarbose também reduziu a hiperglicemia dos animais, porém, demonstrou efeito inferior quando comparado aos inibidores isolados (Fig. 20A), indicando não haver efeito sinérgico entre eles na redução da hiperglicemia em peixe-zebra adulto, mas sim um tipo de efeito competitivo, sugerindo que o uso dos extratos aquosos das folhas de café concomitante com a acarbose não pode ser considerada uma estratégia eficaz.

Figura 20 – Efeito dos extratos aquosos das folhas de café na (A) hiperglicemia e (B) estresse oxidativo hepático em peixe-zebra induzido por D-glicose.



Tratamentos por via oral. Controle: veículo, 3 % DMSO; Extratos aquosos: 40 mg kg<sup>-1</sup>; Extrato com acarbose: 40 e 300 mg kg<sup>-1</sup> resp.; Acarbose: 300 mg kg<sup>-1</sup>; Metformina: 200 mg kg<sup>-1</sup>; Grupo Naive - animais não tratados. ANOVA one-way seguida do teste de Tukey: (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 *versus* controle; # p < 0,05 *versus* Naive).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Consistentemente com esses achados, o efeito antidiabético de extratos de grãos verdes de *C. arabica* foi avaliado em ratos diabéticos, após doze semanas de tratamento, a administração de extratos aquosos de grãos verdes de café mostrou níveis de glicose no sangue, significativamente, menores em comparação com o grupo controle diabético (BOONPHANG et al., 2021), efeito similar ao obtido com extrato das folhas nesse estudo com zebrafish.

O efeito hepatoprotetor dos extratos aquosos de *C. arabica* no estresse oxidativo induzido por hiperglicemia em peixe-zebra adulto também foi avaliado. As amostras de café reduziram o nível de ERO do tecido hepático após os quatro dias de tratamento, efeito similar quando aplicado juntamente com acarbose (Fig. 20B). Os controles positivos (acarbose e metformina) também reverteram o estresse oxidativo causado pela hiperglicemia dos animais. O aumento da atividade enzimática no tecido hepático é muito comum em pacientes diabéticos, geralmente sendo um indicador de inflamação de baixo grau ou dano hepatocelular

(ISLAM et al., 2020). Os extratos aquosos da poupa do café apresentaram um papel, significativo, contra o estresse oxidativo e o acúmulo de lipídeos hepáticos *in vitro*, eliminando a produção de ERO e modificando a expressão de antioxidantes hepáticos (ONTAWONG et al., 2021). Possivelmente, os extratos aquosos das folhas podem ter atenuado o estresse oxidativo dos peixes hiperglicêmicos por mecanismos similares.

Embora ainda falte um modelo adequado para estudar o efeito a longo prazo do diabetes, o peixe-zebra oferece vantagens particulares para o estudo de doenças metabólicas. Modelos para o estudo da obesidade, regeneração do pâncreas, hiperglicemia e complicações diabéticas foram estabelecidos e promoverão a compreensão dos mecanismos da doença e fornecerão novos alvos para a terapia da doença (GHADDAR; DIOTEL, 2022).

### 5.9 Estudos de simulação de computador de inibição de $\alpha$ -glicosidase

Para obter uma visão estrutural dos mecanismos de inibição de ligantes de  $\alpha$ -glicosidase, os modos do ligante no sítio ativo foram investigados usando a técnica de simulação computacional (*molecular docking*) (DUONG et al., 2020). Inicialmente, foi utilizado o RMSD para validação estatística dos resultados das simulações de formação de complexos e escolha da melhor pose. Esta última é calculada com base na medida da distância média entre os átomos dos dois ligantes, com critérios de validação valores próximos a 2 Å.

É possível observar pela Tabela 13 que todas as simulações tiveram valores abaixo ou próximos de 2 Å, destacando a melhor pose do complexo rutina-CtMGAM, que apresentou valor de RMSD na ordem de 1,330 Å, com um desvio muito próximo dos valores das simulações de reencaixe de acarbose (1,228 Å).

A partir das escolhas das melhores poses, baseadas nos valores de RMSD, avaliou-se a energia de afinidade dos complexos pelos ligantes, onde novamente pode-se destacar o complexo rutina-CtMGAM, que apresentou uma energia da ordem de  $-9,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ , seguido pelos complexos mangiferina-CtMGAM e ácido clorogênico-CtMGAM que foram da ordem de  $-8,2$  e  $-8,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ , respectivamente. Esses três complexos citados apresentaram uma energia de ligação mais favorável que o complexo acarbose-CtMGAM. O complexo caféina-CtMGAM apresentou energia de ligação na ordem de  $-6,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ , ligeiramente acima do parâmetro considerado mínimo ( $-6,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) para a formação do complexo.

Tabela 13 – Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados após simulações de docagem contra a subunidade C-terminal (CtMGAM) da enzima maltase-glicoamilase.

Ligantes/Enzima	Parâmetros			
	Energia (kcal mol <sup>-1</sup> )	Ki	pKi	RMSD (Å)
Cafeína	- 6,2	2,839 x 10 <sup>-5</sup>	4,54	1,718
Ácido clorogênico	- 8,0	1,358 x 10 <sup>-6</sup>	5,86	1,857
Mangiferina	- 8,2	9,691 x 10 <sup>-7</sup>	6,01	2,077
Rutina	- 9,8	6,501 x 10 <sup>-8</sup>	7,18	1,330
acarbose *	- 7,9	1,608 x 10 <sup>-6</sup>	5,79	1,228
Metformina	- 5,2	1,536 x 10 <sup>-4</sup>	3,81	1,414

\* ligante co-cristalizado (*redocking*).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No entanto, com base nos resultados, é possível observar que todos os complexos ficaram acima do parâmetro, indicando uma boa afinidade dos ligantes, com destaque para os complexos rutina-CtMGAM, mangiferina-CtMGAM e ácido clorogênico-CtMGAM, que apresentaram maior afinidade que o complexo  $\alpha$ -acarbose-CtMGAM. Vale ressaltar que ao comparar os complexos formados com o complexo metformina-CtMGAM (- 5,2 kcal mol<sup>-1</sup>), todos eles apresentaram melhor energia de afinidade.

Esses resultados são refletidos nos cálculos da constante de inibição (Ki) e pKi, onde pode-se inferir que quanto menor o valor de Ki e maior o pKi, maior a afinidade do ligante pela proteína e, conseqüentemente, menor a concentração de ligante necessária para inibir a atividade enzimática (KADELA-TOMANEK et al., 2021), nesta perspectiva pode-se concluir que rutina-CtMGAM (Ki = 6,501 x 10<sup>-8</sup>, pKi = 7,18) mangiferina-CtMGAM (Ki = 9,691 x 10<sup>-7</sup>, pKi = 6,01) e ácido clorogênico-CtMGAM (Ki = 1,358 x 10<sup>-6</sup>, pKi = 5,86) necessitaram de uma concentração menor para inibir CtMGAM em comparação com a acarbose, cafeína e metformina (Tabela 13).

Com relação às interações intermoleculares, é possível observar que na formação da cafeína-CtMGAM houve apenas uma ligação de hidrogênio forte com o resíduo ASN1404, enquanto o complexo ácido clorogênico-CtMGAM apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos HIS1727A, ARG1730A, GLN1731A, seis ligações de hidrogênio, sendo cinco *Fortes* com os resíduos ARG1311A, THR1726A, ARG1730A, GLN1756A, PRO1793A e

uma *Média* com o resíduo GLN1756A, e, finalmente, duas do tipo pontes salinas com resíduos HIS1727A e ARG1730A (Apêndice E).

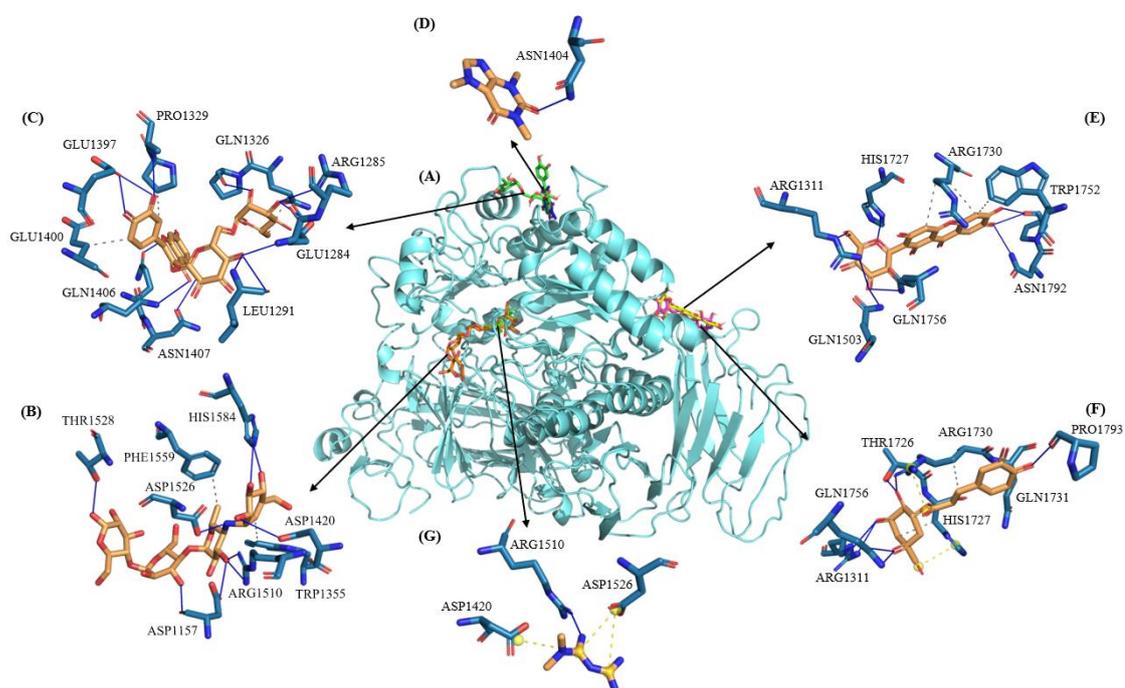
Na formação do complexo mangiferina-CtMGAM, é possível observar que apesar de haver duas interações hidrofóbicas com o resíduo ARG1730A e uma com TRP1752A, há predominância da ligação de hidrogênio, com a formação de oito interações, sendo apenas duas *Médias* com os resíduos ARG1311A, GLN1503A e seis *Fortes* (distância menor que 3,1 Å) com os resíduos ARG1311A, HIS1727A, GLN1756A, ASN1792A, PRO1793A, PRO1793A (Apêndice E).

Esse caráter é muito semelhante ao identificado no complexo rutina-CtMGAM, que também apresentou três interações hidrofóbicas (GLN1326A, PRO1329A, GLU1400A) e doze ligações de hidrogênio, com distâncias que variavam entre 1,76 Å (PRO1327A) e 2,96 Å (ASN1404A) sendo, portanto, classificado como *Forte*. Esse perfil de predominância de ligações de hidrogênio é observável quando se compara o perfil dos complexos mangiferina-CtMGAM, ácido clorogênico-CtMGAM e rutina-CtMGAM, que apesar de complexarem com uma região diferente do sítio acarbose, apresentam similaridade no tipo de interação, uma vez que a acarbose também tem duas interações hidrofóbicas e dez ligações de hidrogênio.

Um perfil muito diferente do complexo formado pela metformina, que possui duas ligações de hidrogênio, três pontes salinas formadas pela interação do grupo guanidina com resíduos ASP1420A e ASP1526A (Figura 21). A formação de pontes salinas também é identificada no complexo ácido clorogênico-CtMGAM, onde ocorre a predominância da ligação de hidrogênio. O complexo cafeína-CtMGAM é formado apenas uma ligação de hidrogênio do tipo *Forte* com o resíduo ASN1404A.

Fazendo uma análise do posicionamento, é possível observar que os ligantes rutina e cafeína estão complexados na mesma região, porém em resíduos totalmente diferentes (Figura 21). Complexos de mangiferina na mesma região do ácido clorogênico têm em comum a interação com os resíduos ARG1730A, ARG1311A, ARG1730A, GLN1756A, PRO1793A e HIS1727A. Ressaltando que, em modelo computacional, todos os ligantes estudados não interagiram com o sítio acarbose, no qual a metformina se complexa, sugerindo a possibilidade de uma ação sinérgica com a acarbose.

Figura 21 – Interação do complexo de CtMGAM com ligantes.



(A) Estrutura do complexo CtMGAM; Mapas de interação da (B) acarbose co-cristalizada e dos ligantes (C) rutina, (D) cafeína, (E) mangiferina, (F) ácido clorogênico e (G) metformina com o receptor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível separar os cafeeiros resistentes à ferrugem dos suscetíveis (*Coffea arabica*) com base na relação entre os metabólitos principais e os elementos inorgânicos em nível traço. Os principais compostos responsáveis por essa diferenciação foram o teor de ácido clorogênico e magnésio nas folhas. O teor de compostos polifenólicos foi menor nas cultivares suscetíveis (principalmente ácido clorogênico) e um efeito diamétrico foi observado entre as concentrações de Mn e Mg. Estes resultados mostram os critérios e variáveis necessárias para a discriminação de cafeeiros resistentes e suscetíveis com base nas análises de elementos inorgânicos e na concentração de polifenóis. O método de classificação PLS-DA é eficaz na discriminação de grupos suscetíveis e resistentes à ferrugem quanto à composição química das folhas de café. A boa classificação dos grupos determinou a identificação de marcadores químicos importantes para cultivares suscetíveis e resistentes à ferrugem.

Em relação as diferentes técnicas de secagem das folhas de café com propósito de conservar os compostos bioativos para o preparo de infusões, verificamos que a secagem por micro-ondas foi o método mais eficaz tanto por evitar a degradação dos metabólitos secundários, como também impediu o desenvolvimento de microrganismos desfavoráveis, devido ao curto tempo de secagem e desnaturou as enzimas oxidativas devido à alta temperatura durante o processo. Como as atividades farmacológicas dependem da preservação dessas substâncias, o pré-tratamento do material vegetal é uma etapa crucial para a extração de compostos bioativos.

Quanto à análise entre a atividade antioxidante e o conteúdo polifenólico das folhas, concluímos que este último influencia diretamente a atividade de captura do radical DPPH•, de tal forma que quanto maior o TFT, maior será essa atividade. Isso ocorre porque os compostos polifenólicos têm uma correlação direta com importantes efeitos farmacológicos (COSME et al., 2020). Estudos anteriores, relataram que as espécies reativas de oxigênio estão intimamente associadas ao desenvolvimento de DM2 (OGUNTIBEJU, 2019). Os extratos das folhas de *C. arabica* mostraram-se muito eficazes na captura de ERO tanto radicalares, quanto não radicalares. Dessa forma, esses extratos podem ser considerados agentes promissores no que diz respeito ao combate do estresse oxidativo e, conseqüentemente, no controle das inúmeras doenças associadas a este problema.

Em relação a bioacessibilidade, os resultados deste estudo mostram que, mesmo após as perdas que ocorrem durante todo o processo da digestão *in vitro*, os extratos das folhas de *C. arabica* se destacam por apresentarem altas concentrações de compostos bioativos, principalmente, de cafeína. O estudo da simulação da digestão é uma ferramenta útil que permite avaliar a influência da matriz vegetal na bioacessibilidade de metabólitos secundários e pode contribuir para um maior entendimento das mudanças que ocorrem após esse processo. No entanto, estudos adicionais, a fim de investigar a biodisponibilidade e a atividade biológica desses compostos são ainda necessários

Por fim, o efeito hipoglicemiante dos extratos das folhas de café também foi analisado em ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. A forte atividade inibitória da  $\alpha$ -glicosidase e da lipase pancreática presentes nos extratos aquosos de *C. arabica* foi confirmada pela alta inibição percentual e, principalmente, pelos baixos valores de IC<sub>50</sub> quando comparadas aos controles positivos (acarbose e orlistat, respectivamente). As substâncias mangiferina e rutina demonstraram propriedades antidiabéticas evidenciadas pela forte inibição da  $\alpha$ -glicosidase, enquanto o ácido clorogênico e a cafeína exibiram propriedades antiobesidade evidenciadas pela inibição significativa da lipase pancreática. Além disso, os extratos das folhas de café promoveram excelente capacidade antiglicante independente da origem da cultivar e, também, foi evidenciado, em modelo *in vivo*, os efeitos hipoglicêmico e hepatoprotetor contra as espécies reativas de oxigênio em peixe zebra adulto. Os estudos em simulação de computador também confirmaram o potencial hipoglicêmico dos compostos bioativos das folhas de café, principalmente da rutina, pois esta substância apresentou os melhores parâmetros de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase.

Desta forma, concluímos que o sinergismo de todos os metabólitos secundários presente nos extratos das folhas de café arábica apresentam propriedades farmacológicas potenciais para a prevenção da diabetes, bem como da obesidade.

## REFERÊNCIAS

- ABALO, R. Coffee and Caffeine Consumption for Human Health. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 2918, 2021.
- ABBAS, G., AL-HARRASI, A. S., HUSSAIN, H., HUSSAIN, J., RASHID, R., & CHOUDHARY, M. I. Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agents for the management of diabetic complications. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 2, p. 198–206, 2016.
- ABBAS, G., AL-HARRASI, A. S., & HUSSAIN, H.  $\alpha$ -Glucosidase Enzyme Inhibitors From Natural Products. **Discovery and Development of Antidiabetic Agents from Natural Products**, p. 251–269, 2017.
- ABD-ALGALEEL, S.; METWALLY, A.; MOHAMED, H.; KASSEM, D.; HATHOUT, R. Synchronizing *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies for the successful nose to brain delivery of an anticancer molecule. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 10, p. 3763-3776, 2021.
- ABDULMALEK, S. A.; FESSAL, M.; EL-SAYED, M. Effective amelioration of hepatic inflammation and insulin response in high fat diet-fed rats via regulating AKT/mTOR signaling: Role of *Lepidium sativum* seed extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 266, p. 113439, 2021.
- ABEYRATHNE, E., NAM, K., HUANG, X., & AHN, D. U. Plant- and Animal-Based Antioxidants' Structure, Efficacy, Mechanisms, and Applications: A Review. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 5, p. 1025, 2022.
- ABREU, L. L. DE C., ROLIM, R. F., & ALMEIDA, A. de A. Type 2 Diabetes mellitus versus pequi's antioxidant potential: a review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e321101119603, 2021.
- AGHAJARI E, KHAJEHLANDI A, MOHAMMADI A. The Effect of Aerobic Training and Caffeine Consumption on Lipid Profile and Resting Blood Pressure in Obese Men: A Quasi-Experimental Study. **Jundishapur J Chronic Dis Care**, v. 9, n. 1, p. e97284, 2020.
- AGUILERA J. M. The food matrix: implications in processing, nutrition and health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 22, p. 3612–3629, 2019.
- AHANGARPOUR, A., SAYAHI, M., & SAYAHI, M. The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. **Diabetes & metabolic syndrome**, v. 13, n. 1, p. 854–857, 2019.
- AJI, O. R., HUDAYA, R. A. & PUTRI, D. A. *In vitro* pancreatic lipase inhibitor activity of *Mangifera foetida* leaves extract. **Jurnal Biodjati**, v. 6, n. 1, p. 82-92, 2021.
- ALASMARI, K.M.; ZEID, I.M.A.; ALATTAR, A.M. Medicinal Properties of Arabica coffee (*Coffea arabica*) Oil: An Overview. **Adv. Life Sci**, v. 8, n. 1, p. 20-29, 2020.

ALBERTO, A.V.P.; da SILVA FERREIRA, N.C.; SOARES, R.F.; ALVES, L.A. Molecular modeling applied to the discovery of new lead compounds for P2 receptors based on natural sources. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 01221, 2020.

ALCÁZAR MAGAÑA, A., KAMIMURA, N., SOUMYANATH, A., STEVENS, J. F., & MAIER, C. S. Caffeoylquinic acids: chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. **The Plant Journal**, v. 107, n. 5, p. 1299–1319, 2021.

ALEIXANDRE-TUDO, J. L., & TOIT, W. D. The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking. In R. L. Solís-Oviedo, & Á. de la Cruz Pech-Canul (Eds.), **Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages**. IntechOpen, 2018.

ALEKSANDROVA, K., KOELMAN, L., & RODRIGUES, C. E. Dietary patterns and biomarkers of oxidative stress and inflammation: A systematic review of observational and intervention studies. **Redox biology**, v. 42, n. 101869, 2021.

ALMEIDA, Ricardo Farias de. **Estudo químico e farmacológico de folhas da espécie de café *Coffea arabica***: isolamento de compostos bioativos e avaliação do potencial antioxidante, de inibição da enzima de conversão da angiotensina e de atividade anticolinesterásica. (2017). 137 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ALONGI, M., & ANESE, M. Effect of coffee roasting on in vitro  $\alpha$ -glucosidase activity: Inhibition and mechanism of action. **Food Research International**, v. 111, p. 480–487, 2018.

ALOUFFI, S., & KHAN, M. Dicarbonyls Generation, Toxicities, Detoxifications and Potential Roles in Diabetes Complications. **Current protein & peptide science**, v. 21, n. 9, p. 890–898, 2020.

ALPHONSE, L.; KOUBALA, B. B.; NEGI, P. S. Antidiabetic ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) and anti-obesity (lipase) inhibitory activities of edible cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as measured by *in vitro* gastrointestinal digestion: effects of phenolics and harvested time. **International Journal of Food Properties**, v. 25, n. 1, p. 492-508, 2022.

ALSHAWI, A.H. The Effect of Coffee Consumption on Blood Glucose: A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 19, p. 420-429, 2020.

ALVES, R.P.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; LIÃO, L.M.; FLORES, I.S. Evaluation of the metabolic profile of arabica coffee via NMR in relation to the time and temperature of the roasting procedure. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 32, n. 1, 2021.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. **Diabetes care**, v. 44 (Suppl 1), S1–S2, 2021.

AMJADI, S., SHAHNAZ, F., SHOKOUHI, B., AZARMI, Y., SIAHI-SHADBAD, M., GHANBARZADEH, S., KOUHSOLTANI, M., EBRAHIMI, A., & HAMISHEHKAR, H. Nanophytosomes for enhancement of rutin efficacy in oral administration for diabetes treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. **International journal of pharmaceutics**, v. 610, n. 121208, 2021.

ANAGNOSTIS, P., SELALMATZIDOU, D., SAPRANIDIS, M., PANAGIOTOU, A., POLYZOS, S. A., SLAVAKIS, A., & KITA, M. Comparative effects of sibutramine and orlistat on weight loss, glucose metabolism and leptin levels in non-diabetic obese patients: A prospective study. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 16, n. 1, p. 146–147, 2012.

ANDRÉS, C.M.C.; PÉREZ DE LA LASTRA, J.M.; JUAN, C.A.; PLOU, F.J.; PÉREZ-LEBEÑA, E. Chemistry of Hydrogen Peroxide Formation and Elimination in Mammalian Cells, and Its Role in Various Pathologies. **Stresses**, v. 2, p. 256–274, 2022.

AQUINO, A.; POESIO, P. Off-Design Exergy Analysis of Convective Drying Using a Two-Phase Multispecies Model. **Energies**, v. 14, n. 223, 2021.

ARANDA-RIVERA AK, CRUZ-GREGORIO A, ARANCIBIA-HERNÁNDEZ YL, HERNÁNDEZ-CRUZ EY, PEDRAZA-CHAVERRI J. RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. **Oxygen**, v. 2, n. 4, p. 437-478, 2022.

ASGHARPOUR-DIL, F.; RANJKESH, Z.; GOODARZI, M. T. A systematic review of antiglycation medicinal plants. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 13, n. 2, p. 1225–1229, 2019.

AZIZULLAH, A.; TAIMUR, N.; HÄDER, D-P. Chapter 14 - Novel biotechnological substances in higher plants. **Natural Bioactive Compounds**, p. 275-298, 2021.

BAILONE, R.L.; AGUIAR, L.K.D.; ROCA, R.D.O.; BORRA, R.C.; CORRÊA, T.; JANKE, H.; FUKUSHIMA, H.C.S. Zebrafish as an animal model for food safety research: trends in the animal research. **Food Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 283-302, 2019.

BAILONE R.L.; R.; FUKUSHIMA, H.C.S.; FERNANDES, B.H.V.; de AGUIAR, L.K.; CORRÊA, T.; JANKE, H.; SETTI, P.G.; ROÇA, R.O.; BORRA, R.C. Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research. **Laboratory Animal Research**, v. 36, n. 13, p. 1-10, 2020.

BAJOUB, A., MEDINA-RODRÍGUEZ, S., AJAL, E. A., CUADROS-RODRÍGUEZ, L., MONASTERIO, R. P., VERCAMMEN, J., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., & CARRASCO-PANCORBO, A. A metabolic fingerprinting approach based on selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) and chemometrics: A reliable tool for Mediterranean origin-labeled olive oils authentication. **Food Research International**, v. 106, p. 233–242, 2018.

BARRETO, J. C., TREVISAN, M. T., HULL, W. E., ERBEN, G., DE 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.

BEZERRA, F. W. A., FECHINE, L. M. U. D., LOPES, K. P. S., DE SOUSA, A. F., DO NASCIMENTO, G. O., DE S. AMARAL, H. H., ... RICARDO, N. M. P. S.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of mangiferin-loaded F127/PEG micellar system. **Materials Letters**, v. 255, p. 126522, 2019.

BIANCOLILLO A, MARINI F, RUCKEBUSCH C, VITALE R. Chemometric Strategies for Spectroscopy-Based Food Authentication. **Applied Sciences**, v. 10, n. 18, p. 6544, 2020.

BIGAGLI, E.; LODOVICI, M. Circulating Oxidative Stress Biomarkers in Clinical Studies on Type 2 Diabetes and Its Complications. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 1–17, 2019.

BIOVIA, D.S.; BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; RICHMOND, T.J. Dassault systèmes BIOVIA, discovery studio visualizer, v.17.2, San Diego: Dassault Systèmes. **J Chem Phys**, v. 10, p. 21–9991, 2000.

BLASCHEK, L., & PESQUET, E. Phenoloxidasas in Plants-How Structural Diversity Enables Functional Specificity. **Frontiers in plant science**, v. 12, n. 754601, 2021.

BLJAJIĆ, K.; BRAJKOVIĆ, A.; ČAČIĆ, A.; VUJIĆ, L.; JABLAN, J.; CARVALHO, I.S.; KONČIĆ, M.Z. Chemical Composition, Antioxidant, and  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibiting Activity of Aqueous and Hydroethanolic Extracts of Traditional Antidiabetics from Croatian Ethnomedicine. **Horticulturæ**, v. 7, n. 2, p. 15, 2021.

BOCCCELLINO, M., & D'ANGELO, S. Anti-Obesity Effects of Polyphenol Intake: Current Status and Future Possibilities. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p. 5642, 2020.

BOECKX, T., WINTERS, A., WEBB, K. J., & KINGSTON-SMITH, A. H. Detection of Potential Chloroplastic Substrates for Polyphenol Oxidase Suggests a Role in Undamaged Leaves. **Frontiers in plant science**, v. 8, n. 237, 2017.

BOONPHANG, O., ONTAWONG, A., PASACHAN, T., PHATSARA, M., DUANGJAI, A., AMORNLERDPISON, D., JINAKOTE, M., & SRIMAROENG, C. Antidiabetic and Renoprotective Effects of Coffea arabica Pulp Aqueous Extract through Preserving Organic Cation Transport System Mediated Oxidative Stress Pathway in Experimental Type 2 Diabetic Rats. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 26, n. 7, p. 1907, 2021.

BORS, W., HELLER, W., MICHEL, C., SARAN, M. Radical Chemistry of Flavonoid Antioxidants. In: Emerit, I., Packer, L., Auclair, C. (eds) Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 264, p. 165-170, 1990.

BOULEBD, H. Radical scavenging behavior of butylated hydroxytoluene against oxygenated free radicals in physiological environments: Insights from DFT calculations. **Int J Chem Kinet**, v. 54, p. 50–57, 2022.

BROWN, S. D. The chemometrics revolution reexamined. **Journal of Chemometrics**, v. 31, p. e2856, 2017.

BUDRYN, G., ZAKŁOS-SZYDA, M., ZACZYŃSKA, D., ŻYŻELEWICZ, D., GRZELCZYK, J., ZDUŃCZYK, Z., & JUŚKIEWICZ, J. Green and roasted coffee extracts as antioxidants in  $\beta$ TC3 cells with induced oxidative stress and lipid accumulation inhibitors in 3T3L1 cells, and their bioactivity in rats fed high fat diet. **European Food Research and**

**Technology**, v. 243, n. 8, p. 1323–1334, 2017.

BULUGONDA, R. K., KUMAR, K. A., GANGAPPA, D., BEEDA, H., PHILIP, G. H., MURALIDHARA RAO, D., & FAISAL, S. M. Mangiferin from *Pueraria tuberosa* reduces inflammation via inactivation of NLRP3 inflammasome. **Scientific reports**, v. 7, n. 42683, 2017.

CAI, Q., CHEN, F., WANG, T., LUO, F., LIU, X., WU, Q., HE, Q., WANG, Z., LIU, Y., LIU, L., CHEN, J., & XU, L. Obesity and COVID-19 Severity in a Designated Hospital in Shenzhen, China. **Diabetes care**, v. 43, n. 7, p. 1392–1398, 2020.

CĂLINOIU, L. F., & VODNAR, D. C. Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1615, 2018.

CALZADA, F., SOLARES-PASCASIO, J. I., ORDOÑEZ-RAZO, R. M., VELAZQUEZ, C., BARBOSA, E., GARCÍA-HERNÁNDEZ, N., MENDEZ-LUNA, D., & CORREA-BASURTO, J. Antihyperglycemic Activity of the Leaves from *Annona cherimola* Miller and Rutin on Alloxan-induced Diabetic Rats. **Pharmacognosy research**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2017.

CAMARGO JSAA, ZAMARCHI TBO, BALIEIRO AAS, PESSOA FAC, CAMARGO LMA. Prevalence of obesity, high blood pressure, dyslipidemia and their associated factors in children and adolescents in a municipality in the Brazilian Amazon region. **Journal of Human Growth and Development**, v. 31, n. 1, p. 2175-3598, 2021.

CAMPA, C.; MONDOLOT, L.; RAKOTONDRAVAO, A.; BIDEL, L.P.; GARGADENNEC, A.; COUTURON, E.; LA FISCA, P.; RAKOTOMALALA, J.J.; JAY-ALLEMAND, C., DAVIS, A.P. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. **Annals of Botany**, v. 10, n. 3, p. 595-613, 2012.

CANEDO, A.; DE JESUS L.W.O.; BAILÃO E.F.L.C.; ROCHA T.L. Micronucleus test and Nuclear Abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): past, present and future trends. **Environment Pollution**, v. 290, p. 118019, 2021.

CANEDO, A., SAIKI, P., LIBERAL SANTOS, A., DA SILVA CARNEIRO, K., MARTINS DE SOUZA, A., QUALHATO, G., DA SILVA BRITO, R., MELLO-ANDRADE, F., & LOPES ROCHA, T. O peixe-zebra (*Danio rerio*) encontra a bioética: os princípios éticos dos 10Rs na pesquisa. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, v. 23, n. 1, 2022.

CAPIOTTI, K.M., ANTONIOLI, R., KIST, L.W., BOGO, M.R., BONAN, C.D., da SILVA, R.S. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comp. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 171, p. 58–65, 2014.

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

CASTRO, A.; MAYORGA, E.; MORENO, F. Mathematical modelling of convective drying of fruits: A review. **J. Food Eng.**, v. 223, p. 152–167, 2018.

CETINKAYA, H., KOC, M., & KULAK, M. Monitoring of mineral and polyphenol content in olive leaves under drought conditions: Application chemometric techniques. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 78–84, 2016.

CHEN, L. Y., HUANG, C. N., LIAO, C. K., CHANG, H. M., KUAN, Y. H., TSENG, T. J., YEN, K. J., YANG, K. L., & LIN, H. C. Effects of Rutin on Wound Healing in Hyperglycemic Rats. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 11, p. 1122, 2020.

CHEN, X., YU, M., XU, W., ZOU, L., YE, J., LIU, Y., XIAO, Y., & LUO, J. Rutin inhibited the advanced glycation end products-stimulated inflammatory response and extra-cellular matrix degeneration via targeting TRAF-6 and BCL-2 proteins in mouse model of osteoarthritis. **Ageing**, v. 13, n. 18, p. 22134–22147, 2021.

CHEWCHINDA, S., SURIYAPHAN, O., KANCHANADUMKERNG, P., SATO, H., & HIRUNPANICH SATO, V. Comparison of Antioxidant and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities in Different Cultivars of Five Mango (*Mangifera Indica L.*) Leaf Extracts. **Chiang Mai University journal of natural sciences**, v. 20, n. 1, p. e2021014, 2020.

CHOWDHARY, V., ALOOPARAMPIL, S., PANDYA, R. V., & TANK, J. G. Physiological Function of Phenolic Compounds in Plant Defense System. In (Ed.), Phenolic Compounds - Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications. **IntechOpen**, 2021.

CINCOTTA, F.; BRIGHINA, S.; CONDURSO, C.; ARENA, E.; VERZERA, A.; FALLICO, B. Sugars Replacement as a Strategy to Control the Formation of  $\alpha$ -Dicarbonyl and Furanic Compounds during Cookie Processing. **Foods**, v. 10, p. 2101, 2021.

CLIFFORD, M. N.; KERIMI, A.; WILLIAMSON, G. Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids (acyl-quinic acids) in humans, **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf**, v. 19, p. 1299-1352, 2020.

CORNELIS, M.C. Coffee and type 2 diabetes: time to consider alternative mechanisms? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 111, n. 2, p. 248–249, 2020.

COSME, P., RODRÍGUEZ, A. B., ESPINO, J., & GARRIDO, M. Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 12, p. 1263, 2020.

CHISTÉ, R. C., MERCADANTE, A. Z., GOMES, A., FERNANDES, E., LIMA, J. L. F. DA C., & BRAGAGNOLO, N. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419–426, 2011.

CSIZMADIA, P. MarvinSketch and MarvinView: molecule applets for the World Wide Web. **MDPI**, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ecsoc-3-01775>. Acesso em: 06 jun. 2020.

da SILVA, W. M. B., de OLIVEIRA PINHEIRO, S., ALVES, D. R., de MENEZES, J. E. S. A., MAGALHÃES, F. E. A., SILVA, F. C. O., ... de MORAIS, S. M. Synthesis of Quercetin-

Metal Complexes, *In Vitro* and *In Silico* Anticholinesterase and Antioxidant Evaluation, and *In Vivo* Toxicological and Anxiolytic Activities. **Neurotoxicity Research**, v. 37, n. 4, p. 893–903, 2019.

de ALMEIDA, R., TREVISAN, M. T. S., THOMAZIELLO, R. A., BREUER, A., KLIKA, K. D., ULRICH, C. M., & OWEN, R. W. Nutraceutical compounds: echinoids, flavonoids, xanthenes and caffeine identified and quantitated in the leaves of *Coffea arabica* trees from three different regions of Brazil. **Food Research International**, v. 115, p. 403-503, 2019.

de ALMEIDA, R., ULRICH, C., OWEN, R. W., TREVISAN, M. T. S. Content and solvent extraction in coffee leaves from Brazil. **Proceedings of ASIC Conferences**, v. 1, p. 42-45, 2014.

de ABREU, F., FERREIRA, L., de JESUS, M., ULIANA, M., GOMES, J. C., FUMIERE, M., SCHERER, R., SOARES, W. Arabica and Conilon coffee flowers: Bioactive compounds and antioxidant capacity under different processes. **Food chemistry**, v. 336, p. 127701, 2021.

de OLIVEIRA FASSIO, L., MALTA, M., CARVALHO, G., LISKA, G., de LIMA, P., & PIMENTA, C. Sensory description of cultivars (*Coffea Arabica* L.) resistant to rust and its correlation with caffeine, trigonelline, and chlorogenic acid compounds. **Beverages**, v. 2, n. 1, p. 1, 2016.

de SOUZA BASTOS, A., GRAVES, D. T., DE MELO LOUREIRO, A. P., JÚNIOR, C. R., CORBI, S., FRIZZERA, F., SCAREL-CAMINAGA, R. M., CÂMARA, N. O., ANDRIANKAJA, O. M., HIYANE, M. I., & ORRICO, S. Diabetes and increased lipid peroxidation are associated with systemic inflammation even in well-controlled patients. **Journal of diabetes and its complications**, v. 30, n. 8, p. 1593–1599, 2016.

DEL CASTILLO, M.D.; FERNANDEZ-GOMEZ, B.; MARTINEZ-SAEZ, N.; IRIONDO-DEHOND, A.; MESA, M.D. Coffee By-products (chapter 12) In: Farah A., editor. Coffee: Production, Quality and Chemistry. **Royal Society of Chemistry**, p. 309–334, 2019.

DELANO, W.L. Pymol: an open-source molecular graphics tool. In: CCP4 newsletter on protein crystallography, 2002. Disponível em: <http://www.ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter36.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2020.

DEMIR, E.O.; DEMIRTAŞ, C.Y.; PAŞAOĞLU, Ö.T. The effects of caffeine on the renal antioxidant activity in rats. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 216-222, 2016.

DI STEFANO, E.; OLIVIERO, T.; UDENIGWE, C. C. Functional significance and structure–activity relationship of food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 7–12, 2018.

DIAS DTM, PALERMO KR, MOTTA BP, KAGA AK, LIMA TFO, BRUNETTI IL, BAVIERA AM. Rutin inhibits the *in vitro* formation of advanced glycation products and protein oxidation more efficiently than quercetin. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 42, p. e718, 2021.

DINDA, B.; DINDA, M.; ROY, A.; DINDA, S. Dietary plant flavonoids in prevention of obesity and diabetes. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 120, p.

159–235, 2020.

DING, H., LI, Y., ZHAO, C., YANG, Y., XIONG, C., ZHANG, D., FENG, S., WU, J., & WANG, X. Rutin Supplementation Reduces Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis of Mammary Gland in Sheep During the Transition Period. **Frontiers in veterinary science**, v. 9, 2022.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2019-2020. **Brasília: Sociedade Brasileira de Diabetes**, 491 p, 2019.

DU, S., LIU, H., LEI, T., XIE, X., WANG, H., HE, X., TONG, R., & WANG, Y. Mangiferin: An effective therapeutic agent against several disorders (Review). **Molecular medicine reports**, v. 18, n. 6, p. 4775–4786, 2018.

DUMANOVIĆ J, NEPOVIMOVA E, NATIĆ M, KUČA K AND JAČEVIĆ V. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. **Front. Plant Sci.** v. 11, 2021.

DUONG, T.-H., PARAMITA DEVI, A., TRAN, N.-M.-A., PHAN, H.-V.-T., HUYNH, N.-V., SICHAEM, J., ... NGUYEN, T.-C. Synthesis,  $\alpha$ -glucosidase inhibition, and molecular docking studies of novel N-substituted hydrazide derivatives of atranorin as antidiabetic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 17, p. 127359, 2020.

DUTTA, S., MAHALANOBISH, S., SAHA, S., GHOSH, S., & SIL, P. C. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 128, p. 240–255, 2019.

EDWARDS, C. A., HAVLIK, J., CONG, W., MULLEN, W., PRESTON, T., MORRISON, D. J., & COMBET, E. Polyphenols and health: Interactions between fibre, plant polyphenols and the gut microbiota. **Nutrition bulletin**, v. 42, n. 4, p. 356–360, 2017.

EGUCHI, N., VAZIRI, N. D., DAFOE, D. C., & ICHII, H. The Role of Oxidative Stress in Pancreatic  $\beta$  Cell Dysfunction in Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1509, 2021.

EL KHOMSI, M.; KARA, M.; HMAMOU, A.; ASSOUGUEM, A.; AL KAMALY, O.; SALEH, A.; ERCISLI, S.; FIDAN, H.; HMOUNI, D. *In Vitro* Studies on the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Total Polyphenol Content of *Cynara humilis* from Moulay Yacoub Area (Morocco). **Plants**, v. 11, p. 1200, 2022.

ENOGIERU, A. B., HAYLETT, W., HISS, D. C., BARDIEN, S., & EKPO, O. E. Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 1-17, 2018.

FARHOOD, H.B.; BALAS, M.; GRADINARU, D.; MARGINA, D.; DINISCHIOTU, A. Hepatoprotective effects of chlorogenic acid under hyperglycemic conditions. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 24, p. 301-307, 2019.

FARIAS-PEREIRA, R., PARK, CS, & PARK, Y. Mecanismos de ação dos componentes

- bioativos do café no metabolismo lipídico. **Ciência de alimentos e biotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1287-1296, 2019.
- FARZADFAR, S., ZARINKAMAR, F., & HOJATI, M. Magnesium and manganese affect photosynthesis, essential oil composition and phenolic compounds of *Tanacetum parthenium*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 112, p. 207–217, 2017.
- FENG Y, NAN H, ZHOU H, XI P, LI B. Mechanism of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity by bavachalcone. **Food Sci Technol**, v. 42, p. e123421, 2022.
- FERNANDEZ-GOMEZ, B., NITRIDE, C., ULLATE, M., MAMONE, G., FERRANTI, P., & DEL CASTILLO, M. D. Inhibitors of advanced glycation end products from coffee bean roasting by-product. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 6, p. 1101–1110, 2018.
- FERREIRA, F.; VALENTIM, I.; CATARI, E.; TREVISAN, M.; OLEA-AZAR, C.; PEREZ-CRUZ, F.; ABREU, F.; GOULART, M. Antioxidant activity of the mangiferin inclusion complex with $\beta$ -cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 129–134, 20136.
- FERREIRA, M. M. C. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações. **Campinas, SP:** Editora da Unicamp, 2015.
- FERREIRA, T.; SHULER, J.; GUIMARÃES, R.; FARAH, A. Introduction to Coffee Plant and Genetics. In *Coffee: Production, Quality and Chemistry*; **Royal Society of Chemistry**, p. 1–25, 2019.
- FERREIRA-SANTOS, P., ZANUSO, E., GENISHEVA, Z., ROCHA, C., & TEIXEIRA, J. A. Green and Sustainable Valorization of Bioactive Phenolic Compounds from Pinus By-Products. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 25, n. 12, p. 2931, 2020.
- FOMENKO, E. V., & CHI, Y. Mangiferin modulation of metabolism and metabolic syndrome. **BioFactors** (Oxford, England), v. 42, n. 5, p. 492–503, 2016.
- FOURNET, M., BONTÉ, F., & DESMOULIÈRE, A. Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. **Aging and disease**, v. 9, n. 5, p. 880–900, 2018.
- FRANCO, R., ZABISKY, L., LIMA Júnior, J., ALVES, V., JUSTINO, A., SARAIVA, A., GOULART, L., ESPINDOLA, F. Antidiabetic effects of *Syzygium cumini* leaves: A non-hemolytic plant with potential against process of oxidation, glycation, inflammation and digestive enzymes catalysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, p. 113132, 2020a.
- FRANCO, E., CONTESINI, F. J., LIMA da SILVA, B., ALVES de Piloto FERNANDES, A. M., WIELEWSKI Leme, C., GONÇALVES Cirino, J. P., BUENO Campos, P. R., de OLIVEIRA Carvalho, P. Enzyme-assisted modification of flavonoids from *Matricaria chamomilla*: antioxidant activity and inhibitory effect on digestive enzymes. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 35, n. 1, p. 42–49, 2020b.
- GARCIA-GONZALEZ, M., MINGUET-LOBATO, M., PLOU, F. J., & FERNANDEZ-LOBATO, M. Molecular characterization and heterologous expression of two  $\alpha$ -glucosidases

from *Metschnikowia* spp, both producers of honey sugars. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 140, 2020.

GHADDAR, B.; DIOTEL, N. Zebrafish: A New Promise to Study the Impact of Metabolic Disorders on the Brain. **Int. J. Mol. Sci**, v. 23, p. 5372, 2022.

GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 305–312, 2017.

GHUFRON ROSYADY, M., ANOM WIJAYA, K., WULANJARI, D., & Wafa, A. Role of Mineral Elements to Induce the Resistance of Arabica Coffee Against Rust Disease at Lowland Area. **E3S Web of Conferences**, v. 142, p. 03003, 2020.

GIRSANG, E., GINTING, C. N., LISTER, I., GUNAWAN, K. Y., & WIDOWATI, W. Anti-inflammatory and antiaging properties of chlorogenic acid on UV-induced fibroblast cell. **PeerJ**, v. 9, p. e11419, 2021.

GLOSTER, T. M., & DAVIES, G. J. Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state. **Org. Biomol. Chem.**, v. 8, n. 2, p. 305–320, 2010.

GONÇALVES, S., MOREIRA, E., GROSSO, C., ANDRADE, P. B., VALENTÃO, P., ROMANO, A. Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 219–227, 2017.

GONÇALVES, A. C., GASPAR, D., FLORES-FÉLIX, J. D., FALCÃO, A., ALVES, G., & SILVA, L. R. Effects of Functional Phenolics Dietary Supplementation on Athletes' Performance and Recovery: A Review. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 9, p. 4652, 2022.

GONZÁLEZ-MENDOZA, V. M., SÁNCHEZ-SANDOVAL, M. E., MUNNIK, T., & HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S. Biochemical characterization of phospholipases C from *Coffea arabica* in response to aluminium stress. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 204, p. 110951, 2020.

GRANATO, D., SHAHIDI, F., WROLSTAD, R., KILMARTIN, P., MELTON, L. D., HIDALGO, F. J., ... FINGLAS, P., 2018. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods? *Food Chemistry*, 264, 471–475.

GROENER, J. B., OIKONOMOU, D., CHEKO, R., KENDER, Z., ZEMVA, J., KIHM, L., MUCKENTHALER, M., PETERS, V., FLEMING, T., KOPF, S., & NAWROTH, P. P. Methylglyoxal and Advanced Glycation End Products in Patients with Diabetes - What We Know so Far and the Missing Links. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, v. 127, n. 8, p. 497–504, 2019.

GROSSO, G.; GODOS, J.; GALVANO, F.; GIOVANNUCCI, E.L. Coffee, caffeine, and health outcomes: an umbrella review. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 37, p.131–156, 2017.

GUERREIRO-Filho, O. Coffee leaf miner resistance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**,

v. 18, p. 109–117, 2014.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-91, 2012.

GUNTER NV, TEH SS, LIM YM AND MAH SH. Natural Xanthonenes and Skin Inflammatory Diseases: Multitargeting Mechanisms of Action and Potential Application. **Front. Pharmacol.**, v. 11, p. 594202, 2020.

GUNTURIZ ML, FORERO AY, CHAPARRO PE. Genes Implicated in Obesity and Overweight: Potential Biomarkers of Early Diagnosis. **Curr Res Clin Diab Obes: CRCDO-101**, 2018.

GUYOT, R., HAMON, P., COUTURON, E., RAHARIMALALA, N., RAKOTOMALALA, J. J., LAKKANNA, S., SABATIER, S., AFFOUARD, A., & BONNET, P. WCSdb: a database of wild *Coffea* species. **Database: The Journal of Biological Databases And Curation**, baaa069, 2020.

HALGREN TA. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **J Comput Chem.**, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R. How glyphosate affects plant disease development: It is more than enhanced susceptibility. **Pest Management Science**, v. 74, n. 5, p. 1054–1063, 2018.

HANWELL MD, CURTIS DE, LONIE DC, VANDERMEERSCH T, ZUREK E, HUTCHISON GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J Cheminform**, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2012.

HAUNER, H. Obesity and Diabetes. **In Textbook of Diabetes** (eds R.I.G. Holt, C.S. Cockram, A. Flyvbjerg and B.J. Goldstein), 2016.

HE, X., ZHENG, S., SHENG, Y., MIAO, T., XU, J., XU, W., HUANG, K., & ZHAO, C. Chlorogenic acid ameliorates obesity by preventing energy balance shift in high-fat diet induced obese mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 2, p. 631–637, 2021.

HEINZE, J.; GENSCHE, S.; WEBER, E.; JOSHI, J. Soil temperature modifies effects of soil biota on plant growth, **Journal of Plant Ecology**, v. 10, n. 5, p. 808–821, 2017.

HERNANDEZ-Hernandez, O., OLANO, A., RASTALL, R. A., MORENO, F. J. *In vitro* digestibility of dietary carbohydrates: toward a standardized methodology beyond amylolytic and microbial enzymes. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, p. 61, 2019.

HU, B., CUI, F., YIN, F., ZENG, X., SUN, Y., & LI, Y. Caffeoylquinic acids competitively inhibit pancreatic lipase through binding to the catalytic triad. **International journal of biological macromolecules**, v. 80, p. 529–535, 2015.

HU, W., SARENGAOWA, GUAN, Y., & FENG, K. Biosynthesis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. **Frontiers in microbiology**, v.

13, p. 906069, 2022.

HUANG, R., ZHANG, Y., SHEN, S., ZHI, Z., CHEN, H., CHEN, S., YE, X. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory effects of flavonoids from different citrus peel extracts: An *in vitro* study. **Food Chemistry**, v. 326, p. 126785, 2020.

HUEY R, MORRIS GM, FORLI S. Using AutoDock 4 and AutoDock vina with AutoDockTools: a tutorial. In: The Scripps Research Institute, Molecular Graphics Laboratory, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/VasanthanVasudevan-2/post/Auto-grid-generation-in-Autodock-tool-for-docking/attachment/59d6223fc49f478072e98d56/AS%3A272113926115328%401441888423193/download/example.zip>. Acesso: 5 jun. 2020.

HUO, M., XIA, A., CHENG, W., ZHOU, M., WANG, J., SHI, T., CAI, C., JIN, W., ZHOU, M., LIAO, Y., & LIAO, Z. Rutin Promotes Pancreatic Cancer Cell Apoptosis by Upregulating miRNA-877-3p Expression. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 27, n. 7, p. 2293, 2022.

IGLESIAS-CARRES, L., MAS-CAPDEVILA, A., BRAVO, F. I., ARAGONÈS, G., AROLA-ARNAL, A., & MUGUERZA, B. A comparative study on the bioavailability of phenolic compounds from organic and nonorganic red grapes. **Food chemistry**, v. 299, p. 125092, 2019.

IMBERTY A, HARDMAN KD, CARVER JP, PEREZ S. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions: docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991.

IMRAN, M., ARSHAD, M. S., BUTT, M. S., KWON, J. H., ARSHAD, M. U., & SULTAN, M. T. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 84, 2017.

IDF DIABETES ATLAS. PubMed, 10th ed., **Brussels**, International Diabetes Federation, 2021. Disponível em: [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org). Acesso: 6 jul. 2022.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Statistical book**, 2016. Disponível em: [http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp?section=Statistics](http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics). Acesso em: 13 mai. 2019.

IRIONDO-DEHOND, A., HAZA, A. I., ÁVALOS, A., DEL CASTILLO, M. D., & MORALES, P. Validation of coffee silverskin extract as a food ingredient by the analysis of cytotoxicity and genotoxicity. **Food Research International** (Ottawa, Ont.), v. 100, n. 1, p. 791–797, 2017.

ISLAM, S., RAHMAN, S., HAQUE, T., SUMON, A. H., AHMED, A. M., & ALI, N. Prevalence of elevated liver enzymes and its association with type 2 diabetes: A cross-sectional study in Bangladeshi adults. **Endocrinology, diabetes & metabolism**, v. 3, n. 2, p. e00116, 2020.

ITO, F.; SONO, Y.; ITO, T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. **Antioxidants**, v. 8, n. 3, p. 72, 2019.

ITOH, K., MURATA, K., NAKAGAKI, Y et al. (2016). A pancreatic lipase inhibitory activity by Mango (*Mangifera indica*) leaf methanolic extract. **J Plant Stud.**, v. 5, n. 2, p. 72-78, 2016.

JARADAT, N., ZAID, A. N., ZAGHAL, E. Anti-lipase activity for *Portulaca oleracea*, *Urtica urens*, *Brassica napus* and *Lathyrus hierosolymitanus* wild plants from Palestine. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 828-836, 2017.

JIANG, T., HAN, F., GAO, G., & LIU, M. Mangiferin exert cardioprotective and anti-apoptotic effects in heart failure induced rats. **Life Sciences**, v. 249, p. 117476, 2020.

JIMENEZ-GARCIA, S. N., VAZQUEZ-CRUZ, M. A., RAMIREZ-GOMEZ, X. S., BELTRAN-CAMPOS, V., CONTRERAS-MEDINA, L. M., GARCIA-TREJO, J. F., & FERREGRINO-PÉREZ, A. A. Changes in the Content of Phenolic Compounds and Biological Activity in Traditional Mexican Herbal Infusions with Different Drying Methods. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1601, 2020.

JUSTINO, A. B.; MIRANDA, N. C.; FRANCO, R. R.; MARTINS, M. M.; SILVA, N. M. D.; ESPINDOLA, F. S. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with *in vitro* antidiabetic and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 100, p. 83-92, 2018.

KACHMAR, M. R., OLIVEIRA, A. P., VALENTÃO, P., GIL-Izquierdo, A., DOMÍNGUEZ-Perles, R., OUAHBI, A., BADAoui, K. E., ANDRADE, P. B., FERRERES, F. HPLC-DAD-ESI/MSn phenolic profile and *in vitro* biological potential of *Centaurium erythraea* Rafn aqueous extract. **Food Chem.**, v. 278, p. 424-433, 2019.

KADELA-TOMANEK, Monika & JASTRZEBSKA, Maria & MARCINIEC, Krzysztof & CHROBAK, Elwira & BEBENEK, Ewa & BORYCZKA, Stanisław. Lipophilicity, Pharmacokinetic Properties, and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1,4-Quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, p. 781, 2021.

KASAHEN, A. Integrated Diseased Management on Coffee Wilt Disease Caused by *Fusarium Xylarioides* and its Mangement Option Review. **Agri Res& Tech: Open Access J.** v. 22, n. 4, p. 556232, 2019.

KATERJI, M., FILIPPOVA, M., & DUERKSEN-HUGHES, P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 1-29, 2019.

KAUR, S., SAMOTA, M. K., CHOUDHARY, M., CHOUDHARY, M., PANDEY, A. K., SHARMA, A., & THAKUR, J. How do plants defend themselves against pathogens- Biochemical mechanisms and genetic interventions. **Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology**, v. 28, n. 2, p. 485–504, 2022.

KHAN, M.; LIU, H.; WANG, J.; SUN, B. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. **Food Res. Int.**, v. 130, p. 108933, 2019.

KIOKIAS, S., & OREOPOULOU, V. A Review of the Health Protective Effects of Phenolic

Acids against a Range of Severe Pathologic Conditions (Including Coronavirus-Based Infections). **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 26, n. 17, p. 5405, 2021.

KIM, D. H., PARK, Y. H., LEE, J. S., JEONG, H. I., LEE, K. W., & KANG, T. H. Anti-obesity effect of DKB-117 through the Inhibition of pancreatic lipase and  $\alpha$ -amylase activity. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 3053, 2020.

KIM, S., THIESSEN, P. A., CHENG, T., ZHANG, J., GINDULYTE, A. & BOLTON, E. E. PUG-View: Programmatic access to chemical annotations integrated in PubChem. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 56, 2019.

KLINGEL, T., KREMER, J. I., GOTTSTEIN, V., RAJCIC DE REZENDE, T., SCHWARZ, S., & LACHENMEIER, D. W. A Review of Coffee By-Products Including Leaf, Flower, Cherry, Husk, Silver Skin, and Spent Grounds as Novel Foods within the European Union. **Foods** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 5, p. 665, 2020.

KO, C. W.; QU, J.; BLACK, D. D.; TSO, P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology*, v. 17, n. 3, p. 169-183, 2020.

KONG, L., XU, M., QIU, Y., LIAO, M., ZHANG, Q., YANG, L., & ZHENG, G. Chlorogenic acid and caffeine combination attenuates adipogenesis by regulating fat metabolism and inhibiting adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 7, 2021.

KORAC, B., KALEZIC, A., PEKOVIC-Vaughan, V., KORAC, A., JANKOVIC, A. Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. **Redox Biology**, v. 42, p.101887, 2021.

KRAKOWSKA-SIEPRAWKA, A.; KIEŁBASA, A.; RAFI ŃSKA, K.; LIGOR, M.; BUSZEWSKI, B. Modern Methods of Pre-Treatment of Plant Material for the Extraction of Bioactive Compounds. **Molecules**, v. 27, p. 730, 2022.

KRISHNAMURTI, C.; RAO, S. C. The isolation of morphine by Serturmer. **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 60, n. 11, p. 861–862, 2016.

KUMAR, A., & CHAUHAN, S. Pancreatic lipase inhibitors: The road voyaged and successes. **Life Sciences**, v. 271, p. 119115, 2021.

KUMAR, Y.; GOYAL, R. K.; THAKUR, A. K. Pharmacotherapeutics of miglitol: an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. **J Anal Pharm Res.**, v. 7, n. 6, p. 617-619, 2018.

LACERDA, J. S., MARTINEZ, H. E. P., PEDROSA, A. W., CLEMENTE, J. M., SANTOS, R. H. S., OLIVEIRA, G. L., & JIFON, J. L. Importance of Zinc for Arabica coffee and its effects on the chemical composition of raw grain and beverage quality. **Crop Science**, v. 58, n. 3, p. 1360–1370, 2018.

LEAL, L. N., JORDÁN, M. J., BELLO, J. M., OTAL, J., DEN HARTOG, L. A., HENDRIKS, W. H., & MARTÍN-TERESO, J. Dietary supplementation of 11 different plant extracts on the antioxidant capacity of blood and selected tissues in lightweight lambs. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 99, n. 9, p. 4296–4303, 2019.

LEE, H. C., LIN, C. Y., & TSAI, H. J. Zebrafish, an *In Vivo* Platform to Screen Drugs And Proteins For Biomedical Use. **Pharmaceuticals** (Basel, Switzerland), v. 14, n. 6, p. 500, 2021.

LEE, E.H., CHA, K.H., VUONG, T.T. et al. Comparison of static and dynamic in vitro digestion models to estimate the bioaccessibility of lutein in lutein-rich foods. **Appl Biol Chem.**, v. 61, p. 441–447, 2018.

LIAO, Y., ZENG, L., RAO, S., GU, D., LIU, X., WANG, Y., ... YANG, Z. Induced biosynthesis of chlorogenic acid in sweetpotato leaves confers the resistance against sweetpotato weevil attack. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 513–522, 2020.

LIMA Júnior, J. P., FRANCO, R. R., SARAIVA, A. L., MORAES, I. B., ESPINDOLA, F. S. *Anacardium humile* St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and  $\alpha$ -amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, p. 113667, 2021.

LIMANTO, A., SIMAMORA, A., SANTOSO, A., TIMOTIUS, K. Antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and molecular docking study of gallic acid, quercetin and rutin: a comparative study. **Molecular and Cellular Biomedical Sciences**, v. 3, p. 67, 2019.

LIN, X., LI, X., & LIN, X. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 25, n. 6, p. 1375, 2020.

LIN, X.; LI, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. **Front. Endocrinol.**, v. 12, p. 706978, 2021.

LIU, T-T.; LIU, X-T.; CHEN, Q-X.; SHI, Y. Lipase inhibitors for obesity: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, p. 1-9, 2020.

LIU, Y., MA, L., CHEN, W.-H., PARK, H., KE, Z., & WANG, B. Binding Mechanism and Synergetic Effects of Xanthone Derivatives as Noncompetitive  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors: A Theoretical and Experimental Study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 43, p. 13464–13471, 2013.

LOADER, T.B.; TAYLOR, C.G.; ZAHRADKA, P.; JONES, P. J. Chlorogenic acid from coffee beans: evaluating the evidence for a blood pressure-regulating health claim. **Nutrition Reviews**, v. 75, n. 2, p. 114-133, 2017.

LOETCHUTINAT, C., KOTHAN, S., DECHSUPA, S., MEESUNGNOEN, J., JAY-GERIN, J.P., MANKHETKORN, S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p. 323–331, 2005.

LOPES, S. C. et al. Peripheral antinociceptive action of mangiferin in mouse models of experimental pain: role of endogenous opioids, KATP-channels and adenosine. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 110, p. 19-26, 2013.

LOURENÇO, S. C., MOLDÃO-MARTINS, M., & ALVES, V. D. Antioxidants of Natural

Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 24, n. 22, p. 4132, 2019.

LU, L., TIBPROMMA, S., KARUNARATHNA, S. C., JAYAWARDENA, R. S., LUMYONG, S., XU, J., & HYDE, K. D. Comprehensive Review of Fungi on Coffee. **Pathogens** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 4, p. 411, 2022.

MAASEN, K., EUSSEN, S., SCHEIJEN, J., VAN DER KALLEN, C., DAGNELIE, P. C., OPPERHUIZEN, A., STEHOUWER, C., VAN GREEVENBROEK, M., & SCHALKWIJK, C. G. Higher habitual intake of dietary dicarbonyls is associated with higher corresponding plasma dicarbonyl concentrations and skin autofluorescence: the Maastricht Study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 115, n. 1, p. 34–44, 2022.

MAJUMDAR, A. S.; SOMANI, S. J. Chapter 12 - Natural Products in Lifestyle Diseases: *In Vitro* Screening. In: MANDAL, S. C. et al. Natural Products and Drug Discovery, **Elsevier**, p. 327-347, 2018.

MALTA MR, OLIVEIRA ACB, LISKA GR, CARVALHO GR, PEREIRA AA, SILVA AD, ALVARO LN AND MOTA DM. Selection of Elite Genotypes of *Coffea arabica* L. to Produce Specialty Coffees. **Front. Sustain. Food Syst.**, v. 5, p. 715385, 2021.

MANQUIÁN-CERDA, K., CRUCES, E., ESCUDEY, M., ZÚÑIGA, G., & CALDERÓN, R. Interactive effects of aluminum and cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets cultivated *in vitro*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 320–326, 2018.

MARCON, G. M., SANCHES, A. C. C., VIRTUOSO, S. Updates of the drugs of the Brazilian Obesity Guideline: a literature review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e10211427139, 2022.

MARINHO EM, DE NETO JB, A, SILVA J, SILVA CR DA, CAVALCANTI BC, MARINHO ES, JÚNIOR HVN. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microb Pathog.**, v. 148, p. 104365, 2020.

MARQUES, S. P. D.; TREVISAN, M. T. S; MAIA, C. E. G.; BREUER, A.; OWEN, R. W. Improved methods for the rapid formation and prevention of advanced glycation end products (AGEs) *in vitro* by coupling to the hypoxanthine/xanthine oxidase assay system. **Biomedicines**, v. 6, n. 3, p. 88, 2018.

MARTEMUCCI, G.; COSTAGLIOLA, C.; MARIANO, M.; D'ANDREA, L.; NAPOLITANO, P.; D'ALESSANDRO, A.G. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. **Oxygen**, v. 2, p. 48–78, 2022.

MARTHE, D.de. B., AUGUSTI, R., & COSTA, L. M. Influence of the lipid phase removal on the quantification of Cu, Fe and Zn bound to proteins from golden flaxseed. **Journal of the Brazilian Chemical Society J.**, v. 26, n. 8, p. 1718–1724, 2015.

MARTINA, S. J., LELO, A., LINDARTO, D., GANIE, R. A., ICHWAN, M., YUSUF, H., ILYAS, S., & NASUTION, I. P. The effect of *Coffea arabica* gayo leaf extract (*Coffea*

*arabica* L.) on increased PI3K serum levels in type 2 diabetic rat. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 294–297, 2021.

MARTÍNEZ INSFRAN, L. A., ALCONCHEL GAGO, F., & PARRILLA PARICIO, P. Fulminant liver failure secondary to submassive hepatic necrosis in a patient treated with Orlistat. A case report. **Sociedad Espanola de Patologia Digestiva**, v. 111, n. 1, p. 83, 2019.

MARTÍNEZ-LAS HERAS, R., PINAZO, A., HEREDIA, A., & ANDRÉS, A. Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by in vitro simulated gastrointestinal digestion. **Food chemistry**, v. 214, p. 478–485, 2017.

MASSARIOLI, A. P., SARTORI, A., JULIANO, F. F., SANTOS, R., RAMOS, J., LIMA, L. M., & ALENCAR, S. M. Optimizing Procedures for Antioxidant Phenolics Extraction from Skin and Kernel of Peanuts with Contrasting Levels of Drought Tolerance. **Foods** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 3, p. 449, 2022.

MELO, G. A., SHIMIZU, M. M., & MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**, v. 67, n. 3, p. 277–285, 2006.

MENG, X. L., YU, M. M., LIU, Y. C., GAO, Y. L., CHEN, X. S., SHOU, S. T., & CHAI, Y. F. Rutin Inhibits Cardiac Apoptosis and Prevents Sepsis-Induced Cardiomyopathy. **Frontiers in physiology**, v. 13, p. 834077, 2022.

MEYERS, J.R. Zebrafish: Development of A Vertebrate Model Organism. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 16, n.1, p. e19, 2018.

MEZA, J. Steepest descent. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Computational Statistics**, v. 2, p. 117, 2010.

MILANI, M.I. et al. Authentication of roasted and ground coffee samples containing multiple adulterants using NMR and a chemometric approach. **Food Control**, v. 112, p. 107104, 2020.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIERE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—An international consensus. **Food Funct.**, v. 5, p. 113–1124, 2014.

MIRA-SÁNCHEZ, M., CASTILLO-SÁNCHEZ, J., MORILLAS-RUIZ, J. Comparative study of rosemary extracts and several synthetic and natural food antioxidants. Relevance of carnosic acid/carnosol ratio. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125688, 2020.

MOLDOGAZIEVA, N. T., MOKHOSOEV, I. M., MEL'NIKOVA, T. I., POROZOV, Y. B., & TEREENTIEV, A. A. Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 3085756, 2019.

MONTEIRO ADRD, FEITAL TDS, PINTO JC. A Numerical Procedure for Multivariate Calibration Using Heteroscedastic Principal Components Regression. **Processes**, v. 9, n. 9, p.

1686, 2021.

MONTEIRO, Â., COLOMBAN, S., AZINHEIRA, H. G., GUERRA-Guimarães, L., Do CÉU Silva, M., NAVARINI, L., & RESMINI, M. Dietary Antioxidants in Coffee Leaves: Impact of Botanical Origin and Maturity on Chlorogenic Acids and Xanthonenes. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 1, p. 6, 2019.

MONTEIRO, A. C. A., de RESENDE, M. L. V., VALENTE, T. C. T., RIBEIRO Junior, P. M., PEREIRA, V. F., da COSTA, J. R., & da SILVA, J. A. G. Manganese phosphite in coffee defense against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 11–12, 2016.

MORAIS, S. M. DE, LOPES, F. F. DA S., FONTENELE, G. A., SILVA, M. V. F. DA, FERNANDES, V. B. & ALVES, D. R. Total phenolic content and antioxidant and anticholinesterase activities of medicinal plants from the State's Cocó Park (Fortaleza-CE, Brazil). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e7510514493, 2021.

MOROZKINA, S. N., NHUNG VU, T. H., GENERALOVA, Y. E., SNETKOV, P. P., & USPENSKAYA, M. V. Mangiferin as New Potential Anti-Cancer Agent and Mangiferin-Integrated Polymer Systems-A Novel Research Direction. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 79, 2021.

MORRIS G. M., HUEY R., LINDSTROM W., SANNER M. F., BELEW R. K., GOODSELL D. S., OLSON A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MORRIS, C., VIRIOT, S. M., FAROOQ MIRZA, Q. U., MORRIS, G., & LYNN, A. Caffeine release and absorption from caffeinated gums. **Food & Function**, v. 10, n. 4, p. 1792–1796, 2019.

MSOPA, E., MWANAKASALE, V. Identification of risk factors of diabetes mellitus in bank employees of selected banks in Ndola town. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 13, n. 2, p. 1497–1504, 2019.

MUBARAK, A., BONDONNO, C. P., LIU, A. H., CONSIDINE, M. J., RICH, L., MAS, E., ...HODGSON, J. M. Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: A randomized trial. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9130–9136, 2012.

MUFLIAH, Y. M., GOLLAVELLI, G., & LING, Y. C. Correlation Study of Antioxidant Activity with Phenolic and Flavonoid Compounds in 12 Indonesian Indigenous Herbs. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), v. 10, n. 10, p. 1530, 2021.

MUIR, R.; FORBES, S.; BIRCH, D.J.S.; VYSHEMIRSKY, V.; ROLINSKI, O.J. Collagen glycation detected by its intrinsic fluorescence. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 125, n. 39, p. 11058–11066, 2021.

MURUGANANDAN, S., SRINIVASAN, K., GUPTA, S., GUPTA, P. K., LAL, J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 3, p. 497–501, 2005.

MURZAINI N. M. N, TAIP F. S, AB AZIZ N, ABD RAHMAN N. A. Effect of Pre-treatment in Producing Pumpkin Powder Using Air Fryer and Its Application in 'Bingka' Baking. **Curr Res Nutr Food Sci.**, v. 8, n. 1, 2020.

MUSZYŃSKA, E., & LABUDDA, M. Dual Role of Metallic Trace Elements in Stress Biology-From Negative to Beneficial Impact on Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3117, 2019.

NAKANO, M., NAKAMURA, Y., SUZUKI, T. et al. Pentosidine and carboxymethyl-lysine associate differently with prevalent osteoporotic vertebral fracture and various bone markers. **Sci Rep.**, v. 10, p. 22090, 2020.

NAVARRO, D., ABELILLA, J. J., & STEIN, H. H. Structures and characteristics of carbohydrates in diets fed to pigs: a review. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 10, p. 39, 2019.

NAVEED, M., HEJAZI, V., ABBAS, M., KAMBOH, A. A., KHAN, G. J., SHUMZAID, M., ... XIAOHUI, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67–74, 2018.

NEMZER, B.; KALITA, D.; ABSHIRU, N. Quantification of Major Bioactive Constituents, Antioxidant Activity, and Enzyme Inhibitory Effects of Whole Coffee Cherries (*Coffea arabica*) and Their Extracts. **Molecules**, v. 26, p. 4306, 2021.

NGAMSUK, S.; HUANG, T. C.; HSU, J. L. Determination of Phenolic Compounds, Procyanidins, and Antioxidant Activity in Processed *Coffea arabica L. Leaves*. **Foods** (Basel, Switzerland), v. 8, n. 9, p. 389, 2019.

NGUYEN D.; XIAO, T.; WANG, M.; WEI, G.W. Rigidity strengthening is a vital mechanism for protein-ligand binding. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 7, p. 1715–1721, 2017.

NICOLAI, J. P., LUPIANI, J. H., & WOLF, A. J. An Integrative Approach to Obesity. **Integrative Medicine**, p. 382–394.e2, 2018.

NIRANJAN Raj, S., SAROSH, B. R., & SHETTY, H. S. Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. **Functional Plant Biology**, v. 33, n. 6, p. 563–571, 2006.

NIVETHA, A.; MOHANASRINIVASAN, V. Mini review on role of  $\beta$ -galactosidase in lactose intolerance. **IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.**, v. 263, p. 022046, 2017.

NUNEZA, O., RODRIGUEZ, B., AND NASIAD, J. G. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by the Mamanwa tribe of Surigao del Norte and Agusan del Norte, Mindanao, Philippines. **Biodiversitas**, v. 22, p. 3284–3296, 2021.

NYAMBE-SILAVWE, H., & WILLIAMSON, G. Chlorogenic and phenolic acids are only very weak inhibitors of human salivary  $\alpha$ -amylase and rat intestinal maltase activities. **Food Research International**, v. 113, p. 452–455, 2018.

- OGUNTIBEJU O. O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 11, n. 3, p. 45–63, 2019.
- OLIVEIRA, J. P. S., SILVA, F. L. F., MONTE, R. J. G., MATOS, W. O., & LOPES, G. S. A new approach to mineralization of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) for trace element analysis by flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 224, p. 335–341, 2017.
- ONTAWONG, A., DUANGJAI, A., MUANPRASAT, C., PASACHAN, T., PONGCHAIDECHA, A., AMORNLERDPISON, D., SRIMAROENG, C. Lipid-lowering effects of *Coffea arabica* pulp aqueous extract in Caco-2 cells and hypercholesterolemic rats. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 52, p. 187–197, 2019.
- ONTAWONG, A., PASACHAN, T., TRISUWAN, K., SOODVILAI, S., DUANGJAI, A., PONGCHAIDECHA, A., AMORNLERDPISON, D., SRIMAROENG, C. *Coffea arabica* pulp aqueous extract attenuates oxidative stress and hepatic lipid accumulation in HepG2 cells. **J. Herb. Med.**, v. 29, p. 100465, 2021.
- OTTERBACH, S., OSKOROUCHI, H. R., Rogan, M., Qaim, M. Using Google data to measure the role of Big Food and fast food in South Africa's obesity epidemic. **World Development**, v. 140, p. 105368, 2021.
- OWEN, R.W, GIACOSA, A., HULL, W.E., HAUBNER, R., SPIEGELHALDER B., BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1235-1247, 2000.
- PAPOUTSIS, K., ZHANG, J., BOWYER, M., BRUNTON, N., GIBNEY, E., LYNG, J. Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition properties: A review. **Food Chemistry**, v. 338, p. 128119, 2021.
- PASTEN, C.; LOZANO, M.; ROCCO, J.; CARRIÓN, F.; ALVARADO, C.; LIBERONA, J.; MICHEA, L.; IRARRÁZABAL, C.E. Aminoguanidine prevents the oxidative stress, inhibiting elements of inflammation, endothelial activation, mesenchymal markers, and confers a renoprotective effect in renal ischemia and reperfusion injury. **Antioxidants**, v. 10, p. 1724, 2021.
- PATAY, É. B., BENCSIK, T., PAPP, N. Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now, **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1127-1135, 2016.
- PATEL D., KUMAR V. Phytochemical analysis & *in-vitro* anti obesity activity of different fractions of methanolic extract of *Fagonia Cretica* L. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 12, n. 3, p. 282-286, 2020.
- PATEL, K., & PATEL, D. K. The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. **Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases**, p. 457–479, 2019.

PETTERSEN EF, GODDARD TD, HUANG CC, COUCH GS, GREENBLATT DM, MENG EC, FERRIN TE. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PINTO, T., AIRES, A., COSME, F., BACELAR, E., MORAIS, M. C., OLIVEIRA, I., FERREIRA-CARDOSO, J., ANJOS, R., VILELA, A., & GONÇALVES, B. Bioactive (Poly)phenols, Volatile Compounds from Vegetables, Medicinal and Aromatic Plants. **Foods** (Basel, Switzerland), v. 10, n. 1, p. 106, 2021.

PLATZER, M., KIESE, S., HERFELLNER, T., SCHWEIGGERT-WEISZ, U., & EISNER, P. How Does the Phenol Structure Influence the Results of the Folin-Ciocalteu Assay? **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 811, 2021.

PRASAD, C., DAVIS, K. E., IMRHAN, V., JUMA, S., & VIJAYAGOPAL, P. Advanced glycation end products and risks for chronic diseases: intervening through lifestyle modification. **American journal of lifestyle medicine**, v. 13, n. 4, p. 384–404, 2017.

PYNER, A., NYAMBE-SILAVWE, H., & WILLIAMSON, G. Inhibition of Human and Rat Sucrase and Maltase Activities to Assess Antiglycemic Potential: Optimization of the Assay Using Acarbose and Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 39, p. 8643–8651, 2017.

QUAN, W., QIE, X., CHEN, Y., ZENG, M., QIN, F., CHEN, J., & HE, Z. Effect of milk addition and processing on the antioxidant capacity and phenolic bioaccessibility of coffee by using an *in vitro* gastrointestinal digestion model. **Food chemistry**, v. 308, p. 125598, 2020.

QURRAT-UL-AIN, ASHIQ, U., JAMAL, R. A., SALEEM, M., & MAHROOF-TAHIR, M. Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 488–499, 2017.

RAGHEB, S. R., EL WAKEEL, L. M., NASR, M. S., & SABRI, N. A. Impact of Rutin and Vitamin C combination on oxidative stress and glycemic control in patients with type 2 diabetes. **Clinical nutrition ESPEN**, v. 35, p. 128–135, 2020.

RAHAMAN, M. M., ZWART, R. S., & THOMPSON, J. P. Constitutive and Induced Expression of Total Phenol and Phenol Oxidases in Wheat Genotypes Ranging in Resistance/Susceptibility to the Root-Lesion Nematode *Pratylenchus thornei*. **Plants** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 4, p. 485, 2020.

RAHMAN, HA, SAHIB, NG, SAARI, N. et al. Efeito anti-obesidade do extrato etanólico da folha de *Cosmos caudatus* Kunth em ratos magros alimentados com dieta hiperlipídica. **BMC Complemento Alternativo Med.**, v. 17, p. 122, 2017.

RAO, V. S., CARVALHO, A. C., TREVISAN, M. T., ANDRADE, G. M., NOBRE-JÚNIOR, H. V., MORAES, M. O., MAGALHÃES, H. I., MORAIS, T. C., & SANTOS, F. A. Mangiferin ameliorates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity and oxidative stress in ketamine model of schizophrenia. **Pharmacological reports: PR**, v. 64, n. 4, p. 848–856, 2012.

REN, L., QIN, X., CAO, X. et al. Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. **Protein Cell**, v. 2, p. 827–836, 2011.

RENA, G., HARDIE, D. G., PEARSON, E. R. The mechanisms of action of metformin. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1577–1585, 2017.

RENARD, C.M.G.C.; WATRELOT, A.A.; LE BOURVELLEC, C. Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 60, p. 43–51, 2017.

REIS, C.E.G.; DÓREA, J.G.; da COSTA, T.H.M. Effects of coffee consumption on glucose metabolism: a systematic review of clinical trials. **J. Tradit. Complement. Med.**, v. 9, p. 184–191, 2019.

RIBAS-AGUSTÍ, A., MARTÍN-BELLOSO, O., SOLIVA-FORTUNY, R., & ELEZ-MARTÍNEZ, P. Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2531–2548, 2018.

RIBEIRO R.X., DA SILVA BRITO R., PEREIRA AC, MONTEIRO K.B.E.S., GONÇALVES B.B., ROCHA T.L. Ecotoxicological assessment of effluents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multi-biomarker approach. **The Science of the total environment**, v. 735, p. 139036, 2020.

RIZWAN, M., MOSTOFA, M. G., AHMAD, M. Z., IMTIAZ, M., MEHMOOD, S., ADEEL, M., DAI, Z., LI, Z., AZIZ, O., ZHANG, Y., & TU, S. Nitric oxide induces rice tolerance to excessive nickel by regulating nickel uptake, reactive oxygen species detoxification and defense-related gene expression. **Chemosphere**, v. 191, p. 23–35, 2018.

ROBERTSON TM, CLIFFORD MN, PENSON S, WILLIAMS P, ROBERTSON MD. Postprandial glycaemic and lipaemic responses to chronic coffee consumption may be modulated by CYP1A2 polymorphisms. **Br. J. Nutr.**, v. 119, p. 792–800, 2018.

ROPER C, TANGUAY RL. Zebrafish as a Model for Developmental Biology and Toxicology. **Handbook of Developmental Neurotoxicology** (Second Edition), p. 143-151, 2018.

ROSHAN H, NIKPAYAM O, SEDAGHAT M, SOHRAB G. Effects of green coffee extract supplementation on anthropometric indices, glycaemic control, blood pressure, lipid profile, insulin resistance and appetite in patients with the metabolic syndrome: a randomised clinical trial. **Br. J. Nutr.**, v. 119, p. 250–258, 2018.

ROSHANAK, S.; RAHIMMALEK, M.; GOLLI, S.A. Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll, antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. **J. Food Sci. Technol.**, v. 53, p. 721–729, 2016.

RUDNICK, V. A. de S.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, C. de F.; ROCHA, R. B.; TEIXEIRA, A. L.; RAMALHO, A. R.; ESPINDULA, M. C.; SANTOS, A. V.; ANJOS, E. F. M. dos; UCHÔA, F. P. Resistance of new *Coffea canephora* clones to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in the western amazon. **Coffee Science**, v. 15, p. e151708, 2020.

- RYAN, P.M. AND CAPLICE, N.M. Is Adipose Tissue a Reservoir for Viral Spread, Immune Activation, and Cytokine Amplification in Coronavirus Disease 2019?. **Obesity**, v. 28, p. 1191-1194, 2020.
- SABRI, N., ZAKARIA, Z., MOHAMAD, S. E., JAAFAR, A. B., & HARA, H. Importance of Soil Temperature for the Growth of Temperate Crops under a Tropical Climate and Functional Role of Soil Microbial Diversity. **Microbes and environments**, v. 33, n. 2, p. 144–150, 2018.
- SACHETTO, A., MIYAMOTO, J. G., TASHIMA, A. K., DE SOUZA, A. O., & SANTORO, M. L. The Bioflavonoids Rutin and Rutin Succinate Neutralize the Toxins of *B. jararaca* Venom and Inhibit its Lethality. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 828269, 2022.
- SALVOZA, N., GIRAUDI, P. J., TIRIBELLI, C., & ROSSO, N. Natural Compounds for Counteracting Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Advantages and Limitations of the Suggested Candidates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2764, 2022.
- SAMPAIO, C.DEG., FROTA, L. S., MAGALHÃES, H. S., DUTRA, L. M., QUEIROZ, D. C., ARAÚJO, R. S., BECKER, H., DE SOUZA, J. R., RICARDO, N. M., & TREVISAN, M. T. Chitosan/mangiferin particles for Cr(VI) reduction and removal. **International journal of biological macromolecules**, v. 78, p. 273–279, 2015.
- SANTANA-GÁLVEZ, J., CISNEROS-ZEVALLOS, L., & JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 22, n. 3, p. 358, 2017.
- SANTOS, C. M. M., FREITAS, M., & FERNANDES, E. A comprehensive review on xanthone derivatives as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1460–1479, 2018.
- SANTOS, M.C.P., GOLÇALVES, E.C.B.A. Effect of different extracting solvents on antioxidant activity and phenolic compounds of a fruit and vegetable residue flour. **Scientia Agropecuaria**, v. 7, n. 1, p. 7–14, 2016.
- SARKER, U., OBA, S. Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. **Sci Rep.**, v. 8, p. 16496, 2018.
- SARRIÁ, B., MARTÍNEZ-LÓPEZ, S., SIERRA-CINOS, J. L., GARCÍA-DIZ, L., MATEOS, R., & BRAVO-CLEMENTE, L. Regularly consuming a green/roasted coffee blend reduces the risk of metabolic syndrome. **European journal of nutrition**, v. 57, n. 1, p. 269–278, 2018.
- 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, p. 254-6299, 2018.
- SELIEM, E. M., AZAB, M. E., ISMAIL, R. S., NAFEAA, A. A., ALOTAIBI, B. S., & NEGM, W. A. Green Coffee Bean Extract Normalize Obesity-Induced Alterations of Metabolic Parameters in Rats by Upregulating Adiponectin and GLUT4 Levels and Reducing RBP-4 and HOMA-IR. **Life** (Basel, Switzerland), v. 12, n. 5, p. 693, 2022.

SENSOY I. A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. **Current research in food science**, v. 4, p. 308–319, 2021.

SERA, G.H.; DE CARVALHO, C.H.S.; DE REZENDE ABRAHÃO, J.C.; POZZA, E.A.; MATIELLO, J.B.; DE ALMEIDA, S.R.; BARTELEGA, L.; DOS SANTOS BOTELHO, D.M. Coffee Leaf Rust in Brazil: Historical Events, Current Situation, and Control Measures. **Agronomy**, v. 12, p. 496, 2022.

SHAH M S, PATEL Z K, BHARUCHA R, et al. Sibutramine-Induced Nonischemic Cardiomyopathy. **Cureus**, v. 14, n. 1, p. e21650, 2022.

SHARIFI-RAD, M., ANIL KUMAR, N. V., ZUCCA, P., VARONI, E. M., DINI, L., PANZARINI, E., ... SHARIFI-RAD, J. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.

SHEN, Y., SONG, X., LI, L., SUN, J., JAISWAL, Y., HUANG, J., LIU, C., YANG, W., WILLIAMS, L., ZHANG, H., & GUAN, Y. Protective effects of *p*-coumaric acid against oxidant and hyperlipidemia-an *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 111, p. 579–587, 2019.

SHENENI VD, ODIBA VA, IDIH FM. Effect of administration of zinc and selenium on lipid peroxidation and endogenous antioxidant enzymes in trypanosoma brucei infected albino rats. **Open Access J Sci.**, v. 2, n. 6, p. 383-387, 2018.

SHI, Z. L., LIU, Y. D., YUAN, Y. Y., SONG, D., QI, M. F., YANG, X. J., WANG, P., LI, X. Y., SHANG, J. H., & YANG, Z. X. *In Vitro* and *In Vivo* Effects of Norathyriol and Mangiferin on  $\alpha$ -Glucosidase. **Biochemistry research international**, v. 2017, p. 1206015, 2017.

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**, v. 3, p. 1278-1281, 2008.

SHITYAKOV S, FÖRSTER, C. *In silico* predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Adv Appl Bioinforma Chem ABC**, v. 7, p. 23–36, 2014.

SHOKOUH, P., JEPPESEN, P. B., CHRISTIANSEN, C. B., MELLBYE, F. B., HERMANSEN, K., GREGERSEN, S. Efficacy of arabica versus robusta coffee in improving weight, insulin resistance, and liver steatosis in a rat model of type-2 diabetes. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2074, 2019.

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.

SILVA, M.D.C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; DINIZ, I.; LOUREIRO, A.; AZINHEIRA, H.; PEREIRA, A.P.; TAVARES, S.; BATISTA, D.; VÁRZEA, V. An Overview of the Mechanisms Involved in Coffee-*Hemileia vastatrix* Interactions: Plant and Pathogen Perspectives. **Agronomy**, v. 12, p. 326, 2022.

SILVÉRIO, A.D., PEREIRA, R.G., DUARTE, S.M., FIGUEIREDO, S.A., PAULA, F.B., ARAÚJO, T., FERREIRA, C.D., SALLES, B.C., VIANA, A.L., FERREIRA, E.B., & RODRIGUES, M.R. Coffee intake (*Coffea arabica L.*) reduces advanced glycation end product (AGEs) formation and platelet aggregation in diabetic rats. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 42, 2021.

SINGH, A. K., RANA, H. K., SINGH, V., CHAND YADAV, T., VARADWAJ, P., & PANDEY, A. K. Evaluation of antidiabetic activity of dietary phenolic compound chlorogenic acid in streptozotocin induced diabetic rats: Molecular docking, molecular dynamics, *in silico* toxicity, *in vitro* and *in vivo* studies. **Computers in biology and medicine**, v. 134, p. 104462, 2021.

SINGH, S.; KAUR, I.; KARIYAT, R. The Multifunctional Roles of Polyphenols in Plant-Herbivore Interactions. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, p. 1442, 2021.

SIVAKUMAR, P. M., PRABHAKAR, P. K., CETINEL, S., R, N., & PRABHAWATHI, V. Molecular Insights on the Therapeutic Effect of Selected Flavonoids on Diabetic Neuropathy. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 22, 2022.

SNOUSSI, A., ESSAIDI, I., BEN HAJ KOUBAIER, H., ZRELLI, H., ALSAFARI, I., ŽIVOSLAV, T., MIHAILOVIC, J., KHAN, M., EL OMRI, A., ČIRKOVIĆ VELIČKOVIĆ, T., & BOUZOUITA, N. Drying methodology effect on the phenolic content, antioxidant activity of *Myrtus communis L.* leaves ethanol extracts and soybean oil oxidative stability. **BMC chemistry**, v. 15, n. 1, p. 31, 2021.

SOARES, J. C., ROSALEN, P. L., LAZARINI, J. G., MASSARIOLI, A. P., DA SILVA, C. F., NANI, B. D., FRANCHIN, M., & DE ALENCAR, S. M. Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, p. 178–188, 2019.

SOBCZAK, A.I.S; BLINDAUER, C.A.; STEWART, A.J. Changes in plasma free fatty acids associated with type-2 diabetes. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2022, 2019.

SOUZA, J.; CARVALHO, J.; TREVISAN, M.; PAULA, R.; RICARDO, N.; FEITOSA, J. Chitosan-coated pectin beads: Characterization and *in vitro* release of mangiferin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2278-2286, 2009.

SOUZA, J.; FEITOSA, J.; RICARDO, N.; TREVISAN, M.; PAULA, H.; ULRICH, C.; OWEN, R. Spray-drying encapsulation of mangiferin using natural polymers. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 10–18, 2013.

SPAGNUOLO, L., DELLA POSTA, S., FANALI, C., DUGO, L., & DE GARA, L. Antioxidant and Antiglycation Effects of Polyphenol Compounds Extracted from Hazelnut Skin on Advanced Glycation End-Products (AGEs) Formation. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), v. 10, n. 3, p. 424, 2021.

STAROWICZ, M., & ZIELIŃSKI, H. Inibição da formação de produtos finais de glicação avançada por especiarias com alto nível de antioxidantes comumente usadas na culinária europeia. **Antioxidantes** (Basileia, Suíça), v. 8, n.4, p. 100, 2019.

- SWAIN, S. K., CHANDRA Dash, U., KANHAR, S., SAHOO, A. K. Ameliorative effects of *Hydrolea zeylanica* in streptozotocin-induced oxidative stress and metabolic changes in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, p. 112257, 2020.
- TAM, D. N. H., MOSTAFA, E. M., TU, V. L., RASHIDY, A. I., MATENOGLOU, E., KASSEM, M., ... HUY, N. T. Efficacy of chalcone and xanthine derivatives on lipase inhibition: A systematic review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 95, p. 205–14, 2019.
- TATIPAMULA, V. B., & KUKAVICA, B. Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. **Cell biochemistry and function**, v. 39, n. 8, p. 926–944, 2021.
- TEOH, S.L.; DAS, S. Phytochemicals and their effective role in the treatment of diabetes mellitus: a short review. **Phytochem Rev.**, v. 17, p. 1111–1128, 2018.
- TESSEMA, H.; KIM, T.; KANG, H.; APOSTOLIDIS, E.; LEE, J.; KWON, Y. Selected Coffee (*Coffea arabica* L.) Extracts Inhibit Intestinal  $\alpha$ -Glucosidases Activities *in-vitro* and Postprandial Hyperglycemia in SD Rats. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 1, 2022.
- THAMKAEW, G.; SJÖHOLM, I.; GALINDO, F.G. A review of drying methods for improving the quality of dried herbs. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 61, p. 1763–1786, 2021.
- THOMA, A., AKTER-MIAH, T., READE, R.L. et al. Targeting reactive oxygen species (ROS) to combat the age-related loss of muscle mass and function. **Biogerontology**, v. 21, p. 475–484, 2020.
- TONIUTTI, L., BREITLER, J. C., ETIENNE, H., CAMPA, C., DOULBEAU, S., URBAN, L., LAMBOT, C., PINILLA, J. H., & BERTRAND, B. Influence of Environmental Conditions and Genetic Background of Arabica Coffee (*C. arabica* L) on Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) Pathogenesis. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 2025, 2017.
- TORRES, P., SODERO, A., JOFILY, P., & SILVA-JR, F. P. Key topics in molecular docking for drug design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.
- TREVISAN, M. T. S., FARIAS de ALMEIDA, R., SOTO, G., de MELO Virginio, FILHO, E., 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.
- TROTT, O., & OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.
- TROTT, OLEG, & OLSON, A. NIH Public Access. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.
- TSUNODA, T., SAMADI, A., BURADE, S. et al. Complete biosynthetic pathway to the antidiabetic drug acarbose. **Nat Commun**, v. 13, p. 3455, 2022.

TUNG, Y. T., ZENG, J. L., HO, S. T., XU, J. W., LIN, I. H., & WU, J. H. Djulis Hull Improves Insulin Resistance and Modulates the Gut Microbiota in High-Fat Diet (HFD)-Induced Hyperglycaemia. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 1, p. 45, 2021.

TVRDÁ, E., & BENKO, F. Free radicals: what they are and what they do. **Pathology**, p. 3–13, 2020.

TWARDA-CLAPA, A., OLCZAK, A., BIAŁKOWSKA, A. M., & KOZIOŁKIEWICZ, M. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. **Cells**, v. 11, n. 8, p.1312, 2022.

WAGMACKER DS, OLIVEIRA AM, OLIVEIRA EC, SANTOS ACN, RODRIGUES LEA, LADEIA AMT. Metabolism of fatty acids, secondary complications and effects of physical exercise: integrative review. **Rev Bras Fisiol Exerc.**, v. 19, n. 2, p. 154-71, 2020.

WANG, R., MOHAMMADI, M., MAHBOUBI, A., & TAHERZADEH, M. J. *In-vitro* digestion models: a critical review for human and fish and a protocol for *in-vitro* digestion in fish. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 3040–3064, 2021.

WATANABE, T., KOBAYASHI, S., YAMAGUCHI, T., HIBI, M., FUKUHARA, I., & OSAKI, N. Coffee Abundant in Chlorogenic Acids Reduces Abdominal Fat in Overweight Adults: A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1617, 2019.

WOJTUNIK-KULESZA, K., ONISZCZUK, A., ONISZCZUK, T., COMBRZYŃSKI, M., NOWAKOWSKA, D., & MATWIJCZUK, A. Influência da Digestão *In Vitro* na Composição, Bioacessibilidade e Atividade Antioxidante de Polifenóis Alimentares - Uma Revisão Não Sistemática. **Nutrientes**, v. 12, n. 5, p. 1401, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Classification of diabetes mellitus. **World Health Organization**, 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325182>. Acesso: 6 jul. 2022.

WU, F., ZHOU, Y., LI, L., SHEN, X., CHEN, G., WANG, X., LIANG, X., TAN, M., & HUANG, Z. Computational approaches in preclinical studies on drug discovery and development. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 726, 2020.

WULANJARI, D.; WIJAYA, K.A.; ROSYADY, M.G.; Wafa, A. Polyphenol Content and Enhancing Plant resistance of Lowland Arabica Coffee, **E3S Web Conf.**, v. 142, p. 1-3, 2020.

XIAOWEI, H., ZHIHUA, L., TAHIR, H.E., XIAOBO, Z., JIYONG, S., YIWEI, X., & XIAODONG, Z. Conventional and rapid methods for measurement of total bioactive components and antioxidant activity in Hibiscus sabdariffa. **Academic Press.**, p. 199-214, 2021.

XU, D. P., LI, Y., MENG, X., ZHOU, T., ZHOU, Y., ZHENG, J., ZHANG, J. J., & LI, H. B. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 96, 2017.

XU H, GAN C, GAO Z, HUANG Y, WU S, ZHANG D, WANG X AND SHENG J. Caffeine Targets SIRT3 to Enhance SOD2 Activity in Mitochondria. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 8, p.

822, 2020.

XU, H.; LUO, J.; HUANG, J.; WEN, Q. Flavonoids intake and risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of prospective cohort studies. **Medicine**, v. 97, n. 19, p. e0686, 2018.

XU, X., LIU, A., HU, S., ARES, I., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R., WANG, X., MARTÍNEZ, M., ANADÓN, A., & MARTÍNEZ, M. A. Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. **Food chemistry**, v. 353, p. 129488, 2021.

YAMAN, S. O., & AYHANCI, A. Lipid Peroxidation. In (Ed.), *Accenting Lipid Peroxidation*. **IntechOpen**, 2021.

YAN, J., ZHANG, G., PAN, J., & WANG, Y.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 213–223, 2014.

YAN, Y., ZHOU, X., GUO, K., ZHOU, F., & YANG, H. Use of Chlorogenic Acid against Diabetes Mellitus and Its Complications. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, p. 9680508, 2020.

YANG, H., SUN, L., LI, W., LIU, G., & TANG, Y. *In silico* prediction of chemical toxicity for drug design using machine learning methods and structural alerts. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 30, 2018.

YE, Y.; HE, J.; HE, Z.; ZHANG, N.; LIU, X.; ZHOU, J.; CHENG, S.; CAI, J. Evaluation of the Brewing Characteristics, Digestion Profiles, and Neuroprotective Effects of Two Typical Se-Enriched Green Teas. **Foods**, v. 11, p. 2159, 2022.

YUSUF D, DAVIS AM, KLEYWEGT GJ, SCHMITT S. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR versus RMSD. **J Chem Inf Model**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008.

ZAID, A. N., ZOHUD, N., E'LAYAN, B., ABURADI, T., JARADAT, N., ALI, I., ... ABU ZAAROR, Y. (2017). Pharmacodynamic testing and new validated HPLC method to assess the interchangeability between multi-source orlistat capsules. **Drug Design, Development and Therapy**. 11, 3291–3298.

ZANG, L., SHIMADA, Y. & NISHIMURA, N. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. **Sci Rep.**, v. 7, p. 1461, 2017.

ZANG, L., MADDISON, L. A., & CHEN, W. Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, p. 91, 2018.

ZAPATA F.J., REBOLLO-HERNANZ M., NOVAKOFSKI J.E., NAKAMURA M.T., DE MEJIA E.G. Caffeine, but Not Other Phytochemicals, in Mate Tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) Attenuates High-Fat-High-Sucrose-Diet-Driven Lipogenesis and Body Fat Accumulation. **J. Funct. Foods**, v. 64, p. 103646–103659, 2020.

ZAYNAB, M., FATIMA, M., ABBAS, S., HAMMAD, M., BAHADAR, K., SHARIF, Y., & UMAIR, M. Microbial Pathogenesis Role of secondary metabolites in plant defense against

pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 198–202, 2018.

ZENDRINI RECHENCHOSKI, D., FACCIN-GALHARDI, L. C., PACHECO CUNHA, A., PONTES SILVA RICARDO, N. M., NOZAWA, C., & CARVALHO LINHARES, R. E. Antiviral potential of mangiferin against poliovirus. **International Journal of Pharmacological Research**, v. 8, p. 34, 2018.

ZHANG, T, TANG, H, LI, H. Chemometrics in laser-induced breakdown spectroscopy. **Journal of Chemometrics**, v. 32, p. e2983, 2018.

ZHANG, Z., ZHANG, F., SONG, L., SUN, N., GUAN, W., LIU, B., TIAN, J., ZHANG, Y., & ZHANG, W. Site-directed mutation of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus candidus* to reduce galactose inhibition in lactose hydrolysis. **3 Biotech**, v. 8, n. 11, p. 452, 2018.

ZHENG, Y., YANG, W., SUN, W., CHEN, S., LIU, D., KONG, X., TIAN, J., YE, X. Inhibition of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase activity by chlorogenic acid. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103587, 2019.

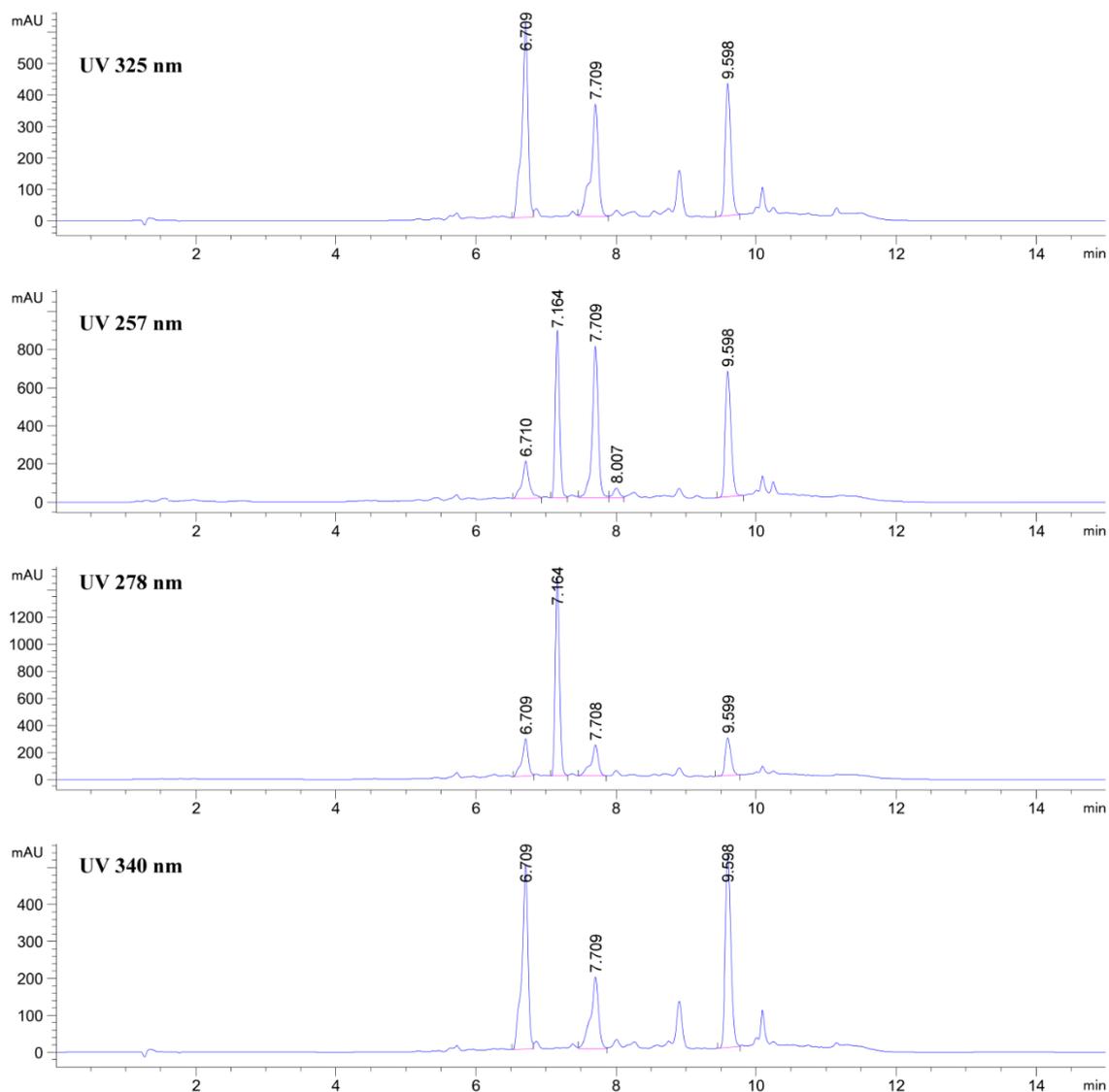
ZHOU Y, LI H AND XIA N. The Interplay Between Adipose Tissue and Vasculature: Role of Oxidative Stress in Obesity. **Front. Cardiovasc. Med.**, v. 8, p. 650214, 2021.

ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA, H.; SITAREK, P.; MERECZ-SADOWSKA, A.; MALINOWSKA, K.; ZAJDEL, K.; JABLONSKA, M.; SLIWINSKI, T.; ZAJDEL, R. Plant extracts and reactive oxygen species as two counteracting agents with anti- and pro-obesity properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1-30, 2019.

ZUÑIGA-MARTÍNEZ BS, DOMÍNGUEZ-AVILA JA, ROBLES-SÁNCHEZ RM, AYALA-ZAVALA JF, VILLEGAS-OCHOA MA, GONZÁLEZ-AGUILAR GA. Agro-Industrial Fruit Byproducts as Health-Promoting Ingredients Used to Supplement Baked Food Products. **Foods**, v. 11, n. 20, p. 3181, 2022.

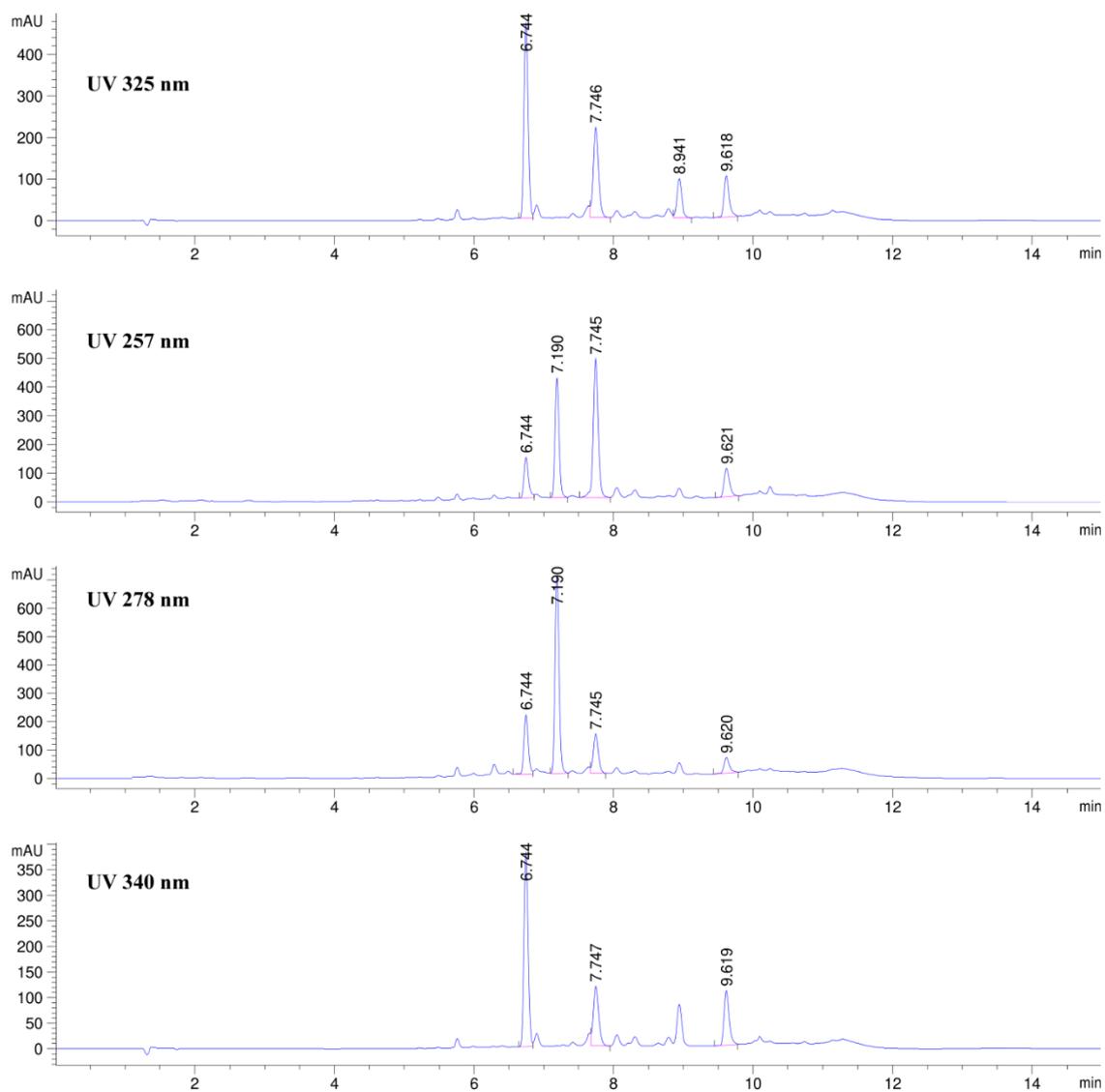
## APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS DE CAFÉ

Figura 22 - Cultivar Acaia Cerrado MG 1474



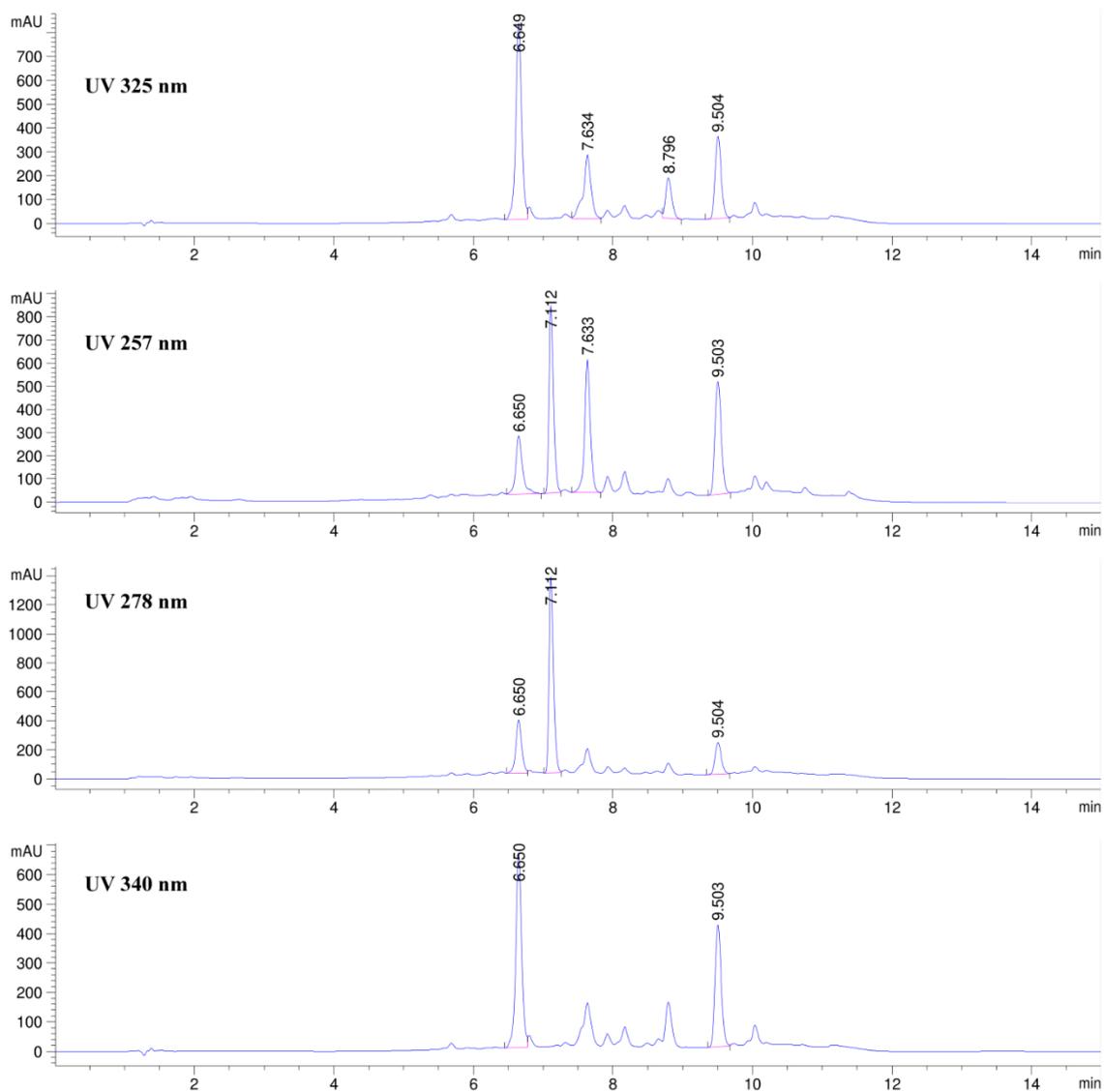
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 - Cultivar Rubi MG 1192



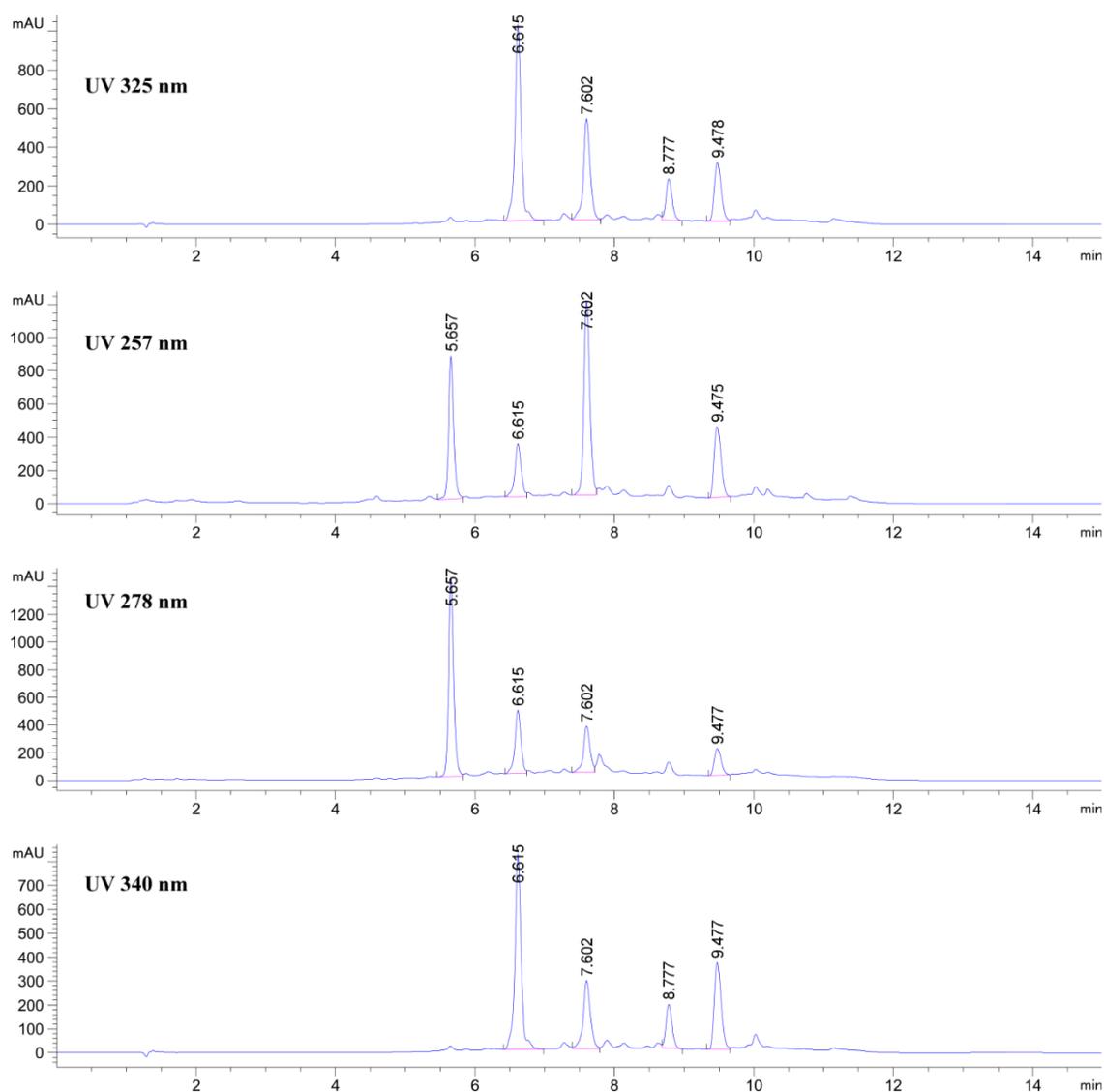
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 - Cultivar Topázio MG 1190



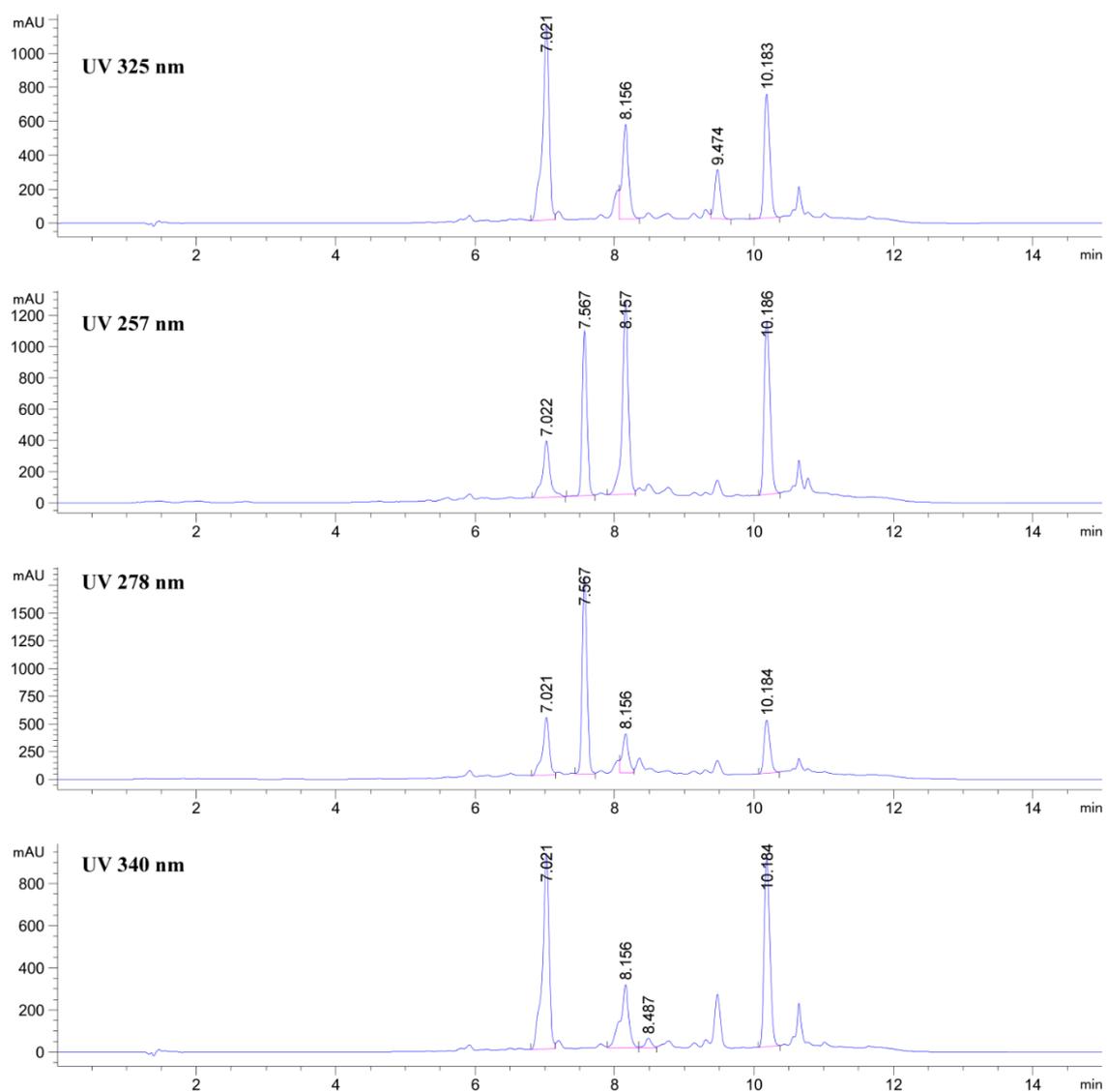
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 - Cultivar MGS Travessia



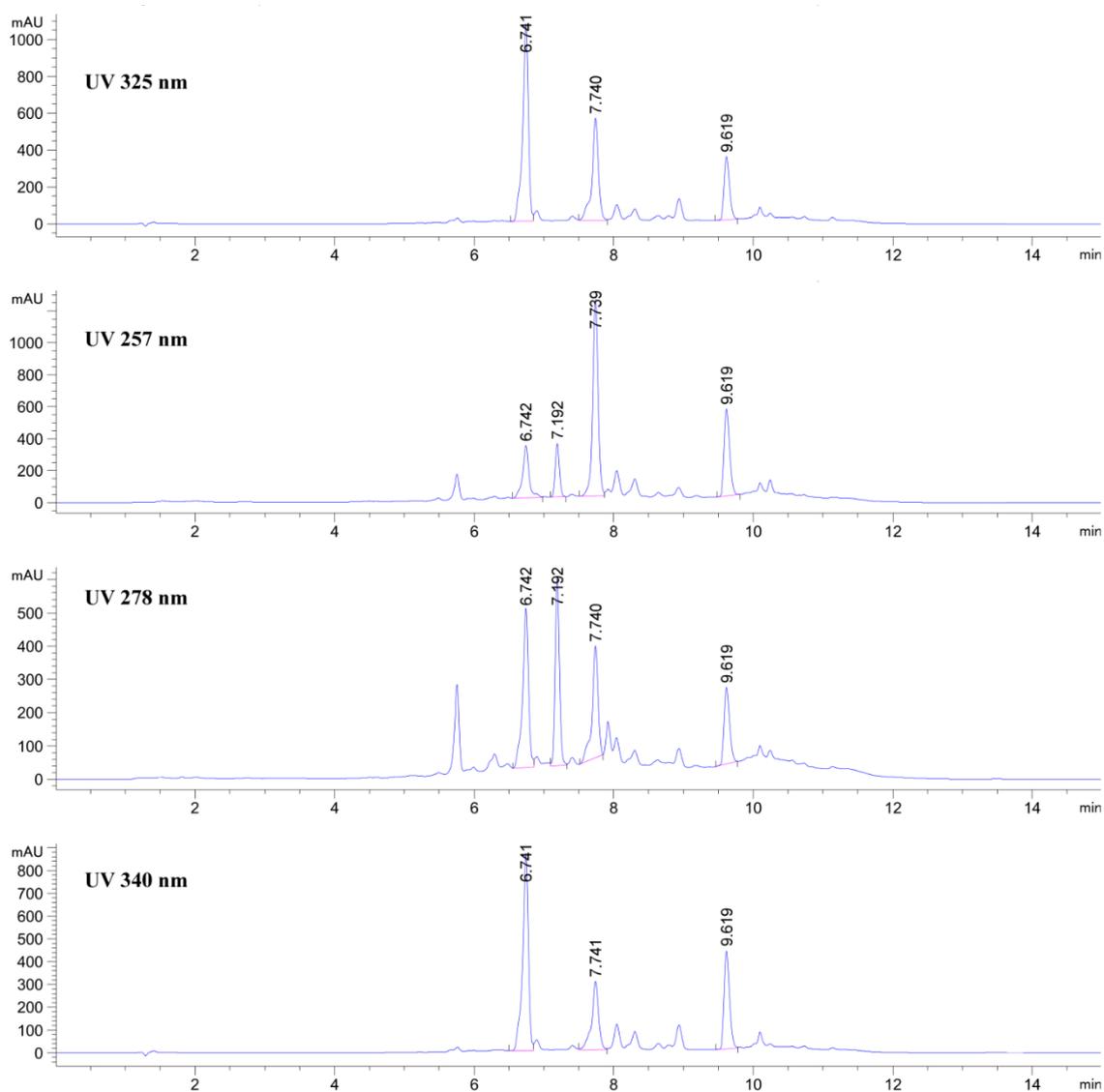
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26 - Cultivar MGS Arañas



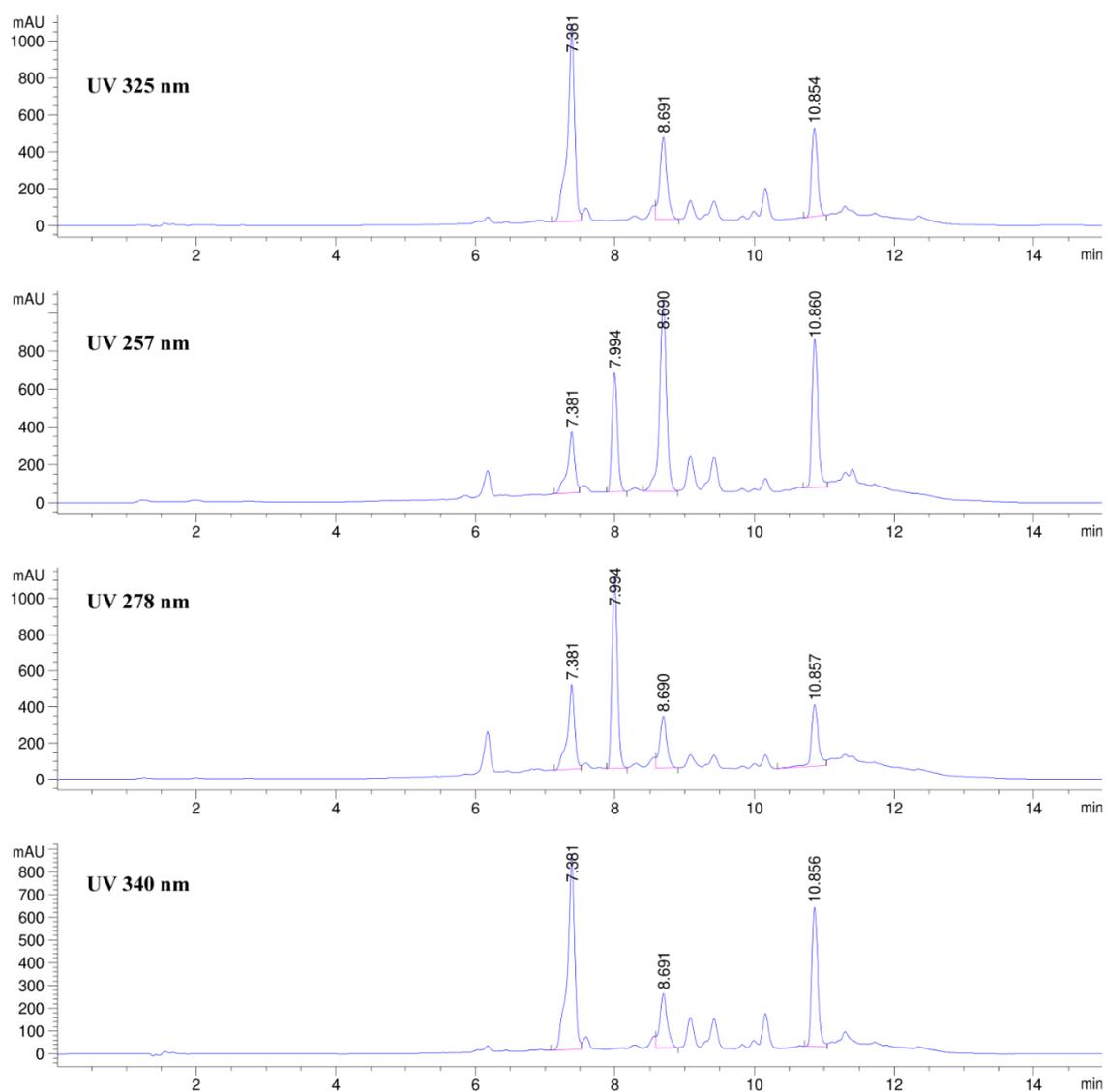
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 - Cultivar Araponga MG1



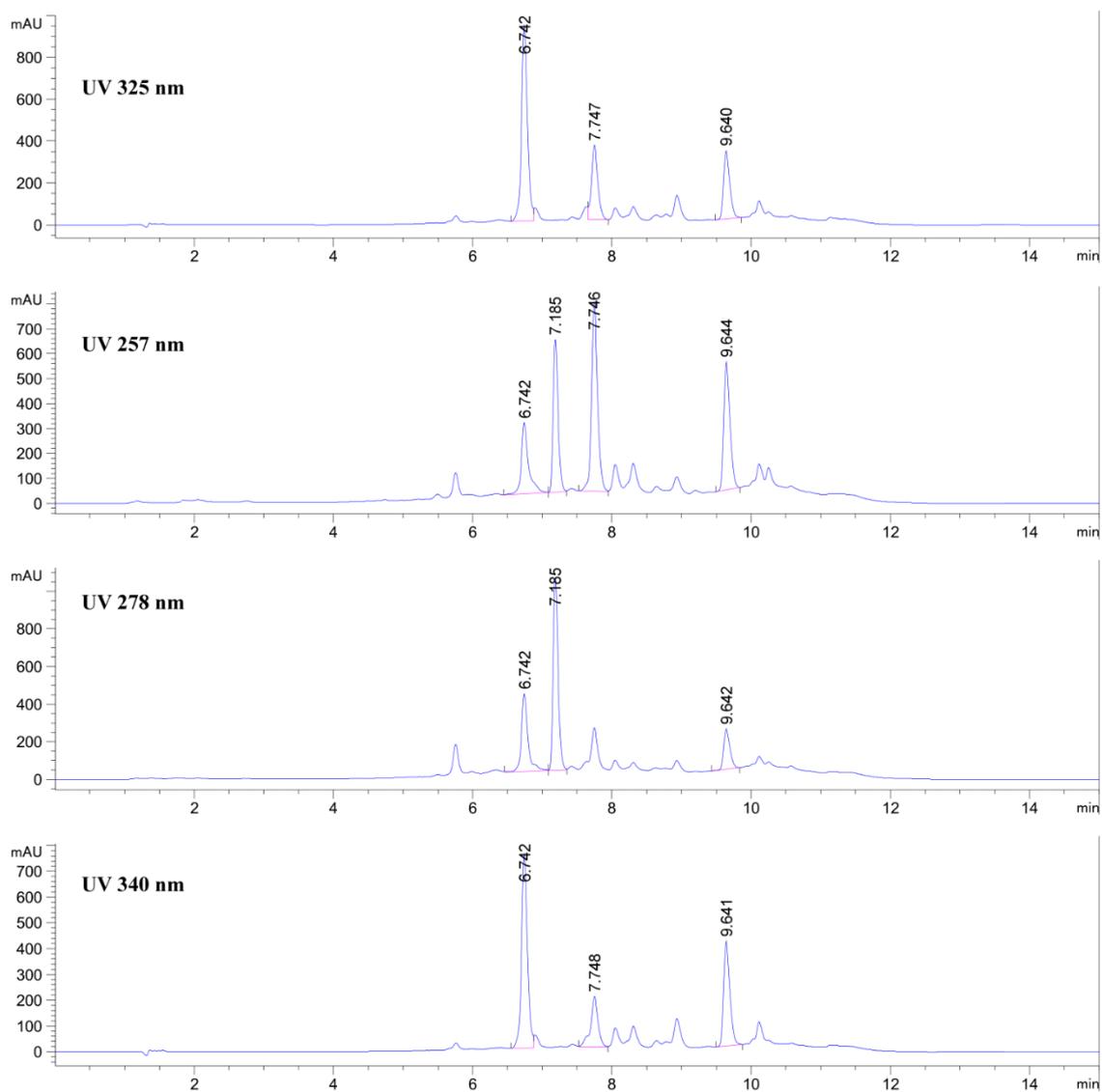
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28 - Cultivar MGS Ametista



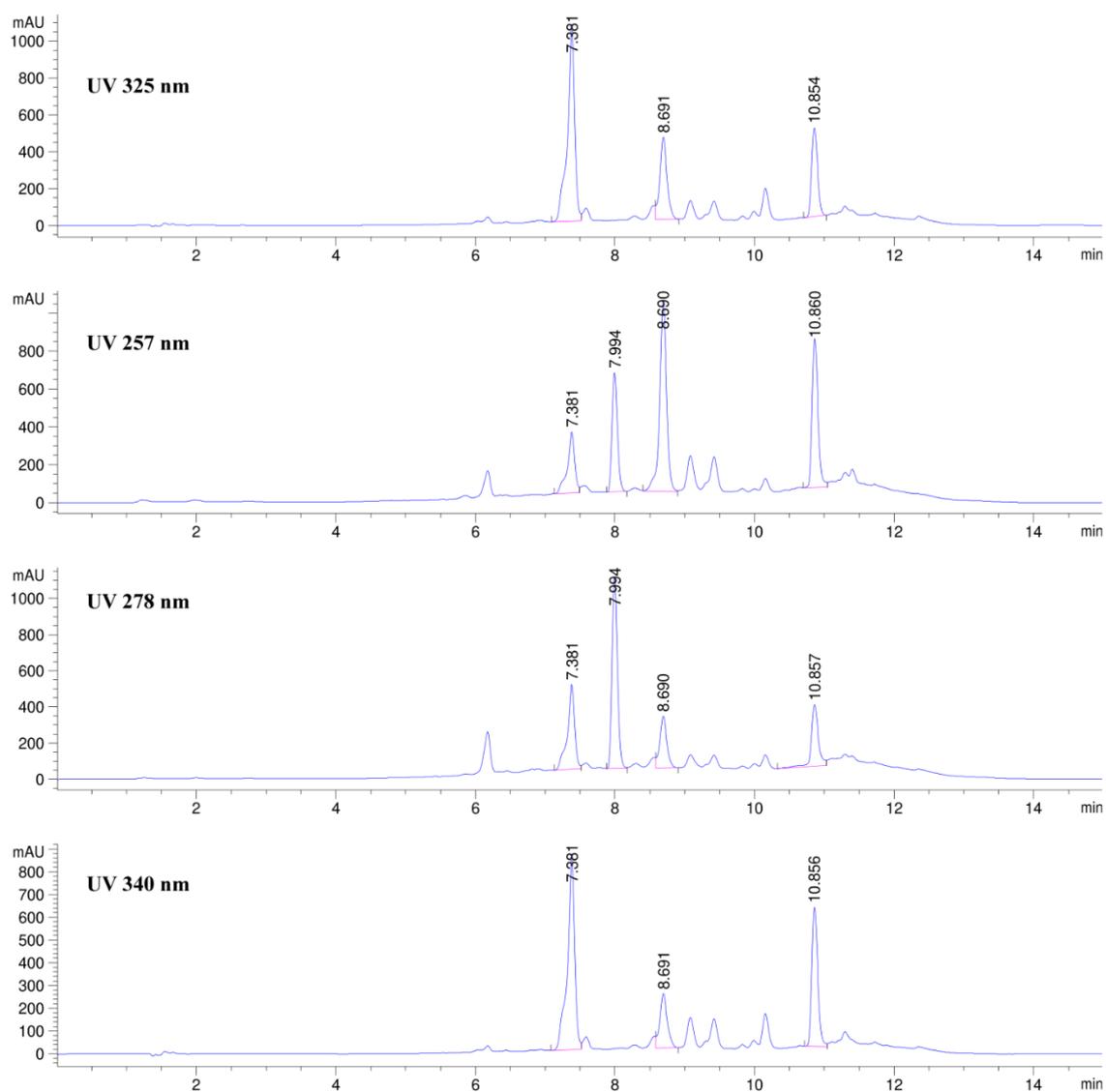
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 - Cultivar Catiguá MG1



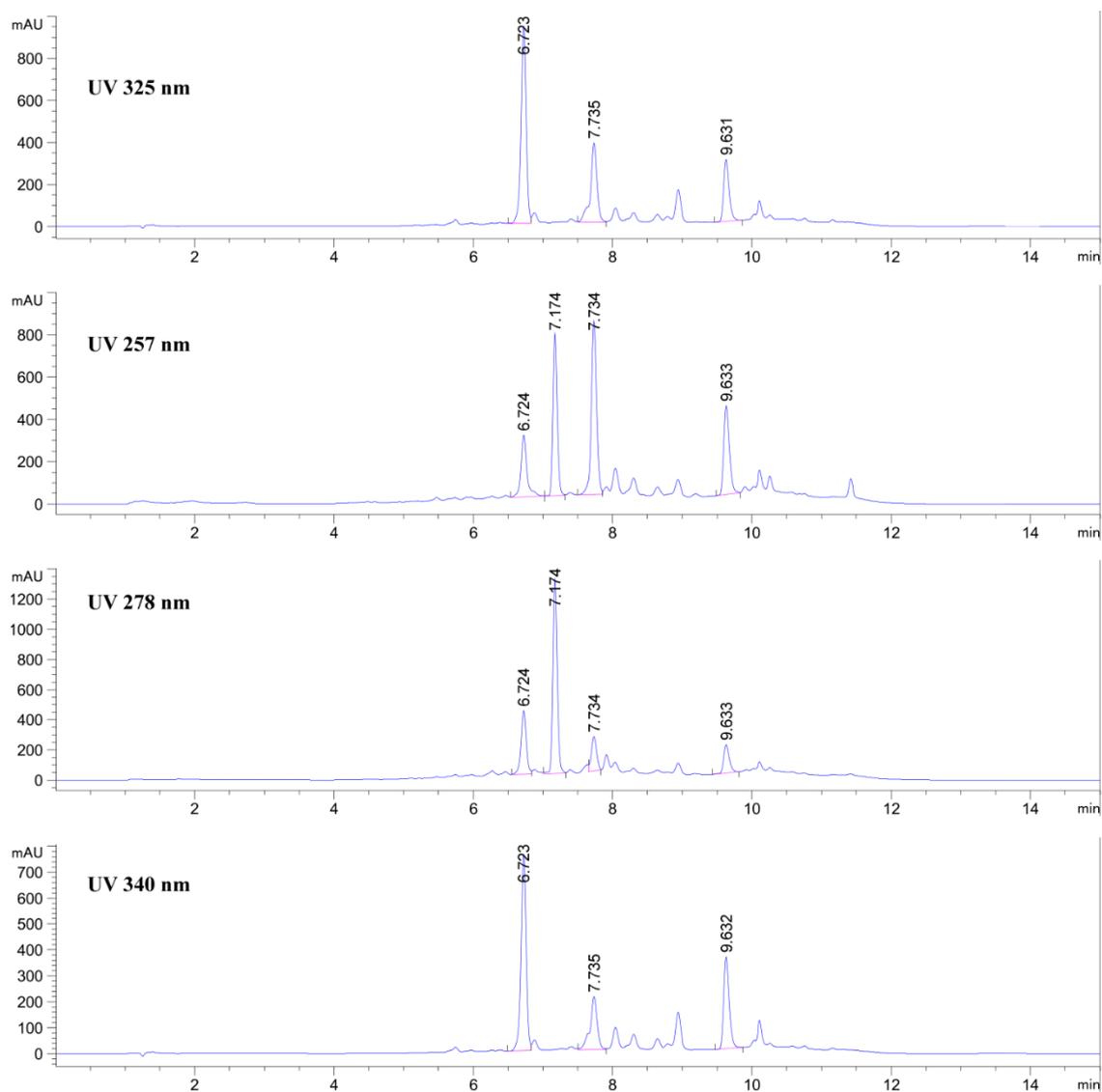
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 - Cultivar MGS Catiguá 3



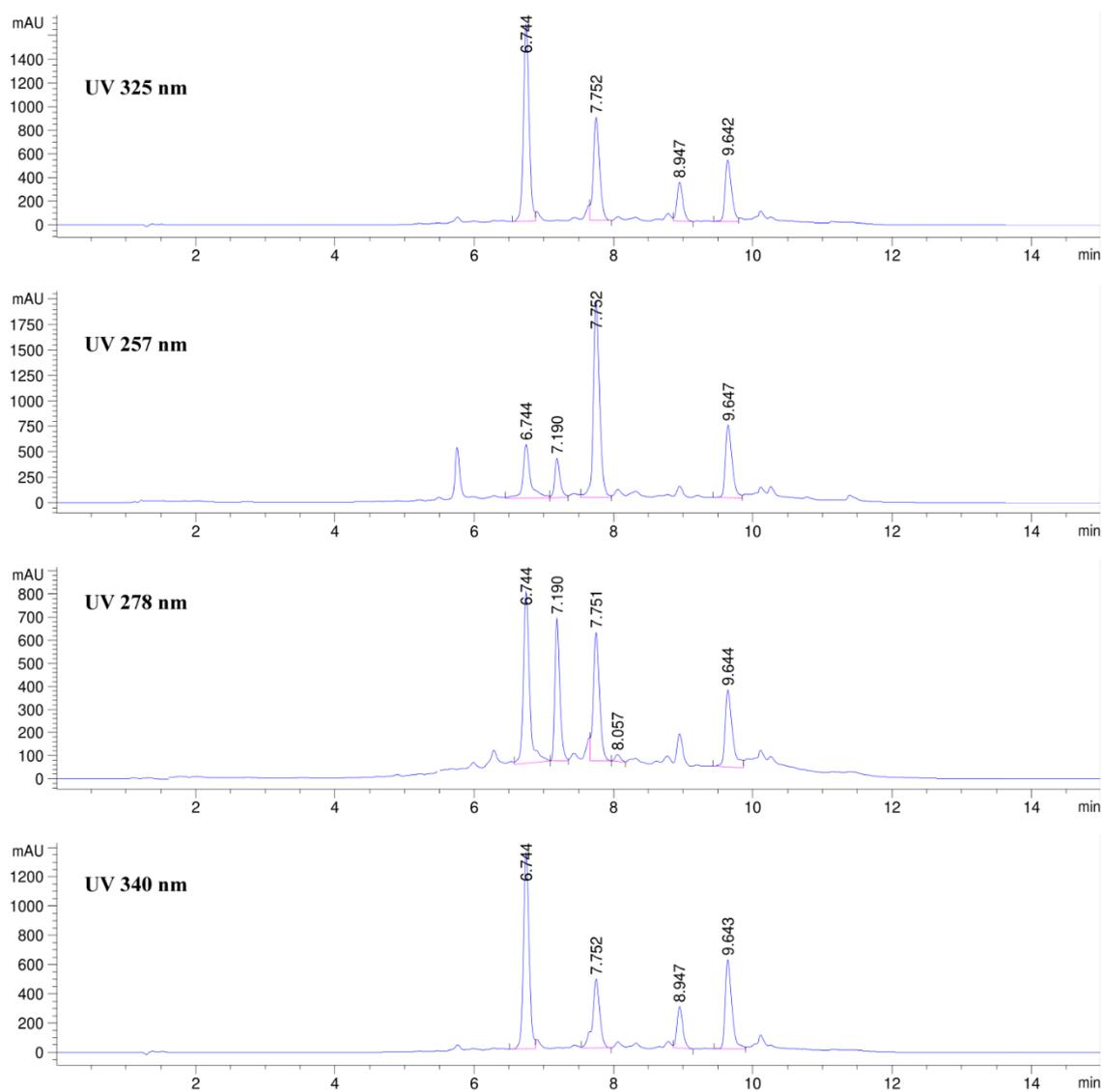
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 - Cultivar Oeiras MG 6851



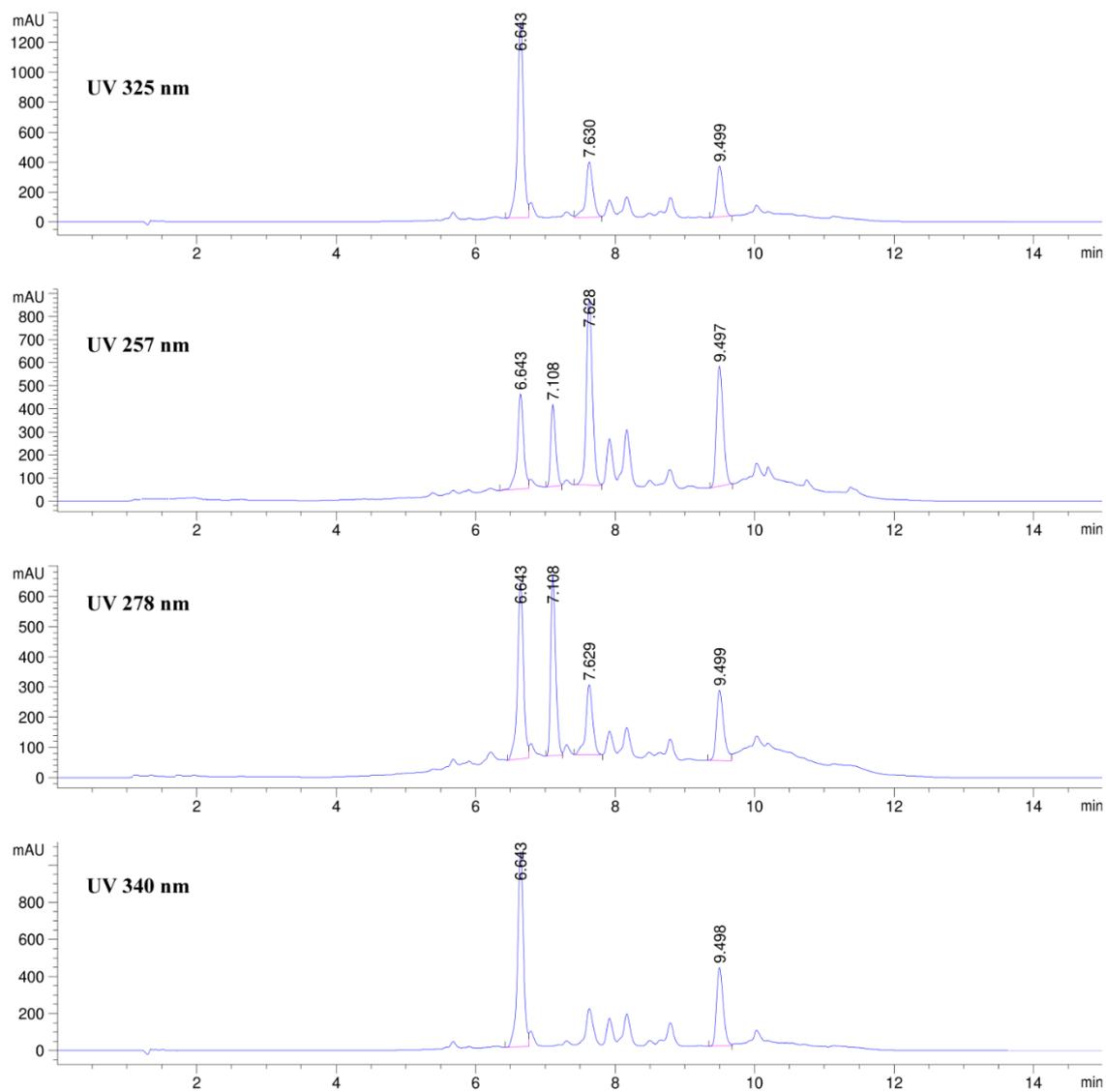
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 - Cultivar MGS Paraíso 2



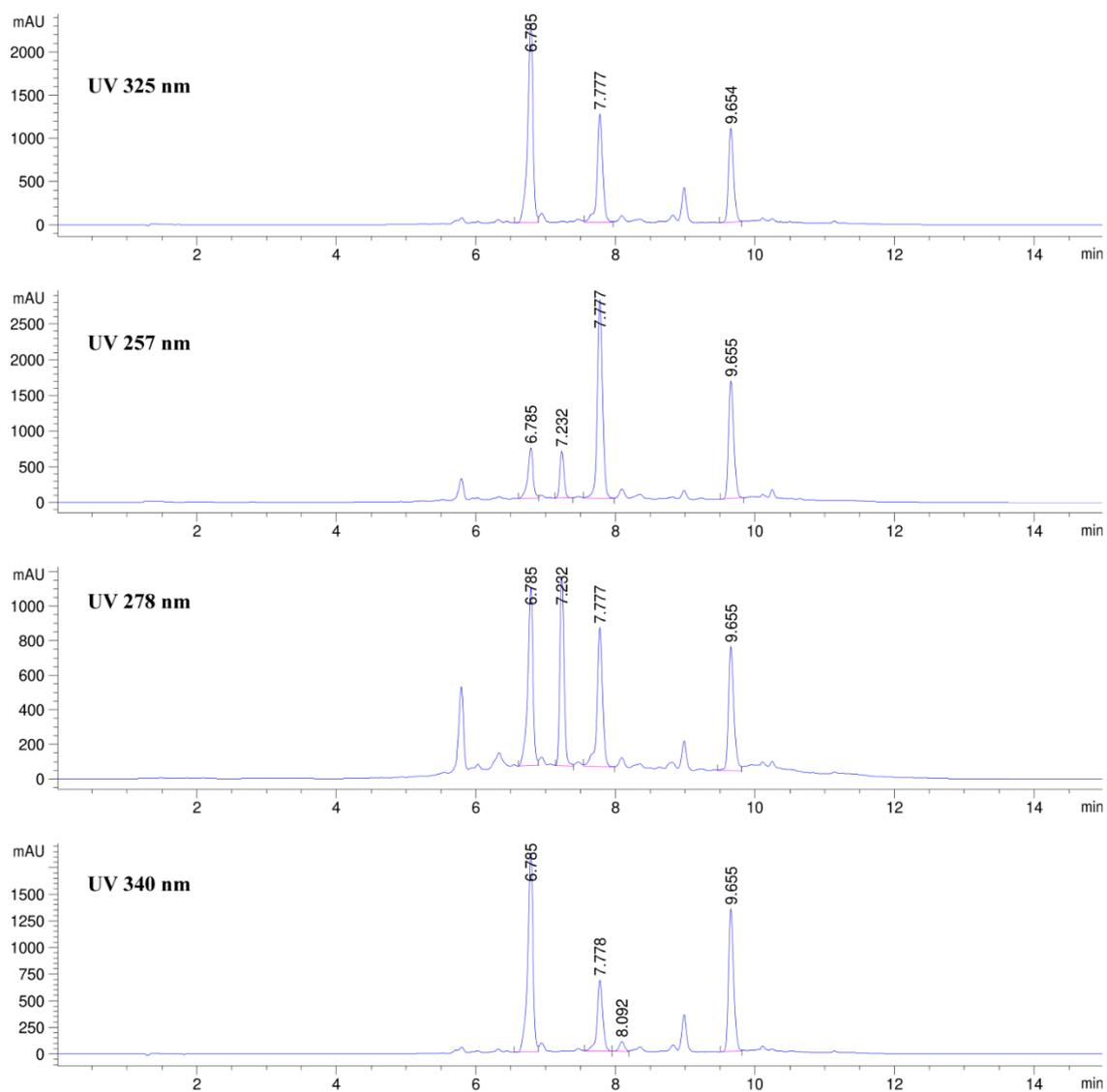
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33 - Cultivar Paraíso MG H 419-1



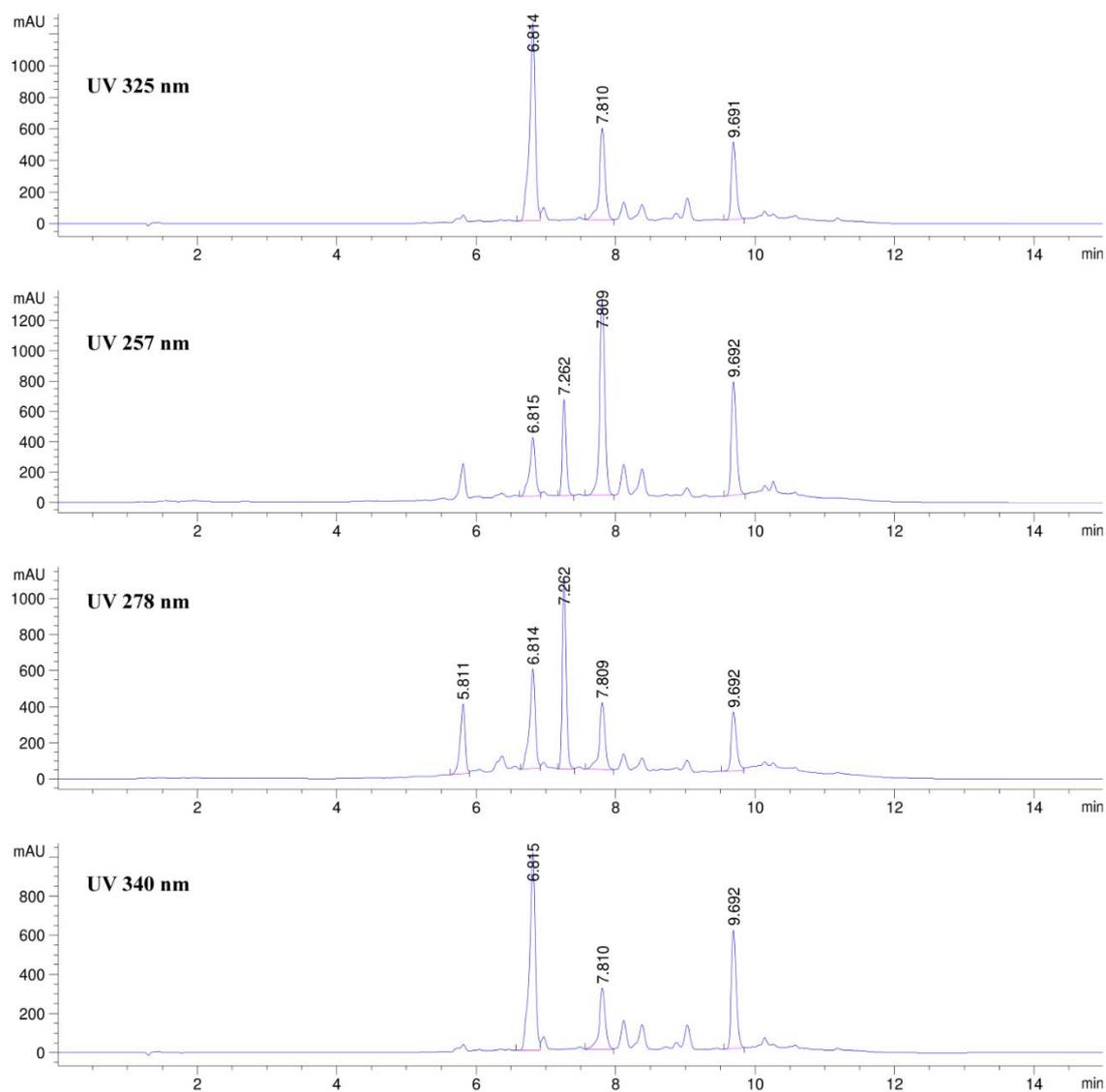
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 34 - Cultivar Pau Brasil 2



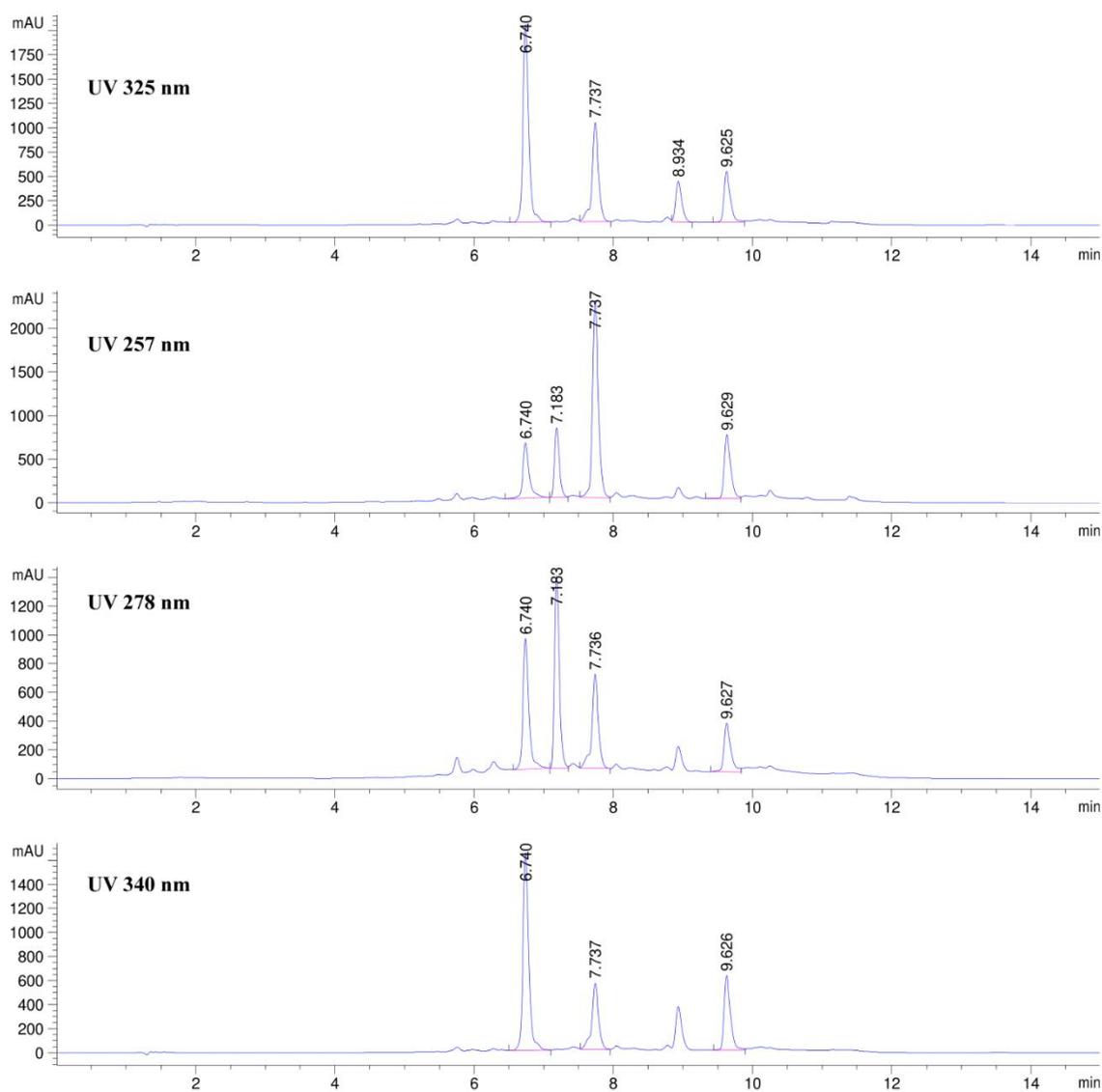
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 - Cultivar Pau Brasil MG1



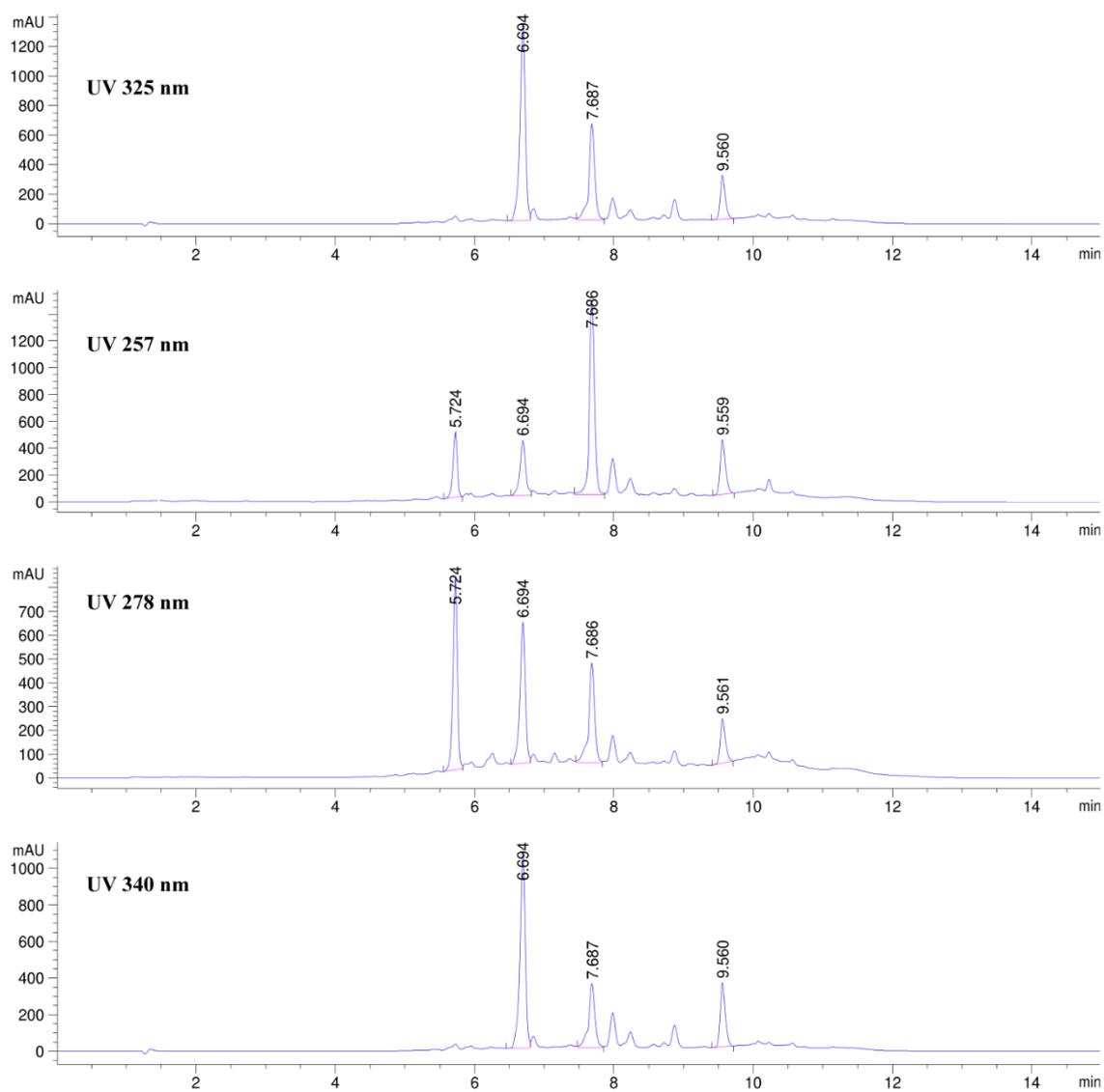
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36 - Cultivar Sarchimor MG 8840



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37 - Cultivar Sacramento MG1



Fonte: Elaborado pelo autor.

## APÊNDICE B – QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS EM DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

Cultivar	Ácido clorogênico			Mangiferina			Rutina		
	Aquosos	MeOH	QuEChERS	Aquosos	MeOH	QuEChERS	Aquosos	MeOH	QuEChERS
Acaíá Cerrado	3,18 ± 0,69	18,59 ± 1,37	2,65 ± 0,71	6,48 ± 0,12	18,57 ± 1,49	2,04 ± 0,18	6,47 ± 0,85	28,06 ± 2,11	2,77 ± 0,06
Rubi MG 1192	15,84 ± 0,96	21,56 ± 0,59	3,23 ± 0,27	8,61 ± 0,44	23,62 ± 0,32	1,99 ± 0,35	4,75 ± 0,54	11,17 ± 0,21	0,50 ± 0,09
Topázio MG1190	10,49 ± 0,20	20,20 ± 0,08	2,91 ± 1,01	1,84 ± 0,02	12,62 ± 0,07	0,88 ± 0,41	9,48 ± 0,17	20,88 ± 0,01	1,67 ± 0,52
MGS Travessia	14,04 ± 0,63	23,18 ± 0,13	4,05 ± 0,56	7,91 ± 0,49	15,28 ± 0,41	1,72 ± 0,21	11,61 ± 0,19	21,49 ± 0,51	1,66 ± 0,03
MGS Arañas	20,89 ± 0,62	31,45 ± 0,41	5,81 ± 0,11	12,21 ± 0,53	29,55 ± 0,08	2,89 ± 0,11	18,26 ± 0,57	39,69 ± 0,34	4,64 ± 0,96
Arapongas MG1	21,01 ± 0,20	26,3 ± 0,28	4,11 ± 0,03	14,47 ± 0,13	26,12 ± 1,17	2,57 ± 0,09	11,57 ± 0,02	19,23 ± 0,84	2,17 ± 0,44
MGS Ametista	23,49 ± 0,04	27,18 ± 0,28	4,33 ± 0,22	7,52 ± 0,09	26,75 ± 0,03	2,68 ± 0,88	13,36 ± 0,07	19,47 ± 0,27	2,07 ± 0,27
Catiguá MG1	18,77 ± 0,83	24,17 ± 0,25	3,89 ± 1,01	8,50 ± 0,15	17,76 ± 0,37	2,02 ± 0,31	13,75 ± 0,03	21,45 ± 0,51	1,74 ± 0,18
MGS Catiguá 3	26,46 ± 0,12	28,32 ± 0,89	3,07 ± 0,31	15,08 ± 0,12	28,99 ± 0,12	1,23 ± 0,27	20,21 ± 0,19	29,40 ± 0,36	2,15 ± 0,01
Oeiras MG 6851	9,00 ± 0,36	20,29 ± 0,19	2,81 ± 0,24	3,57 ± 0,02	16,29 ± 0,17	1,07 ± 0,77	6,96 ± 0,81	15,54 ± 0,12	1,45 ± 0,89
MGS Paraíso 2	20,89 ± 0,34	40,23 ± 0,31	6,06 ± 0,78	13,85 ± 0,07	46,26 ± 1,02	4,55 ± 0,48	8,66 ± 0,11	31,71 ± 0,19	3,04 ± 0,13
Paraíso MGH419-1	22,59 ± 0,28	32,62 ± 0,67	5,49 ± 0,07	12,07 ± 0,22	17,44 ± 0,51	2,18 ± 0,62	12,14 ± 0,34	21,99 ± 0,39	2,28 ± 0,07
Pau Brasil 2	27,26 ± 0,08	53,92 ± 0,84	12,62 ± 0,47	24,08 ± 0,02	56,06 ± 1,13	8,13 ± 0,96	23,09 ± 0,02	52,39 ± 0,30	9,33 ± 0,09
Pau Brasil MG1	5,80 ± 0,19	28,22 ± 0,32	4,52 ± 0,53	6,72 ± 0,26	23,63 ± 0,22	2,43 ± 0,64	6,51 ± 0,36	22,8 ± 0,09	2,79 ± 0,41
Sarchimor MG8840	21,68 ± 1,01	52,66 ± 0,94	8,25 ± 0,77	16,76 ± 1,31	55,94 ± 0,57	5,60 ± 0,55	9,22 ± 1,28	32,79 ± 0,46	3,55 ± 0,62
Sacramento MG1	23,77 ± 0,38	30,18 ± 0,07	4,92 ± 0,12	17,4 ± 0,89	29,63 ± 0,28	2,53 ± 0,21	11,68 ± 0,04	15,29 ± 0,27	1,79 ± 0,09

Dados obtidos em triplicata.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

**APÊNDICE C – CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS NAS FOLHAS DE CAFÉ ARÁBICA**

<b>Cultivar</b>	<b>AC1</b>	<b>AC2</b>	<b>M</b>	<b>Q1</b>	<b>Q2</b>	<b>Q3</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
Acaiá Cerrado	2,65 ± 0,71	1,18 ± 0,68	2,04 ± 0,18	0,05 ± 0,75	0,72 ± 0,06	0,48 ± 0,17	2,77 ± 0,06	ND
Rubi MG 1192	3,23 ± 0,27	1,24 ± 0,81	1,99 ± 0,35	0,19 ± 0,15	0,05 ± 0,92	ND	0,50 ± 0,09	0,48 ± 0,97
Topázio MG1190	2,91 ± 1,01	1,21 ± 0,62	0,88 ± 0,41	0,83 ± 0,01	0,68 ± 1,31	0,31 ± 0,22	1,67 ± 0,52	0,36 ± 1,11
MGS Travessia	4,05 ± 0,56	1,44 ± 0,31	1,72 ± 0,21	0,18 ± 0,91	0,92 ± 0,81	0,16 ± 0,79	1,66 ± 0,03	0,12 ± 0,31
MGS Arañas	5,81 ± 0,11	1,81 ± 0,29	2,89 ± 0,11	0,11 ± 1,26	1,39 ± 0,07	0,66 ± 0,23	4,64 ± 0,96	0,48 ± 0,65
Arapongas MG1	4,11 ± 0,03	1,00 ± 0,12	2,57 ± 0,09	1,00 ± 0,47	0,33 ± 0,10	0,28 ± 0,16	2,17 ± 0,44	1,30 ± 0,21
MGS Ametista	4,33 ± 0,22	1,43 ± 0,33	2,68 ± 0,88	ND	0,25 ± 0,89	0,27 ± 0,49	2,07 ± 0,27	0,32 ± 0,09
Catiguá MG1	3,89 ± 1,01	1,18 ± 0,08	2,02 ± 0,31	0,81 ± 0,36	0,64 ± 0,65	0,16 ± 0,65	1,74 ± 0,18	0,83 ± 0,07
MGS Catiguá 3	3,07 ± 0,31	1,03 ± 0,15	1,23 ± 0,27	1,23 ± 0,62	0,48 ± 0,41	0,29 ± 0,25	2,15 ± 0,01	1,19 ± 0,12
Oeiras MG 6851	2,81 ± 0,24	1,03 ± 0,20	1,07 ± 0,77	0,41 ± 0,14	0,20 ± 0,62	0,13 ± 0,12	1,45 ± 0,89	1,10 ± 0,79
MGS Paraíso 2	6,06 ± 0,78	1,85 ± 0,19	4,55 ± 0,48	0,35 ± 0,13	0,73 ± 0,14	0,55 ± 0,09	3,04 ± 0,13	0,63 ± 0,11
Paraíso MGH419-1	5,49 ± 0,07	1,08 ± 0,41	2,18 ± 0,62	2,20 ± 0,91	0,62 ± 0,11	0,24 ± 0,55	2,28 ± 0,07	1,87 ± 0,66
Pau Brasil 2	12,62 ± 0,47	2,25 ± 0,83	8,13 ± 0,96	0,59 ± 0,62	1,86 ± 0,09	1,45 ± 0,38	9,33 ± 0,09	1,44 ± 0,12
Pau Brasil MG1	4,52 ± 0,53	1,02 ± 0,05	2,43 ± 0,64	1,73 ± 0,74	0,54 ± 0,78	0,33 ± 0,17	2,79 ± 0,41	1,96 ± 0,34
Sarchimor MG8840	8,25 ± 0,77	2,09 ± 0,36	5,60 ± 0,55	ND	0,56 ± 0,56	0,66 ± 0,99	3,55 ± 0,62	0,54 ± 0,21
Sacramento MG1	4,92 ± 0,12	1,25 ± 1,01	2,53 ± 0,21	0,78 ± 0,70	0,11 ± 0,96	0,20 ± 0,16	1,79 ± 0,09	2,27 ± 0,18

Valores em triplicata expressos em g kg<sup>-1</sup>. AC1 = ácido clorogênico; AC2 = Ácido 3,5-dicafeoilquínico; M = mangiferina; Q1 = Quercetina diglicosídeo; Q2 = Quercetina 3-O-glicosídeo; Q4 = Quercetina ramnogalactosídeo; R1 = rutina; R2 = Rutina glicosídeo. ND = não detectado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

**APÊNDICE D – CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS INORGÂNICOS NAS FOLHAS DE CAFÉ ARÁBICA**

<b>Cultivar</b>	<b>Al</b>	<b>Cu</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>Sn</b>	<b>Zn</b>
Acaiá Cerrado	47,0 ± 8,2	662 ± 75	677 ± 86	79,3 ± 0,9	1791 ± 268	102 ± 13	26,8 ± 2,5
Rubi MG 1192	77,2 ± 2,8	466 ± 13	1935 ± 52	80,6 ± 2,2	1864 ± 132	126 ± 18	402 ± 23
Topázio MG1190	108 ± 3	109 ± 10	199 ± 30	41,88 ± 1,08	479 ± 24	< 0,010	< 0,020
MGS Travessia	93,9 ± 4,7	106 ± 9	269 ± 26	25,16 ± 0,56	502 ± 22	< 0,010	< 0,020
MGS Arañas	156 ± 13	148 ± 13	2258 ± 131	78,8 ± 1,8	3772 ± 137	155 ± 14	131 ± 2
Arapongas MG1	108,1 ± 0,4	111 ± 1	225 ± 38	83,4 ± 5,6	380 ± 14	< 0,010	< 0,020
MGS Ametista	71,5 ± 7,6	484 ± 40	1624 ± 199	91,8 ± 8,0	1790 ± 164	106 ± 10	222 ± 8
Catiguá MG1	124 ± 12	131 ± 2	1015 ± 141	83,4 ± 3,0	3691 ± 415	119 ± 11	71,8 ± 7,2
MGS Catiguá 3	105 ± 1	231 ± 3	679 ± 4	73,5 ± 6,9	1125 ± 36	84,8 ± 9,9	109 ± 5
Oeiras MG 6851	131 ± 16	136 ± 6	1845 ± 145	75,1 ± 7,8	1094 ± 39	193 ± 12	296 ± 14
MGS Paraiso 2	174 ± 19	251 ± 19	1574 ± 87	70,6 ± 3,1	3635 ± 18	128 ± 22	242 ± 24
Paraíso MGH419-1	77,2 ± 2,8	466 ± 13	1935 ± 52	80,6 ± 2,2	1864 ± 132	126 ± 18	402 ± 23
Pau Brasil 2	108 ± 9	106,1 ± 0,2	1086 ± 174	55,8 ± 0,2	763 ± 77	< 0,010	< 0,020
Pau Brasil MG1	76,8 ± 2,6	440 ± 37	1083 ± 82	90,06 ± 4,20	1485 ± 46	71,46 ± 8,02	132,77 ± 4,58
Sarchimor MG8840	108 ± 3	109 ± 10	199 ± 30	41,88 ± 1,08	479 ± 24	< 0,010	< 0,020
Sacramento MG1	76,8 ± 2,6	440 ± 37	1083 ± 82	90,06 ± 4,20	1485 ± 46	71,46 ± 8,02	132,77 ± 4,58

Valores em triplicata expressos em mg kg<sup>-1</sup>.

Fonte: Elaborador pelo autor.

**APÊNDICE E – INTERAÇÕES DE METABÓLITOS E CONTROLE COM CtMGAM**

<b>Ligantes</b>	<b>Receptor</b>	<b>Interação</b>	<b>Distância (Å)</b>
Cafeína	ASN1404A	Ligação de hidrogênio	2,58
Ácido clorogênico	HIS1727A	Hidrofóbica	3,85
	ARG1730A	Hidrofóbica	3,63
	GLN1731A	Hidrofóbica	3,68
	ARG1311A	Ligação de hidrogênio	1,98
	THR1726A	Ligação de hidrogênio	2,29
	ARG1730A	Ligação de hidrogênio	2,38
	GLN1756A	Ligação de hidrogênio	3,21
	GLN1756A	Ligação de hidrogênio	2,11
	PRO1793A	Ligação de hidrogênio	2,34
	HIS1727A	Ponte salina	3,54
	ARG1730A	Ponte salina	3,45
Mangiferina	ARG1730A	Hidrofóbica	3,75
	ARG1730A	Hidrofóbica	3,94
	TRP1752A	Hidrofóbica	3,88
	ARG1311A	Ligação de hidrogênio	2,57
	ARG1311A	Ligação de hidrogênio	3,51
	GLN1503A	Ligação de hidrogênio	3,32
	HIS1727A	Ligação de hidrogênio	2,56
	GLN1756A	Ligação de hidrogênio	2,10
	ASN1792A	Ligação de hidrogênio	2,47
	PRO1793A	Ligação de hidrogênio	2,32
	PRO1793A	Ligação de hidrogênio	3,06
Rutina	GLN1326A	Hidrofóbica	3,86
	PRO1329A	Hidrofóbica	3,40
	GLU1400A	Hidrofóbica	3,38
	GLU1284A	Ligação de hidrogênio	2,80
	GLU1284A	Ligação de hidrogênio	2,57
	ARG1285A	Ligação de hidrogênio	2,50
	LEU1291A	Ligação de hidrogênio	2,32

<b>Ligantes</b>	<b>Receptor</b>	<b>Interação</b>	<b>Distância (Å)</b>
	LEU1291A	Ligação de hidrogênio	2,79
	PRO1327A	Ligação de hidrogênio	1,76
	ALA1330A	Ligação de hidrogênio	2,48
	GLU1397A	Ligação de hidrogênio	2,84
	GLU1397A	Ligação de hidrogênio	2,16
	ASN1404A	Ligação de hidrogênio	2,96
	GLN1406A	Ligação de hidrogênio	2,65
	ASN1407A	Ligação de hidrogênio	2,29
Acarbose	TRP1355A	Hidrofóbica	3,69
	PHE1559A	Hidrofóbica	3,23
	ASP1157A	Ligação de hidrogênio	2,13
	ASP1157A	Ligação de hidrogênio	3,06
	ASP1420A	Ligação de hidrogênio	3,33
	ARG1510A	Ligação de hidrogênio	2,02
	ARG1510A	Ligação de hidrogênio	2,60
	ASP1526A	Ligação de hidrogênio	1,96
	THR1528A	Ligação de hidrogênio	3,23
	THR1528A	Ligação de hidrogênio	3,32
	HIS1584A	Ligação de hidrogênio	2,37
	HIS1584A	Ligação de hidrogênio	1,98
Metformina	ARG1510A	Ligação de hidrogênio	2,24
	ARG1510A	Ligação de hidrogênio	2,35
	ASP1420A	Ponte salina	4,55
	ASP1526A	Ponte salina	3,73
	ASP1526A	Ponte salina	4,17

Legenda: ALA - Alanina; ARG - Arginina; ASN - Asparagina; ASP - Ácido aspártico; GLN - Glutamina; GLU - Ácido glutâmico; HIS - Histidina; LEU - Leucina; PHE - Fenilalanina; PRO - Prolina; THR - Treonina; TRP - Triptofano.

Fonte: Elaborado pelo autor.