



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS
Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição - PPGAN

***SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTS OF COFFEA ARABICA L. AS A POTENTIAL
ADJUVANT IN PROSTATE CANCER CELLS: ANTIOXIDANT AND
ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS***

**EXTRATOS DE FLUIDO SUPERCRÍTICO DE *COFFEA ARABICA L.* COMO
POTENCIAL COADJUVANTE EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA:
EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVO**

RAQUEL BERNARDO NANA DE CASTRO

RIO DE JANEIRO

2023

RAQUEL BERNARDO NANA DE CASTRO

**EXTRATOS DE FLUIDO SUPERCRÍTICO DE COFFEA ARABICA L. COMO
POTENCIAL COADJUVANTE EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA:
EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Dr. Anderson Junger Teodoro

RIO DE JANEIRO

2023

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

B Bernardo Nana de Castro, Raquel
Extratos de fluido supercrítico de Coffea Arabica
L. como potencial coadjuvante em células de câncer
de próstata: efeitos antioxidante e
antiproliferativo / Raquel Bernardo Nana de Castro.
-- Rio de Janeiro, 2023.
152

Orientador: Anderson Junger Teodoro .
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição, 2023.

1. café. 2. compostos bioativos. 3.
adenocarcinoma de próstata. 4. linhagem celular de
câncer de próstata. 5. fluido supercrítico. I. ,
Anderson Junger Teodoro, orient. II. Título.

Raquel Bernardo Nana de Castro

EXTRATOS DE FLUIDO SUPERCRÍTICO DE COFFEA ARABICA L. COMO
POTENCIAL COADJUVANTE EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA:
EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro.

Aprovado em: 26/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Presidente da banca: Dr. Anderson Junger Teodoro (PPGAN/EMBRAPA)

Prof. Dr. Otniel Freitas Silva (PPGAN/UFF)

Prof. Dra. Carolyne Pimentel Rosado (PPGAN/ UNIRIO)

Prof. Dra. Thais Uekane (UFF)

Prof. Dra. Emília Akil (UNESA)



Ata_Defesa_Tese_Nº21_Raquel Bernardo Nana de Castro

Data e Hora de Criação: 26/09/2023 às 16:54:18

Documentos que originaram esse envelope:

- Ata_Defesa_Tese_Nº21_Raquel Bernardo Nana de Castro (2).pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 66d420fb4b918d1c4cda9ed80cca654394762ba86bb5b36eb7c76538a588490f

[SHA512]: 8430d6f5f3fe1339e5e36e71679d9aee3899799e994d327c4d1c3339bcf7c0b76810743edc9a7e1765afcbbc08a988704baa3b0fe60c88b21bbbd5b781e77b0

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Anderson Junger Teodoro (atteodoro@gmail.com)

Data/Hora: 26/09/2023 - 17:00:32, IP: 200.156.102.43, Geolocalização: [-22.886, -43.1248]

[SHA256]: a0446978f949d45ec3d1acbb812bc81b5aa77749d8c051face98669b5d89919c

Anderson Junger Teodoro



ASSINADO - Carolyne Pimentel Rosado (carolynerosado@gmail.com)

Data/Hora: 26/09/2023 - 17:21:02, IP: 18.230.59.152, Geolocalização: [-23.675078, -46.670534]

[SHA256]: 850841e98fef3b3f8ada998004e8cd1a7f0dcd8138da0085b14080b9bfd3e1



ASSINADO - Emilia Akil (emilia.akil@gmail.com)

Data/Hora: 26/09/2023 - 17:07:51, IP: 200.179.49.34, Geolocalização: [-22.790543, -43.307873]

[SHA256]: ab5abe7d5dd4bb058f7ddf463fed3b4164b0343a2d1ae983cd00768618e11646



ASSINADO - Otniel Freitas Silva (otniel.freitas@embrapa.br)

Data/Hora: 26/09/2023 - 17:00:54, IP: 186.212.181.213

[SHA256]: 4340f629cabfbb2194a6158c917dedf78cf6c39b56fa4e3eda28a9cb833cfb1a



ASSINADO - Thais Matsue Uekane (thaisuekane@id.uff.br)

Data/Hora: 26/09/2023 - 17:45:36, IP: 200.156.108.230

[SHA256]: da5a2abf01fc4e3f88d68f7a387678c4013c0d00812d776db383f039af144e4b

Histórico de eventos registrados neste envelope

26/09/2023 17:45:36 - Envelope finalizado por thaisuekane@id.uff.br, IP 200.156.108.230

26/09/2023 17:45:36 - Assinatura realizada por thaisuekane@id.uff.br, IP 200.156.108.230

26/09/2023 17:21:02 - Assinatura realizada por carolynerosado@gmail.com, IP 18.230.59.152

26/09/2023 17:20:32 - Envelope visualizado por carolynerosado@gmail.com, IP 18.230.59.152

26/09/2023 17:07:51 - Assinatura realizada por emilia.akil@gmail.com, IP 200.179.49.34

26/09/2023 17:07:33 - Envelope visualizado por emilia.akil@gmail.com, IP 200.179.49.34

26/09/2023 17:00:54 - Assinatura realizada por otniel.freitas@embrapa.br, IP 186.212.181.213

26/09/2023 17:00:46 - Envelope visualizado por otniel.freitas@embrapa.br, IP 186.212.181.213

26/09/2023 17:00:32 - Assinatura realizada por atteodoro@gmail.com, IP 200.156.102.43

26/09/2023 16:58:08 - Envelope registrado na Blockchain por ppgan.secretaria@unirio.br, IP 200.156.27.158

26/09/2023 16:58:06 - Envelope encaminhado para assinaturas por ppgan.secretaria@unirio.br, IP 200.156.27.158

26/09/2023 16:54:17 - Envelope criado por ppgan.secretaria@unirio.br, IP 200.156.27.158



Dedico este trabalho à Deus, o autor e consumidor da minha fé.

Ao meu querido marido Frederico e amado filho Daniel,
pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos.

E aos meus pais que sempre acreditaram e oraram por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por entregar seu filho Jesus para morrer pelos meus pecados, por me guiar até aqui e por me sustentar em cada momento, mesmo sem eu merecer.

Ao meu querido marido, Frederico, pelo amor, incentivo, compreensão e apoio em todos os momentos. Por não me deixar desistir em nenhum momento durante o desenvolvimento deste trabalho e por desejar sempre o melhor para o meu desenvolvimento profissional.

Ao meu filho amado, Daniel, minha mola propulsora que me impulsiona para frente e me faz acreditar que posso fazer qualquer coisa.

Aos meus pais, Leila e José Geraldo, pelas orações, amor, compreensão, estímulo e confiança nos meus objetivos.

Aos meus sogros, Marcia e Sérgio (*in memoriam*), por todo o suporte para eu pudesse me dedicar aos experimentos e à escrita desta tese. Por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a continuar.

Aos meus familiares e amigos, pela amizade, torcida, compreensão e incentivo em todos os momentos.

À Dra. Lana que me estimulou a realizar o doutorado, me apresentou meu orientador e me emprestou livros para estudar para o processo seletivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson, pela orientação, compreensão, confiança, estímulo e apoio. Pela disponibilidade e paciência sem as quais não seria possível desenvolver este trabalho, especialmente no período da pandemia de COVID-19.

À pós-doutoranda Dra. Carolyne, pela contribuição na análise colorimétrica e suporte na redação e revisão dos artigos científicos.

Às doutorandas Marta, Lauriza, Luciana e Michele, por toda ajuda na realização dos experimentos. Obrigada pela disponibilidade, amizade e parceria ao longo destes quatro anos.

Ao aluno de Iniciação científica, Rodrigo, pela parceria, amizade e suporte na execução dos experimentos.

À toda equipe do LAAF, LabCen e LABAL, pela torcida, amizade, convivência e contribuição direta ou indireta para realização deste trabalho.

Aos Dr. Antônio Fidalgo Neto e Dr. Alex Queiroz de Souza, do SENAI, pela parceria e contribuições durante o processo de extração supercrítica das amostras de café.

Ao Prof. Dr. Otniel Freitas Silva e à EMBRABA, pela parceria e contribuição nos experimentos de CLAE.

Ao banco de células do INCA pela doação das linhagens celulares de câncer de próstata DU-145 e PC-3 para a realização dos experimentos *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Rafael e à toda equipe do LBE do IB da UNIRIO por ceder seu espaço para realização de parte dos experimentos de células e nos receber de forma tão acolhedora.

Aos colegas do Doutorado, pela convivência, amizade, torcida, vibração e momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-graduação de Alimentos e Nutrição da UNIRIO pela oportunidade de realizar este trabalho.

À coordenação e a secretaria do PPGAN, por todo suporte e orientações nos últimos quatro anos.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

“Tudo posso naquele que me fortalece”
Filipenses 4.13

CASTRO, Raquel Bernardo Nana de. **Extratos de fluido supercrítico de *Coffea Arabica L.* como potencial coadjuvante em células de câncer de próstata: efeitos antioxidante e antiproliferativo.** 2023. 153 p. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

RESUMO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, sendo conhecido por suas propriedades bioativas. O conteúdo de compostos bioativos no café depende de muitas condições, tais como: variedade genética, ambiente e manejo, bem como das condições de cultivo, colheita, processamento, fermentação, torrefação e modo de preparo. Pesquisas sugerem que os fitoquímicos presentes no café podem atuar na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, inclusive de câncer. Estudos observacionais indicam uma relação inversa entre o consumo de café e o risco de câncer de próstata. O café consumido mundialmente como bebida é obtido por métodos de percolação e/ou infusão. A técnica de extração com fluido supercrítico é uma metodologia alternativa, sendo um processo que utiliza o dióxido de carbono como extrator, no qual não é inflamável nem tóxico. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos bioativos dos extratos de *Coffea arabica* em diferentes níveis de torra obtidos por extração com fluido supercrítico em duas linhagens celulares metastáticas de câncer de próstata. Foram avaliados a concentração de cafeína, ácido clorogênico e ácido cafeico, além do perfil colorimétrico, capacidade antioxidante e o efeito dos extratos de café na viabilidade, ciclo celular e na apoptose de PC-3 e DU-145, linhagens celulares de câncer de próstata. O extrato supercrítico de café verde apresentou atividade antioxidante superior aos extratos de café torrado, o que é consistente com seu maior teor de compostos fenólicos totais. Ainda, os extratos supercríticos de café verde foram capazes de realizar a parada do ciclo celular em G₀/G₁, em ambas as linhagens celulares de câncer de próstata, mas os extratos de torra clara foram capazes de parar o ciclo celular na fase S e G₂/M, apenas em PC-3. Observou-se que tanto o café verde quanto o café de torra clara induziram uma redução significativa na viabilidade celular e foram capazes de induzir apoptose em PC-3 e DU-145, com destaque para o café de torra clara. O café causou uma redução mais acentuada na viabilidade celular e apoptose de DU-145 do que em PC-3. Este fato pode estar relacionado aos efeitos diretos e indiretos dos compostos bioativos degradados e formados no café durante a torrefação, que podem atuar em diferentes vias de sinalização celular destas linhagens. A técnica de extração utilizada produziu extratos de café arábica com teor de fenólicos totais mais elevado e resultados significativos das amostras de torra clara no ciclo celular de PC-3 e DU-145 em comparação com outras técnicas testadas em estudos prévios. Apesar dos resultados satisfatórios observados na viabilidade celular e apoptose, os resultados para PC-3 foram inferiores aos obtidos por extração assistida por ultrassom, técnica de menor custo. A viabilidade econômica desta técnica pode ser considerado um fator limitante de sua aplicação. As amostras supercríticas de café arábica podem ser eficazes na prevenção e tratamento do câncer de próstata, porém, mais estudos são necessários para confirmar essa eficácia e avaliar os mecanismos moleculares envolvidos. Especialmente, ensaios *in vivo* para determinar doses na prevenção e tratamento do câncer de próstata.

Palavras-chave: café, compostos bioativos, adenocarcinoma de próstata, linhagem celular PC-3, linhagem celular DU-145, fluido supercrítico.

CASTRO, Raquel Bernardo Nana de. **Supercritical Fluid Extracts of Coffea arabica L. as a Potential Adjuvant in Prostate Cancer Cells: Antioxidant and Antiproliferative Effects**. 2023. 153 p. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

ABSTRACT

Coffee is one of the most consumed beverages in the world, known for its bioactive properties. The content of bioactive compounds in coffee depends on various conditions, such as genetic variety, environment, and management, as well as cultivation, harvesting, processing, fermentation, roasting, and brewing methods. Research suggests that phytochemicals present in coffee may contribute to reducing the risk of non-communicable chronic diseases, including cancer. Observational studies indicate an inverse relationship between coffee consumption and the risk of prostate cancer. Coffee consumed worldwide as a beverage is obtained through percolation and/or infusion methods. Supercritical fluid extraction is an alternative methodology that uses carbon dioxide as an extractor, which is neither flammable nor toxic. The aim of this study was to evaluate the bioactive effects of *Coffea arabica* extracts at different roast levels obtained through supercritical fluid extraction on two metastatic prostate cancer cell lines. The concentrations of caffeine, chlorogenic acid, and caffeic acid were evaluated, as well as the colorimetric profile, antioxidant capacity, and the effects of coffee extracts on the viability, cell cycle, and apoptosis of PC-3 and DU-145 prostate cancer cell lines. Supercritical green coffee extract exhibited higher antioxidant activity compared to roasted coffee extracts, consistent with its higher content of total phenolic compounds. Furthermore, supercritical green coffee extracts were capable of arresting the cell cycle at the G0/G1 phase in both prostate cancer cell lines, while light roast coffee extracts were able to arrest the cell cycle at the S and G2/M phases, particularly in PC-3. Both green and light roast coffee extracts induced a significant reduction in cell viability and induced apoptosis in PC-3 and DU-145, with light roast coffee being more effective. Coffee caused a more pronounced reduction in cell viability and apoptosis in DU-145 compared to PC-3. This difference may be related to the direct and indirect effects of bioactive compounds degraded and formed in coffee during roasting, which may act on different signaling pathways in these cell lines. The extraction technique used produced Arabica coffee extracts with higher total phenolic content and significant results for light roast samples in the cell cycle of PC-3 and DU-145 compared to other techniques tested in previous studies. Despite the satisfactory results observed in cell viability and apoptosis, the results for PC-3 were lower than those obtained by ultrasound-assisted extraction, a less costly technique. The economic viability of this technique may be considered a limiting factor for its application. Supercritical Arabica coffee extracts may be effective in the prevention and treatment of prostate cancer; however, further studies are needed to confirm this efficacy and assess the molecular mechanisms involved. In particular, *in vivo* trials are necessary to determine doses for the prevention and treatment of prostate cancer.

Keywords: coffee, bioactive compounds, prostate adenocarcinoma, cell line PC-3, cell line DU-145, supercritical fluid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (A) Desenho do fruto do café e suas partes. Fotos dos frutos de cafés em: (B) diferentes estágios de maturação, (C) corte transversal do fruto com a casca removida, (D) grão com mucilagem, (E, F) grãos após secagem com o pergaminho e (G) grão cru com a película prateada.....	22
Figura 2 - As duas espécies de café mais comercializadas no mundo.	23
Figura 3 - Etapas do processamento do fruto do café para produção da bebida.	28
Figura 4 - Estrutura química da cafeína.	34
Figura 5 - Estrutura química do ácido cafeico (A), ácido quínico (B), ácido ferúlico (C), p-cumárico (D), ácido 4-cafeoilquínico (E), 3-FQA (F), 4-FQA (G), 5-FQA (H), ácido 5-cafeoilquínico (I) e ácido 3-cafeoilquínico (J).	36
Figura 6 - Estrutura química da trigonelina	37
Figura 7 - Estrutura química do caveol livre (A), caveol esterificado (B), cafestol livre (C), cafestol esterificado (D).	38
Figura 8 - Mecanismos da atividade antioxidante do café.	39
Figura 9 - Mecanismos da ação do café para atividade anti-inflamatória.....	41
Figura 10 - Anatomia da glândula prostática.....	43
Figura 11 - Diagrama de fases típico de uma substância pura.....	51
Figura 12 - Cossolventes mais utilizados na SFE para compostos fenólicos.....	52
Figura 13 - Escala Agtron.....	55
Figura 14 - Etapas da extração por fluido supercrítico.	57
Figura 15 - Amostras supercríticas de café.....	58
Figura 16 - Representação espacial de cores no diagrama de cores CIELAB.....	59
Figura 17 - Capacidade antioxidante de extratos de café arábica em diferentes níveis de torra pelos métodos ABTS(A), DPPH(B), FRAP (C) e ORAC (D).	69
Figura 18 - A viabilidade celular em resposta a diferentes concentrações de amostras de extrato de café verde (A e B) e torra clara foram testadas pelo ensaio MTT: PC-3 24 h (A e C), PC-3 48 h (B e D).	72
Figura 19 - A viabilidade celular em resposta a diferentes concentrações de amostras de extrato de café verde (A e B) e torra clara foram testadas pelo ensaio MTT: DU-145, 24 h (A e C), PC-3 48 h (B e D).	73
Figura 20 - Indução de apoptose em 48h em células de câncer de próstata PC-3 por diferentes extratos de café arábica verde e torra clara. (A) Células PC-3 de controle. (B e C) Células PC-3, respectivamente, após tratamento com 5mg/ml e 10mg/ml de extrato de café de torra clara.	75
Figura 21 - Indução de apoptose em 48h em células de câncer de próstata DU-145 por diferentes extratos de café arábica verde e torra clara. (A) Células DU-145 de controle. (B e C) Células DU-145, respectivamente, após tratamento com 5mg/ml e 10mg/ml de extrato de café verde. (D e E) Células DU-145, respectivamente, após tratamento com 5mg/ml e 10mg/ml de extrato de café de torra clara.	76

Figura 22 - Aumento da apoptose após tratamento com extratos de café arábica verde e torra clara após 48 horas de incubação. (A) Aumento relativo na indução de apoptose por diferentes extratos de café arábica verde e torra clara em células de câncer de próstata PC-3. (B) Aumento relativo na indução de apoptose por diferentes extratos de café arábica verde e torra clara em células de câncer de próstata DU-145. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do grão cru de <i>C. arábica</i> e <i>C. canephora</i>	27
Tabela 2 - Compostos que aumentam ou diminuem durante o processo de torrefação do grão de café. A coluna da esquerda mostra os mais abundantes compostos no café verde que são perdidos durante o processo de torrefação, enquanto a coluna da direita mostra aqueles que aparecem durante a o processo de torrefação.....	31
Tabela 3 - Análise colorimétrica de amostras de fluido supercrítico de café arábica por diferentes graus de torra.	66
Tabela 4 - Teor de cafeína e compostos fenólicos nos extratos de café arábica verde e em diferentes níveis de torra.....	68
Tabela 5 - Efeito de extratos de café arábica na progressão do ciclo celular em células PC-3 e DU-145, após 48 horas de incubação.	71
Tabela 6 - Efeito de extratos de café arábica na apoptose em células PC-3 e DU-145, após 48 horas de incubação.	74
Tabela 7 - Comparação do efeito de extratos de café arábica na concentração 5mg/mL obtidos por 3 diferentes métodos de extração em células PC-3.	78
Tabela 8 - Comparação do efeito de extratos de café arábica na concentração 5mg/mL obtidos por 2 métodos de extração em células DU-145.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2-AZOBIS-2-AMIDINOPROPANO DIHIDROCLORADO
ABTS	ÁCIDO 2,2-AZINO-BIS 3-ETILBENZOTIAZOLIN 6-ÁCIDO SULFÔNICO
ACS	AMERICAN CANCER SOCIETY
B	BOMBA
C	COMPRESSOR
CaP	CÂNCER DE PRÓSTATA
CAT	CATALASE
CGA	ÁCIDO CLOROGÊNICO
CLAE	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
CO ₂	DIÓXIDO DE CARBONO
COX-2	CICLOOXIGENASE DOIS
CV	CAFÉ VERDE
CONAB	COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO
DMSO	DIMETIL SULFÓXIDO
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
DP	DESVIO PADRÃO
DPPH	2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL
EMBRAPA	EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
ERA	ELEMENTO DE RESPOSTA ANTIOXIDANTE
FAO	FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION
FRAP	MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO
FUNED	FUNDAÇÃO EZEQUIAS DIAS
GAE	EQUIVALENTE DE ÁCIDO GÁLICO
GR	GLUTATIONA REDUTASE
GSH	GLUTATIONA REDUZIDA
GPx	GLUTATIONA PEROXIDASE
GST	GLUTATIONA S-TRANSFERASE
HMF	HIDROXIMETILFURFURAL
IARC	INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER
ICO	INTERNATIONAL ORGANIZATION OF COFFEE
IL	INTERLEUCINA
INCA	INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER

iNOS	ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
LC3B-I	CADEIA LEVE TRÊS BETA DA PROTEÍNA UM
MAE	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICROONDAS
MAPA	MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
MCP-1	PROTEÍNA QUIMIOATRAENTE DE MONÓCITOS UM
mTORC	COMPLEXO ALVO DA RAPAMICINA EM MAMÍFEROS
MTT	3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZÓLIO
NF-Kb	FATOR NUCLEAR KAPPA BETA
PC	PONTO CRÍTICO
PCR	PROTEÍNA C-REATIVA
PIB	PRODUTO INTERNO BRUTO
PSA	ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO
PTP1B	PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE UM B
ROS	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
SDS-PAGE	SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE
SENAI	SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
SOD	SUPERÓXIDO DISMUTASE
SFE	SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION
TEAC	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AO TROLOX
TC	TORRA CLARA
TE	TORRA ESCURA
TI	TORRA ITALIANA
TM	TORRA MÉDIA
TNF- α	FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA
VE	VÁLVULA DE EXPANSÃO
5-CQA	ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Aspectos históricos e econômicos do café	19
2.2	Café	21
2.2.1	<i>Coffea arabica</i>	23
2.2.2	<i>Coffea canephora</i>	24
2.2.3	Composição química	25
2.2.4	Produção e processamento dos grãos	27
2.3	Bioatividade dos compostos do café	33
2.3.1	Cafeína	34
2.3.2	Ácidos clorogênicos	35
2.3.3	Trigonelina	37
2.3.4	Diterpenos Caveol e Cafestol	38
2.4	Atividade antioxidante induzida pelo café	39
2.5	Efeitos anti-inflamatórios do café	40
2.6	Café e câncer de próstata	43
2.7	Métodos de extração de compostos bioativos	48
2.8	Extração de compostos bioativos por fluido supercrítico	49
3	OBJETIVOS	54
3.1	Objetivo geral	54
3.2	Objetivos específicos	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	Matéria prima	55
4.2	Obtenção dos extratos de café por CO₂ supercrítico	56
4.3	Análise colorimétrica	58
4.4	Determinação de compostos fenólicos totais	59
4.5	Caracterização química dos extratos de café por CLAE	60
4.6	Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH	60

4.7	Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (FRAP).....	61
4.8	Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS+ ..	61
4.9	Ensaio ORAC	62
4.10	Cultura de células e protocolo de tratamento	62
4.11	Ensaio de viabilidade e proliferação celular (MTT).....	63
4.12	Análise de ciclo celular	63
4.13	Avaliação da indução de apoptose	64
4.14	Análises estatísticas.....	65
5	RESULTADOS	66
5.1	Medições de parâmetros colorimétricos de extratos de café.....	66
5.2	Perfil fitoquímico e atividade antioxidante de extratos de café.....	67
5.3	Compostos bioativos de extratos de café promovem efeitos citostáticos em células de câncer de próstata	70
5.4	Compostos bioativos de extratos de café reduzem a viabilidade celular e induzem apoptose em células de câncer de próstata.....	71
5.5	Comparação dos efeitos de extratos de café arábica obtidos por diferentes métodos de extração após incubação com células de câncer de próstata	77
6	DISCUSSÃO	80
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	APÊNDICE A - INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE TORREFAÇÃO NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E NOS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE CAFÉ ARÁBICA (COFFEA ARABICA L.)	111
	APÊNDICE B – CAFÉ NO DIA A DIA	123
	APÊNDICE C – BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ROASTED AND GREEN COFFEE OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION DECREASE SURVIVAL AND INDUCE APOPTOSIS IN PROSTATE CANCER.....	125
	APÊNDICE D – ANTIOXIDANT AND ANTICARCINOGENIC EFFECTS OF COFFEE AND ITS BIOACTIVE COMPOUNDS IN CREST CANCER: A REVIEW.....	152

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, sendo produzido a partir dos grãos torrados do fruto do cafeeiro, servido tradicionalmente quente, mas também pode ser consumido gelado (INTERNATIONAL ORGANIZATION OF COFFEE [ICO], 2018). Pode ser preparado e apresentado de diversas formas, por exemplo, expresso, prensa francesa, café com leite etc. O café é ligeiramente ácido e pode ter um efeito estimulante em humanos devido ao seu teor de cafeína (DESHPANDE *et al.*, 2019).

Segundo a Organização Internacional do Café (ICO, 2021), o café é a *commodity* agrícola mais comercializada no mundo. Cerca de 80 países tropicais e subtropicais produzem café extensivamente e, em alguns casos, é o principal produto de exportação agrícola (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012; ICO, 2021). Estima-se que a indústria cafeeira tenha um faturamento mundial de mais de 100 bilhões de dólares, sendo até 20 bilhões de dólares envolvidos apenas com exportações (JANDA *et al.*, 2020). Vale destacar que o Brasil é o maior produtor e exportador de café e o segundo maior consumidor da bebida no mundo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO [CONAB], 2018; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION [FAO], 2020).

O café também é conhecido por possuir propriedades bioativas que estão relacionadas principalmente à sua capacidade antioxidante (WACHAMO, 2017; NAVEED *et al.*, 2018). Estudos sugerem que o consumo de café atua na redução do risco de várias doenças crônicas não transmissíveis, incluindo o Alzheimer, Parkinson, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica e o câncer (BULDAK *et al.*, 2018; SARRIÁ *et al.*, 2018).

O câncer, em geral, se desenvolve devido a mutações sucessivas em genes, que alteram a morfologia e fisiologia celular (HASSANPOUR & DEGHANI, 2017). O estresse oxidativo leva à inflamação por vias redox, aumentando a circulação de marcadores inflamatórios (KUO *et al.*, 2020; POULSEN, LAMBERT & JEPPESEN, 2020). A resposta inflamatória causa lesão tecidual e dano ao DNA (KUO *et al.*, 2020; MURATA, 2018). Esse distúrbio afeta o ciclo e a divisão celular, a sinalização da apoptose e os mecanismos de reparo do DNA, levando ao câncer (HASSANPOUR & DEGHANI, 2017).

Além dos fatores de risco não modificáveis, como idade, história e etnia, o desenvolvimento do câncer também pode ser influenciado pela dieta e por fatores ambientais, por meio da epigenética, que envolve alterações na transcrição gênica sem nenhuma alteração na sequência de nucleotídeos (KGATLE *et al.*, 2016).

O câncer de próstata (CaP) se desenvolve quando as células prostáticas secretoras de sêmen mutantes começam a se proliferar incontrolavelmente. Se o CaP não for tratado, ele pode metastatizar, geralmente para os linfonodos, para o osso do quadril e depois para outros órgãos. Normalmente, não é diagnosticado nos estágios iniciais porque inicialmente é assintomático (KGATLE *et al.*, 2016). O CaP é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens no mundo, correspondendo a estimativa de 14,1% dos todos os cânceres para 2023 (BRASIL, 2022).

O consumo elevado de fitoquímicos naturais de plantas está associado a benefícios para a saúde (MURATA, 2018). O café é uma importante fonte de compostos fitoquímicos da dieta que podem contribuir para a proteção contra o CaP (MONTENEGRO, SILVA & TEODORO, 2022).

Em relação ao efeito protetor sobre o risco de desenvolver câncer de próstata, há evidências de que o café modula a transcrição de genes relacionados ao câncer e a inflamação devido a seus compostos bioativos (CHEN *et al.*, 2021). Ainda, existem algumas metanálises com dados epidemiológicos explorando a associação da ingestão de café e risco de CaP (CAO *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2016). No entanto, apesar das evidências epidemiológicas, o câncer de próstata e sua correlação com o café, e os mecanismos pelos quais essa proteção ocorre ainda não são totalmente compreendidos (TVERDAL, 2015).

Dentre as substâncias presentes no café que afetam o corpo humano, destacam-se os polifenóis, incluindo a cafeína, o ácido cafeico, a trigonelina, o ácido clorogênico e os diterpenos como cafestol e caveol (BULDAK *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2019).

Vale destacar que o conteúdo de compostos bioativos no café depende de muitas condições, tais como: variedade genética, ambiente e manejo, bem como as modificações induzidas durante o processamento pós-colheita, como fermentação e grau de torrefação (DURÁN *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2017). Dentre as etapas da cadeia produtiva do café, o processo de torrefação é fundamental, pois degrada e

forma novos compostos, principalmente por meio da reação de *Maillard*, bem como pode estar relacionado à redução de compostos bioativos e, possivelmente, aos efeitos protetores (DÍAZ, ORMAZA & ROJANO, 2018).

Com os recentes avanços nas ciências médicas e nutricionais, os produtos naturais e os alimentos promotores de saúde receberam grande atenção tanto dos profissionais de saúde quanto da população em geral. Estes alimentos funcionais e fitonutrientes ou fitoterápicos desempenham um papel positivo na manutenção do bem-estar, melhorando a saúde e modulando a função imunológica para prevenir doenças específicas. Nesse contexto, crescentes demandas tem aumentado o consumo de extratos vegetais e produtos naturais isolados de plantas e fontes de alimento de interesse terapêutico (ZHAO, 2007).

Especificamente na terapia de enfermidades infecciosas e do câncer, estima-se que mais de 75 e 60%, respectivamente, dos fármacos atualmente empregados são derivados de fontes naturais, sendo muito deles compostos com atividade antioxidante que podem agir em diversos níveis da sequência oxidativa nos sistemas biológicos (JUSTO & MORAES, 2008).

Uma vez que compostos biologicamente ativos geralmente estão presentes nas plantas em baixas concentrações, métodos de extração eficientes e seletivos são necessários para a obtenção destes a partir dos materiais vegetais (LANG & WAI, 2001). No contexto do estudo de produtos naturais, o termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou a fração ativa contida no material vegetal (SONOGLIO *et al.*, 2007).

Neste contexto, a técnica do fluido supercrítico é uma metodologia alternativa para a extração do café, sendo um processo que utiliza o dióxido de carbono como extrator, no qual não é inflamável nem tóxico, ou seja, não produz contaminantes para o meio ambiente. Além disso, pode penetrar em matrizes sólidas de forma mais eficiente quando comparada a solventes líquidos, sendo uma técnica que apresenta vantagens em relação às técnicas convencionais de extração (NASTI *et al.*, 2021).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos históricos e econômicos do café

O café continua sendo a *commodity* mais valiosa globalmente e uma das bebidas mais consumidas (ICO, 2021). A cadeia produtiva do café exerce significativa influência no setor econômico mundial, tornando-a a segunda mercadoria mais comercializável do mundo (COSTA *et al.*, 2023). De acordo com dados da ICO, cerca de 129 milhões de sacas de 60kg de grãos de café foi exportado em todo o mundo em 2021-2022 (ICO, 2021).

Cerca de 80 países tropicais e subtropicais produzem café extensivamente e, em alguns casos, é o principal produto de exportação agrícola (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012; ICO, 2021). Apesar dos países desenvolvidos serem os maiores consumidores de café, 90% dos cafezais são cultivados em países em desenvolvimento, principalmente na América Central e do Sul, na África e no sul da Ásia (CHEN; MA; KITTS, 2018). Brasil, Vietnã e Colômbia são os maiores produtores e exportadores de café do mundo, com 39, 26 e 12 milhões de sacas exportados, respectivamente, no período de 2021-2022, o que equivale a 60% da produção mundial (ICO, 2021).

A pandemia de COVID-19 trouxe impacto negativo na produção, exportação e consumo do café no ano cafeeiro de 2019/2020 devido as políticas de restrição e distanciamento social aplicadas. A partir de 2021 a economia global começou a se recuperar, expandindo 6,1% em 2021 e os países começaram a flexibilizar as regras de isolamento social após a pandemia do COVID-19, assim, o consumo de café voltou a aumentar. A produção (1,1%), a exportação (1,6%) e o consumo de café (1%) voltaram a crescer no ano cafeeiro de 2020/2021 em comparação com o anterior (ICO, 2021).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café e segundo maior consumidor da bebida no mundo (CONAB, 2018; FAO, 2020). O café é o 5º produto na pauta de exportação brasileira, movimentando US\$ 5,2 bilhões em 2017 (BRASIL, 2018). Os principais estados brasileiros produtores de café são: Minas Gerais, Espírito Santo,

São Paulo, Bahia, Rondônia, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás, Mato Grosso e Amazonas, que correspondem a 99,6% da produção nacional (CONAB, 2018).

Embora mais de 100 espécies de café tenham sido identificadas em todo o mundo, apenas duas são economicamente importantes, são elas a Arábica (*Coffea arabica*), e a Robusta (*Coffea canephora*) (COSTA *et al.*, 2023). Ambas são diferentes em muitos aspectos, incluindo climas ideais de crescimento, aspectos físicos, composição química e características da bebida feita com as sementes moídas e torradas (FARAH, 2012).

A espécie *Coffea arábica* é a mais comercializada e possui maior aceitabilidade no mercado, devido suas características sensoriais, como doçura, acidez, aroma e corpo (DEBONA *et al.*, 2020). Ela é originária da Etiópia, da região de Kaffa. No início, o café era conhecido apenas por suas propriedades estimulantes e a fruta era consumida fresca, sendo utilizada para alimentar e estimular os rebanhos durante as viagens (MARTINS, 2008).

A partir do século IX, o consumo de infusões do fruto do café difundiu-se por todo o Oriente próximo, mas a torra dos grãos foi registrada pela primeira vez na Pérsia no século XVI. No século seguinte seu consumo já era bastante difundido o que levou os europeus a realizarem seu plantio em suas colônias tropicais (KOBELITZ, 2011).

No século XVII, os cafés começaram a surgir em várias cidades europeias, incluindo Londres, Paris e Viena. Os cafés europeus se tornaram centros de encontro intelectual, onde artistas, escritores e filósofos se reuniam para discutir ideias e trocar informações, ou seja, o café se tornou uma parte importante da cultura europeia e um símbolo do Iluminismo (MARTINS, 2008).

No século XVIII, o cultivo do café se espalhou para outras partes do mundo, incluindo as colônias europeias na América. O café se tornou um importante produto de exportação para países como Brasil, Colômbia e Costa Rica, impulsionando o crescimento econômico desses países. O surgimento das plantações de café nas Américas foi acompanhado pelo uso intensivo de mão de obra escrava, o que teve um impacto significativo na história do comércio de escravos (MARTINS, 2008).

A história do café continuou a evoluir ao longo dos séculos seguintes, a popularidade da bebida se espalhou pelo mundo, e diferentes cultivares de café foram

desenvolvidas, cada uma com características distintas de sabor e aroma (KOBBLITZ, 2011).

No Brasil, o café chegou pela Guiana Francesa em 1727, sendo as primeiras plantações realizadas na região Norte – no Pará e no Maranhão. O cultivo se adaptou melhor no Vale do Paraíba, de onde se difundiu para o sul de Minas Gerais, Paraná e São Paulo (KOBBLITZ, 2011).

Tradicionalmente, o café é produzido no Brasil desde a época do império, com a mão-de-obra imigrante a cultura ganhou impulso e durante três quartos de século, quase toda riqueza do país se concentrou na agricultura cafeeira. Durante toda sua história, tem sido uma importante fonte de renda para a economia do país e contribuindo para o PIB (Produto Interno Bruto) do Brasil (MARTINS, 2008).

2.2 Café

Café é o nome dado à bebida produzida pela infusão do produto obtido da secagem, da torrefação e da moagem das sementes do fruto do cafeeiro (ANUNCIACÃO & JÚNIOR, 2016).

O cafeeiro é uma planta de porte arbustivo ou arbóreo pertencente à família *Rubiaceae*, que tem cerca de 500 gêneros e mais de 6.000 espécies (CLIFFORD&WILSON, 1985; WRIGLEY, 1988). De maneira geral, pode-se dizer que o cafeeiro é um arbusto perene, cuja altura varia entre dois a seis metros e, no estado selvagem, sem nenhum tipo de condução, pode chegar a 10 metros. As folhas, quando adultas, são de coloração verde-escura e brilhantes, formato elíptico e bordas onduladas. Os frutos são de formato oblongo, de coloração amarela ou vermelha, encerrando duas sementes envolvidas por uma membrana resistente comumente chamada de pergaminho (CARVALHO, 2007).

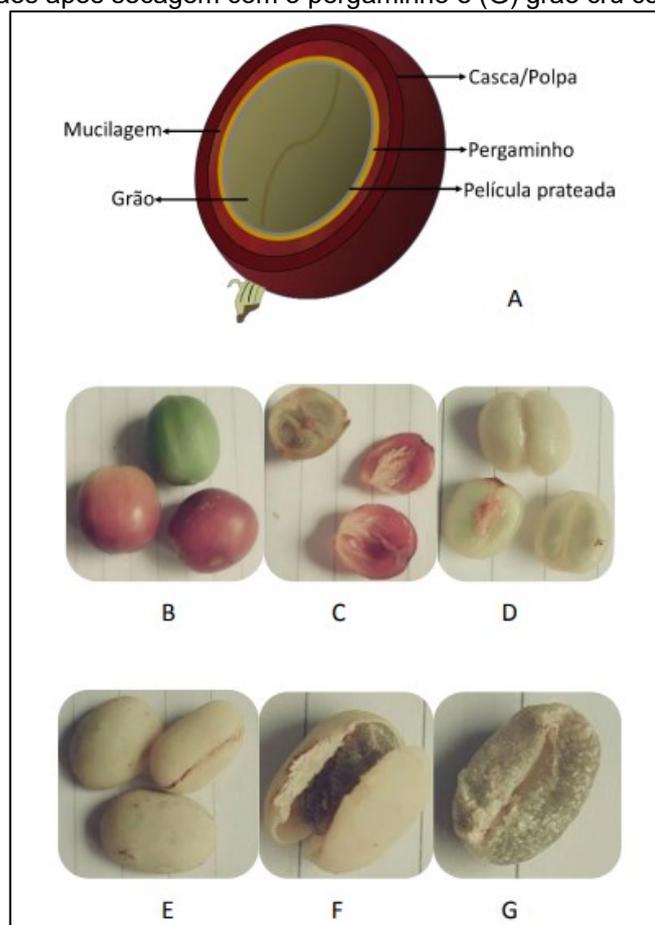
Seus constituintes mais importantes são: óleos, celulose, água e açúcares redutores. Os grãos livres do endosperma constituem o chamado café verde e, quando os grãos são torrados, os açúcares sofrem caramelização, a umidade diminui e desenvolve-se o aroma característico de café (ANUNCIACÃO & JÚNIOR, 2016).

O fruto do café é uma drupa constituída de duas sementes cobertas por uma camada de aspecto pergaminhoso (endocarpo) formada por fibras esclerenquimáticas

alongadas com lúmen estreito e pontoações arredondadas (FUNDAÇÃO EZEQUIAS DIAS [FUNED], 2012).

A Figura 1 mostra que a semente do café apresenta forma plana convexa sulcada longitudinalmente na face plana e é formada a partir do exocarpo, mesocarpo, endocarpo, casca prateada e do próprio grão, denominado endosperma (FUNED, 2012). O exocarpo, também conhecido como casca externa, é o componente mais externo do fruto, formado por um único parênquima e cloroplasto celular; o mesocarpo é a camada intermediária pastosa do grão, chamada de mucilagem, que é composta de carboidratos (pectina, glicose e frutose), proteínas, minerais, polifenóis e cafeína. A semente (endosperma) tem uma camada de proteção conhecida como espermodérmica, chamada de pele prateada e o endosperma tem a função biológica de proteger o próprio embrião do café (COSTA *et al.*, 2023).

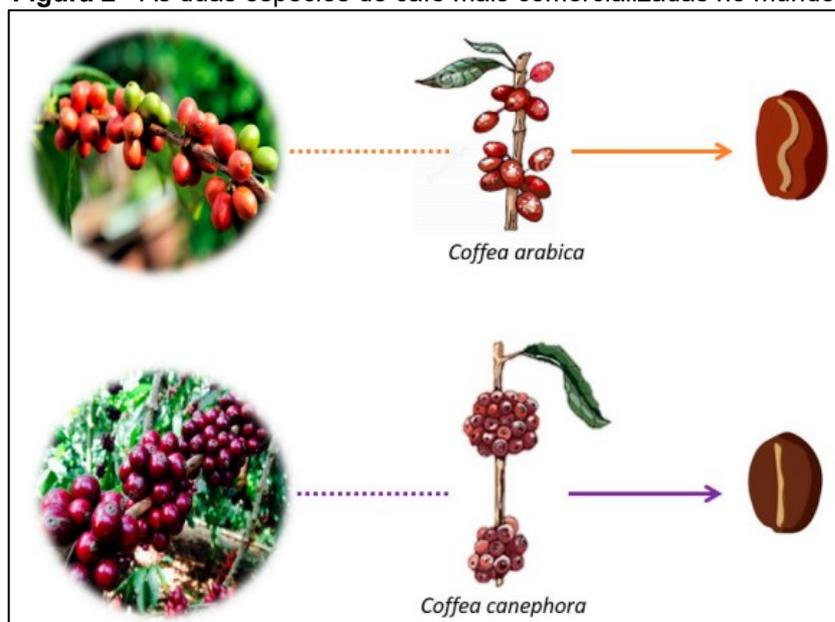
Figura 1 - (A) Desenho do fruto do café e suas partes. Fotos dos frutos de cafés em: (B) diferentes estágios de maturação, (C) corte transversal do fruto com a casca removida, (D) grão com mucilagem, (E, F) grãos após secagem com o pergaminho e (G) grão cru com a película prateada.



Fonte: DÚRAN et al., 2017.

O gênero *Coffea* possui mais de 103 espécies descritas na literatura, mas, apenas quatro espécies são difundidas no comércio mundial: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Coffea liberica* e *Coffea excelsa*, sendo as duas primeiras significativamente mais expressivas (COSTA *et al.*, 2023). A Figura 2 mostra as diferenças morfológicas entre as duas espécies mais produzidas no mundo.

Figura 2 - As duas espécies de café mais comercializadas no mundo.



Fonte: COSTA *et al.*, 2023.

2.2.1 *Coffea arabica*

O *Coffea arabica* foi descrito pela primeira vez por Lineu em 1753 (CLIFFORD&WILSON, 1985). Ele possui características sensoriais consideradas superiores, devido seu sabor doce e aroma forte e possui uma produção em larga escala no mundo todo, sendo consumido puro ou em misturas (com outras espécies) (COSTA *et al.*, 2023).

Suas variedades mais conhecidas são o “*Typica*” e o “*Bourbon*”, mas a partir dessas variedades desenvolveram-se muitas linhagens e cultivares, como o *Caturra* (Brasil, Colômbia), o *Mundo Novo* (Brasil), o *Tico* (América Central), o *San Ramon* anão e o *Blue Mountain* jamaicano (CLIFFORD&WILSON, 1985; WRIGLEY, 1988).

A espécie *Coffea arabica* difere das demais espécies por apresentar maturação dos frutos em menor tempo, variando de 7 a 9 meses. Além disso, o café arábica é mais suscetível a pragas e variações abióticas (temperatura, umidade, pH e altitude) devido à sua forma. Além disso, o *Coffea arabica* tem níveis mais baixos de cafeína e sólidos solúveis (COSTA *et al.*, 2023). Em relação ao cultivo, esta espécie necessita de altitudes superiores a 600m e um clima ameno (15–22°C), sendo cultivado à sombra devido à sua maior susceptibilidade à variação de temperatura, ou seja, sem esses fatores abióticos, o desenvolvimento da planta é prejudicado (COSTA *et al.*, 2023).

2.2.2 *Coffea canephora*

O *Coffea canephora*, popularmente conhecido por sua variedade *Coffea robusta* (café Robusta), é nativo da África Central, e seu cultivo é popular em países asiáticos e no Brasil (COSTA *et al.*, 2023). Ele é utilizado para a produção de cafés com sabor mais forte e amargor pronunciado, é menos aromático e possui teor mais elevado de sólidos solúveis e de compostos bioativos que o café arábica (RINCON, 2011; YILMAZ & ACAR-TEK, 2017; COSTA *et al.*, 2023).

Geralmente é utilizado em *blends*, nos quais é combinado com o café arábica, e pode representar até 30% do produto (COSTA *et al.*, 2023). Ainda, é frequentemente usado para produção de café solúvel por causa de seu baixo custo e alta eficiência (RINCON, 2011; YILMAZ & ACAR-TEK, 2017).

Os cafeeiros de *Coffea robusta* são multicaules, com um ciclo fenológico (9-11 meses) mais longo do que o café arábica. Morfologicamente, suas raízes são geralmente mais desenvolvidas que as de café arábica e pode absorver ainda mais nutrientes e água do solo, tornando a planta mais resistente a deficiências hídricas e nutricionais. As folhas são maiores que a espécie *Coffea arabica*, com coloração verde menos intensa. Os frutos são arredondados, vermelhos (intensos a claro) e pode ser amarelo (raro). Os grãos de *Coffea canephora* têm uma vida útil mais curta do que *Coffea arabica* e, portanto, são recalcitrantes (COSTA *et al.*, 2023).

O *Coffea canephora* é cultivada em baixas altitudes (0–900m), climas equatoriais e temperaturas variando de 17°C (mínimo) a um máximo de 31°C, ele pode

ser cultivado em ambiente com temperaturas mais altas, sendo mais adequado para cultivo a pleno sol (COSTA *et al.*, 2023).

2.2.3 Composição química

A composição química do café cru é influenciada pela variedade genética, condições ambientais como altitude, temperatura e umidade, e pelo processamento pós-colheita; fatores que influenciam a qualidade da bebida do café (DÚRAN *et al.*, 2017; FERRÃO *et al.*, 2009; VELOSO *et al.*, 2020).

O grão do café (café verde) é composto principalmente de água, carboidratos, fibras, proteínas e aminoácidos livres, lipídios, minerais, ácidos orgânicos, ácidos clorogênicos, trigonelina e cafeína (FARAH, 2012).

A infusão do café é um produto de complexa composição química, principalmente após sua torrefação, onde compostos originais do grão são degradados e novos compostos são formados garantindo a presença de substâncias nutritivas, bioativas e suas características de sabor e aroma (ABRAHÃO *et al.*, 2010).

O sabor característico do café se deve à presença de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis, destacando-se os ácidos, aldeídos, cetonas, proteínas, aminoácidos livres, ácidos graxos, extrato etéreo e à ação de enzimas em alguns destes constituintes (FERNANDES *et al.*, 2001).

Os carboidratos (solúveis e insolúveis) são os principais constituintes do grão de café cru (40 – 65,5%). No caso dos carboidratos solúveis, o teor é de 6 a 12,5%, e corresponde aos monossacarídeos (frutose, glicose, galactose, arabinose) e, oligossacarídeos (sucrose, rafinose, estaquiose); os polissacarídeos representam aproximadamente 50% do peso seco total do grão de café verde (polímeros de galactose, manose e arabinose) (DÚRAN *et al.*, 2017; DESHPANDE *et al.*, 2019).

As sementes contêm cerca de 11 a 12% de proteínas e uma pequena fração de aminoácidos livres. Os aminoácidos sulfurados são considerados importantes para a formação do aroma característico do café, durante a torra (KOBELITZ, 2011).

A fração lipídica (óleos e ceras) representa entre 7,7 e 16% da composição química do grão de café cru, composta principalmente por triacilgliceróis, esteróis e tocoferóis. Em relação à composição mineral do grão de café, são encontrados

principalmente potássio (1,1%), cálcio (0,2%) e magnésio (0,2%), com a presença de traços de outros minerais, tais como: sódio, ferro, manganês, rubídio, zinco, cobre, estrôncio, cromo, vanádio, bário, níquel, cobalto, chumbo, molibdênio, titânio e cádmio (DÚRAN *et al.*, 2017; DESHPANDE *et al.*, 2019).

O café verde também possui vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, sendo a principal vitamina lipossolúvel presente, a vitamina E e seus níveis dependem do processamento pós-colheita e do tempo de armazenamento (DESHPANDE *et al.*, 2019). As vitaminas hidrossolúveis também foram detectadas no café verde, mas em quantidades muito menores do que é fisiologicamente relevante, no entanto, são totalmente destruídas durante a torrefação por serem termolábeis (DESHPANDE *et al.*, 2019).

Existem diversos compostos nitrogenados não proteicos no grão de café cru, tais como: a cafeína, teofilina, teobromina e trigonelina (DÚRAN *et al.*, 2017). O café possui de 1 a 2,5% de cafeína, que é o componente mais conhecido por seus efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central (SNC), e geralmente é associada a uma melhora no estado de alerta, na capacidade de aprendizado e resistência ao esforço físico (PAULA & FARAH, 2019).

O café também contém quantidades significativas de ácidos clorogênicos, responsáveis por grande parte da atividade antioxidante da bebida, na proporção de 7 a 10%, isto é, teor de três a cinco vezes maior que o de cafeína, e ainda com potencial atividade antibacteriana, antiviral e anti-hipertensiva (FARAH, 2019). Os teores de ácido clorogênico sofrem intensa degradação durante o processamento térmico do grão e dá origem a uma série de compostos voláteis, como os fenólicos, que são importantes para o sabor do café (ELIAS, 2019).

O café arábica possui em torno de 1 a 1,2% de trigonelina, uma n-metil betaína, responsável pela formação de produtos de degradação como pirróis e piridinas que também são importantes para o aroma do café (ALVES, 2012; DÚRAN *et al.*, 2017, PINHEIRO *et al.*, 2019). A Tabela 1 apresenta um comparativo da composição química dos grãos crus de café arábica e robusta.

Tabela 1 - Composição química do grão cru de *C. arábica* e *C. canephora*.

Componentes	Café arábica (%)	Café Robusta (%)
Cafeína	0,7 – 1,4	1,2 – 2,4
Trigonelina	1,0 – 1,2	0,6 – 0,7
Minerais	3 – 4,2	3 – 4,2
Lignina	1 – 3	1 – 3
Proteínas	11– 13	11– 13
Aminoácidos livres	0,2 – 0,8	0,2 – 0,8
Óleos	7,7 – 16	7,7 – 16
Ceras	0,2 – 0,3	0,2 – 0,3
Ácidos clorogênicos totais	3,5 – 7,3	7,0 – 14,0
Ácidos alifáticos não voláteis	2 – 2,9	1,3 – 2,2
Ácidos voláteis	0,1	0,1
Carboidratos solúveis	9 – 12,5	6,0 – 11,5
Polissacarídeos insolúveis	46 – 53	34 – 44

Fonte: DÚRAN *et al.*, 2017.

2.2.4 Produção e processamento dos grãos

O fruto do café passa por diversas etapas de processamento até o produto final, sendo o principal, a infusão. Cada etapa é fundamental para a obtenção de um café de boa qualidade. Durante as etapas de processamento, o café passa por inúmeras modificações físicas, mas principalmente químicas (FARAH, 2012).

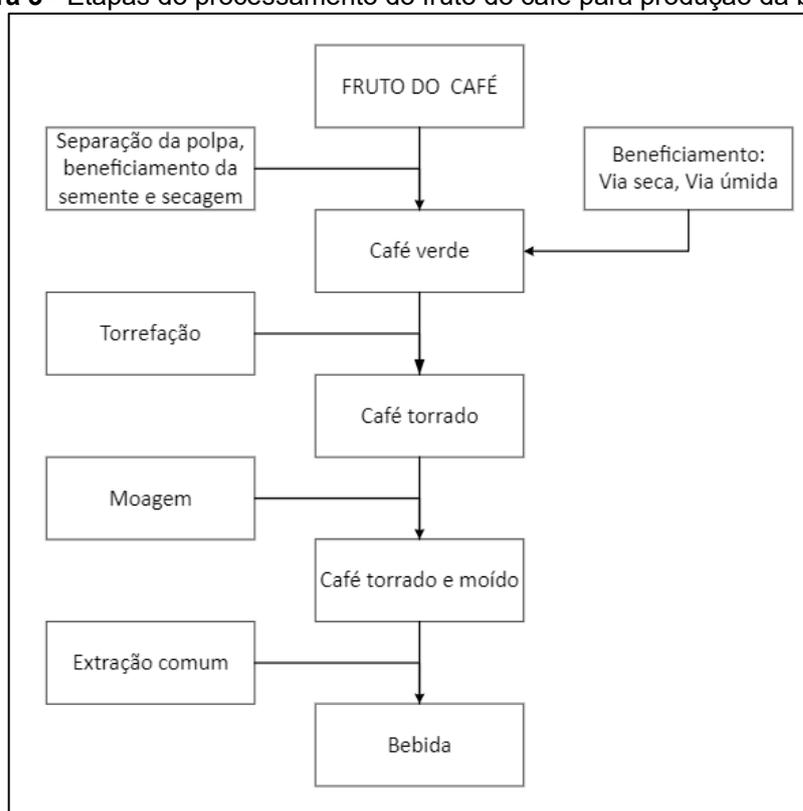
A colheita é uma etapa fundamental no pré-processamento do café e está associada à qualidade do produto, que é determinada pelo grau de maturação dos frutos. A presença de frutos imaturos resulta em grãos defeituosos e de má qualidade, enquanto os grãos maduros resultam em uma bebida de alta qualidade. Esta etapa pode ser realizada manualmente ou mecanicamente, dependendo do método de colheita, o nível de defeitos do grão pode variar (COSTA *et al.*, 2023).

Os frutos do café são normalmente colhidos de três maneiras: colheita manual, semimecanizada (com trabalhadores e uso de máquinas) ou colheita mecânica. No primeiro método, os frutos maduros, conhecidos como cerejas, são colhidos um a um, no entanto, como os frutos do café geralmente não amadurecem simultaneamente, esse método é demorado e, portanto, mais caro. Por outro lado, a colheita tende a produzir sementes de café de melhor qualidade do que os outros métodos, tanto em

termos de sabor quanto de saúde. A colheita semimecanizada dos galhos do cafeeiro coleta as sementes imaturas, maduras e muito maduras junto com as folhas. E a colheita mecanizada é realizada sacudindo as árvores ou arrancando os galhos com um aparelho semelhante a um pente flexível. Os dois últimos métodos podem levar a colheita de grãos em diferentes graus de maturação, fermentação, defeituosos, danificados por insetos e quebrados (FARAH, 2012).

A Figura 3 apresenta um esquema simplificado das etapas do processamento do café, uma bebida produzida pela infusão do produto obtido da separação, secagem, torrefação e moagem das sementes do cafeeiro (MORAES, 2002).

Figura 3 - Etapas do processamento do fruto do café para produção da bebida.



Fonte: Adaptado de MORAES, 2002.

Após a colheita, os frutos do café devem passar por um processamento preliminar para separar sementes do restante dos frutos, consistindo em processos de lavagem e separação. Eles são então separados com base no número e categorias de defeitos, tamanho e outros fatores, para auxiliar na classificação dos lotes de café (FARAH, 2012).

Os métodos de processamento mais utilizados são as vias seca e úmida. Os dois métodos apresentam algumas variações dependendo de onde o procedimento

será realizado, mas, geralmente, são os mais conhecidos e mais utilizados (COSTA *et al.*, 2023). A principal diferença entre os métodos de processamento seco e úmido é que no processamento úmido, as sementes são separadas da polpa e da casca antes da secagem (FARAH, 2012).

No método de processamento seco, as sementes são expostas ao sol ou a secadores de ar até que o teor de umidade seja reduzido a aproximadamente 10% a 12%. Após a secagem, os frutos são limpos e descascados, e então a pele seca e a polpa são removidas, deixando um material mucilaginoso. Já a técnica de processamento úmido é mais sofisticada e geralmente produz uma bebida de maior qualidade; antes de descascar e separar as sementes, a seleção da cereja ocorre em tanques de flutuação, seguidos de imersão e fermentação. Durante a fermentação podem ser adicionadas enzimas, a película prateada é removida e a acidez aumenta (o pH pode ser reduzido para 4,5). As sementes são então exaustivamente lavadas, polidas, e secas ao sol e/ou ao ar. O processamento úmido é frequentemente usado onde o café é colhido por colheita manual em países como Colômbia, Ásia e América Central (FARAH, 2012).

A torrefação, é uma operação de destaque das etapas pós-colheita, pois ela converte o grão verde em torrado, tornando-o apto para moagem e extração da bebida (SCHENKER; ROTHGEB, 2017). A torrefação melhora sua palatabilidade e auxilia na liberação dos seus aromas característicos; o grão do café pode ser processado a diferentes níveis de torrefação, formando cafés de torra clara até cafés de torras mais escuras (FARAH, 2012).

Os graus de torra podem ser divididos em três tipos: torra clara, torra média e torra escura. A torra clara apresenta acidez acentuada, aroma e sabor suaves e menor amargor; já a torra média acentua o aroma e o sabor; e a torra escura diminui a acidez e acentua o sabor amargo (ALVES, 2012).

Os diferentes graus de torrefação produzem bebidas com diferentes perfis aromáticos, produzindo cafés com aromas ricos em mais compostos voláteis, como ácidos voláteis e furanos enfatizando as notas frescas e florais, como cafés com aromas ricos em pirazinas, furanos e piridinas, enfatizando notas torradas e características terrosas. Sugerindo que o controle do grau de torra é influenciado por uma taxa, considerando-se o binômio tempo x temperatura, sendo necessário um

conhecimento da composição volátil para o desenvolvendo do perfil de torra desejado para a bebida (TOLEDO *et al.*, 2016).

O processo de torrefação é dividido em três fases: secagem, torrefação e resfriamento. A primeira fase é caracterizada pela liberação de água e compostos voláteis presentes nos grãos. A segunda fase é caracterizada pelas reações de pirólise e pela reação de *Maillard*, onde os grãos de café escurecem para uma cor marrom devido à caramelização dos açúcares. O final dessa etapa é caracterizado por um evento conhecido como “crack” onde, devido ao aumento da pressão interna, ocorre a expansão dos grãos causando pequenas rachaduras em suas paredes. A terceira fase, o resfriamento, é necessária para evitar a carbonização do grão, pois paralisa as reações de pirólise e, tanto o ar quanto a água podem ser utilizados como “agentes de resfriamento” (CAMPOS, 2016; PEDROSA; 2018).

As elevadas temperaturas necessárias para a etapa de torrefação do café causam mudanças físicas e químicas nas sementes, e conseqüentemente na bioatividade da bebida. Há alterações, por exemplo, na caramelização da sacarose (em 160°C) e na geração da reação de *Maillard* (em 190°C), causada pelo seu precursor, a asparagina (FARAH, 2012; LUDWIG *et al.*, 2014).

A reação de *Maillard* é uma compilação de reações não enzimáticas entre açúcares e grupamentos amino de aminoácidos livres, e ocorre principalmente em alimentos submetidos ao processamento térmico (NURSTEN, 2005). Na primeira fase da reação, a condensação entre um grupo amino de proteínas, peptídeos ou aminoácidos livres e o grupo carbonila de um redutor açúcar ocorre. A condensação libera água e forma uma base de Schiff instável. Na segunda etapa, a base Schiff se rearranja, formando produtos Amadori ou Heyns que, na terceira e última etapa da reação, são fracionados e sofrem reações de desidratação, retroaldolização e enolização, gerando compostos dicarbonílicos e produtos carbonílicos insaturados (compostos heterocíclicos e redutores). A partir desta cascata de reação, podem ser formados 5-hidroxometilfurfural (HMF) e compostos cíclicos com alta reatividade. Estes compostos intermediários, como o HMF, podem ser polimerizados, formando compostos chamados de melanoidinas (COSTA *et al.*, 2023), pigmentos macromoleculares e heterogêneos de coloração marrom (DÚRAN *et al.*, 2017).

O controle de grau de torra pode ser feito basicamente por perda de umidade, cor e/ou por perfil, levando-se em consideração o binômio tempo x temperatura. Além

disso, o aumento das temperaturas de torra tem efeito direto sobre a perda de massa total, o que possibilita o estabelecimento de taxas de perda de massa para cada temperatura de torrefação (BARBOSA *et al.*, 2020).

A Tabela 2 mostra os principais compostos presentes no café verde, ou seja, nos grãos de café antes da torrefação, e o aparecimento ou aumento de determinados componentes nos grãos de café torrado (NIGRA, TEODORO & GIL, 2021).

Tabela 2 - Compostos que aumentam ou diminuem durante o processo de torrefação do grão de café. A coluna da esquerda mostra os mais abundantes compostos no café verde que são perdidos durante o processo de torrefação, enquanto a coluna da direita mostra aqueles que aparecem durante a o processo de torrefação.

Processo de Torrefação de grãos de café		
Açúcares, polissacarídeos e metabólitos de açúcar	Sacarose, frutose, arabinose, galactose, glicose, manose, manitol, xilose, ribose	Hidroxiacetilfurfural
Proteínas e aminoácidos	Asparagina, prolina, glutamina, histidina, leucina, fenilalanina, alanina	Proteínas
Lipídios e ácidos graxos	Palmítico, esteárico, araquínídico, linolênico, oleico, araquidônico	PUFA n-6, MUFA +PUFA
Ácidos clorogênicos (CGA)	1-FQA, 4-CoQA, 4-FQA, 3-CQA, 5-CQA , 4-CQA, 5-FQA, 4,5-diCQA, 3,4-diCQA , 3,5-diCQA .	3-CoQA, 3-FQA, 5-CoQA, lactonas de ácido clorogênico .
Ácidos orgânicos	Cítrico , GABA, málico, quínico, fenólico	Gálico , cafeico , acético, fórmico, láctico, siloquínico, nicotínico (niacina/Vitamina B3) γ- quinídeo, flavonóides , N-metilpiridínio , ésteres alquílicos, ésteres de shiquimoil, melanoidinas
Outros compostos	Cafeína , trigonelina , conteúdo polifenólico , colina, cafestol , caveol , fluoreto	

Legenda: Os compostos bioativos conhecidos estão marcados em negrito. GABA: ácido gama-aminobutírico; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados. Fonte: Adaptado de NIGRA, TEODORO & GIL, 2021.

Durante a torrefação, os grãos de café são expostos a altas temperaturas em um dado período de tempo, fazendo com que ocorra uma ruptura na estrutura celular dos frutos, liberando água e compostos aromáticos; enquanto se expulsa a umidade, os aminoácidos e açúcares redutores reagem, produzindo melanoidinas, o que causa o escurecimento do grão (BHUMIRATANA; ADHIKARI; CHAMBERS, 2011). Quanto mais escuro o grau de torrefação, maior a quantidade de melanoidinas presentes na

bebida e sua complexidade estrutural (VITAGLIONE; FOGLIANO; PELLEGRINI, 2012).

Conforme destacado na Tabela 2, durante o processo de torrefação, a concentração de alguns compostos nutracêuticos, como: 5-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, ácido fenólico, trigonelina, polifenóis, cafestol e caveol, diminuem enquanto outros são formados, como: melanoidinas, lactona de ácidos clorogênicos, ácido gálico, ácido nicotínico, ácido cafeico, flavonóides e N-metilpiridínio (todos marcados em negrito na Tabela 2) (NIGRA, TEODORO & GIL, 2021).

Esse delicado equilíbrio entre a formação e a decomposição de compostos bioativos permite os efeitos biológicos do café de torra mais escura encontrado em modelos experimentais (NIGRA, TEODORO & GIL, 2021). Algumas vezes, esses efeitos são maiores no café de torra escura do que na torra mais clara, apesar do teor de antioxidantes no café escuro ser menor (SAMOGGIA & RIEDEL, 2019). De fato, Priftis *et al.* (2015) relataram que em oito das 13 variedades de café estudados, o café torrado aumentou a atividade de eliminação de radicais livres.

Por outro lado, além da formação de características desejáveis, o processamento térmico do café modifica os compostos do grão causando também alterações indesejáveis, como a formação de acrilamida, um dos contaminantes do processo de torrefação (ALSAFRA *et al.*, 2023). A acrilamida é um subproduto indesejado da reação de *Maillard*, e tem sido considerada neurotóxica e carcinogênica (ABRAHÃO *et al.*, 2010; FADRI *et al.*, 2019).

A acrilamida é formada a partir de aminoácidos livres presentes no café, sendo a asparagina identificada como a principal precursora da acrilamida; durante a reação de *Maillard* este aminoácido sofre um rearranjo de Amadori (N-glicosídeo derivado da asparagina e glicose), que após descarboxilação e desaminação é convertido em acrilamida. Por ser solúvel em água, é transferido para a bebida de café durante a infusão (ALSAFRA *et al.*, 2023). O tempo de torrefação também está relacionado com seus teores, pois a acrilamida é formada nos estágios iniciais deste processo; seu conteúdo diminui de acordo com o aumento do tempo de torra após a temperatura de 200°C, tanto para o café arábica quanto o café robusta (IGNÁCIO, 2022).

2.3 Bioatividade dos compostos do café

Os compostos fenólicos, além de serem relatados como contribuintes do sabor e aroma característicos das bebidas de café, são conhecidos em razão das propriedades fisiológicas e farmacológicas que conferem à saúde humana, como a atividade antioxidante (ABRAHÃO *et al.*, 2010; TORRES, 2014).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se, principalmente, à sua estrutura química e suas propriedades redutoras. Essas características desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (ABRAHÃO *et al.*, 2010).

Alguns compostos presentes no café verde e torrado têm sido estudados devido a propriedades específicas, e inúmeros produtos contendo café são elaborados na intenção de combinar seu sabor e aroma com suas propriedades biológicas (FARAH, 2012).

Dentre os compostos químicos presentes no café, aqueles que são fundamentais e caracterizam sensorialmente os cafés submetidos a torra são os ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina (DEBONA *et al.*, 2020). Existem vários estudos que verificaram que os compostos bioativos têm um efeito anticarcinogênico; neste contexto, é observado na literatura um aumento no número de publicações sobre compostos bioativos do café com potencial efeito inibitório em cânceres invasivos e metastáticos (ASMA, *et al.*, 2022; BULDAK *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021).

Estudos observacionais apontam uma relação inversa entre o consumo de café e a incidência de diferentes tipos de câncer (GAPSTUR *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2019; NEHLIG *et al.*, 2021), incluindo o câncer de próstata (GAPSTUR *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2021; SCHIMIT *et al.*, 2020).

Pessoas que consomem de 3 a 4 xícaras de café por dia apresentam um risco reduzido de todas as causas de mortalidade cardiovascular, bem como da incidência de doenças cardiovasculares, enquanto o alto consumo de café está relacionado a um menor risco de incidência de cânceres e doenças metabólicas, digestivas, hepáticas e neurológicas. Alguns dos estudos analisados pelos autores relatam que o consumo habitual de café reduz a concentração de marcadores de inflamação, como

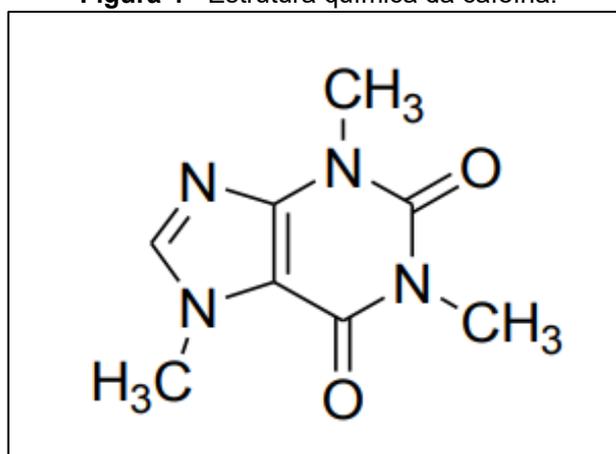
a interleucina-18, a selectina-E, a proteína C-reativa, as adipocinas e o interferon-gama (IFN- γ), e aumenta a concentração de adiponectina, o que gera efeitos anti-inflamatórios e aumenta a sensibilidade à insulina (BULDAK *et al.*, 2018).

Extratos de café e seus compostos bioativos (cafeína, ácido cafeico, ácidos clorogênicos e o caveol) têm mostrado efeitos anticarcinogênicos em modelos animais e culturas de células humanas (BULDAK *et al.*, 2018) e podem ter um papel protetor contra o câncer de próstata (BAUER *et al.*, 2018; BULDAL *et al.*, 2018; IWAMOTO *et al.*, 2018; KOLBERG *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2020; MONTENEGRO *et al.*, 2021).

2.3.1 Cafeína

A cafeína é uma trimetil xantina e é o principal composto bioativo do café (HU *et al.*, 2019). Na Figura 4 é apresentada a estrutura química da cafeína, substância parcialmente responsável pelas características amargas do café (PAULA & FARAH, 2019), sendo o composto mais estudado do café (DÚRAN *et al.*, 2017).

Figura 4 - Estrutura química da cafeína.



Fonte: DÚRAN *et al.*, 2017.

Uma vez ingerida, ela é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal superior, com um valor de pico dentro de 60 minutos após a ingestão, sendo toda a cafeína absorvida (HU *et al.*, 2019). Sua ingestão tem sido associada a um elevado número de efeitos biológicos, principalmente a estimulação do Sistema Nervoso Central (SNC) e simpático (MARTINI *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2019).

A ingestão baixa a moderada de cafeína geralmente está associada ao aumento do estado de alerta, capacidade de aprendizado, desempenho no exercício e, possivelmente, melhora do humor (FARAH, 2012). A cafeína possui também ação estimulante e broncodilatadora, efeito diurético e termogênico (CANO-MARQUINA *et al.*, 2013).

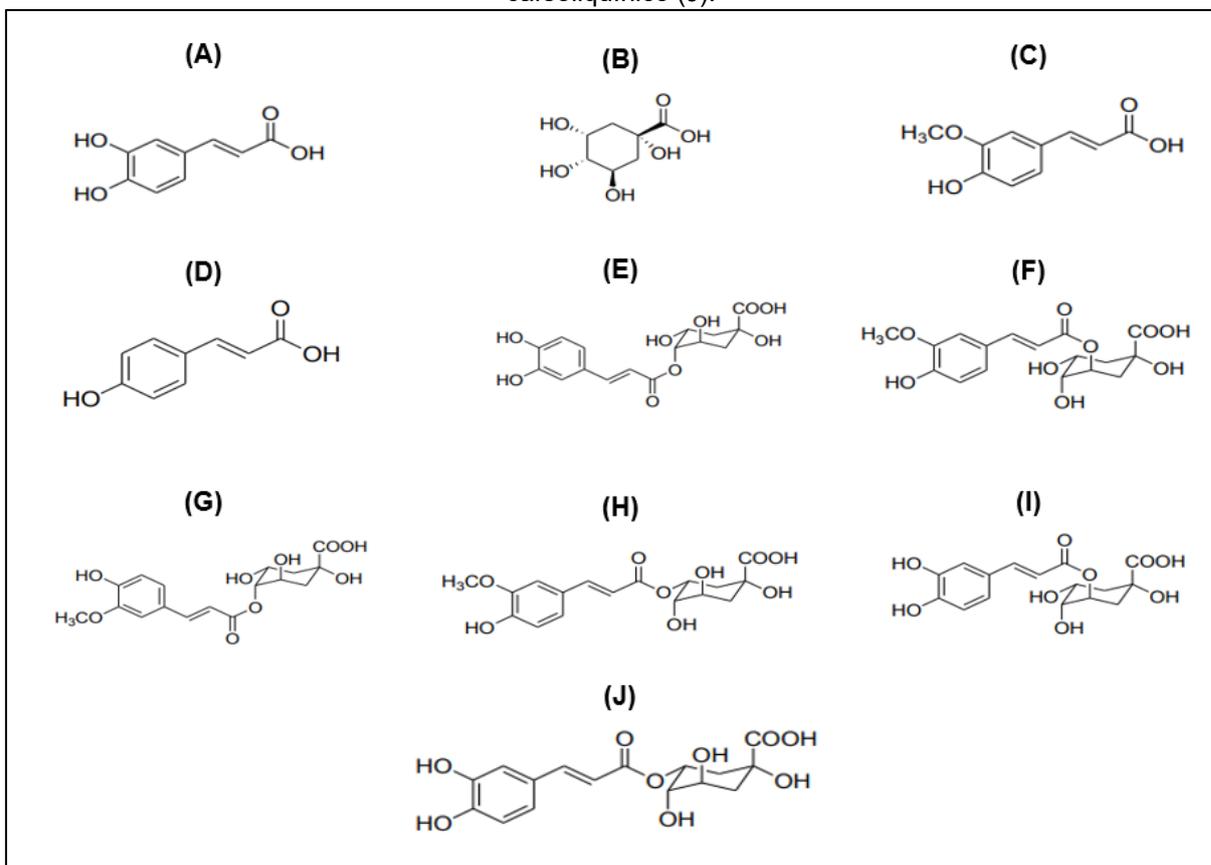
Alguns dos efeitos benéficos à saúde relatados para a cafeína estão associados a suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, ou seja, sua capacidade de eliminar radicais hidroxila, inibição da peroxidação lipídica e da fosfodiesterase, modulação da liberação de citocinas anti-inflamatórias, incluindo a interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (IFN- γ) (PAULA&FARAH, 2019).

2.3.2 Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos (CGAs) são um grupo de polifenóis formado entre os ácidos transcinâmico e quínico (WACHAMO, 2017; LUKITASARI, NUGROHO & WIDODO, 2018). Entre os compostos fenólicos do café, os ácidos clorogênicos são os mais abundantes, representando mais de 98% de seu conteúdo fenólico total (MARTINI *et al.*, 2016). O café é a principal fonte de ingestão de ácidos clorogênicos no mundo ocidental (YAO *et al.*, 2019).

Os CGAs mais comuns no grão de café são os formados a partir do ácido cafeico e dos ácidos quínico, ferúlico e p-cumárico, principalmente (DÚRAN *et al.*, 2017) (Figura 5). O principal ácido clorogênico presente no café é o ácido 5-cafeoilquínico, embora outros ácidos cafeoilquínicos, ferulilquínicos e dicafoilquínicos estejam presentes em quantidades significativas (NIEBER, 2017).

Figura 5 - Estrutura química do ácido cafeico (A), ácido quínico (B), ácido ferúlico (C), p-cumárico (D), ácido 4-cafeoilquínico (E), 3-FQA (F), 4-FQA (G), 5-FQA (H), ácido 5-cafeoilquínico (I) e ácido 3-cafeoilquínico (J).



Fonte: Adaptado de DÚRAN *et al.*, 2017.

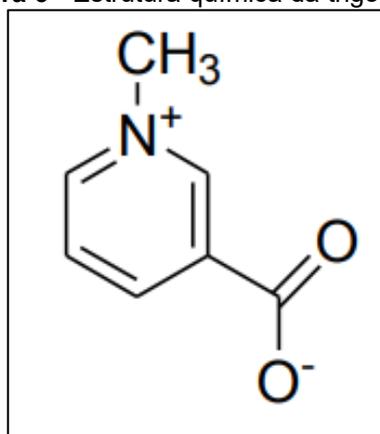
Dependendo da espécie, os grãos de café verde contêm cerca de 6 a 10% de ácido clorogênico com base na matéria seca. Durante a torrefação, ocorre uma destruição progressiva e transformação dos ácidos clorogênicos com 8-10% sendo perdido para até 1% de peso de matéria seca. No entanto, estima-se que uma xícara de 200 ml de café torrado e moído pode fornecer de 20 mg (infusão fraca, torrefação muito escura) até 675 mg de ácido clorogênico (infusão forte, robusta, torra muito clara) (CLIFFORD, 1999). A presença de CGAs no café tem sido relacionada aos benefícios para a saúde do consumo regular de café (YAO *et al.*, 2019).

Os CGAs desempenham vários papéis terapêuticos importantes, tais como atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antipiréticas, neuro e hepato protetoras, regulação da glicose e do metabolismo lipídico, ou seja, pode contribuir na prevenção da degeneração da retina, obesidade, diabetes do tipo 2, hipertensão e o câncer (JABIR *et al.*, 2018; FARAH, 2019).

2.3.3 Trigonelina

A trigonelina é um alcalóide biologicamente derivado da metilação enzimática do ácido nicotínico (Figura 6). Contribui para o sabor amargo da bebida e é um precursor para a formação de diferentes classes de compostos voláteis durante a torrefação, como pirróis e piridinas, alguns dos quais podem conferir um sabor desagradável (FARAH, 2012, ALCANTARA, 2019), e na formação de compostos não voláteis, como a niacina (ALCANTARA, 2019).

Figura 6 - Estrutura química da trigonelina



Fonte: DÚRAN *et al.*, 2017.

Seu grau de degradação está diretamente relacionado com a temperatura do processo, que deve ser entre 180 e 230°C, com maior intensidade entre 210 e 220°C, ou seja, a taxa de degradação da trigonelina está mais relacionada a temperatura do processo de torra do que o tempo em que o grão é exposto ao calor (DEBONA *et al.*, 2020).

Possui propriedade hipoglicemiante, neuroprotetora, estrogênica, anticancerígena e anticariogênica (ASHIHARA *et al.*, 2015). Além disso, quando submetida a altas temperaturas, no caso da torrefação dos grãos de café, a trigonelina é convertida a ácido nicotínico ou niacina, uma vitamina do complexo B, que atua como coenzima de processos metabólicos e sua deficiência causa Pelagra, uma doença caracterizada por lesões na pele (FARAH, 2012).

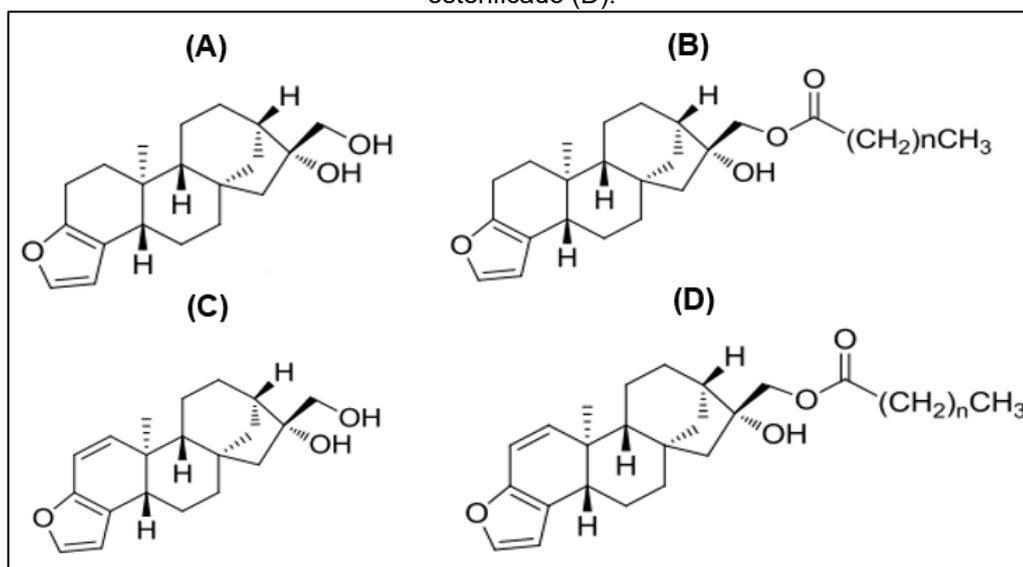
Vale destacar que o ácido nicotínico é um promissor agente anti-inflamatório, pois diminui a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e aumenta a adiponectina em adipócitos infundidos com TNF- α (MONTENEGRO, SILVA &

TEODORO, 2022). Além disso, a trigonelina regula enzimas-chave no metabolismo da glicose e dos lipídios, evitando invasão e proliferação de células cancerígenas (JABIR *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2019).

2.3.4 Diterpenos Caveol e Cafestol

O óleo de café apresenta uma fração insaponificável que contém cafestol e caveol, dois furanoditerpenos da família dos cauranos, de interesse devido aos seus diferentes efeitos fisiológicos (DÚRAN *et al.*, 2017). Cafestol e caveol estão presentes na forma livre (baixo teor) e esterificada com diferentes ácidos graxos no café (Figura 7).

Figura 7 - Estrutura química do caveol livre (A), caveol esterificado (B), cafestol livre (C), cafestol esterificado (D).



Fonte: Adaptado de DÚRAN *et al.*, 2017.

Os componentes diterpênicos caveol e cafestol do café possuem ação anticarcinogênica, antioxidante e atividade anti-inflamatória (HU *et al.*, 2019). Eles são capazes de aumentar a expressão da proteína de reparo do DNA, O6-metilguanina-DNA metiltransferase, e algumas enzimas de fase II. O caveol diminui a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), uma enzima responsável pela produção de mediadores inflamatórios e, atua como quimioatratante de MCP-1, o que significa que pode ser antiangiogênica (MONTENEGRO, SILVA & TEODORO, 2022).

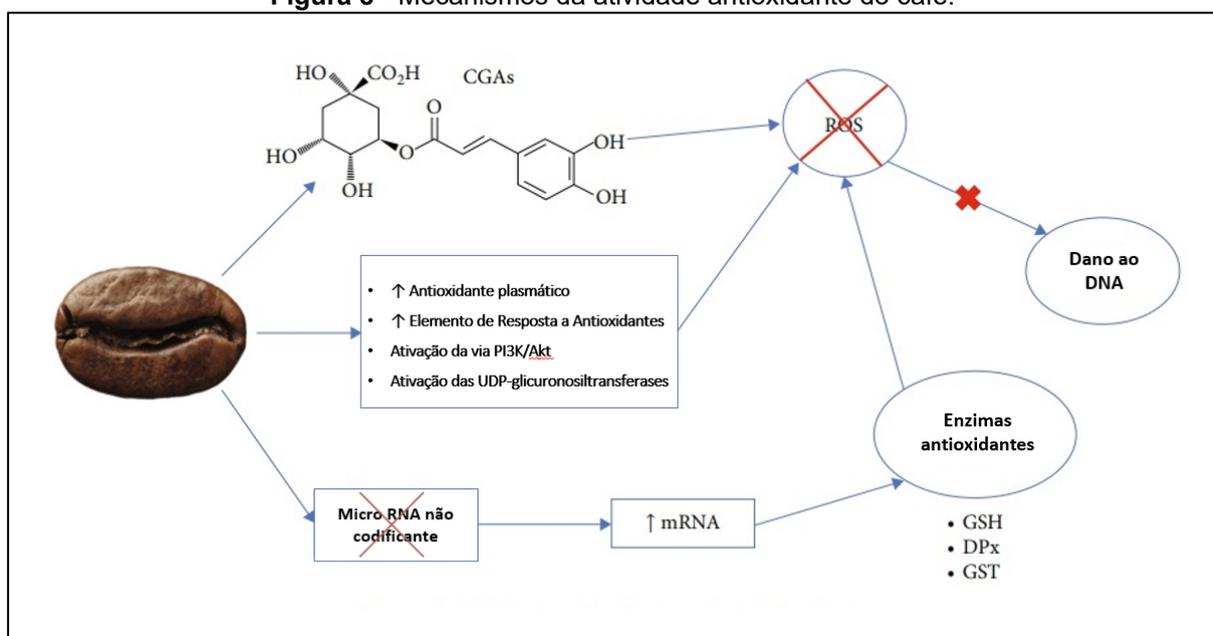
2.4 Atividade antioxidante induzida pelo café

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos inevitáveis de vários processos metabólicos importantes (YAO *et al.*, 2019), eles são produzidos endogenamente pela respiração mitocondrial e exogenamente pela exposição a agentes oxidantes (LIANG & KITTS, 2016).

O estresse oxidativo resulta da produção celular de moléculas oxidantes superando a capacidade dos antioxidantes de combater esses danos e pode levar ao desenvolvimento de CaP (MARTINI *et al.*, 2016). Este processo causa a oxidação de biomoléculas cruciais, causando danos ao DNA e oxidando enzimas-chave envolvidas na expressão gênica (LIANG & KITTS, 2016).

O café apresenta alta capacidade antioxidante *in vitro* (BAUER *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020; MONTENEGRO *et al.*, 2021; LÓPEZ-BARRERA *et al.*, 2016; PERGOLIZZI *et al.*, 2020). Os compostos antioxidantes do café incluem a cafeína, os compostos fenólicos (principalmente ácidos clorogênicos), a trigonelina, os diterpenos (cafestol e caveol) e as melanoidinas (LÓPEZ-BARRERA *et al.*, 2016; JABIR *et al.*, 2018). Um mecanismo para a atividade antioxidante do café é descrito na Figura 8.

Figura 8 - Mecanismos da atividade antioxidante do café.



Fonte: Adaptado de MONTENEGRO, SILVA & TEODORO, 2022.

Alguns estudos relataram um aumento significativo na capacidade antioxidante total do plasma após o consumo de café, mesmo após uma única porção (200 ou 400 ml). Esses efeitos, de uma única dose, foram perdidos a longo prazo, mas no consumo recorrente de café de torra média (150 ml/dia), a atividade antioxidante plasmática foi aumentada em até 26% (MARTINI *et al.*, 2016).

O café aumentou significativamente a ativação do elemento de resposta antioxidante (ERA), o que poderia induzir a expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante celular (CHOI, JUNG & KO, 2018; VOLZ *et al.*, 2012). As proteínas do ERA fazem parte do complexo sistema antioxidante que protege as células do dano oxidativo, neutralizando radicais livres e agentes oxidantes (PRIFTIS *et al.*, 2018). Os genes relacionados ao ERA estão nas regiões promotoras de defesa celular, que incluem enzimas desintoxicantes de fase II e enzimas envolvidas na defesa antioxidante (VOLZ *et al.*, 2012; PAHLKE *et al.*, 2019).

O consumo de café aumenta a atividade intracelular de enzimas de fase I (citocromo P450) e II (SHAPOSHNIKOV *et al.*, 2018), como glutatona redutase (GR), glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-transferases (GST), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (BAKURADZE *et al.*, 2011; PRIFTIS *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2017; NOGAIM *et al.*, 2020; VICENTE *et al.*, 2011). Sendo este aumento de GSH atribuído aos polifenóis (JUNG *et al.*, 2017).

2.5 Efeitos anti-inflamatórios do café

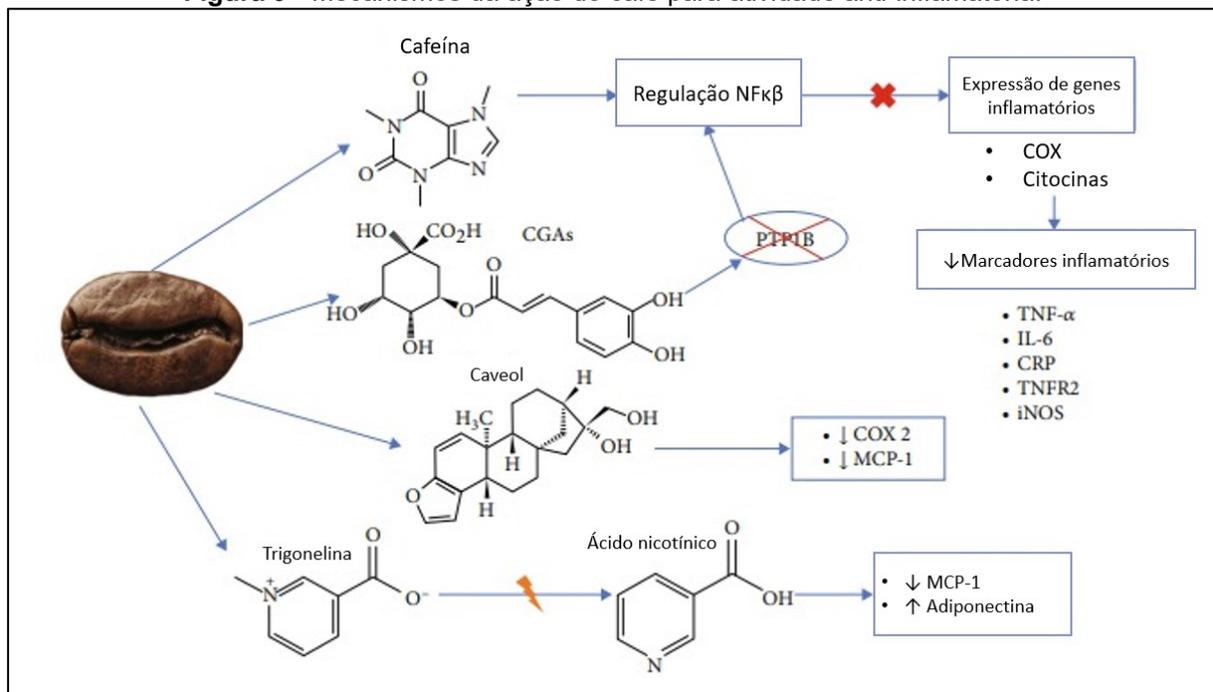
A inflamação é uma reação fisiológica ao dano tecidual induzida por agentes exógenos ou endógenos. Fatores exógenos incluem patógenos, alérgenos, corpos estranhos e agentes perniciosos substâncias. As causas endógenas se originam da sinalização celular devido a tecidos lesionados ou com mau funcionamento (LIANG & KITTS, 2016).

Compostos do café podem diminuir a inflamação crônica e, portanto, protegem contra a degradação do DNA, diminuindo conseqüentemente o risco de doenças (FROST-MEYER & LOGOMARSINO, 2012). o processo inflamatório é caracterizado

pele aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a proteína C-reativa (PCR), interleucinas (IL) e fatores de necrose tumoral (TNF) (JUNG *et al.*, 2017).

Um mecanismo proposto para os efeitos anti-inflamatória do café é descrito na Figura 9.

Figura 9 - Mecanismos da ação do café para atividade anti-inflamatória.



Fonte: Adaptado de MONTENEGRO, SILVA & TEODORO, 2022.

Em modelos animais, a ingestão de café verde reduziu marcadores inflamatórios, como TNF- α (ALAMRI *et al.*, 2020; HO *et al.*, 2020), IL-6, IL-10 (HO *et al.*, 2020), IL-1 β e óxido nítrico sintase 2 (iNOS2) e reduziu o índice inflamatório intersticial (ALAMRI *et al.*, 2020). Foi observado em ensaios clínicos que a ingestão de café durante várias semanas teve uma ação anti-inflamatória predominante avaliada por marcadores séricos (PAIVA *et al.*, 2019). Além dos marcadores inflamatórios sanguíneos, o tratamento tópico de café e cafeína nas patas de camundongos mostrou uma inibição considerável do desenvolvimento de edema induzido por carragenina (PERGOLIZZI *et al.*, 2020).

As expressões de TNF- α e IL-6 foram diminuídas pelo extrato de café de torra clara, e os níveis aumentados à medida que os níveis de torra foram mais escuros (JUNG *et al.*, 2017). A expressão induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) diminuiu, o que produz mediadores pró-inflamatórios, como o óxido nítrico (LÓPEZ-BARRERA *et al.*, 2016; JUNG *et al.*, 2017). O café exibiu uma relação inversa com

PCR, IL-6 e TNFR2, com resultados semelhantes tanto no café cafeinado quanto no descafeinado (HANG *et al.*, 2019).

A autofagia degrada seletivamente os componentes celulares para minimizar a lesão celular (KUO *et al.*, 2020). A autofagia está relacionada com a regulação da inflamação e da imunidade e tem propriedades supressoras de tumores (ZHONG, SANCHEZ-LOPEZ & KARIN, 2016). Foi observado que o café com cafeína e descafeinado podem induzir a autofagia; a administração crônica e aguda de café aumentou o fluxo autofágico em diferentes tecidos e reduziu o conteúdo do substrato autofágico sequestossomo-1 (p62/SQSTM1). Os autores sugerem que isso ocorre por meio da lipidação da cadeia leve 3 β da proteína 1 associada aos microtúbulos (LC3B-I), aumentando a separação eletroforética de proteínas em dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e convertendo-a em LC3B-II. O café também causou inibição da atividade enzimática alvo do complexo 1 da rapamicina em mamíferos (mTORC1), provavelmente relacionada à desacetilação de proteínas celulares (PIETROCOLA *et al.*, 2014).

A cafeína é conhecida por induzir a autofagia hepática, sendo hepatoprotetora (RAY, 2013; SINHA *et al.*, 2014; SALOMONE; GALVANO & VOLTI, 2017). De fato, a cafeína é o principal composto com atividade anti-inflamatória geral no café e pode reduzir o TNF- α e a produção de IL-6 de forma dose-dependente. Ainda, a cafeína pode modular a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (CHOI, JUNG & KO, 2018), que provoca a expressão de genes inflamatórios, incluindo iNOS, COX-2 e citocinas (JUNG *et al.*, 2017).

No entanto, 26 metabólitos anti-inflamatórios foram identificados no café (HO *et al.*, 2020). Os ácidos clorogênicos diminuem a geração de mediadores inflamatórios pela inibição da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), minimizando expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e regulando a ativação de NF- κ B (HUANG *et al.*, 2016). Como resultado, a COX é suprimida, causando uma redução de liberação de IL-6 e IL-8 e TNF- α (CHOI, JUNG & KO, 2018; JUNG *et al.*, 2017). Altas concentrações de ácidos clorogênicos reprimem o mRNA de IL-1B, provocando consideravelmente menos adesão celular e inflamação (FROST-MEYER & LOGOMARSINO, 2012).

O caveol reduz COX-2 e quantidades de MCP-1, o que significa que pode ser antiangiogênica. O caveol também diminui iNOS em carragenina de ratos com edema da pata. Durante a torrefação, a trigonelina é fracionada em ácido nicotínico, que é

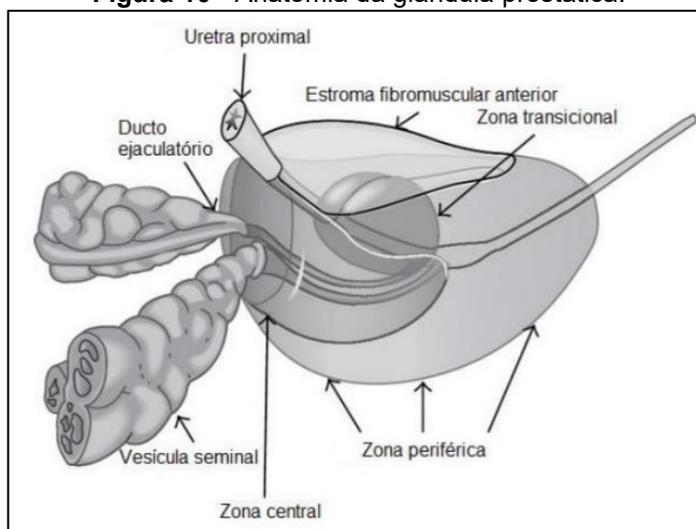
um promissor agente anti-inflamatório, pois diminui o MCP-1 e aumenta a adiponectina em adipócitos infundidos com TNF- α (FROST-MEYER & LOGOMARSINO, 2012).

2.6 Café e câncer de próstata

A próstata é uma pequena glândula em forma de noz localizada abaixo da bexiga e à frente do reto, envolvendo a parte superior da uretra e, faz parte do sistema reprodutor masculino (AMERICAN CANCER SOCIETY [ACS], 2023). A próstata tem a função de produzir um líquido que compõe parte do sêmen, que nutre e protege os espermatozoides (ACS, 2023; BRASIL, 2019).

A próstata é dividida em quatro áreas: zona central, zona de transição, zona periférica e o estroma fibromuscular anterior (Figura 10). A zona periférica é a maior delas, responsável por cerca de 70% do tecido glandular e nesta zona é mais comum ocorrer carcinoma, prostatite crônica e atrofia pós-inflamatória. A zona central é responsável por cerca de 25% do tecido glandular e circunda os dutos ejaculatórios. A zona de transição é responsável por apenas 5% do tecido glandular e é essa região que aumenta quando há hiperplasia benigna da próstata. Por fim, o estroma fibromuscular anterior não contém tecido glandular e é composto de elementos musculares lisos e fibrosos (BHAVSAR & VERMA., 2014).

Figura 10 - Anatomia da glândula prostática.



Fonte: BHAVSAR & VERMA, 2014.

Ademais, a próstata também é responsável pela produção do antígeno prostático específico (PSA), um importante marcador funcional que é produzido em massa pelo epitélio glandular e tem como função solubilizar o esperma após a ejaculação. Caso seja encontrado em elevados níveis sanguíneos pode indicar hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatite e adenocarcinoma de próstata (CaP) (GARCIA, 2022).

O câncer de próstata se desenvolve a partir das células da glândula (as células que produzem o fluido da próstata que é adicionado ao sêmen), a maioria dos cânceres de próstata são adenocarcinomas (ACS, 2023). Outros tipos de câncer que podem começar na próstata incluem: carcinomas de pequenas células; tumores neuroendócrinos (exceto carcinomas de células pequenas); carcinomas de células transitórias e sarcomas; esses outros tipos de câncer de próstata são raros (ACS, 2023).

O CaP é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens em todo o mundo, atrás apenas do câncer de pele. Houve mais de 1,4 milhão de novos casos de câncer de próstata no mundo em 2020. A incidência varia em diferentes regiões do mundo, com taxas mais altas observadas na América do Norte, Europa Ocidental, Austrália e partes do Caribe, e taxas mais baixas na Ásia, África e América do Sul (BRASIL, 2022).

Cerca de 60% dos casos são diagnosticados em pessoas com 65 anos ou mais, sendo a idade média no momento do diagnóstico de 66 anos. A doença raramente é identificada em pessoas com menos de 40 anos. O número de novos casos diagnosticados em homens negros é 70% maior do que o número de novos casos diagnosticados em homens brancos. Homens negros nos Estados Unidos e no Caribe têm as maiores taxas de incidência de câncer de próstata em todo o mundo (ACS, 2023).

No Brasil, o câncer de próstata é predominante em todas as regiões, totalizando 72 mil novos casos estimados a cada ano do próximo triênio (2023-2025), atrás apenas do câncer de pele não melanoma (BRASIL, 2022). Os fatores de risco para o câncer de próstata incluem idade avançada, histórico familiar da doença, etnia e sobrepeso e obesidade. Homens com mais de 50 anos têm maior probabilidade de desenvolver a doença, e o risco aumenta significativamente após os 65 anos (BRASIL, 2019).

Em seus estágios iniciais, o CaP geralmente não apresenta sintomas. No entanto, à medida que a doença progride, podem surgir sintomas como dificuldade em urinar, aumento da frequência urinária, fluxo urinário fraco ou interrompido, presença de sangue na urina ou no sêmen, dor na região lombar, entre outros. É importante ressaltar que esses sintomas também podem estar associados a outras condições benignas da próstata, como, por exemplo, a hiperplasia benigna de próstata e a prostatite (BRASIL, 2019).

O diagnóstico precoce do câncer de próstata é fundamental para um melhor prognóstico. A triagem mais comum é feita por meio do exame de sangue para verificar os níveis de PSA e do exame de toque retal, que permite ao médico avaliar o tamanho, a forma e a consistência da próstata (BRASIL, 2019). Posteriormente a biópsia e o estudo histopatológico são indicados para a definição do diagnóstico do paciente (BACELAR JUNIOR *et al.*, 2015).

A pandemia de coronavírus (COVID-19) em 2019 causou atrasos no diagnóstico e tratamento de câncer devido o fechamento de estabelecimentos de saúde, interrupções no emprego e planos de saúde e, medo de exposição ao COVID-19. Embora o impacto tenha sido maior durante o pico da COVID-19 em meados de 2020, a prestação de cuidados de saúde ainda não foi totalmente recuperada (SIEGEL *et al.*, 2023).

O tratamento do CaP deve ser individualizado e varia de acordo com o estágio da doença, idade, tamanho da próstata, grau histológico, estágio do tumor e a saúde geral do paciente. As opções de tratamento incluem cirurgia para remoção da próstata, radioterapia, terapia hormonal, quimioterapia e vigilância ativa, que envolve monitoramento cuidadoso do câncer sem intervenção imediata (BACELAR JUNIOR *et al.*, 2015).

A indústria farmacêutica e organizações de saúde em todo o mundo têm somado esforços para compreender melhor o câncer. Devido seu crescente e expressivo acometimento na população mundial, estudos para a melhora de tratamentos e medicamentos que promovam a cura de pacientes acometidos vêm sendo desenvolvidos. No sentido de prevenção e ação coadjuvante em tratamentos farmacológicos, os alimentos são comumente vistos como aliados (GUIMARÃES, 2018).

Compostos naturais obtidos na alimentação são motivos de pesquisa recente para novos medicamentos antitumorais, uma vez que esses compostos raramente apresentam efeitos colaterais graves e, atuam de forma eficiente em uma ampla de vias moleculares envolvidas na tumorigênese (HADDAD *et al.*, 2013).

Dentre os compostos naturais com efeitos antitumorais, os encontrados na bebida de café têm sido associados a efeitos eficazes em diferentes estágios de câncer, desde o surgimento de células tumorais malignas, implantação do tumor, nutrição da massa tumoral e evolução da doença a estágios e metástase (GUIMARÃES, 2018; ASMA *et al.*, 2022; BULDAK *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021).

Neste contexto, estudos observacionais indicam uma relação inversa entre o consumo de café e a incidência de diferentes tipos de câncer (KIM *et al.*, 2021; GAPSTUR *et al.*, 2020; SCHIMIT *et al.*, 2020; ONG *et al.*, 2019), incluindo o câncer de próstata (SEN *et al.*, 2019; POUNIS *et al.*, 2017; HASHIBE *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2013, BOSIRE *et al.*, 2013; SHAFIQUE *et al.*, 2012).

Li *et al.* (2013) sugerem uma associação positiva entre o consumo de café e menor risco de câncer de próstata, corroborando com os resultados de Discacciato *et al.* (2013) que identificaram efeito protetor do café no tumor de próstata avançado, sobretudo nos pacientes com sobrepeso e obesidade, assim como três meta-análises que concordam com estes resultados (LU *et al.*, 2014; HUANG, 2014; ZHONG *et al.*, 2014).

Por outro lado, Bosire *et al.*, (2013) não encontraram forte correlação entre o consumo de café e estágios avançados de câncer de próstata. Segundo Tverdal (2015), apesar das evidências epidemiológicas, o câncer de próstata, sua correlação com o café e os mecanismos pelos quais essa proteção ocorre ainda não são totalmente esclarecidos.

Um estudo em modelo animal, realizado por Kolberg *et al.* (2016) mostrou que o café pode inibir a atividade de NF- κ B induzida por TNF- α e a ligação ao DNA em células PCa. O café também regulou a expressão de reações inflamatórias e genes relacionados ao câncer provavelmente através da via de sinalização NF- κ B. Genes hiporregulados do café relacionados à invasão (MMP9) e inflamação (NF- κ B2, CD40, EDN1 e ICAM-1) e genes suprarregulados relacionados ao antioxidante sistema, como NFE2L2, HMOX1, NQO1 e GCLC (KOLBERG *et al.*, 2016).

Ainda, estudos *in vitro* realizados nos últimos anos apontam efeitos citostáticos e apoptóticos de extratos de café verde e diferentes níveis de torra em duas linhagens celulares metastáticas de câncer de próstata, PC-3 e DU-145 (BAUER *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020; MONTENEGRO *et al.*, 2021).

O uso de cultura celular é importante para conhecer os mecanismos moleculares, identificar as bases genéticas e processos fenotípicos envolvidos na transformação celular e contrapor o comportamento de linhagens celulares normais e tumorais (GARCIA, 2022). As linhagens celulares PC-3 e DU-145 são consideradas parte da tríade que constituiu o padrão ouro das linhagens de cultura de células de CaP; as células DU-145 foram isoladas pela primeira vez de um tumor cerebral metastático da próstata, enquanto as células PC3 foram isoladas de um tumor de próstata metastático vertebral; ambas são semelhantes pois são insensíveis a hormônios e não têm receptores de andrógenos (NAMEKAWA *et al.*, 2019; CUNNINGHAM & YOU, 2015). Além disso, é possível trabalhar com tais células em ambiente controlado para replicação, amostras uniformes, concentrações equilibradas de fármacos e entre outras características que torna o uso de culturas celulares favorável para a pesquisa (GARCIA, 2022).

Uma revisão recente da literatura apontou mecanismos moleculares do café na prevenção do câncer de próstata, dentre eles, podemos destacar o efeito anti-inflamatório dos compostos do café através da redução de marcadores inflamatórios, como o TNF- α , IL-6, IL-10 conferindo proteção contra degradação do DNA e; por meio da modulação de fatores de transcrição (MONTENEGRO, SILVA, TEODORO, 2022).

A inflamação pode estar relacionada ao desenvolvimento de CaP porque as células inflamatórias estão frequentemente presentes no microambiente prostático de homens adultos e estão relacionadas a lesões precursoras de CaP, denominada atrofia inflamatória proliferativa, que é abundante em células que podem estar predispostas a mutações genômicas, e o estresse inflamatório pode provocar alterações epigenéticas, concomitante com a ruptura da barreira epitelial (SFANOS *et al.*, 2018).

Dentre os mecanismos moleculares dos ácidos clorogênicos na prevenção do câncer de próstata, destaca-se sua capacidade de reduzir a geração de mediadores inflamatórios pela inibição da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), minimizando a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e regulando a ativação do NF- κ B;

como resultado a COX é suprimida, causando redução da liberação de IL-6 e IL-8 e TNF- α (MONTENEGRO, SILVA & TEODORO, 2022).

Ao passo que a cafeína pode modular a expressão do fator NF- κ B que regula a expressão de genes inflamatórios, incluindo iNOS, COX-2 e citocinas (MONTENEGRO, SILVA, TEODORO, 2022). Desta forma, observa-se que a cafeína é capaz de aumentar a morte de células cancerígenas e proteger contra mutagenicidade (JABIR *et al.*, 2018).

2.7 Métodos de extração de compostos bioativos

O desenvolvimento de produtos a partir de matrizes vegetais, devido seu potencial funcional, tem sido cada vez mais cotados pela indústria farmacêutica e de alimentos, devido a presença de substâncias promotoras de benefícios à saúde (SILVA *et al.*, 2022).

Especificamente na terapia de enfermidades infecciosas e do câncer, estima-se que mais de 75 e 60%, respectivamente, dos fármacos atualmente empregados são derivados de fontes naturais, sendo muito deles compostos com atividade antioxidante que podem agir em diversos níveis da sequência oxidativa nos sistemas biológicos (JUSTO *et al.*, 2008).

Dentre os componentes bioativos que se destacam, estão os compostos fenólicos, que representam um dos mais abundantes grupos fitoquímicos nos vegetais, pois apresentam diversas atividades, como, potenciais indícios de efeitos prebióticos, aumento da viabilidade de microrganismos, efeito antioxidante, antitumoral e consequente diminuição do risco de doenças crônicas e degenerativas (SILVA *et al.*, 2022).

Uma vez que compostos biologicamente ativos geralmente estão presentes nas plantas em baixas concentrações, métodos de extração eficientes e seletivos são necessários para a obtenção destes a partir das matrizes vegetais (LANG & WAI, 2001). No contexto do estudo de produtos naturais, o termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou a fração ativa contida no material vegetal (SONAGLIO *et al.*, 2007).

A extração é o principal passo para a recuperação e isolamento de fitoquímicos bioativos a partir de materiais vegetais, antes da análise (AZMIR *et al.*, 2013; ALTEMIMI *et al.*, 2017). Nesta etapa, a matriz vegetal é colocada em contato com a fase extratora que pode ser constituída por um único solvente, mistura de solventes ou uso de solventes de forma sequenciada (ALTEMIMI *et al.*, 2017; FARJADMAND *et al.*, 2018).

Existem diversos métodos de extração desses fitoquímicos; os métodos mais comuns são, maceração, prensagem, *Soxhlet* e destilação. Entretanto, a maioria desses processos envolvem aquecimento elevado, que podem gerar degradação térmica dos compostos de interesse, além do que, necessitam de altas demandas de tempo, energia ou quantidades de solventes elevados (SILVA *et al.*, 2022).

O número de métodos de extração é amplo e podem se apresentar mais ou menos instrumentalizados (ALTEMINI *et al.*, FARJADMAND *et al.*, 2018). Dentre os métodos instrumentalizados, destaca-se a extração assistida por micro-ondas (MAE), a extração assistida por ultrassom (UAE), a extração por líquido pressurizado e a extração por fluido supercrítico (ZHANG *et al.*, 2018; ALTEMIMI *et al.*, 2017; ALARA, ABDURAHMAN & UKAEGBU, 2021).

Até o momento, não existe um método padrão que possa ser realizado como referência para extração de compostos em plantas, em virtude da complexidade e especificidade de cada matriz (AZMIR *et al.*, 2013). O café é consumido mundialmente como bebida e geralmente é obtido por métodos de percolação e/ou infusão. A técnica de extração com fluido supercrítico (SFE = Supercritical Fluid Extraction) surge como uma metodologia alternativa para a extração do café, sendo um processo que utiliza o dióxido de carbono como extrator, no qual não é inflamável nem tóxico (NASTI *et al.*, 2021).

2.8 Extração de compostos bioativos por fluido supercrítico

O método de extração por CO₂ supercrítico funciona levando a substância ao PC, ou seja, elevando a temperatura e pressão a um nível que não se faça mais distinção entre líquido e gasoso. O dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais usado na extração supercrítica por diversos fatores, tais como: estar disponível de forma

pura, ter alto grau de solvatação, ser barato, não tóxico, ter facilidade de dissolução em substâncias tanto polares quanto apolares, mas, principalmente, por ser de fácil remoção (bastando apenas diminuir a densidade) (MAUL, WASICY & BACCHI, 1996; CAPUZZO, MAFFEI & OCCHIPINTI, 2013). Além disso, pode penetrar em matrizes sólidas de forma mais eficiente quando comparada a solventes líquidos, sendo uma vantagem em relação às técnicas convencionais de extração (NASTI *et al.*, 2021).

Quando uma substância no estado líquido é aquecida em um recipiente fechado e, submetida a uma determinada pressão, a pressão de vapor da substância eleva-se de acordo com o aumento da temperatura. Conseqüentemente, ocorre um aumento da densidade do líquido devido ao aumento de seu volume. Há um ponto em que a densidade do vapor se iguala à do líquido remanescente e o limite entre as duas fases desaparece. O ponto que limita a região onde não há distinção entre as fases líquido e gasoso é denominado de ponto crítico (PC), sendo caracterizado pela temperatura crítica e pela pressão crítica, as quais são características para cada substância (ATKINS, 2003; NETZ & ORTEGA, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2022).

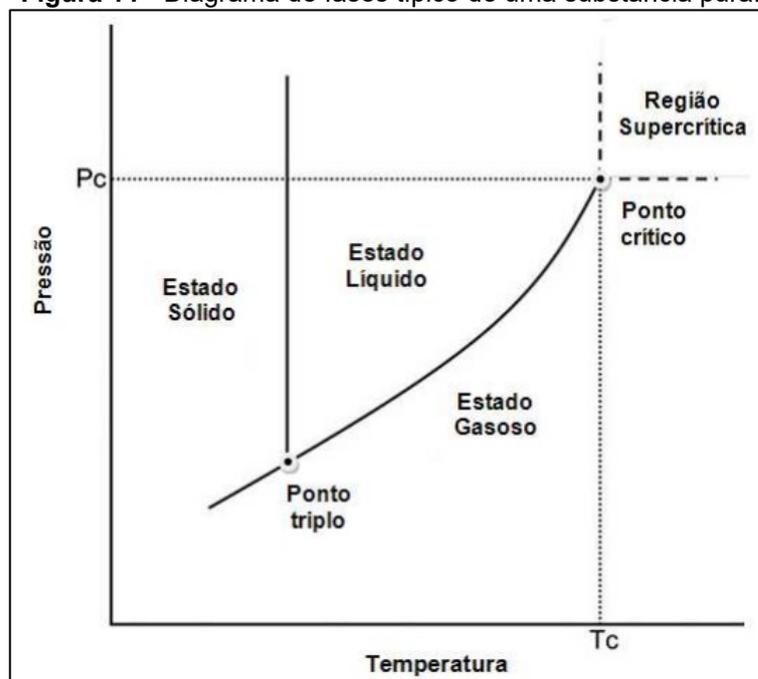
A pressão crítica pode ser definida como a pressão mínima para liquefazer um gás a uma determinada temperatura, enquanto a temperatura crítica é definida como a temperatura acima da qual é impossível liquefazer um gás por compressão. Assim, uma substância acima da temperatura crítica ainda se comportará como um gás, independente da pressão aplicada. Já uma substância que se encontra em condições de temperatura e pressão críticas é chamada de estado supercrítico, sendo denominada também de fluido supercrítico (MUKHOPADHYAY, 2000; SINKO, 2006).

No estado supercrítico, as substâncias possuem características intermediárias entre as de um gás e de um líquido. Fluidos supercríticos possuem coeficientes de difusão próximos ao de um gás, o que proporciona uma rápida e eficiente transferência de massa. Outra característica é sua baixa viscosidade e ausência de tensão superficial, o que facilita a penetração dos fluidos supercríticos na matriz sólida. Além disso, os fluidos supercríticos possuem valores de densidade semelhantes aos de um líquido, o que proporciona um bom poder solvente (TAYLOR, 1996; CAPUZZO, MAFFEI & OCCHIPINTI, 2013).

O diagrama de fases de uma substância é uma representação gráfica que demonstra as condições de temperatura e pressão em que as diferentes fases de uma determinada substância são termodinamicamente estáveis. As curvas que separam

as regiões de cada fase, denominadas curvas de equilíbrio, fornecem valores de pressão e temperatura nos quais as diferentes fases coexistem em equilíbrio, conforme pode ser observado na Figura 11 (ATKINS, 2003).

Figura 11 - Diagrama de fases típico de uma substância pura.



Fonte: Adaptado de HERRERO *et al.*, 2010.

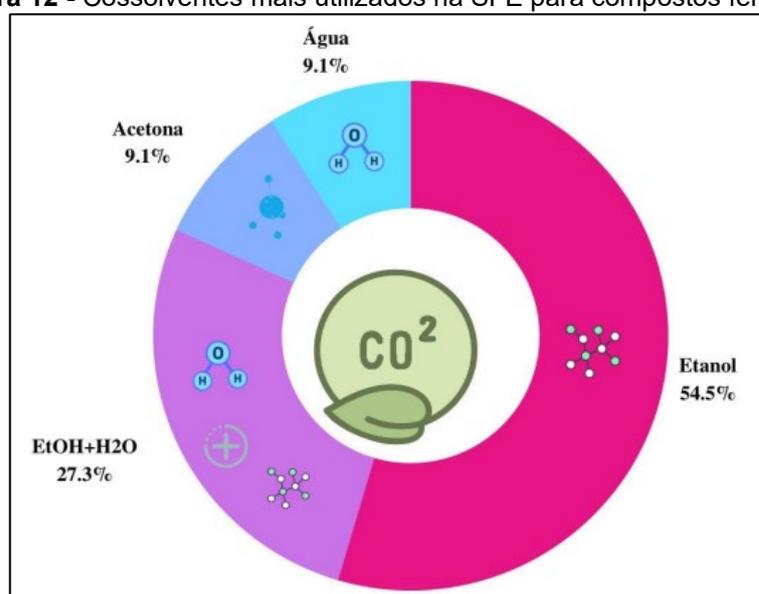
A técnica SFE, além de proporcionar a extração com um solvente de maior poder de solvatação em relação aos solventes líquidos, possui outras vantagens em relação às técnicas convencionais de extração. Sendo a principal delas, a possibilidade de ajuste das variáveis do processo, por exemplo da temperatura e pressão, o que leva a alterações nas propriedades físico-químicas do solvente utilizado, como densidade, difusividade e viscosidade. Apesar do CO_2 ser um solvente de baixa polaridade, seu poder solvente e sua seletividade variam consideravelmente com a densidade. Assim, a extração supercrítica permite uma adequação das condições de extração de acordo com as necessidades específicas das substâncias a serem extraídas (MUKHOPADHYAY, 2000; ABBAS *et al.*, 2008). Outra vantagem do uso da técnica SFE é o fato de ser uma tecnologia limpa, isto é, não gera produtos que poluem o meio ambiente (BHARDWAY *et al.*, 2010).

O uso de um solvente auxiliar ao CO_2 , denominado cossolvente ou modificador, tem sido utilizado com o intuito de melhorar a eficiência da extração, aumentar a solubilidade de compostos-alvo polares e para possibilitar o controle da seletividade

do processo de extração, proporcionando a utilização de pressões menos elevadas (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006; SINKO, 2006; PEREIRA & MEIRELES, 2010, ANDRADE *et al.*, 2012).

Os cossolventes mais utilizados como modificadores em processo de extração com fluido supercrítico são o metanol, o etanol puro e etanol com água (Figura 12), pois são capazes de realizar interações do tipo dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio com moléculas do soluto contendo grupos funcionais polares, seguidos da acetona e da água pura (KOPCAK & MOHAMED, 2005; SILVA *et al.*, 2022).

Figura 12 - Cossolventes mais utilizados na SFE para compostos fenólicos.



Fonte: SILVA *et al.*, 2022.

O uso de cossolventes ou modificadores é necessário na SFE para fenólicos, devido ao CO_2 apresentar baixa afinidade por compostos polares (SILVA *et al.*, 2022). Ainda, Pies (2017) indica que o uso de cossolventes associados ao CO_2 supercrítico remete maior rendimento para obtenção de polifenóis, corroborando com Serra *et al.* (2010).

A quantidade de água disponível presente no substrato pode condicionar o rendimento final do processo de extração (SAHENA *et al.*, 2009). Outro fator importante que influencia no rendimento da extração com fluido supercrítico é o tamanho da partícula da matriz vegetal; como uma tendência geral, a diminuição do tamanho das partículas gera um aumento do rendimento da extração, ou seja, o menor tamanho da partícula facilita o acesso do solvente de extração até o soluto, reduzindo as limitações de transferência de massa (LAROZE *et al.*, 2010).

Um empecilho ao uso desta tecnologia deve-se ao custo inicial de montagem da planta de operação, visto que o equipamento que opera à alta pressão é mais caro que os utilizados em métodos de separação convencionais (SANTOS, 2013). Ainda, para possíveis aplicações industriais, a otimização e avaliação do processo de extração com modelagem matemática são fundamentais (XIA *et al.*, 2011). Assim, a utilização da extração supercrítica é indicada apenas quando o produto final possui alto valor agregado (SANTOS *et al.*, 2011).

Apesar disso, alguns estudos têm apresentado viabilidade econômica da SFE na obtenção de extratos de plantas medicinais, sobretudo após sua instalação inicial (PEREIRA & MEIRELES, 2010; MEZZOMO, MARTÍNEZ & FERREIRA, 2011). Sobrepujando a dificuldade de custos e operando em condições de altos rendimentos, o produto extraído através desta tecnologia é de boa qualidade (ZHANG *et al.*, 2018).

Atualmente, os métodos comumente utilizados para extração de substâncias provenientes de produtos naturais são de baixa seletividade, e podem provocar a degradação dos compostos, além de gerar a toxicidade advinda dos solventes habitualmente utilizados. O uso de métodos instrumentalizados como o SFE, que utilizam solventes atóxicos e eficientes podem contribuir em pesquisas na área de Ciência de Alimentos, principalmente quando o objetivo é sua aplicação em linhagens celulares. Sendo assim, esse trabalho busca avaliar os efeitos antioxidantes e antiproliferativos dos extratos supercríticos de café arábica em linhagens celulares metastáticas de câncer de próstata.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos bioativos dos extratos de *Coffea arabica* verde e em diferentes níveis de torra obtidos por extração com fluido supercrítico em duas linhagens celulares metastáticas de câncer de próstata.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a extração supercrítica dos grãos de café arábica verde e em diferentes níveis de torra;
- Caracterizar a coloração dos extratos de café em diferentes níveis de torra;
- Quantificar, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a concentração de cafeína, ácido cafeico e ácido clorogênico das amostras supercríticas de café;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos supercríticos de café em diferentes níveis de torra;
- Avaliar a capacidade antiproliferativa dos extratos supercríticos de café arábica por meio do método MTT, em duas linhagens celulares de câncer de próstata, DU-145 e PC-3;
- Analisar o efeito da incubação isolada dos extratos de café extraídos por fluido supercrítico (SFE) sobre o ciclo celular e a indução de apoptose em células de câncer de próstata, DU-145 e PC-3.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria prima

Os grãos de *Coffea arábica L.* foram adquiridos de regiões produtoras dos estados do Rio de Janeiro. Tais amostras foram transportadas e armazenadas no Laboratório de Diagnostico Molecular e Micologia da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, RJ.

As amostras de cafés foram processadas nas torras clara (12 minutos à 230°C); média (14 minutos à 240°C), escura (15 minutos à 245°C), e italiana (23 minutos à 250°C), realizadas no torrador Gene café® (BAUER *et al.*, 2018; MONTENEGRO *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2020). Estes níveis de torra são classificados de acordo com a Escala Agtron apresentada na Figura 13 (RABELO *et al.*, 2015).

Figura 13 - Escala Agtron.



Fonte: RABELO *et al.*, 2015.

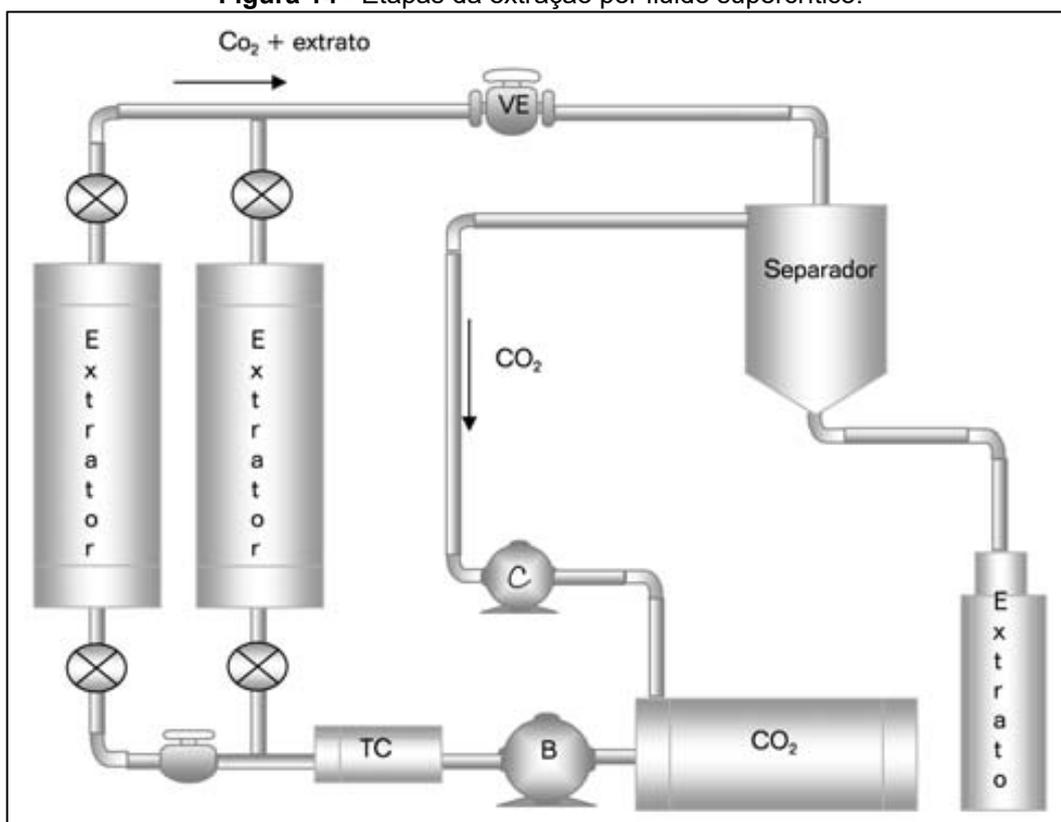
Após atingirem temperatura ambiente foram moídos em moedor caseiro (Cusinart®) e moedor analítico (IKA®). Já os grãos verdes, foram moídos diretamente em moedor analítico (IKA®). Para padronização dos grãos de café, pó de café verde e torrados foram peneirados em peneira analítica (710 µM), no intuito de nivelar a superfície de contato das amostras no momento da extração.

4.2 Obtenção dos extratos de café por CO₂ supercrítico

Após obtenção das amostras de café moído nas torras clara, média, escura e italiana, os extratos de café foram produzidos por método de extração por CO₂ supercrítico, no Conjunto de Extração Supercrítica (modelo BR003F, Fornecedor: MAQNAGUA) no Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) e foram padronizados para os experimentos de atividade biológica.

As instalações industriais possuem 2 extratores, sendo que um deles se encontra em operação durante o ciclo de extração e o outro está sendo limpo e preparado para entrar em operação; desta forma, o processo pode se aproximar de operação contínua. No reservatório de solvente (CO₂) a pressão é de aproximadamente 20 bar, para ser utilizado no processo o dióxido de carbono é pressurizado com a bomba (B) a pressões, em geral, acima de 100 bar e, se for necessário, é aquecido no trocador de calor (TC). O solvente na condição de processo passa por um dos extratores e, na sequência, a mistura extrato/ solvente é submetida à decompressão no sistema válvula de expansão (VE)/separador. Nesta etapa, a pressão do sistema decresce, o solvente perde o poder de solvatação, o extrato se separa e o solvente retorna ao tanque de armazenamento com o auxílio do compressor (C) (Figura 14).

Figura 14 - Etapas da extração por fluido supercrítico.



Legenda: VE: válvula de expansão, B: bomba, C: compressor, TC: trocador de calor.

Fonte: MEIRELLES, 2006.

Inicialmente foram realizadas análises prévias com diferentes parâmetros de extração a fim de definir, volume de cossolvente, tempo, temperatura e pressão de trabalhos ideais para melhor rendimento do processo de extração. A cada teste foi utilizado o café arábica verde moído e realizado análises de compostos fenólicos totais.

Após essas análises iniciais, foi determinado os parâmetros a serem utilizados no processo de SFE de todos os extratos de café obtidos após a torra e moagem dos grãos de café arábica, sendo definidos o uso de 200mL do cossolvente etanol, a temperatura de trabalho de 60°C, a pressão de trabalho de 100bar para o tempo de residência do material no reator de 2 horas.

Conforme metodologia descrita por Zetzi, Brunner e Meirelles (2003), o vaso do reator, com volume interno de 1L, foi preenchido com 40g de amostra de café arábica verde e café arábica submetido previamente a diferentes processos de torra. Em seguida, foram introduzidos no reator 200 ml de etanol. Posteriormente, o vaso foi aquecido até a temperatura de trabalho de 60°C e, após a estabilização das condições do sistema, pressurizado com CO_2 até a pressão de trabalho de 100 bar, com auxílio

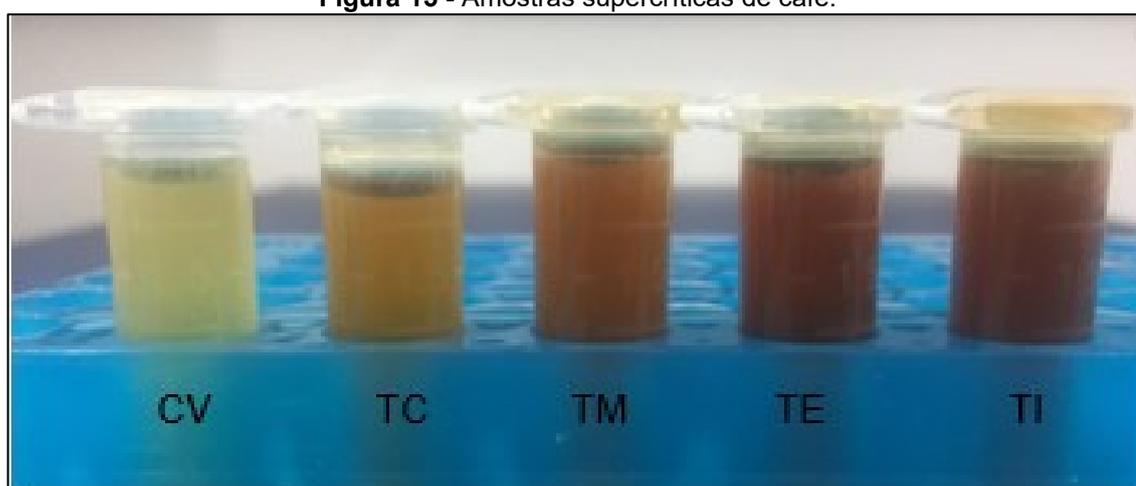
de uma bomba hidropneumática. A partir de então, foi esperado o tempo da estabilização das condições do sistema e 2 horas para contagem do tempo de residência do material no reator. Após o tempo estipulado, a pressão do sistema foi reduzida, o CO₂ foi pressurizado para retornar ao tanque de armazenamento e o extrato foi coletado via válvula agulha para um recipiente fechado.

As amostras líquidas de café supercríticos foram obtidas na concentração de 200g/L e foram armazenadas em câmara fria a -8°C, sendo apenas retiradas alíquotas das amostras armazenadas para realização dos experimentos posteriormente.

4.3 Análise colorimétrica

Para análise de cor das amostras supercríticas de café (Figura 15) foi utilizado o espectrofotômetro de bancada CM-5 Konica Minolta® (Sensing Américas, INC) mediante a prévia calibração automática. As medições foram realizadas por refletância, em cubeta para espectrofotômetro, sendo realizada completa higienização do referido utensílio a cada medição. Foram realizadas três leituras de cada amostra supercrítica de café, café verde (CV), torra clara (TC), torra média (TM) e torra escura (TE). Optou-se por não realizar análise colorimétrica da torra italiana (TI).

Figura 15 - Amostras supercríticas de café.

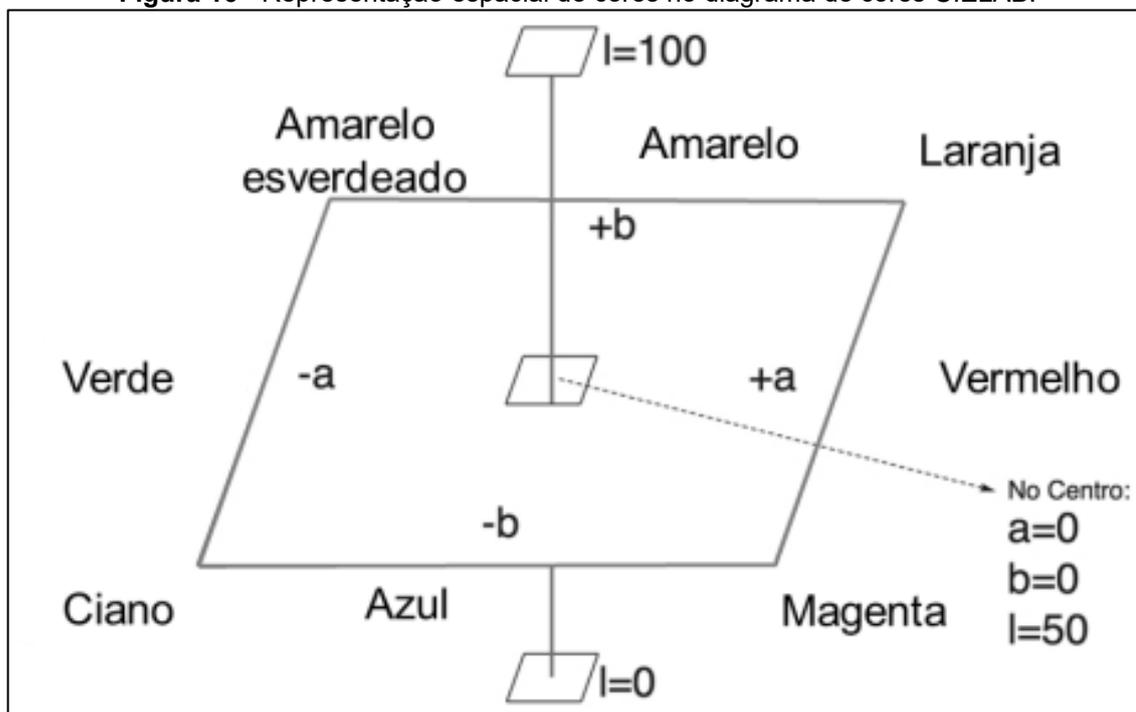


Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, TM: torra média, TE: torra escura e TI: torra italiana.

Fonte: Próprio autor.

A expressão dos dados foi baseada no diagrama de cores CIE $L^* a^* b^*$, como mostra a Figura 16, usando as coordenadas L^* , a^* , b^* . Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão.

Figura 16 - Representação espacial de cores no diagrama de cores CIELAB.



Fonte: Adaptado de Google imagens.

4.4 Determinação de compostos fenólicos totais

A análise de fenólicos totais foi realizada de acordo com o ensaio de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, *et al.*, 1965). As alíquotas dos extratos supercríticos de café (20, 40 e 80 μL) foram elaboradas a partir de uma solução inicial (25mg/10mL); em seguida, foram pipetadas e repousaram ao abrigo da luz por duas horas e após esse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro na absorvância de 750 nm. Os resultados foram comparados com a reação do padrão ácido gálico e expresso em mg de ácido gálico (GAE)/100g de amostra.

4.5 Caracterização química dos extratos de café por CLAE

Os conteúdos foram medidos usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Waters-Alliance 2695, com detector de arranjo de fotodiodos (PDA) 2996 e software Empower® (Waters, Massachusetts, EUA).

Para determinação do teor de cafeína foi utilizada uma coluna BDS Hypersil C18 (5 cm × 4,6 mm e 2,6 µm - Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), utilizando a técnica de Perrone *et al.* (2008). A determinação do ácido clorogênico (5-CQA) foi realizada em coluna BDS Hypersil C18 (5 cm × 4,6 mm e 2,6 µm – Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), utilizando a técnica de Trugo & Macrae (1984). Para o teor de ácido cafeico, as amostras foram extraídas, com a fase móvel por 10 minutos em ultrassom e filtradas (FHUP 0,45 µm) e injetadas no cromatógrafo, utilizando a técnica de Rivelli *et al.* (2007).

4.6 Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams & Berset (1995). O DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante, os padrões comerciais dos ácidos foram adicionados para reação com o radical estável DPPH em uma solução de metanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 515 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. A redução do radical do DPPH foi medida através da leitura da absorbância a 515 nm em 30 minutos de reação. Os volumes de extrato utilizados foram de 20, 30 e 40 µL partindo da solução inicial. A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a Equação 1 de MENSOR *et al.* (2001), descrita abaixo:

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

4.7 Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante pelo método de FRAP foi determinada de acordo com Rufino *et al.* (2006). Este método baseia-se na quantificação da capacidade de redução do complexo Fe (III)-TPTZ (cor azul clara) para o complexo Fe (II)-TPTZ (cor azul escura) em meio ácido, reação esta que é desencadeada pelo antioxidante presente na amostra. O método consistiu em adicionar os volumes 20, 30 e 40 μL da amostra e quantificar, em 2,7 ml de reagente FRAP somado a 270 μl de água destilada. Após 30 minutos em banho-maria é efetuada a leitura de absorbância a 595 nm. Os resultados foram expressos em μM de sulfato ferroso por grama de amostra. A curva padrão foi produzida com uma solução de sulfato ferroso com quatro diluições diferentes.

4.8 Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS⁺

O método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) foi utilizado como descrito por Rufino et al (2007), O radical ABTS⁺ é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1:0,5. Uma vez formado, o radical ABTS⁺ é diluído em etanol até obter uma medida de absorbância de 0,70 ($\pm 0,02$) a um comprimento de onda de 734 nm. Alíquotas com três diferentes volumes das amostras de ácidos foram utilizadas de modo a restar um volume final de 3 ml em cada leitura. As leituras serão realizadas em triplicata. Uma curva padrão com soluções de Trolox e outra curva com ácido ascórbico foram produzidas.

Os resultados foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), em μmol de trolox por grama de amostra.

4.9 Ensaio ORAC

Este método, mede a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais peroxil que são gerados por uma fonte radicalar, AAPH (2,2-azobis-2-amidinopropano dihidroclorado), a 37°C (PRIOR *et al.*, 2003). Para a análise, 20 µL das amostras em diferentes diluições (1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 e 1:600), foram adicionadas nos poços com 90 µL do tampão fosfato que foram adicionados a microplaca, todos em duplicata. Em todos os poços, em seguida, foi adicionado 120 µL da solução de fluoresceína e 60 µL de AAPH (2,2'-azinobis (2amidinopropano)-dihidrocloro). A microplaca contendo as amostras e o tampão fosfato, foram incubados por 3 horas a 37 °C no fluorímetro (SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices), onde também foi realizada a leitura.

O radical peroxil, gerado pela reação do com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência em 575nm e 578nm. A atividade antioxidante das substâncias foi determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo.

Usando-se Trolox de concentrações conhecidas, uma curva padrão foi gerada e a atividade ORAC da amostra foi calculada. Este ensaio expressa o resultado em unidade de ORAC ou equivalentes de Trolox, o qual corresponde à quantidade de Trolox em micro mols que tem a mesma atividade antioxidante de um litro da solução testada.

4.10 Cultura de células e protocolo de tratamento

As linhagens celulares PC-3 e DU-145 de adenocarcinoma de próstata foram obtidas a partir do Instituto Nacional do Câncer (INCA). As linhagens de próstata foram cultivadas em meio RPMI *medium* suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina, pH 7,4, sob atmosfera de 5% de CO₂. As células quando em confluência de 70-80%, sofriam processo de tripsinização, cerca de uma ou duas vezes por

semana. Para cada experimento, as células foram plaqueadas (10^4 células/cm²) em placas de 6 e 96 poços, para análises de ciclo celular e proliferação celular, respectivamente. Foi incluído um grupo controle para todas as amostras analisadas, sendo tratadas somente com próprio meio de manutenção da cultura, isento das amostras. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.11 Ensaio de viabilidade e proliferação celular (MTT)

A viabilidade celular foi determinada usando o ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) (MOSMANN, 1983). As células foram semeadas em microplacas de 96 poços com $2,0 \times 10^4$ células/poço.

As células foram tratadas com oito concentrações distintas das amostras que variavam de 150 µg/ml a 10.000 µg/ml e, então incubadas por 24, 48 e 72h. Dez microlitros de solução de MTT (5 g/L) foram adicionados a cada poço. Após incubação por 4h, o meio de cultura foi removido e 50 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) foram adicionados para solubilizar o formazan. As amostras foram lidas em um leitor de ELISA (Bio-Rad iMARK) a 570 nm. Após 15 minutos em estufa, a placa foi lida em leitor de microplacas (POLARIS, CELER®) a 570nm. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi calculada com base na fórmula:

$$CPIR = 1 - \frac{\text{valor médio do grupo experimental}}{\text{valor médio do grupo controle}} \times 100\%$$

4.12 Análise de ciclo celular

As células foram semeadas em microplacas de 6 poços com $5,0 \times 10^5$ /poço. Células de câncer de próstata incubadas por 48 horas na presença e na ausência das quatro amostras em diferentes concentrações (1.000 µg/ml e 5.000 µg/ml) foram destacadas com solução de tripsina a 25°C. A suspensão celular foi analisada quanto ao conteúdo de DNA por um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA).

O reagente de Vindlov foi usado para ler 30.000 células para cada réplica (POZAROWSKI & DARZYNKIEWICZ, 2004). Células com menor conteúdo de DNA do que G₁ na distribuição do ciclo celular foram consideradas células hipodiploides (subG₁). Proporções relativas de G₀/G₁ diploides (2n), S (>2n, mas <4n) e G₂/M (4n) indicativas do conteúdo de DNA foram adquiridas usando o Cell Quest iPro. A porcentagem da população celular em cada fase específica foi estimada com o software FlowJo v 10.0.6 e comparada com o controle.

4.13 Avaliação da indução de apoptose

A externalização da fosfatidilserina foi observada através do ensaio de Anexina-V usando a técnica de citometria de fluxo (VAN ENGELAND *et al.*, 1998) para indicar a porcentagem de células que provavelmente eram viáveis, em apoptose ou morte celular não apoptótica. As células de adenocarcinoma da próstata foram incubadas em uma microplaca de 6 poços usando $5,0 \times 10^5$ células/poço com os extratos por 48 h. As células foram destacadas usando uma solução de tripsina e, em seguida, os marcadores de iodeto de propídio e anexina foram adicionados. A detecção foi realizada com um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) usando o software CellQuest iPro, para contar 30.000 unidades de células/repetição.

As populações de células analisadas foram reconhecidas por suas propriedades de dispersão direta (FSC)/dispersão lateral (SSC). A fluorescência verde do isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi medida a 530 ± 30 nm (detector FL1) e a fluorescência vermelha do iodeto de propídio foi medida a 585 ± 42 nm (FL2). A porcentagem de células viáveis e aquelas células em apoptose precoce ou tardia ou morte não apoptótica foi calculada usando o software FlowJo v 10.0.6.

4.14 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm Desvio Padrão (DP) e as diferenças estatísticas foram determinadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida por um teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas.

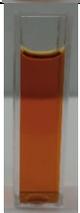
Para a análise do ciclo celular e ensaios de apoptose, foram testados 99% e 99,9% de confiança também. O teste de Spearman foi utilizado para análise de correlação para cálculos entre o teor de cafeína, CGA e ácido cafeico e os métodos para atividade antioxidante. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas usando GraphPad Prism (versão 5.04, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Medições de parâmetros colorimétricos de extratos de café

A análise colorimétrica (Tabela 3) mostrou que a coloração dos extratos foi diferente conforme o grau de torra. Nos diagramas de cores CIE $L^* a^* b^*$, o parâmetro L^* corresponde à luminosidade, portanto os valores podem variar de 0 (preto) a 100 (branco), a^* seria a coordenada cromática do vermelho (+) ao verde (-) e b^* , coordenada cromática do amarelo (+) ao azul (-). O extrato com maior intensidade de luz do branco foi o da amostra CV, evidenciado pelo maior valor de L^* ($42,86 \pm 0,17$).

Tabela 3 - Análise colorimétrica de amostras de fluido supercrítico de café arábica por diferentes graus de torra.

Amostras	Variáveis colorimétricas					Cor Digital	Cor Real
	L^*	a^*	b^*	C^*	h^*		
CV	$42,86 \pm 0,17$	$5,83 \pm 0,15$	$24,00 \pm 0,27$	$24,69 \pm 0,25$	$76,34 \pm 0,42$		
TC	$34,10 \pm 0,05$	$14,31 \pm 0,18$	$13,11 \pm 0,10$	$19,41 \pm 0,21$	$42,49 \pm 0,13$		
TM	$31,56 \pm 0,16$	$15,71 \pm 0,08$	$10,47 \pm 0,28$	$18,89 \pm 0,09$	$33,69 \pm 0,84$		
TE	$27,31 \pm 0,29$	$11,99 \pm 0,35$	$4,69 \pm 0,48$	$12,89 \pm 0,17$	$21,39 \pm 2,53$		

Legenda: os dados são expressos como média \pm DP. Médias com letras diferentes (a,b) na mesma coluna denotam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ao nível de 5%. Abreviaturas: CV: café verde, TC: torra clara, TM: torra média, TE: torra escura. L^* , leveza; a^* , croma a; b^* , Croma b; C^* , Croma c; h^* , ângulo Hue.

Os valores cromáticos a^* e b^* foram positivos em todos os modos de preparo nos diferentes perfis de torra, indicando, respectivamente, que as bebidas apresentaram intensidade de cor vermelha (variando de +5,83 a +15,71) e amarela (variando de +4,69 a +24,00). O Chroma c (C^*) e o ângulo Hue (h^*) correspondem, respectivamente, à intensidade e saturação da cor. Entre os extratos de café analisados, os valores de C^* e h^* são inversamente proporcionais ao grau de torra; indicando, portanto, que as bebidas tornam-se, com a progressão da torra, com cores mais opacas e saturadas ($p < 0,05$).

5.2 Perfil fitoquímico e atividade antioxidante de extratos de café

Os teores de cafeína, ácido cafeico e ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) dos extratos de café obtidos pelo fluido supercrítico foram apresentados neste estudo (Tabela 4).

O teor de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) reduziu significativamente do extrato de café verde para o de torra clara ($16,76 \pm 0,81$ para $0,85 \pm 0,12$, $p < 0,05$), com reduções posteriores com o aumento da temperatura de torra (Tabela 4).

Os teores de cafeína e ácido clorogênico são maiores no café verde ($80,0 \pm 2,20$ e $19,37 \pm 1,25$ mg/ml, respectivamente) (Tabela 4). Considerando os perfis de torra, o teor de cafeína aumentou ligeiramente e atingiu o nível mais alto na condição de torra escura ($69,0 \pm 4,30$ mg/ml). Portanto, o efeito da torrefação no nível de cafeína precisa ser mais investigado para afirmar claramente a influência da torrefação no conteúdo desse composto bioativo.

O extrato de torra clara (TC) apresentou uma redução de 25,7% em seu teor de cafeína em relação ao café verde (CV), enquanto os extratos de torra média (TM) e torra escura (TE) tiveram, respectivamente, uma perda de 28% e 13,7%. Essa flutuação no teor de cafeína pode ser explicada pela maior solubilidade da cafeína em água à medida que a temperatura de torrefação aumenta.

O teor de ácido clorogênico, após a torrefação, apresentou declínio (Tabela 4) e atingiu o menor valor no café torrado escuro ($0,28$ mg/ml). A temperatura de torrefação neste trabalho foi em torno de 200°C , sugerindo que a maior parte do ácido clorogênico neste experimento foi convertida em lactona de ácido clorogênico.

O perfil e a concentração de compostos biologicamente ativos nos grãos de café dependem principalmente do grau de torra, que, por sua vez, afeta a atividade antioxidante e o caráter quimiopreventivo do café.

Entre as amostras de extratos de café, em relação ao teor de compostos fenólicos totais, o processo de torrefação dos grãos de café reduziu significativamente o teor com o aumento da temperatura de torra (Tabela 4), com o menor valor apresentado no extrato CV ($17,42 \pm 1,13$ g GAE/100g; $p < 0,05$) em relação ao extrato TC ($15,11 \pm 0,35$ g GAE/100g; $p < 0,05$), seguido de uma nova redução após o aumento da torrefação temperatura. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os extratos TM ($10,93 \pm 0,64$ g GAE/100g) e TE ($11,68 \pm 0,27$ g GAE/100g).

Tabela 4 - Teor de cafeína e compostos fenólicos nos extratos de café arábica verde e em diferentes níveis de torra.

Extratos de café	Cafeína (mg/100g)	Compostos fenólicos		Fenólicos totais (g GAE/100g)
		Ácido cafeico (mg/mL)	Ácido clorogênico (mg/mL)	
CV	$80.0 \pm 2.2^*$	$16.76 \pm 0.81^*$	$19.37 \pm 1.25^{**}$	$17.42 \pm 1.13^{**}$
TC	59.4 ± 3.6	0.85 ± 0.12	$4.35 \pm 0.36^*$	$15.11 \pm 0.35^*$
TM	57.6 ± 1.5	2.23 ± 1.20	0.72 ± 0.15	10.93 ± 0.64
TE	69.0 ± 4.3	0.98 ± 0.32	0.28 ± 0.08	11.68 ± 0.27

Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, CT: controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Asteriscos representam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade antioxidante do café verde e em diferentes torras foi avaliada pelos métodos DPPH, FRAP, ABTS e ORAC (Figura 17). Ao comparar a capacidade antioxidante do café em diferentes níveis de torra, pode-se observar a mesma tendência nos resultados entre os métodos utilizados.

O extrato de café verde apresentou a maior atividade antioxidante em comparação com os extratos de café torrado; e dentre os extratos de café torrado, destaca-se o TC com maior potencial antioxidante.

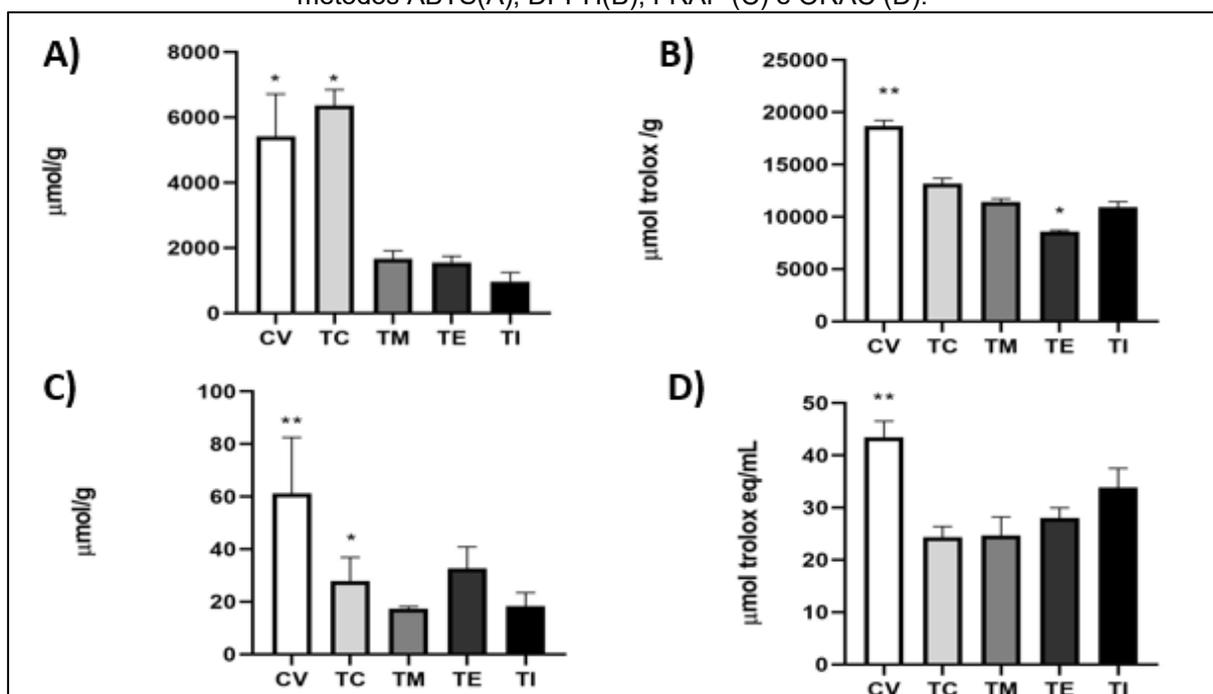
No ensaio de DPPH, observou-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,01$) no potencial antioxidante do CV ($18,94 \pm 0,52$ mmol TE/g) para o TC ($13,52 \pm 0,53$ mmol TE/g). Não houve diferença estatística entre TC e TM ($11,13 \pm 0,31$ mmol TE/g), e TE ($8,17 \pm 0,14$ mmol TE/g) foi significativamente menor que TC e TM.

De acordo com o método FRAP, a capacidade antioxidante aumentada ($p > 0,01$) foi observada no CV ($61,22 \pm 21,31 \mu\text{mol FSE/g}$). Não foi observada diferença significativa entre TC ($27,81 \pm 9,08 \mu\text{mol FSE/g}$), TM ($17,35 \pm 0,83 \mu\text{mol FSE/g}$) e TE ($32,66 \pm 8,24 \mu\text{mol FSE/g}$).

No ensaio ABTS, não houve diferença estatisticamente significativa entre CV ($5,16 \pm 1,35 \text{ mmol TE/g}$) e TC ($6,50 \pm 0,39 \text{ mol TE/g}$) e entre TM ($1,03 \pm 0,20 \text{ mmol TE/g}$) e TE ($1,57 \pm 0,16 \text{ mmol TE/g}$). Mas CV e TC têm potencial antioxidante significativamente maior ($p > 0,05$) do que TM e TE.

Conforme observado com o ensaio ORAC, a atividade antioxidante diminuiu ($p < 0,01$) do CV ($43,50 \pm 3,06 \text{ mmol TE/g}$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), de acordo com a progressão da torrefação (TC, $27,86 \pm 2,04 \text{ mmol TE/g}$; TM, $31,23 \pm 3,54 \text{ mmol TE/g}$; e TE, $25,68 \pm 1,97 \text{ mmol TE/g}$).

Figura 17 - Capacidade antioxidante de extratos de café arábica em diferentes níveis de torra pelos métodos ABTS(A), DPPH(B), FRAP (C) e ORAC (D).



Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, CT: controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Asteriscos representam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor

5.3 Compostos bioativos de extratos de café promovem efeitos citostáticos em células de câncer de próstata

Neste estudo, foi avaliado o efeito de extratos supercríticos de café nas células PC-3 e DU-145. O efeito dos extratos supercríticos de café sobre o ciclo celular PC-3 e DU-145 após 48 horas de incubação são apresentados na Tabela 5.

Em PC-3, não foi observada diferença estatística no número de células quando comparado ao controle no subG₁. As amostras de CV induziram redução de células logo no início do ciclo celular, em G₀/G₁, nas concentrações de 5mg/ml (40,57%±5,58) e 10mg/ml (58,83%±6,52), enquanto no TC induziram aumento de células ($p < 0,001$) na fase G₀/G₁, nas concentrações de 5mg/ml e 10mg/ml, com aumento da porcentagem de células de 77,43%±1,96 e 77,37%±1,86, respectivamente. Na fase S, apenas o TC a 5mg/ml (6,29%±0,69) e 10mg/ml (5,60%±2,11) apresentou redução significativa no percentual de células. E, no G₂/M, o TC também foi a única amostra que apresentou redução significativa em 5mg/ml (5,7%±2,03) e 10mg/ml (5,57%±1,34), quando comparado às células PC-3 não tratadas.

Em DU-145, houve diferença estatística no número de células em todas as amostras no subG₁ em comparação com o controle. No início do ciclo celular, em G₀/G₁, a amostra de CV na concentração de 5mg/ml não apresentou diferença estatística em relação ao controle, mas a CV 10mg/ml (29,53± 5,17) induziu redução do número de células. Da mesma forma, TC 5mg/ml não apresenta diferença em relação ao controle e TC 10mg/ml foi capaz de reduzir o número de células. Nas últimas fases do ciclo celular, S e G₂/M, ambas concentrações de CV e TC apresentaram aumento significativo no número de células.

Observa-se perfil bem distinto no ciclo celular entre as linhagens celulares metastáticas de câncer de próstata, PC-3 e DU-145, após 48 horas de incubação com extratos de CV e TC. Tanto em PC-3 quanto em DU-145, o CV 10mg/ml foi capaz de parar o ciclo celular logo no início, em G₀/G₁, mas apenas em PC-3, os extratos de TC em ambas as concentrações reduziram o número de células em S e G₂/M, no meio e final do ciclo celular, ou seja, apenas em PC-3, os extratos de TC foram capazes de reduzir a replicação celular.

Tabela 5 - Efeito de extratos de café arábica na progressão do ciclo celular em células PC-3 e DU-145, após 48 horas de incubação.

Amostras	Concentração	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
PC-3					
Controle	-	1,45 ± 0,43	60,63 ± 1,93	9,25 ± 1,33	8,59 ± 0,30
CV	5mg/ml	0,04 ± 0,00	40,57 ± 5,58 *	10,93 ± 1,48	9,93 ± 0,38
CV	10mg/ml	0,04 ± 0,01	58,83 ± 6,52*	10,94 ± 1,13	8,87 ± 0,29
TC	5mg/ml	0,35 ± 0,16	77,43 ± 1,96**	6,29 ± 0,69*	5,70 ± 2,03*
TC	10mg/ml	0,19 ± 0,05	77,37 ± 1,86**	5,60 ± 2,11*	5,57 ± 1,34*
DU-145					
Controle	-	0,75 ± 0,43	45,2 ± 3,96	15,57 ± 2,38	11,92 ± 3,51
CV	5mg/ml	2,29 ± 0,18*	42,10 ± 6,83	23,90 ± 1,27*	16,63 ± 3,96*
CV	10mg/ml	1,31 ± 0,53*	29,53 ± 5,17*	21,73 ± 2,22*	24,40 ± 1,56**
TC	5mg/ml	3,07 ± 0,25*	53,43 ± 0,61	24,40 ± 1,06*	12,60 ± 0,29
TC	10mg/ml	1,42 ± 0,39*	32,27 ± 0,90*	21,93 ± 0,62*	15,10 ± 0,29*

Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, CT: controle, *p <0,05, **p<0.001. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Asteriscos representam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (p<0,05).

5.4 Compostos bioativos de extratos de café reduzem a viabilidade celular e induzem apoptose em células de câncer de próstata

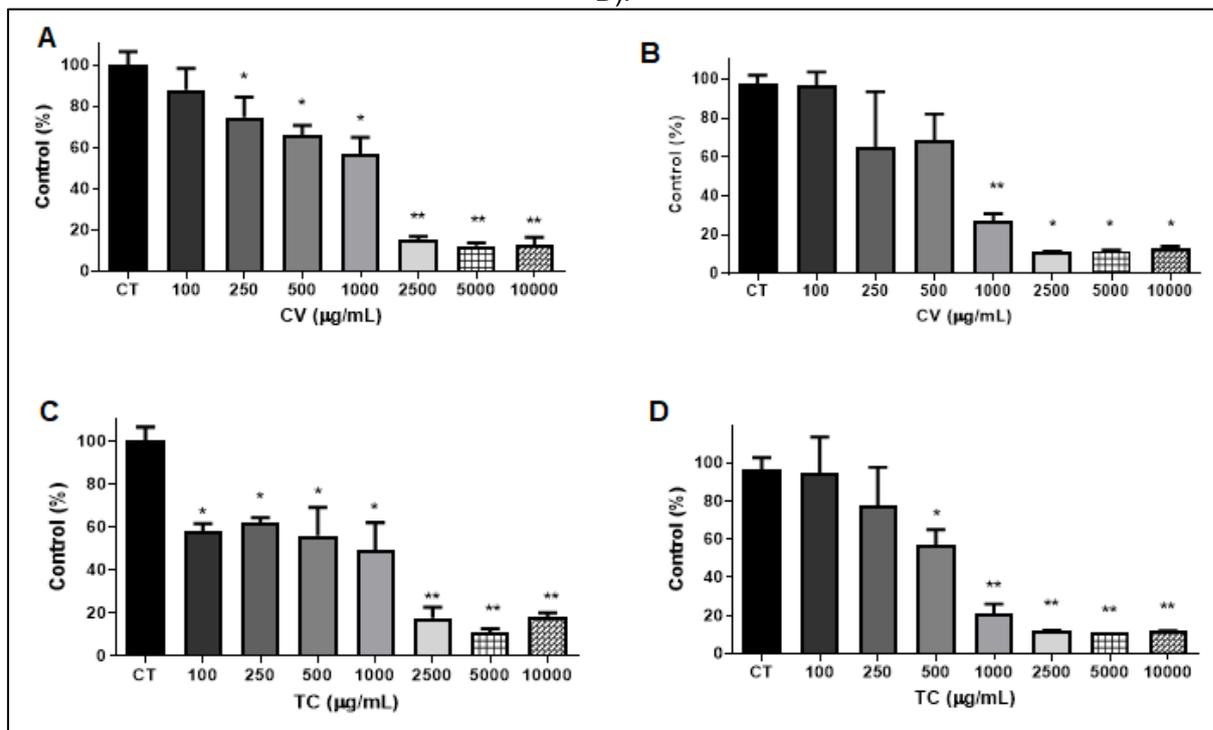
Os efeitos citotóxicos dos extratos supercríticos de café foram avaliados através da metabolização do sal do tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) em formazan pelas enzimas mitocondriais das células malignas PC-3.

Na Figura 18 são observados os resultados da viabilidade celular de PC-3. Na incubação de 24 horas, todas as concentrações de CV, exceto 100µg/ml, mostraram uma redução significativa na viabilidade celular em células PC-3. O CV apresentou redução significativa nas concentrações 250, 500 e 1000µg/ml (p<0,05), e nas concentrações 2500, 5000 e 1000µg/ml uma redução com significância estatística de p<0,001. Enquanto, em 48 horas, o CV apresentou redução significativa apenas na concentração de 1000µg/ml (p<0,001) e redução estatisticamente significativa (p<0,05) em 5000 e 10000µg/ml.

O extrato da TC, em 24 horas, induziu uma redução na viabilidade celular das células PC-3 em todas as concentrações testadas. Houve significância estatística de p<0,001 nas maiores concentrações (2500, 5000 e 10000µg/ml). Em 48 horas, o TC foi capaz de reduzir a viabilidade celular das células PC-3 nas cinco maiores

concentrações testadas. Houve redução estatisticamente significativa de $p < 0,001$ nas concentrações 1000, 2500, 5000 e 10000 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 18 - A viabilidade celular em resposta a diferentes concentrações de amostras de extrato de café verde (A e B) e torra clara foram testadas pelo ensaio MTT: PC-3 24 h (A e C), PC-3 48 h (B e D).



Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, CT: controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Asteriscos representam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

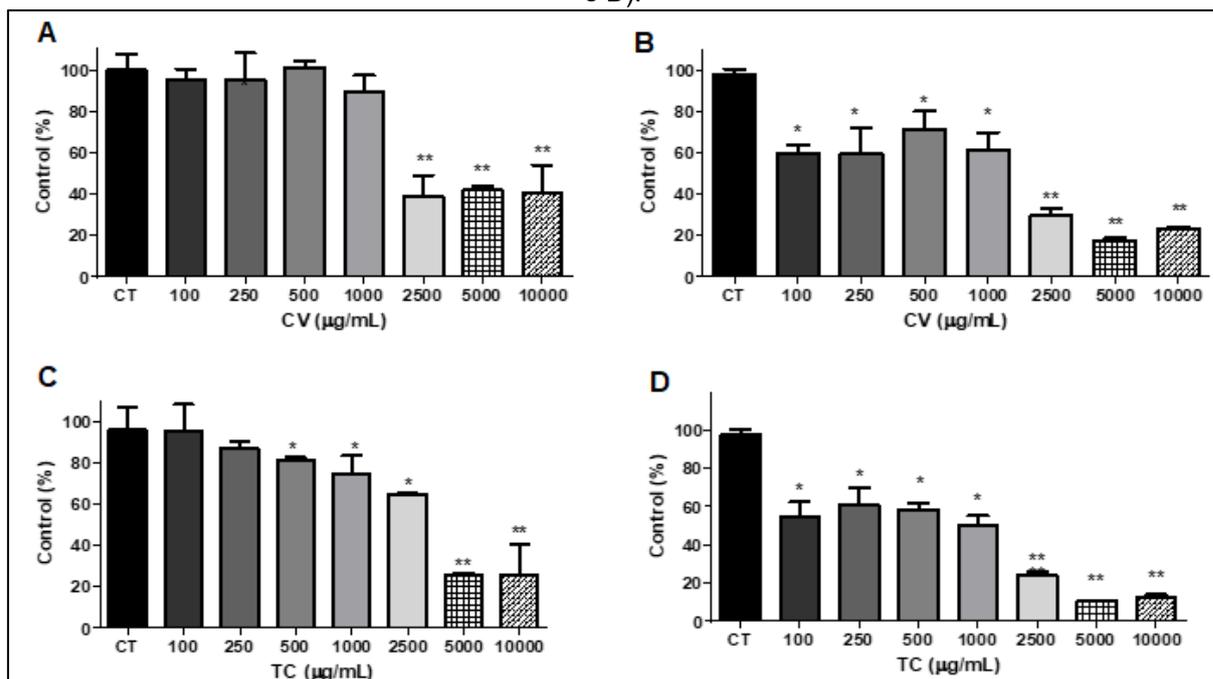
Fonte: Próprio autor

Na Figura 19 são observados os resultados da viabilidade celular de DU-145. Na incubação de 24h, as concentrações de CV 2500, 5000 e 10000 $\mu\text{g/ml}$ apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) na viabilidade celular de DU-145. Ao passo que em 48h, todas as concentrações CV mostraram uma redução significativa na viabilidade celular de DU-145, sendo $p < 0,001$ nas concentrações 2500, 5000 e 10000 $\mu\text{g/ml}$.

O extrato da TC, em 24 horas, induziu uma redução na viabilidade celular das células DU-145 em quase todas as concentrações testadas, exceto 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$. Houve significância estatística de $p < 0,001$ nas maiores concentrações (5000 e 10000 $\mu\text{g/ml}$). Em 48 horas, o TC foi capaz de reduzir a viabilidade celular das células DU-145 em todas as concentrações testadas. Houve redução estatisticamente significativa de $p < 0,001$ nas concentrações 2500, 5000 e 10000 $\mu\text{g/ml}$.

Tanto CV quanto TC apresentaram resultados significativos nas concentrações mais altas em ambos os tempos de incubação. Destaca-se que em ambos os extratos a incubação de 48 horas apresentou resultados significativos em todas as concentrações e, $p > 0,001$ nas três maiores concentrações testadas.

Figura 19 - A viabilidade celular em resposta a diferentes concentrações de amostras de extrato de café verde (A e B) e torra clara foram testadas pelo ensaio MTT: DU-145, 24 h (A e C), PC-3 48 h (B e D).



Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, CT: controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Asteriscos representam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor

O efeito dos diferentes extratos de café sobre as linhagens celulares PC-3 e DU-145 em apoptose são mostrados na Tabela 6. Em PC-3, houve uma redução significativa no número de células viáveis em relação ao controle, essa redução ocorreu no CV 10mg/ml ($89\% \pm 0,7$) e TC 5mg/ml ($82,48\% \pm 0,66$), e uma redução maior foi observada no TC 10mg/ml ($75,93\% \pm 2,58$). Apenas, CV 10mg/ml mostrou um aumento significativo no número de células durante a apoptose precoce ($5,6\% \pm 1,78$). Na apoptose tardia, foi demonstrado que houve um aumento significativo no número de células em TC 5mg/ml ($10,64\% \pm 2,83$), e um maior aumento de expressão com 10mg/ml ($23,18\% \pm 2,77$). No processo de necrose, apenas o TC 5mg/ml apresentou aumento significativo de células ($6,48\% \pm 3,29$).

Em DU-145, também houve redução significativa no número de células viáveis em relação ao controle, apresentando significância de $p < 0,001$ na concentração 10mg/ml em ambos os extratos testados. Foi observado aumento significativo ($p < 0,001$) na apoptose precoce e tardia em ambos os extratos, tanto em 5mg/ml quanto em 10mg/ml. Não houve aumento significativo de necrose para nenhuma concentração dos extratos testados. Os extratos de CV e TC foram mais eficazes em induzir apoptose precoce e tardia na linhagem celular DU-145.

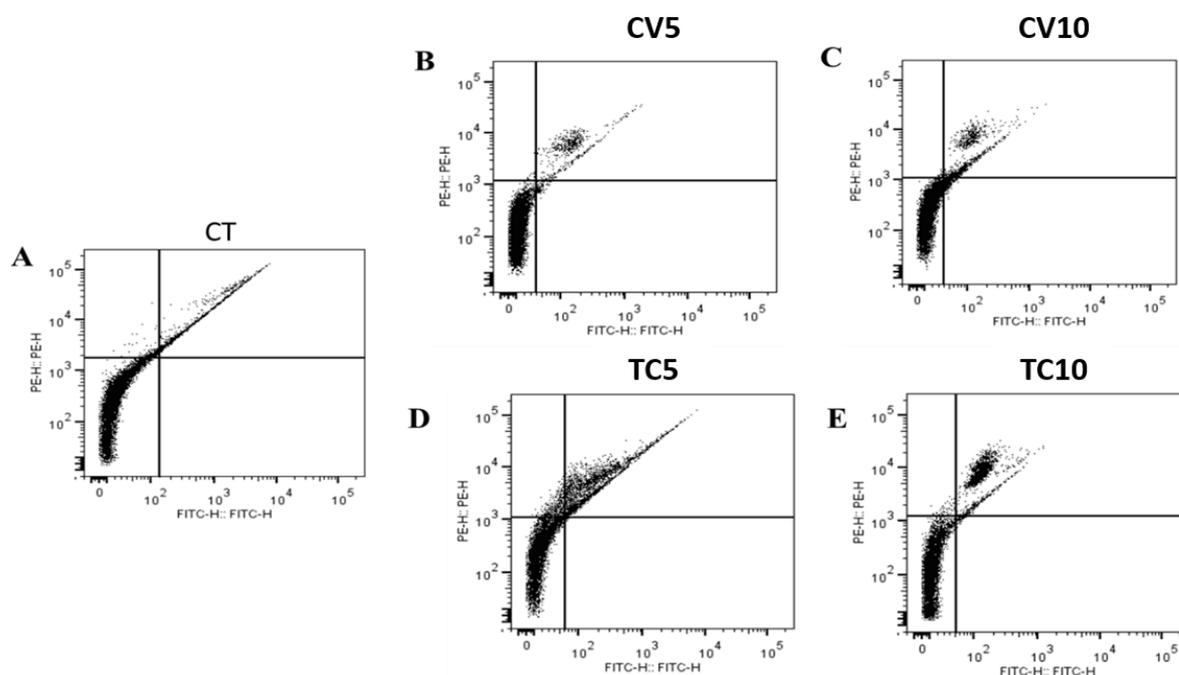
Tabela 6 - Efeito de extratos de café arábica na apoptose em células PC-3 e DU-145, após 48 horas de incubação.

Amostras	Concentração	Células viáveis	Apoptose inicial	Apoptose tardia	Necrose
PC-3					
Controle	-	94,13 ± 2,34	1,33 ± 0,78	5,93 ± 3,13	0,40 ± 0,23
CV	5mg/ml	93,95 ± 0,96	0,58 ± 0,23	4,96 ± 0,37	0,52 ± 0,33
CV	10mg/ml	89,00 ± 0,70*	5,60 ± 1,78**	5,38 ± 1,18	0,03 ± 0,02
TC	5mg/ml	82,48 ± 0,66*	0,39 ± 0,67	10,64 ± 2,83*	6,48 ± 3,29*
TC	10mg/ml	75,93 ± 2,58**	0,76 ± 0,74	23,18 ± 2,77**	0,13 ± 0,07
DU-145					
Controle	-	96,72 ± 1,03	0,87 ± 0,28	1,67 ± 0,79	0,72 ± 0,15
CV	5mg/ml	55,63 ± 5,36*	18,37 ± 9,36**	25,35 ± 1,37**	0,68 ± 0,35
CV	10mg/ml	24,03 ± 2,23**	25,65 ± 2,77***	49,93 ± 1,16***	0,43 ± 0,28
TC	5mg/ml	40,83 ± 4,57*	27,6 ± 4,89**	31,28 ± 1,78***	0,29 ± 0,13
TC	10mg/ml	31,63 ± 7,66**	52,5 ± 9,06***	14,3 ± 3,54**	1,57 ± 0,39

Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, CT: controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Asteriscos representam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Figura 20, A é o controle, B e C são as células PC-3 após tratamento com 5 e 10 mg/ml de CV e D e E são as células PC-3 após tratamento com 5 e 10 mg/ml da TC. Dentre os diferentes extratos de CV e TC testados, TC 10mg/ml foi capaz de causar a maior redução na viabilidade celular ($p < 0,001$). CV 10mg/ml foi a concentração que mais induziu apoptose precoce ($p < 0,001$), enquanto TC 10mg/ml, apoptose tardia ($p < 0,001$). E apenas TC 5mg/ml induziu necrose ($p < 0,05$).

Figura 20 - Indução de apoptose em 48h em células de câncer de próstata PC-3 por diferentes extratos de café arábica verde e torra clara. (A) Células PC-3 de controle. (B e C) Células PC-3, respectivamente, após tratamento com 5mg/ml e 10mg/ml de extrato de café de torra clara.

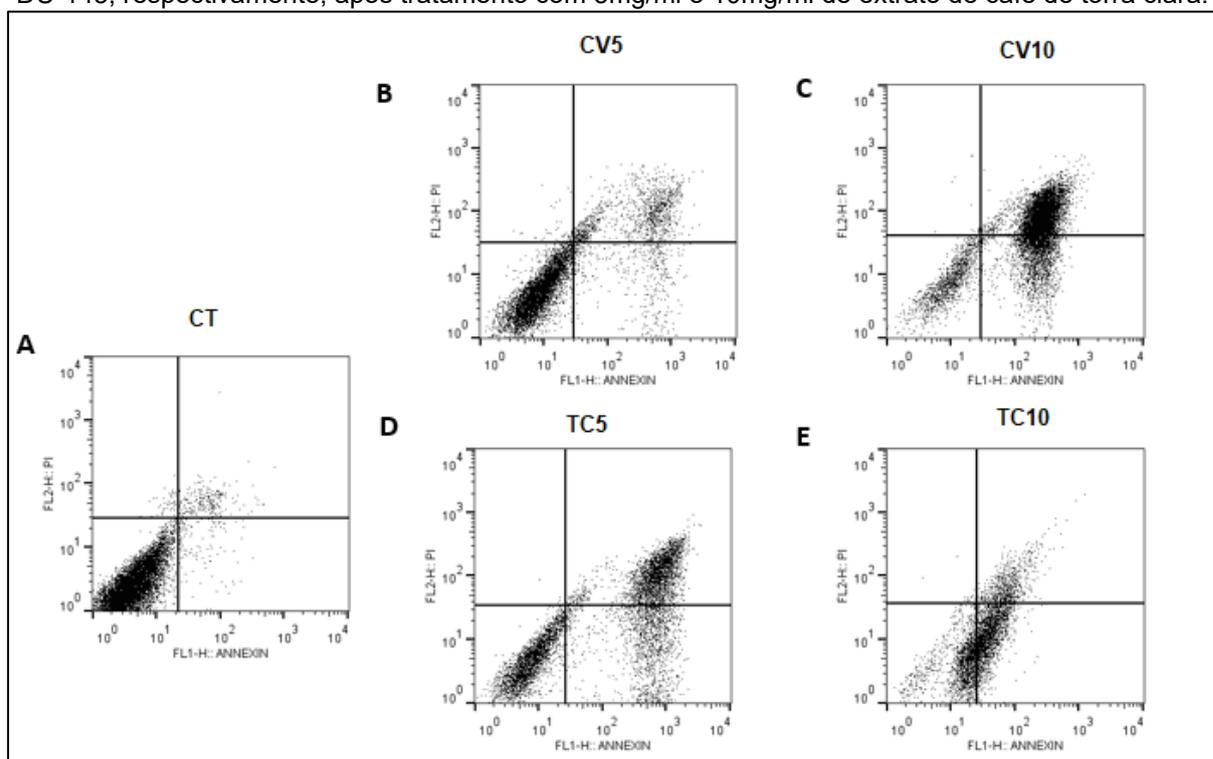


Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, CT: controle. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Asteriscos representam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor

Na Figura 21, A é o controle, B e C são as células DU-145 após tratamento com 5 e 10 mg/ml de CV e D e E são as células DU-145 após tratamento com 5 e 10 mg/ml da TC. Dentre os diferentes extratos de CV e TC testados, tanto CV quanto TC na concentração 10mg/ml foram capazes de causar a maior redução na viabilidade celular ($p < 0,001$). As quatro amostras testadas foram capazes de induzir significativamente a apoptose precoce e tardia em DU-145.

Figura 21 - Indução de apoptose em 48h em células de câncer de próstata DU-145 por diferentes extratos de café arábica verde e torra clara. (A) Células DU-145 de controle. (B e C) Células DU-145, respectivamente, após tratamento com 5mg/ml e 10mg/ml de extrato de café verde. (D e E) Células DU-145, respectivamente, após tratamento com 5mg/ml e 10mg/ml de extrato de café de torra clara.

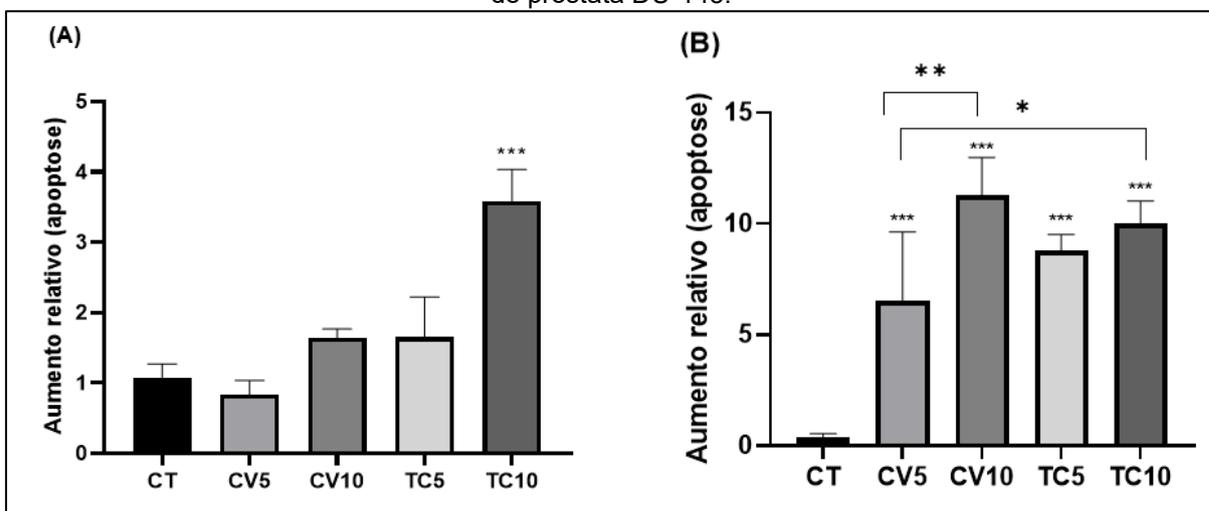


Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, CT: controle. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Asteriscos representam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor

O aumento relativo da apoptose após 48 horas de tratamento com extratos de café arábica verde e torra clara é observado na Figura 22. Em (A), observamos que apenas TC 10mg/ml provocou aumento relativo na apoptose de células PC-3 ($p < 0,0001$). Ao passo que em (B), todas as amostras testadas nas células DU-145 induziram aumento relativo de apoptose com significância de $p < 0,0001$ em comparação com o controle. Sendo CV10 diferente de CV5 ($p < 0,001$) e CV5 diferente de TC10 ($p < 0,05$). De forma geral, os extratos foram mais eficazes em induzir apoptose nas células de câncer de próstata DU-145.

Figura 22 - Aumento da apoptose após tratamento com extratos de café arábica verde e torra clara após 48 horas de incubação. (A) Aumento relativo na indução de apoptose por diferentes extratos de café arábica verde e torra clara em células de câncer de próstata PC-3. (B) Aumento relativo na indução de apoptose por diferentes extratos de café arábica verde e torra clara em células de câncer de próstata DU-145.



Legenda: diferenças significativas entre células não tratadas (controle) e células tratadas com extratos de café foram comparadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$.

Fonte: Próprio autor

5.5 Comparação dos efeitos de extratos de café arábica obtidos por diferentes métodos de extração após incubação com células de câncer de próstata

A Tabela 7 apresenta uma comparação dos efeitos da incubação de extratos de café (5mg/ml) obtidos por diferentes métodos de extração, em células PC-3. Ao comparar as amostras de café arábica obtida por SFE com estudos prévios que utilizaram a extração assistida por ultrassom (UAE) com posterior *spray drying* (SOUZA *et al.*, 2020) e extração assistida por micro-ondas (MAE) (MONTENEGRO *et al.*, 2021) observa-se diferenças significativas nas fases do ciclo celular, viabilidade celular e indução da apoptose. É importante salientar que o estudo de Souza *et al.* (2020) também utilizou o etanol como co-solvente, enquanto Montenegro *et al.* (2021) utilizou a água.

O CV obtido por SFE apresentou redução ($\downarrow 33,1\%$) semelhante no número de células em G_0/G_1 com CV obtido por MAE ($\downarrow 33,8\%$), em relação aos seus respectivos controles, mas superior a mesma concentração de CV por UAE ($\downarrow 21,7\%$). Na fase G_2/M apenas os extratos de CV obtidos por UAE (SOUZA *et al.*, 2020) induziram

redução no número de células ($\downarrow 20,5\%$), porém sem diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao seu controle.

O extrato UAE de TC foi o único que apresentou redução significativa no número de células em G_0/G_1 ($\downarrow 10\%$), enquanto, os extratos SFE de TC foram os únicos capazes reduzir ($p < 0,05$) o número de células na fase S ($\downarrow 32\%$) e G_2/M ($\downarrow 33,6\%$). No entanto, a técnica de UAE (SOUZA *et al.*, 2020) foi a que apresentou resultados mais significativos na redução da viabilidade celular e indução de apoptose em células PC-3 (Tabela 7). Apenas o extrato CV obtido por UAE de café arábica foi capaz de reduzir ($p < 0,05$) a viabilidade celular de PC-3 ($\downarrow 58,6\%$). Ao passo que, o extrato de TC obtido por UAE ($\downarrow 27,2\%$) e por SFE ($\downarrow 12,4\%$) foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular da linhagem PC-3.

Tabela 7 - Comparação do efeito de extratos de café arábica na concentração 5mg/ml obtidos por 3 diferentes métodos de extração em células PC-3.

Ensaio celular	C. arábica obtido por SFE		C. arábica obtido por MAE (MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2021)		C. arábica obtido por UAE (DE SOUZA <i>et al.</i> , 2020)	
	CV	TC	CV	TC	CV	TC
Ciclo celular: G_0/G_1	$\downarrow 33,1\%^*$	$\uparrow 27,7\%$	$\downarrow 33,8\%^{***}$	$\downarrow 10,5\%$	$\downarrow 21,7\%^*$	$\downarrow 10\%^*$
Ciclo celular: S	$\uparrow 18,2\%$	$\downarrow 32\%^*$	$\uparrow 244\%^{***}$	$\uparrow 6,9\%$	$\uparrow 838,2\%^*$	$\uparrow 123,5\%$
Ciclo celular: G_2/M	$\uparrow 15,6\%$	$\downarrow 33,6\%^*$	$\uparrow 54,7\%^{***}$	$\downarrow 5,6\%$	$\downarrow 20,5\%$	$\downarrow 53\%^*$
Viabilidade celular	$\downarrow 0,2\%$	$\downarrow 12,4\%^*$	$\uparrow 0,8\%$	$\uparrow 1,9\%$	$\downarrow 58,6\%^*$	$\downarrow 27,2\%^*$
Apoptose inicial	$\downarrow 56,4\%$	$\downarrow 70,7\%$	$\uparrow 19,6\%$	$\uparrow 191,8\%^{***}$	$\uparrow 2137\%^*$	$\uparrow 946\%^*$
Apoptose tardia	$\downarrow 16,4\%$	$\uparrow 79,4\%^*$	$\uparrow 56,4\%$	$\uparrow 75,7\%^*$	$\uparrow 1507\%^*$	$\uparrow 1514\%^*$
Necrose	$\uparrow 30\%$	$\uparrow 1520\%^*$	$\downarrow 57\%^{**}$	$\downarrow 83\%^{***}$	$\downarrow 55,1\%$	$\uparrow 80,9\%^*$

Legenda: CV: café verde, TC: torra clara; SFE: extração com fluido supercrítico; MAE: extração assistida por micro-ondas; UAE: extração assistida por ultrassom; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Em relação à indução de apoptose em células PC-3, os extratos de CV e TC obtidos por UAE provocaram aumento significativo no número de células em apoptose inicial, $\uparrow 2137\%$ e $\uparrow 946\%$, respectivamente. Apenas o extrato obtido por MAE (MONTENEGRO *et al.*, 2021) de TC induziu aumento na apoptose inicial ($\uparrow 191,8\%$). Semelhantemente, foi observado que ambos os extratos obtidos por UAE (CV: $\uparrow 1507\%$ e TC: 1514%) induziram apoptose tardia ($p < 0,05$), mas apenas os extratos de TC obtido por MAE ($\uparrow 75,7\%$) e por SFE ($\uparrow 79,4\%$) provocaram este efeito. Assim, sugere-se que os extratos obtidos por UAE (SOUZA *et al.*, 2020) foram mais eficazes

na redução da viabilidade celular e indução de apoptose em células de câncer próstata PC-3. Todavia, apenas os extratos aquosos de café obtidos por MAE (MONTENEGRO *et al.*, 2021) foram capazes de reduzir a morte celular por necrose.

Em DU-145, foram comparados os resultados obtidos apenas com o estudo prévio de Montenegro *et al.* (2021) que também analisou esta linhagem celular de câncer de próstata. Os extratos aquosos de café arábica obtidos por MAE (MONTENEGRO *et al.*, 2021) de CV (↓23,4%) apresentaram redução significativa no número de células em G₀/G₁, ao passo que as amostras de café obtidas por SFE não (Tabela 8). A redução no número de células em G₀/G₁ induzidas por CV (↓34,7%) e TC (↓28,6%) obtidos por SFE foram observadas apenas na maior concentração testada (10mg/ml), que não foi avaliada pelo estudo de Montenegro *et al.* (2021).

Ambos os extratos de CV e TC obtidos por SFE e MAE (MONTENEGRO *et al.*, 2021) reduziram significativamente a viabilidade celular e aumentaram a apoptose inicial de DU-145. Mas apenas os extratos obtidos por SFE foram capazes de induzir apoptose inicial em DU-145. Outrossim, apenas o extrato de TC obtido por SFE foi capaz de reduzir o número de células em necrose.

Tabela 8 - Comparação do efeito de extratos de café arábica na concentração 5mg/ml obtidos por 2 métodos de extração em células DU-145.

Ensaio celular	C. arábica obtido por SFE		C. arábica obtido por MAE (MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2021)	
	CV	TC	CV	TC
Ciclo celular: G ₀ /G ₁	↓7%	↑18,2%	↓23,4%***	↓11,8%
Ciclo celular: S	↑53,5%*	↑56,7%*	↑57,6%***	↓12%
Ciclo celular: G ₂ /M	↑39,5%*	↑5,5%	↑9,5%	↑12,6%
Viabilidade celular	↓42,5%*	↓57,8%*	↓18,8%***	↓30,7%***
Apoptose inicial	↑2011%**	↑3072%**	↓40,4%	↓23%
Apoptose tardia	↑1417%**	↑1773%***	↑199,1%***	↑334,5%***
Necrose	↓5,6%	↓59,7%	↑142,1%	↑403%***

Legenda: CV: café verde, TC: torra clara; SFE: extração com fluido supercrítico; MAE: extração assistida por micro-ondas; *p <0,05, **p<0.001, ***p<0,0001.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou os efeitos antioxidantes e antiproliferativos dos extratos supercríticos de café arábica verde e de diferentes tipos de torra em duas linhagens celulares de câncer de próstata, PC-3 e DU-145. O café escolhido para este estudo é a espécie mais consumida e comercializada mundialmente (ICO, 2021).

O perfil de torra nas amostras de café arábica seguiu a escala de Agtron (RABELO *et al.*, 2015) para obtenção do padrão de torra clara, média, escura e italiana. A definição de cor envolve percepção e subjetividade de interpretação, por este motivo, foi utilizado o diagrama CieLab, uma vez que é amplamente usado em pesquisas científicas e pela indústria para padronizar a avaliação das cores (GUIMARÃES, 2018).

A quantificação colorimétrica é realizada em espectrofotômetros ou colorímetros, onde a luz refletida dos objetos é medida em cada comprimento de onda ou em faixas específicas, quantificando os dados espectrais para determinar as coordenadas de cor do objeto, no espaço de cor $L^*a^*b^*$, apresentando a informação em termos numéricos. As características universais de cores são baseadas em três aspectos principais, a luminosidade (L^*) para dizer se a amostra é clara ou escura, e as coordenadas a^* e b^* que se referem às cores primárias: $-a^*$: verde, $+a^*$: vermelho, $-b^*$: azul e $+b^*$: amarelo e, os dados das amostras testadas são colocados no gráfico de forma tridimensional (MANOJLOVIC *et al.*, 2015).

A cor do café é um importante indicador para controlar e verificar a qualidade do processo de torrefação (SAKLAR *et al.*, 2001). Como visto na Tabela 3, o extrato de café verde teve o maior valor de L^* , enquanto os extratos supercríticos de café torrados apresentaram a menor luminosidade. As reduções nos valores de L^* com o aumento do tempo e da temperatura de torrefação podem ser explicadas pela formação de pigmentos marrons em decorrência da reação de escurecimento não enzimático (Reação de *Maillard*) e degradação de fosfolipídios, bem como a oxidação térmica de polifenóis (BUDRYN *et al.*, 2009, PATRAS *et al.*, 2010; BAUER *et al.*, 2018).

A saturação da cor do café indica o processo de escurecimento e é geralmente considerada uma medida indireta do conteúdo de compostos de pigmento produzidos a partir das reações de escurecimento. Dessa forma, a saturação de cor no café pode

ser relacionada aos produtos da reação de *Maillard*, que são compostos de cor marrom com aroma típico e propriedades funcionais, incluindo potencial antioxidante. Portanto, os dados sugerem que a torra leve pode ter a maior atividade antioxidante, e que a progressão da torra promove a degradação de compostos relacionados ao potencial antioxidante da bebida (MEHAYA & MOHAMMAD, 2020).

Apesar do café já ter sido considerado cancerígeno pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), devido a presença de produtos da pirólise do café no processo de torra, como a acrilamida, hidroximetilfurfural, entre outros (IARC, 1991), duas décadas depois, foi observado que o consumo de café em geral não possui efeito carcinogênico, visto que o café apresenta maior teor de substâncias com ação antioxidante que o efeito de espécies reativas de oxigênio (ERO's), que são os principais contribuintes para o estresse oxidativo (LOOMIS *et al.*, 2016).

Na literatura, vários efeitos potencialmente quimiopreventivos e antioxidantes do café têm sido discutidos nos últimos anos, correlacionados principalmente ao conteúdo de compostos fenólicos totais, cafeína, ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) (TVERDAL, 2015, BAUER *et al.*, 2018; MONTENEGRO *et al.*, 2021; NIGRA *et al.*, 2021). Neste contexto, estudos recentes que investigaram o efeito da torra no teor de cafeína e compostos fenólicos no café verde mostraram que a degradação dos compostos fenólicos ocorreu com o processo de torrefação (SOUZA *et al.*, 2020; MONTENEGRO *et al.*, 2021; LICZBINSKI & BUKOWSKA, 2022). Esses resultados estão de acordo com o que foi observado na Tabela 4.

No entanto, ao analisar o teor de cafeína do presente estudo, observou-se uma flutuação no teor desse composto bioativo ao longo do processo de torrefação. O teor de cafeína no extrato de café de torra escura aumentou cerca de 16% e 20%, quando comparado ao extrato de torra clara e ao extrato de torra média, respectivamente (Tabela 4). Essa flutuação no teor de cafeína pode ser explicada pela maior solubilidade da cafeína em água à medida que a temperatura de torrefação aumenta. Além disso, a redução no teor de cafeína, ao comparar o CV com a TC, pode ser atribuída a um arrasto pelo vapor de água liberado da estrutura do grão de café durante a torrefação (BAGGENSTOSS *et al.*, 2008). Portanto, o maior teor aparente de cafeína nas torras mais escuras pode ser decorrente da diminuição do teor de umidade conforme aumenta o tempo de torra (VIGNOLI *et al.*, 2014).

A cafeína é relatada na literatura como uma molécula termoestável, com ponto de fusão de 238°C (MEHAYA & MOHAMMAD, 2020). Este fato foi observado por Kitzberger *et al.* (2014) e Tsai & Jioe (2021), que descreveram a estabilidade da cafeína durante o processo de torrefação em cultivares de café submetidos às mesmas condições de manejo. Portanto, como há perda de massa de compostos termolábeis durante o processo de torra, a cafeína tende a se concentrar no grão (MEHAYA & MOHAMMAD, 2020).

No entanto, pesquisas realizadas tanto com café arábica quanto café robusta observaram uma redução significativa no teor de cafeína dos grãos de café durante o processo de torrefação (KRÓL *et al.*, 2020; BAUER *et al.*, 2018; HECIMOVIC, BELSCAK & HORZIC, 2011). Ao passo que outros autores mostraram que o teor de cafeína não foi afetado pelo grau de torrefação (TFOUNI *et al.*, 2012; JEON *et al.*, 2017; CLARKE *et al.*, 2001; DEBONA *et al.*, 2020). Assim, o efeito da torrefação no nível de cafeína precisa ser mais investigado para determinar claramente a influência da torrefação no teor desse composto bioativo.

Além disso, foi observado que os níveis de ácido cafeico diminuíram significativamente com a progressão do processo de torrefação, assim como foi visto em estudos anteriores (BAUER *et al.*, 2018; MONTENEGRO *et al.*, 2021) e por outros autores (PERRONE, FARAH & DONANGELO, 2012). Portanto, a degradação do ácido cafeico, que é o composto fenólico mais abundante no café verde, pode explicar a redução da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos com a torra e, conseqüentemente, com o aumento da temperatura de torrefação do café (CASTRO *et al.*, 2018).

O processo de torrefação também é capaz de reduzir significativamente o teor total de ácidos clorogênicos dos grãos de café (PERRONE, FARAH & DONANGELO, 2012; BAGCHI; MORIYAMA; SWAROOP, 2017). Moon & Shibamoto (2009) e Nebesny & Budryn (2003) descreveram que mais de 60% dos ácidos clorogênicos são perdidos durante o processo de torra. À medida que a torrefação progride, o ácido clorogênico é convertido em lactona de ácido clorogênico (FARAH *et al.*, 2005).

O 5-CQA é o principal composto de ácido fenólico do café e apresenta funções biológicas de redução de lipídios no sangue, antioxidante e antibacteriana (ASAMENEY *et al.*, 2019). A degradação térmica do 5-CQA durante a torrefação do café leva à formação de compostos fenólicos amargos e compostos fenólicos

aromáticos, ou seja, o 5-CQA participou da formação da cor do café através de sua incorporação no esqueleto das melanoidinas, principal responsável pela pigmentação e amargor do café (PERRONE, FARAH & DONANGELO, 2012; SAUD & SALAMATULLAH, 2021).

No presente estudo, os extratos apresentaram declínio em suas concentrações de 5-CQA com o uso da temperatura, predominando as maiores concentrações desse composto fenólico no café verde (19,37mg/ml) e na torra clara (4,35mg/ml). Esse comportamento está de acordo com o relatado na literatura, que associa a redução dos ácidos clorogênicos e aumento de seus produtos de degradação durante a torrefação (PERRONE, FARAH & DONANGELO, 2012; MEHAYA & MOHAMMAD, 2020; LUDWIG *et al.*, 2014; MOON & SHIBAMOTO, 2009; KRÓL *et al.*, 2020; DEBONA *et al.*, 2020). O estudo de Dawidowicz & Typek (2017) investigou o acúmulo de lactona clorogênica em torno de 170–200°C e observou que o teor de lactona de ácido clorogênico diminuiu em temperaturas acima de 200°C. Assim, a condição de temperatura de torra no presente estudo, em torno de 200°C, pode ter contribuído para que a maior parte do ácido clorogênico nos extratos TC, TM e TE tenha sido convertida em lactona de ácido clorogênico.

Em relação à atividade antioxidante, considerando que nenhum método isoladamente pode refletir o exato "potencial antioxidante total" de uma matriz alimentar devido à complexidade e diversidade de seus compostos bioativos, foram realizados ensaios baseados em diferentes mecanismos de ação (HOU *et al.*, 2004).

Conforme mencionado anteriormente, o extrato de café verde apresentou atividade antioxidante superior aos extratos de grãos de café torrado, em todos os ensaios realizados, o que é consistente com seu maior teor de compostos fenólicos totais. Além disso, o extrato de TC apresentou a maior atividade antioxidante dentre as amostras que foram submetidas à torrefação, devido à menor degradação de compostos bioativos. Estudos prévios também observaram essa redução na atividade antioxidante de acordo com o grau de torra do café (BAUER *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020; MONTENEGRO *et al.*, 2021), além de outros trabalhos na literatura (PERRONE, FARAH & DONANGELO, 2012; DÍAZ, ORMANZA & ROJANO, 2018; FARAH & LIMA, 2019; KRÓL *et al.*, 2020). Essa redução na capacidade antioxidante e no teor de compostos fenólicos pode ser explicada por uma possível degradação do ácido 5-CQA (ABRAHÃO *et al.*, 2010; PERRONE, FARAH & DONANGELO, 2012;

CASTRO *et al.*, 2018), composto fenólico mais abundante no café verde (PERRONE, FARAH & DONANGELO, 2012). Uma vez que o 5-CQA é mais termolábil do que seus isômeros (3-CQA e 4-CQA) (KAMIYAMA *et al.*, 2015).

As análises dos extratos de café pelos métodos de captura de radicais ABTS e DPPH mostraram maior potencial antioxidante quando comparado ao ensaio ORAC, onde foi observado o menor potencial antioxidante. O ORAC é um método mais direto que os demais, pois induz a formação de peróxido, que é instável e se forma no organismo, ao contrário de outros radicais livres (DPPH e ABTS), que são sintéticos e instáveis, sendo considerado por muitos autores, o ORAC, o método que seria mais comparável ao que ocorre no organismo (ALVES *et al.*, 2010; SUCUPIRA *et al.*, 2012; YASHIN *et al.*, 2013).

As amostras supercríticas de café arábica apresentaram maior atividade antioxidante em comparação com estudos prévios, valores superiores de FRAP e teor de fenólicos totais que Souza *et al.* (2020), que utilizou extração assistida por ultrassom (UAE) com posterior *spray-drying* e; superiores de DPPH, ORAC e fenólicos totais que Montenegro *et al.* (2021), que realizou extração assistida por micro-ondas (MAE). Ainda, como esperado, a atividade antioxidante observada em estudos com a espécie *Coffea canephora* foi superior (μmol de Trolox/g) aos encontrados neste trabalho, em todos os métodos empregados (FRAP, DPPH, ORAC, ABTS⁺) (PERRONE, FARAH & DONANGELO, 2012; BAUER *et al.*, 2018).

Em tese, os resultados deste trabalho demonstram que o café verde e a torra clara seriam mais eficazes na prevenção e possivelmente no tratamento do câncer de próstata, corroborando com estudos anteriores (MONTENEGRO *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2020; BAUER *et al.*, 2018), e que observaram redução significativa da viabilidade celular das linhagens PC-3 e DU-145, em 48 horas de incubação, principalmente em amostras de café verde, mesmo em concentrações menores de café arábica e robusta (SOUZA *et al.*, 2020; BAUER *et al.*, 2018), respectivamente. Ainda, Choi, Jung & Ko (2018), em modelo animal, sugerem que o grau de torrefação afeta os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios dos extratos de café. Por estas razões, o CV e a TC foram as amostras escolhidas para realização dos experimentos com células de câncer de próstata.

O câncer de próstata (CaP) é um dos tipos de cânceres mais prevalentes em todo o mundo, e o câncer é uma das doenças mais intensamente estudadas (BRASIL,

2022; SIEGEL *et al.*, 2023). Várias linhagens celulares de câncer foram desenvolvidas e usadas para determinar os mecanismos subjacentes à tumorigênese do câncer e identificar os marcadores de resposta terapêutica, visto que o uso de linhagens de células cancerígenas tem várias vantagens, incluindo capacidade de proliferação infinita e receptividade à triagem de drogas de alto rendimento (NAMEKAWA *et al.*, 2019; CUNNINGHAM & YOU, 2015).

O desenvolvimento inicial do câncer está relacionado a distúrbios na regulação do ciclo celular. Nas células normais, há um ponto de verificação na fase S para identificar a replicação do DNA e confirmar que não há áreas de danos não reparados no DNA de estágios anteriores do ciclo celular. Os *checkpoints* também podem causar o reparo do DNA e regular a progressão do câncer, além de induzir a parada do ciclo celular (VICONTI, DELLA MONICA & GRIECO, 2016). Ao passo que, a proliferação de células cancerosas acontece sem controle devido a perda da capacidade de regular seu ciclo celular e sua taxa de proliferação (SOUZA, 2011).

Neste contexto, os constituintes do café apresentam efeitos quimiopreventivos que são capazes de induzir a apoptose e inibir a atividade angiogênica (NIGRA, TEODORO & GIL, 2021; MONTENEGRO, SILVA & TEODORO, 2022). De acordo com os resultados deste estudo. Portanto, as amostras podem ter promovido o reparo ou, no caso de danos irreparáveis, estimulado a morte celular.

Murad (2013) sugere que os compostos intermediários, produzidos através da isomerização e/ou hidrólise dos ácidos clorogênicos são capazes de modular o ciclo celular e conseqüentemente, induzir apoptose das células incubadas com extratos de café verde e torra clara, onde os ácidos clorogênicos estão mais preservados. Neste contexto, Sadegui *et al.* (2018) e Lodise *et al.* (2019) relataram que os ácidos clorogênicos e seus derivados causam uma redução de células nas fases G₀/G₁ e parada do ciclo celular na fase S em células de câncer de cólon e, em células de câncer de próstata, respectivamente. Portanto, os ácidos clorogênicos são provavelmente os responsáveis pela maior parada do ciclo celular na fase G₀/G₁ no tratamento de PC-3 com CV, em ambas as concentrações testadas e, em DU-145 na maior concentração.

A parada da fase G₂/M no ciclo celular induzido pela TC em ambas as linhagens celulares, sendo que em PC-3 ocorreu nas duas concentrações testadas da TC, pode ter sido promovida pela trigonelina, conhecida por regular esse ciclo e, portanto,

sugere-se ser a responsável pelos resultados observados nessa fase (MOHAMADI *et al.*, 2018).

Ainda, a alteração do ciclo celular induzida pelo café de torra clara pode ter sido causada por outros compostos, visto que grande parte dos ácidos clorogênicos e trigonelina são degradados durante a torrefação (DAWIDOWICZ & TYPEK, 2017). Segundo Debona *et al.* (2020), a trigonelina é degradada na temperatura de 180 a 230°C e para a torra clara foi realizado processamento térmico de 230°C por 12 minutos.

Vale lembrar que durante a torra do café, a condensação da asparagina e dos açúcares redutores forma acrilamida, na reação de *Maillard* (BERTUZZI *et al.*, 2020; SCHOUTEN, TAPPI & ROMANI, 2020). Um estudo realizado por Chen *et al.* (2013) demonstrou que a acrilamida reduziu o número de células na fase G_0/G_1 em astrócitos. Outra substância formada neste processo, é a melanoidina. Marco *et al.* (2011) sugerem que as melanoidinas possuem propriedade anticarcinogênica através da inibição de metaloproteases de matriz. Neste sentido, outros estudos relatam que as melanoidinas são capazes de suprimir a proliferação celular de células cancerígenas *in vitro*, provavelmente devido à inibição da cascata de proteína quinase ativada por mitogênio (MARKO *et al.*, 2002; MARKO *et al.*, 2003). Portanto, as alterações do ciclo celular causadas pelos extratos de TC nas linhagens PC-3 e DU-145, observadas no presente estudo, podem ter sido causadas pelos efeitos da acrilamida e das melanoidinas, que são formadas durante a torrefação dos grãos de café.

Em geral, os resultados foram mais expressivos com o tratamento dos extratos no ciclo celular da linhagem PC-3, em comparação com DU-145. Vale destacar que ambas as linhagens celulares de câncer de próstata têm moderado a alto potencial metastático, no entanto, PC-3 expressa um maior número de genes relacionados à inflamação que foram regulados positivamente na hipóxia com uma resposta mais completa e persistente em células mais agressivas (RAVENA *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2018). Desta forma, os resultados indicam que o extrato de café atuou efetivamente contra células com maior potencial metastático, assim como foi observado nos estudos anteriores (SOUZA *et al.*, 2020; MONTENEGRO *et al.*, 2021) em células PC-3 e DU-145. Ainda, estes resultados corroboram com alguns estudos epidemiológicos que mostraram que o café foi mais eficaz em reduzir o risco de formas

avançadas de CaP que formas localizadas e não agressivas (LU *et al.*, 2014; SHAFIQUE *et al.*, 2012; WILSON *et al.*, 2013).

O café causou redução mais rápida e acentuada na viabilidade celular de DU-145 do que em PC-3, após 48 horas de incubação. Embora, a menção anterior a linhagem celular de câncer de próstata PC-3 ser mais agressiva (RAVENNA *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2018), vale destacar que a linhagem celular de câncer de próstata DU-145 pode ser equivalente a um estágio mais avançado do CaP por ser uma linhagem de metástase cerebral (MONTENEGRO *et al.*, 2021).

Ao comparar os resultados dos extratos supercríticos de café arábica no ciclo celular de PC-3 e DU-145 com os estudos anteriores, que utilizaram extratos obtidos por UAE (SOUZA *et al.*, 2020) e por MAE (MONTENEGRO *et al.*, 2021), foram observadas algumas diferenças. Em PC-3, o CV 5mg/ml obtido por SFE apresentou redução (↓33,1%) semelhante no número de células em G₀/G₁ com CV obtido por MAE (↓33,8%), em relação aos seus respectivos controles, mas superior a mesma concentração de CV por UAE (↓21,7%). Já na concentração de CV 10mg/ml, os extratos obtidos por UAE (SOUZA *et al.*, 2020) foram os mais eficazes em reduzir o número de células em G₀/G₁ (↓40%), comparado com SFE que reduziu apenas 3%. Na fase G₂/M apenas os extratos de CV obtidos por UAE (SOUZA *et al.*, 2020) induziram redução significativa no número de células, em ambas as concentrações testadas (5 e 10mg/ml). Enquanto, os extratos SFE de TC foram os únicos capazes reduzir o número de células na fase S e G₂/M, sendo a redução inversamente proporcional à concentração testada ($p < 0,05$).

Em DU-145, os extratos de café arábica obtidos por MAE (MONTENEGRO *et al.*, 2021) de CV 5mg/ml (↓23,4%) apresentaram redução significativa no número de células em G₀/G₁ e TC 5mg/ml nas fases G₀/G₁ (↓11,8%) e S (↓12%), ao passo que as amostras de café obtidas por SFE não. A redução no número de células em G₀/G₁ induzidas por CV (↓34,7%) e TC (↓28,6%) obtidos por SFE foram observadas apenas na maior concentração testada, 10mg/ml, que não foi avaliada pelo estudo de Montenegro *et al.* (2021).

Os mecanismos de apoptose podem ser ativados por duas vias: extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). De acordo com esses autores, a via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, onde os resultados destes estímulos convergem para a mitocôndria,

principal mediadora de processos apoptóticos, uma vez que permite a permeabilização com a consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas. A presença de compostos capazes de inibir a respiração mitocondrial, podem desencadear a produção de ERO's que promovem o desequilíbrio de processos metabólicos da mitocôndria, levando a célula à apoptose (MARULLO *et al.*, 2013).

Os antioxidantes presentes no café podem induzir efeitos antitumorais diretos, mas também através da ativação de enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase (SOD) e a gama-L-glutamil-L-cisteína sintetase (γ GCS), sendo possível, em diferentes tipos de células, prevenir o dano mitocondrial pelo estresse oxidativo, desempenhando um papel fundamental na apoptose, uma vez que o processo inicial de apoptose está associado à fragmentação mitocondrial de proteínas pró-apoptóticas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; NIGRA *et al.*, 2021).

Alguns autores na literatura têm estudado os mecanismos que o café e seus compostos bioativos induzem a apoptose em células de câncer de próstata (KOLBERG *et al.*, 2016; IWAMOTO *et al.*, 2018; NIGRA, TEODORO & GIL, 2021; MONTENEGRO, SILVA & TEODORO, 2022). Neste contexto, Kolberg *et al.* (2016) observaram que o café foi capaz de aumentar a apoptose e modular a expressão de vários genes relacionados à inflamação em células PC-3 e em xenoinxertos de câncer de próstata; os autores identificaram que o café foi capaz de inibir a atividade de NF- κ B induzida pela ligação do TNF- α ao DNA. Portanto, o extrato de café arábica apresenta potencial terapêutico no câncer de próstata devido aos seus diversos efeitos antioxidante, anti-inflamatório, citotóxico e pró-apoptótico, citados anteriormente (SILVA *et al.*, 2020; MONTENEGRO *et al.*, 2021).

Geralmente, as células de linhagem tumoral tendem a ter uma resistência a processos de apoptose (OKADA & MAK, 2004). No entanto, a cafeína, ácido cafeico, ácidos clorogênicos, cafestol e caveol têm sido descritos como tendo propriedades antimutagênicas, antioxidantes e capacidade de inibir a ação de carcinógenos em estudos que utilizaram modelos animais e culturas de células humanas, indicando que podem ter um papel protetor contra o câncer colorretal, de mama e próstata (LUDWIG *et al.*, 2014; IWAMOTO *et al.*, 2018; BULDAK *et al.*, 2018; BAUER *et al.*, 2018; BARTOLOMEU *et al.*, 2022; HU *et al.*, 2019; MONTENEGRO *et al.*, 2021; NIGRA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2020).

A indução da apoptose e a modulação do ciclo celular podem ser alcançadas pela obtenção da isomerização e hidrólise do 5-CQA (BAUER *et al.*, 2018). Isso pode explicar a maior indução de apoptose observada pelo extrato TC (Tabela 6). No cólon, por exemplo, o 5-CQA pode inativar as ERO's da dieta e, como resultado, ajudar a prevenir câncer de cólon (LUDWIG *et al.*, 2014).

Em linhagens metastáticas de próstata, a cafeína apresentou efeito inibitório na adesão, motilidade e proliferação de células DU-145 e PC-3 (POUNIS *et al.*, 2017). Iwamoto *et al.* (2018), observaram que o acetato de caveol e o cafestol, dois diterpenos presentes no café, induziram a síntese de proteínas relacionados à apoptose e inibiram sinergicamente a proliferação e a migração de células de câncer de próstata de maneira dose-dependente. Ainda, He *et al.* (2003) sugerem que a via envolvendo as caspases, bax e p53 são as possíveis vias pelas quais a atividade biológica mediada pelo café pode ser correlacionada com a regulação do ciclo celular e aumento da atividade pró-apoptótica.

De forma geral, os extratos supercríticos de café arábica foram mais eficazes em induzir o aumento relativo de apoptose nas células de câncer de próstata DU-145 do que em PC-3, visto que ambos os extratos testados, CV e TC, nas concentrações de 5 e 10mg/ml induziram aumento significativo na apoptose de células DU-145; enquanto no tratamento de PC-3 apenas com TC na concentração de 10mg/ml. Estes resultados estão de acordo com estudo prévio de Montenegro *et al.* (2021) que também observaram resultados mais satisfatórios em DU-145. Outro estudo prévio utilizando extratos de café robusta também obteve resultados significativos, na concentração de 5mg/ml de CV e TC, na indução da apoptose de células DU-145 (BAUER *et al.*, 2018). Vale ressaltar, que o café robusta possui teor mais elevado de cafeína e ácidos clorogênicos que o café arábica (DÚRAN *et al.*, 2017), sendo interessante estudos que avaliem os efeitos dos extratos supercríticos de café também na espécie *Coffea canephora*.

Em comparação com outros métodos de extração, os extratos supercríticos de café arábica foram mais eficazes em reduzir a viabilidade celular (↓42,5% com CV5 e ↓75,2% com CV10) e induzir a apoptose (inicial e tardia) do que os extratos de café arábica obtidos por MAE em DU-145 (MONTENEGRO *et al.*, 2021). No entanto, a técnica de UAE (SOUZA *et al.*, 2020) foi a que apresentou resultados mais significativos na redução da viabilidade celular e indução de apoptose em células PC-

3, sendo interessante avaliar se os resultados também seriam superiores na linhagem DU-145.

Apesar dos resultados superiores da UAE na viabilidade celular e apoptose de PC-3, os extratos obtidos por SFE apresentaram maior teor de fenólicos totais. Vale ressaltar que as duas técnicas utilizadas pelos estudos prévios (SOUZA *et al.*, 2020; MONTENEGRO *et al.*, 2021) requerem menor custo de operação. Portanto, apesar dos resultados satisfatórios dos extratos supercríticos do café arábica nas células de câncer de próstata, a viabilidade econômica desta técnica pode ser considerado um fator limitante de sua aplicação, visto que a técnica de UAE (SOUZA *et al.*, 2020) requer uso de equipamento que ocupa menos espaço físico e apresenta custo em torno de 6 vezes menor que a SFE.

No que tange à dados epidemiológicos, coortes elaborados por Kakizaki *et al.* (2013), assim como Shafique *et al.* (2012), Lu *et al.* (2014) e as metanálises de Zhong *et al.* (2014) e Huang *et al.* (2014) sugerem uma associação protetora entre o consumo de café e o risco de desenvolver câncer de próstata. Neste contexto, a revisão elaborada por Buldak *et al.*, (2018) apontou que o consumo habitual de café reduz a concentração plasmática de uma série marcadores de inflamatórios (interleucina-18, selectina-E, proteína C-reativa, adipocinas e IFN- γ). E a revisão de Montenegro, Silva & Teodoro (2022), elucidou alguns dos mecanismos moleculares pela qual o café, os ácidos clorogênicos e os diterpenos, caveol e cafestol, protegem o organismo humano contra danos ao DNA (ativação da via Nrf2/ARE) e pode modular os fatores de transcrição envolvidos na proliferação celular e na angiogênese (inibição da via PI3K/Akt e da via MAPK).

Embora muitos compostos bioativos do café arábica sejam amplamente conhecidos, ainda existem outros pouco estudados, além de estudos que avaliem o efeito sinérgico destes compostos nos extratos de café. Mais estudos são necessários para elucidar o papel do café verde e do café de torra clara, e seus compostos fitoquímicos, no câncer próstata; em especial, estudos de seguimento a esse, em modelo animal, estudos epidemiológicos e ensaios clínicos controlados em humanos para avaliar se os efeitos observados serão mantidos em modelos *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

A saturação de cor no café pode ser relacionada aos produtos da reação de *Maillard*, que são compostos de cor marrom com aroma típico e propriedades funcionais, incluindo potencial antioxidante.

O café arábica possui elevada capacidade antioxidante, mas como esperado, foi observada redução no teor de ácido cafeico e ácidos clorogênicos durante o processo de torrefação dos grãos.

Os extratos de café verde e de torra clara apresentaram maior atividade antioxidante em relação aos extratos de café de torra média e escura, visto que a progressão da torra promove a degradação de compostos relacionados ao potencial antioxidante da bebida.

No ciclo celular, as amostras podem ter promovido o reparo ou, no caso de danos irreparáveis, estimulado a morte celular. O café verde induziu a parada do ciclo celular na fase G_0/G_1 , ao passo que o extrato de torra clara foi capaz de reduzir o número de células nas fases S e G_2/M , em PC-3. Em DU-145, ambos os extratos supercríticos de café só induziram parada do ciclo em G_0/G_1 nas maiores concentrações testadas.

Os extratos supercríticos de café causaram redução significativa da viabilidade celular e aumento da apoptose nas células PC-3 e DU-145, com destaque para o café de torra clara. Os antioxidantes presentes no café podem induzir efeitos antitumorais diretos, mas também indiretos, através da ativação de enzimas antioxidantes endógenas. Sugere-se que a maior concentração de ácidos clorogênicos nos extratos causaria uma maior indução na apoptose.

Ao comparar as linhagens metastáticas de próstata, os extratos foram mais eficazes na redução da viabilidade celular e de induzir a apoptose em DU-145 do que em PC-3. Este fato pode estar relacionado aos efeitos diretos e indiretos dos compostos bioativos degradados e formados no café durante o processo de torrefação, que podem atuar em diferentes vias de sinalização celular destas linhagens.

A técnica de extração utilizada produziu extratos de café arábica com teor de fenólicos totais mais elevado e resultados significativos das amostras de torra clara no ciclo celular de PC-3 e DU-145, em comparação com outras técnicas

instrumentalizadas. Apesar dos resultados satisfatórios na viabilidade celular e apoptose, os resultados observados em PC-3 foram inferiores aos obtidos por UAE, técnica de extração de menor custo testada em estudo prévio. Portanto, a viabilidade econômica desta técnica pode ser considerado um fator limitante de sua aplicação.

Conclui-se que essas amostras supercríticas de café arábica podem ser eficazes na prevenção e tratamento do câncer de próstata, porém, mais experimentos com células são necessários para confirmar essa eficácia e avaliar os mecanismos moleculares envolvidos. Além disso, experimentos em modelo animal e ensaios clínicos são necessários para avaliar se os efeitos se mantêm nos modelos *in vivo* e para determinar doses de recomendação para formulações nutracêuticas na prevenção e tratamento do câncer de próstata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, K. A. *et al.* A review on supercritical fluid extraction as new analytical method. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 345-353, 2008.
- ABRAHÃO, S. A. *et al.* Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010.
- ALAMRI, O. D. *et al.* Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities as well as the renal protective potential of green coffee extract in high fat-diet/streptozotocin-induced diabetes in male albino rats. **Journal of Functional Foods**, v. 71, p. 103996, 2020.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021.
- ALCANTARA, G. M. R. N. *et al.* **Comparação das espécies químicas não voláteis entre cafés especiais e tradicionais**. Orientador: Wanessa Melchert Mattos. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2019.
- ALSAFRA, Z. *et al.* Characterizing the formation of process contaminants during coffee roasting by multivariate statistical analysis. **Food Chemistry**, p. 136655, 2023.
- ALTEMIMI, A. *et al.* Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 42, 2017.
- ALVES, B. H. P. **Análise Química do Aroma e da Bebida de Cafés de Minas Gerais e Espírito Santo em Diferentes Graus de torra**. Orientador: Sérgio Antônio Lemos de Moraes. 2012. 162 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **About Prostate Cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/prostate-cancer/about.html>. Acesso em: 24 mar. 2023.
- ANDRADE, K. S. *et al.* Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, p. 544-552, 2012.
- ANUNCIÇÃO, A. S.; SEVERO, L.; SILVA, D. A. Análise da qualidade do café obtido por torrefação a vácuo. **Revista CSBEA**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2016.

- ASAMENEW, G. *et al.* Comprehensive characterization of hydroxycinnamoyl derivatives in green and roasted coffee beans: A new group of methyl hydroxycinnamoyl quinate. **Food Chemistry: X**, v. 2, p. 100033, 2019.
- ASHIHARA, H. *et al.* Trigonelline and related nicotinic acid metabolites: occurrence, biosynthesis, taxonomic considerations, and their roles in planta and in human health. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 765-798, 2015.
- ASMA, S. T. *et al.* Natural Products/Bioactive Compounds as a Source of Anticancer Drugs. **Cancers**, v. 14, n. 24, p. 6203, 2022.
- ATKINS, P.W. **Físico-Química – Fundamentos**. 3 ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2003.
- AZMIR, Jannatul *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.
- BACELAR JÚNIOR, A. J. *et al.* Câncer de próstata: métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research**, v. 10, n. 3, 2015.
- BAGCHI, D.; MORIYAMA, H.; SWAROOP, A. (Org.). **Green coffee bean extract in human health**. Taylor & Francis, 2017.
- BAGGENSTOSS, J. *et al.* Coffee roasting and aroma formation: application of different time– temperature conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5836-5846, 2008.
- BAKURADZE, T. *et al.* Antioxidant-rich coffee reduces DNA damage, elevates glutathione status and contributes to weight control: results from an intervention study. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 5, p. 793-797, 2011.
- BARBOSA, P.T. *et al.* Controle do grau de torra do grão de café: perda de umidade e composição volátil. In: CIAGRO, 2021. Recife: p. 01-18. **Anais Eletrônicos** [...]. Disponível em: <https://ciagro.institutoidv.org/ciagro2021/uploads/607.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2023.
- BARTOLOMEU, A. R. *et al.* Caffeine and chlorogenic acid combination attenuate early-stage chemically induced colon carcinogenesis in mice: Involvement of oncomiR miR-21a-5p. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6292, 2022.
- BAUER, D. *et al.* Effect of roasting levels and drying process of Coffea canephora on the quality of bioactive compounds and cytotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3407, 2018.
- BERTUZZI, T. *et al.* Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagine and low molecular weight sugars. **Food Chemistry**, v. 303, p. 125372, 2020.

BHARDWAJ, L. *et al.* A review on methodology and application of supercritical fluid technology in pharmaceutical industry. **Der Chemica Sinica**, v. 1, n. 3, p. 183-194, 2010.

BHAVSAR, A. *et al.* Anatomic imaging of the prostate. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

BHUMIRATANA, N.; ADHIKARI, K.; CHAMBERS IV, E. Evolution of sensory aroma attributes from coffee beans to brewed coffee. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2185-2192, 2011.

BOSIRE, C. *et al.* Coffee consumption and the risk of overall and fatal prostate cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. **Cancer Causes & Control**, v. 24, p. 1527-1534, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. **Café no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>. Acesso em: 24 mar. 2023.

_____. **Câncer de próstata: Vamos falar sobre isso?**. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. 3 reimpressão. Rio de Janeiro: Inca, 2019. Disponível em:

https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/cartilha_cancer_prostata_nov2019_3areimp_2022_visualizacao.pdf. Acesso em: 23 mar. 2023.

_____. **INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025**.

Instituto Nacional de Câncer - INCA. 2022. Disponível em:

<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025#:~:text=S%C3%A3o%20esperados%20704%20mil%20casos,cerca%20de%2070%25%20da%20incid%C3%A2ncia>. Acesso em: 23 mar. 2023.

BUDRYN, Grażyna *et al.* Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 913-922, 2009.

BUŁDAK, R. J. *et al.* The impact of coffee and its selected bioactive compounds on the development and progression of colorectal cancer in vivo and in vitro. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3309, 2018.

CAMPOS, R. C. **Propriedades físicas dos grãos de café moca durante o processo de torra e avaliação de qualidade**. Orientador: Paulo Cesar Corrêa. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

CANO-MARQUINA, A.; TARÍN, J. J.; CANO, A. The impact of coffee on health. **Maturitas**, v. 75, n. 1, p. 7-21, 2013.

CAO, S. *et al.* Coffee consumption and risk of prostate cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 2, p. 256-261, 2014.

CAPUZZO, A.; MAFFEI, M. E.; OCCHIPINTI, A. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 7194-7238, 2013.

CARVALHO, C. H. S. de. **Cultivares de café**. Brasília – DF: EMBRAPA, 2007.

CASTRO, A. C. C. M. *et al.* Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 246, p. 48-57, 2018.

CHEN, X. *et al.* Coffee consumption and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **BMJ open**, v. 11, n. 2, p. e038902, 2021.

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

CHOI, S.; JUNG, S.; KO, K. S. Effects of coffee extracts with different roasting degrees on antioxidant and anti-inflammatory systems in mice. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 363, 2018.

CLARKE R.J.; VITZTHUM, O. G. **Coffee**: recent developments. Blackwell Science, Hoboken, 2001.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, M.N.; Wilson, K.C. **Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage**, 1st ed.; Springer: Westport, CT, USA, p. 48–257, 1985.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café**. 2018. Disponível em: http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab_safra2018_n4.pdf. Acesso em: 22 mar. 2023.

COSTA, D. S. da *et al.* Thermal Contaminants in Coffee Induced by Roasting: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 8, p. 5586, 2023.

CUNNINGHAM, D. *et al.* In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. **Journal of Biological Methods**, v. 2, n. 1, p. e17, 2015.

DAWIDOWICZ, A. L.; TYPEK, R. Transformation of chlorogenic acids during the coffee beans roasting process. **European Food Research and Technology**, v. 243, p. 379-390, 2017.

DEBONA, D. *et al.* Avaliação da composição química de café arábica submetido a diferentes perfis de torra. **Revista Ifes Ciência**, v. 6, n. 3, p. 124-133, 2020.

DESHPANDE, S. *et al.* Nutrients in caffeinated beverages—An overview. **Caffeinated and Cocoa Based Beverages**, p. 367-389, 2019.

DÍAZ, O.; ORMAZA, A.; ROJANO, B. Effect of Coffee Roasting (*Coffea arabica* L. var. Castillo) on cup profile, Antioxidant Compound Content and Antioxidant Activity. **INFORMACION TECNOLÓGICA**, v. 29, n. 4, p. 31-42, 2018.

DÍAZ-REINOSO, B. *et al.* Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441-2469, 2006.

DISCACCIATI, A. *et al.* Coffee consumption and risk of localized, advanced and fatal prostate cancer: a population-based prospective study. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 7, p. 1912-1918, 2013.

DURÁN, C. A. A. *et al.* Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 107-134, 2017.

ELIAS, A. M. T. **Perfil físico-químico de Blends de variedades de café em diferentes condições do processo de torrefação**. Orientador: Suzana Pedroza da Silva. 2019. 77f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns. 2019.

ESQUIVEL, P.; JIMENEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food research international**, v. 46, n. 2, p. 488-495, 2012.

FADRI, R. A. *et al.* The effect of temperature and roasting duration on physical characteristics and sensory quality of Singgalang Arabica coffee (*Coffea Arabica*) agam regency. **Journal of Applied Agricultural Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 189-201, 2019.

FAO. **FAOSTAT Online Database**. 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 24 mar. 2023.

FARAH, A. Coffee constituents. **Coffee: Emerging health effects and disease prevention**, v. 1, p. 22-58, 2012.

FARAH, A. *et al.* Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1505-1513, 2005.

FARAH, A.; LIMA, J. de P. Consumption of chlorogenic acids through coffee and health implications. **Beverages**, v. 5, n. 1, p. 11, 2019.

FERNANDES, S. M. *et al.* Caracterização da composição química de grãos de cafés arábica (*Coffea arabica* L.) e Conilon (*Coffea canephora* P.). In: II Simpósio dos

Cafés do Brasil. **Anais eletrônicos** [...] Vitória, 2001. p. 01 - 03. Disponível em: http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1119/155585_Art202f.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 1 mar. 2023.

FERRÃO, M. A. G. *et al.* Qualidade do Café Arábica em Diferentes Altitudes no Espírito. In: VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 2009, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos** [...] Rio de Janeiro, 2009. p. 01 - 03. Disponível em: http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio6/257.pdf. Acesso em: 1 mar. 2023.

FROST-MEYER, N. J.; LOGOMARSINO, J. V. Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 819-830, 2012.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. **Atlas de microscopia** - Café torrado e moído (Coffea sp), FUNED, 2012. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2021/12/ATLAS-FINAL-CAFE.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2023.

GAPSTUR, S. M. *et al.* Coffee consumption and invasive breast cancer incidence among postmenopausal women in the cancer prevention study-II nutrition cohort. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 29, n. 11, p. 2383-2386, 2020.

GARCIA, L. C. M. **Análise de cell free DNA circulante tumoral em células normais da próstata**. Orientador: Vivian Alonso Goulart. 2022. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

GRIVICICH, I. REGNER, A. ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUIMARÃES, D, A.B. **Influência de extratos de café submetidos a diferentes níveis de torra em linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata**. Orientador: Anderson Junger Teodoro. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Centro de Ciências biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

HADDAD, N. F. *et al.* Lycopene and beta-carotene induce growth inhibition and proapoptotic effects on ACTH-secreting pituitary adenoma cells. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e62773, 2013.

HAN, D. *et al.* Cytoprotective effect of chlorogenic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells through PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 14680, 2017.

HANG, D. *et al.* Coffee consumption and plasma biomarkers of metabolic and inflammatory pathways in US health professionals. **The American journal of clinical nutrition**, v. 109, n. 3, p. 635-647, 2019.

HASHIBE, M. *et al.* Coffee, tea, caffeine intake, and the risk of cancer in the PLCO

cohort. **British journal of cancer**, v. 113, n. 5, p. 809-816, 2015.

HASSANPOUR, S. H.; DEGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127-129, 2017.

HE, Z. *et al.* Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. **Cancer research**, v. 63, n. 15, p. 4396-4401, 2003.

HEČIMOVIĆ, I. *et al.* Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. **Food chemistry**, v. 129, n. 3, p. 991-1000, 2011.

HO, K. *et al.* Identification and quantification of bioactive molecules inhibiting pro-inflammatory cytokine production in spent coffee grounds using metabolomics analyses. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 229, 2020.

HOU, D. *et al.* Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2004, n. 5, p. 321, 2004.

HU, G. L. *et al.* The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. **Food & Function**, v. 10, n. 6, p. 3113-3126, 2019.

HUANG, H. *et al.* Supercritical fluid extract of spent coffee grounds attenuates melanogenesis through downregulation of the PKA, PI3K/Akt, and MAPK signaling pathways. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

HUANG, T. *et al.* Coffee consumption and urologic cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. **International Urology and Nephrology**, v. 46, p. 1481-1493, 2014.

IARC. **Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal**. [s.l.] IARC, 1991.

ICO - INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, Coffee Development Report. **The value of coffee – Sustainability, Inclusiveness and Resilience of the Coffee Global Value Chain**, 2020. Disponível em: <https://www.ico.org/documents/cy2020-21/ed-2357e-cdr-2020.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2023.

_____. Coffee Development Report. **The Future of Coffee - Investing in youth for a resilient and sustainable coffee sect.**, 2021. Disponível em: <https://www.ico.org/documents/cy2022-23/coffee-development-report-2021.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2023.

_____. Historical data on the global coffee trade. International Coffee Organization-**Historical Data on the Global Coffee Trade** (ico org), 2018. Disponível em: https://www.ico.org/new_historical.asp. Acesso em: 23 mar. 2023.

IGNACIO, A. H. S. **Identificação e quantificação de acrilamida em grãos de café torrado e moído por análise cromatográfica**. Orientador: Isabel Craveiro Moreira.

2022. 68 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2022.

IWAMOTO, H. *et al.* Coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol synergistically inhibit the proliferation and migration of prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 79, n. 5, p. 468-479, 2019.

JABIR, N. R. *et al.* An insight towards anticancer potential of major coffee constituents. **BioFactors**, v. 44, n. 4, p. 315-326, 2018.

JANDA, K. *et al.* Mineral composition and antioxidant potential of coffee beverages depending on the brewing method. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 121, 2020.

JEON, J. *et al.* Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. **Journal of Chromatography B**, v. 1064, p. 115-123, 2017.

JUNG, S. *et al.* Cellular antioxidant and anti-inflammatory effects of coffee extracts with different roasting levels. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 6, p. 626-635, 2017.

JUSTO, O. R. *et al.* Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, v. 31, p. 1699-1705, 2008.

KAKIZAKI, M. *et al.* Sleep duration and the risk of prostate cancer: the Ohsaki Cohort Study. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 1, p. 176-178, 2008.

KAMIYAMA, M. *et al.* Role of degradation products of chlorogenic acid in the antioxidant activity of roasted coffee. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 7, p. 1996-2005, 2015.

KGATLE, M. M. *et al.* Prostate cancer: epigenetic alterations, risk factors, and therapy. **Prostate Cancer**, v. 2016, 2016.

KHANA VI, M. *et al.* The effect of extraction method on the major constituents and biological effects of *Trachyspermum ammi* L. fruits. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 5, n. 1, p. 55-61, 2018.

KIM, S. Y. *et al.* Association between coffee consumption/physical exercise and gastric, hepatic, colon, breast, uterine cervix, lung, thyroid, prostate, and bladder cancer. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3927, 2021.

KITZBERGER, C. S. G.; DOS SANTOS SCHOLZ, M. B.; BENASSI, M. de T. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. **Food Research International**, v. 61, p. 61-66, 2014.

KLOBITZ, M. G. B. Café, cacau e chá. In Klobitz, Maria Gabriela Bello. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. Rio de Janeiro:

Guanaraba Koogan, 2011.

KOLBERG, M. *et al.* Coffee inhibits nuclear factor-kappa B in prostate cancer cells and xenografts. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 27, p. 153-163, 2016.

KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 209-214, 2005.

KRÓL, K. *et al.* The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. **European Food Research and Technology**, v. 246, p. 33-39, 2020.

KUO, C. A. *et al.* Toona sinensis modulates autophagy and cytokines in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110386, 2020.

KWON, O. K. *et al.* Comparative proteome profiling and mutant protein identification in metastatic prostate cancer cells by quantitative mass spectrometry-based proteogenomics. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 16, n. 4, p. 273-286, 2019.

LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 771-782, 2001.

LAROZE, L. E. *et al.* Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. **European Food Research and Technology**, v. 231, p. 669-677, 2010.

LEE, P. M. Y. *et al.* Associations between coffee products and breast cancer risk: a case-control study in Hong Kong Chinese women. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12684, 2019.

LI, Q. *et al.* Coffee consumption and the risk of prostate cancer: the Ohsaki Cohort Study. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 11, p. 2381-2389, 2013.

LIANG, N.; KITTS, D. D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 16, 2015.

LICZBIŃSKI, Przemysław; BUKOWSKA, Bożena. Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations. **Industrial Crops and Products**, v. 175, p. 114265, 2022.

LIU, H. *et al.* Coffee consumption and prostate cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. **Nutrition and cancer**, v. 67, n. 3, p. 392-400, 2015.

LIVRAMENTO, K. G. do *et al.* Proteomic analysis of coffee grains exposed to different drying process. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1874-1882, 2017.

LODISE, O. *et al.* Inhibition of prostate cancer cells by 4, 5-dicaffeoylquinic acid through cell cycle arrest. **Prostate Cancer**, v. 2019, 2019.

LOOMIS, D. *et al.* Carcinogenicity of drinking coffee, mate, and very hot

beverages. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 7, p. 877-878, 2016.

LÓPEZ-BARRERA, D. M. *et al.* Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. **Food chemistry**, v. 212, p. 282-290, 2016.

LU, Y. *et al.* Coffee consumption and prostate cancer risk: an updated meta-analysis. **Cancer Causes & Control**, v. 25, p. 591-604, 2014.

LUDWIG, I. A. *et al.* Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: what are we drinking?. **Food & function**, v. 5, n. 8, p. 1718-1726, 2014.

LUKITASARI, M.; NUGROHO, D. A.; WIDODO, N. Chlorogenic acid: The conceivable chemosensitizer leading to cancer growth suppression. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 23, p. 2515690X18789628, 2018.

MANOJLOVIC, D. *et al.* Evaluation of staining-dependent colour changes in resin composites using principal component analysis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14638, 2015.

MARCO, L. M. de; FISCHER, S.; HENLE, T. High molecular weight coffee melanoidins are inhibitors for matrix metalloproteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.21, 11417–11423, 2011.

MARKO, D. *et al.* Studies on the inhibition of tumor cell growth and microtubule assembly by 3-hydroxy-4-[(E)-(2-furyl)methylidene]methyl-3-cyclopentene-1,2-dione, an intensively coloured Maillard reaction product. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n.1, 9–18, 2002.

MARKO, D. *et al.* Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro. **Chemical Research in Toxicology**, v. 16, n.1, 48–55, 2003.

MARTINI, D. *et al.* Coffee consumption and oxidative stress: a review of human intervention studies. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 979, 2016.

MARTINS, A. L. **História do café**. Editora contexto, 2008.

MATOS, E. C. *et al.* Atlas de microscopia: café torrado e moído (Coffea sp.). **Belo Horizonte: Funed**, 2012. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2021/12/ATLAS-FINAL-CAFE.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2023.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 185-200, 1996.

MEHAYA, F. M.; MOHAMMAD, A. A. Thermostability of bioactive compounds during roasting process of coffee beans. **Heliyon**, v. 6, n. 11, 2020.

MEIRELES, M. A. A. Extração Supercrítica: Aspectos Técnicos e Econômicos. **Revista Fitos**, v. 2, n. 01, p. 65-72, 2006.

- MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Economical viability of SFE from peach almond, spearmint and marigold. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 4, p. 473-479, 2011.
- MOHAMADI, N. *et al.* A review on biosynthesis, analytical techniques, and pharmacological activities of trigonelline as a plant alkaloid. **Journal of Dietary Supplements**, v. 15, n. 2, p. 207-222, 2018.
- MONTENEGRO, J. *et al.* Bioactive compounds, antioxidant activity and antiproliferative effects in prostate cancer cells of green and roasted coffee extracts obtained by microwave-assisted extraction (MAE). **Food Research International**, v. 140, p. 110014, 2021.
- MOON, J.; YOO, H. S.; SHIBAMOTO, T. Role of roasting conditions in the level of chlorogenic acid content in coffee beans: correlation with coffee acidity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5365-5369, 2009.
- MORAES, R. C. P. **Efeito da torrefação e da granulometria na composição química do café**. Orientador: Luís Carlos Trugo. 2002. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Boca Raton: **CRC Press**, 2000.
- MURAD, L. D. **Efeitos dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico sobre o crescimento e captação celular em células de adenocarcinoma de cólon humano**. Orientador: Anderson Junger Teodoro. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- MURATA, M. Inflammation and cancer. **Environmental health and preventive medicine**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2018.
- NAMEKAWA, T. *et al.* Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells. **Cells**, v. 8, n. 1, p. 74, 2019.
- NASTI, R. *et al.* Valorisation of coffee roasting by-products: Recovery of silverskin fat by supercritical CO₂ extraction. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, p. 6021-6033, 2021.

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

NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 157-163, 2003.

NEHLIG, A. *et al.* Coffee consumption and breast cancer risk: a narrative review in the general population and in different subtypes of breast cancer. **European Journal of Nutrition**, v. 60, p. 1197-1235, 2021.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de Físico-Química**: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NIEBER, K. The impact of coffee on health. **Planta medica**, v. 83, n. 16, p. 1256-1263, 2017.

NIGRA, A. D. *et al.* Antitumor effects of freeze-dried Robusta coffee (*Coffea canephora*) extracts on breast cancer cell lines. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1-16, 2021.

NIGRA, A. D.; TEODORO, Anderson J.; GIL, Germán A. A decade of research on coffee as an anticarcinogenic beverage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

NOGAIM, Q. A. *et al.* Protective effect of Yemeni green coffee powder against the oxidative stress induced by Ochratoxin A. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 142-148, 2020.

NURSTEN, H. **The Maillard Reaction—Chemistry, Biochemistry and Implications**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2005.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

ONG, J. *et al.* Association between coffee consumption and overall risk of being diagnosed with or dying from cancer among > 300 000 UK Biobank participants in a large-scale Mendelian randomization study. **International Journal of Epidemiology**, v. 48, n. 5, p. 1447-1456, 2019.

PAHLKE, G. *et al.* Dark coffee consumption protects human blood cells from spontaneous DNA damage. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 285-295, 2019.

PAIVA, C. L. R. S. *et al.* Consumption of coffee or caffeine and serum concentration of inflammatory markers: A systematic review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 4, p. 652-663, 2019.

PARK, C. *et al.* Coffee consumption and risk of prostate cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. **BJU international**, v. 106, n. 6, p. 762-769, 2010.

PATRAS, A. *et al.* Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010.

PAULA, J. de.; FARAH, A. Caffeine consumption through coffee: Content in the beverage, metabolism, health benefits and risks. **Beverages**, v. 5, n. 2, p. 37, 2019.

PEDROSA, M.L.R.S. **A Importância da Terra do Café: Etapas e Procedimentos do Processo na Indústria**. Orientador: Malu Lima. 2018. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Produção), Faculdade de Ciências Educacionais Capim Grosso, Capim Grosso, 2018.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 340-372, 2010.

PERGOLIZZI, S. *et al.* Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of green coffee beans methanolic extract in rat skin. **Natural Product Research**, v. 34, n. 11, p. 1535-1541, 2020.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 17, p. 4265-4275, 2012.

PIES, G. **Tecnologia supercrítica aplicada à obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos a partir de casca de jabuticaba *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel**. Orientador: Sandra Regina Salvador Ferreira. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

PIETROCOLA, F. *et al.* Coffee induces autophagy in vivo. **Cell Cycle**, v. 13, n. 12, p. 1987-1994, 2014.

PINHEIRO, C. A. *et al.* Physico-chemical properties and sensory profile of *Coffea canephora* genotypes in high-altitudes. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 12, 2019.

PINHEIRO, L.M.B. *et al.*, Extração supercrítica para obtenção de compostos fenólicos: revisão In Figueiredo et al., Inovações em ciência e tecnologia de alimentos III ENAG E CITAG, 2022. **Anais eletrônicos** [...]. Bananeiras: 2022. p. 664-674. Disponível em: <https://agronfoodacademy.com/livro-inovacoes-em-ciencia-e-tecnologia-de-alimentos/>. Acesso em: 24 mar. 2023.

POULSEN, N. B.; LAMBERT, M. N. T.; JEPPESEN, P. B. The effect of plant derived bioactive compounds on inflammation: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 64, n. 18, p. 2000473, 2020.

POUNIS, G. *et al.* Reduction by coffee consumption of prostate cancer risk: evidence from the moli-sani cohort and cellular models. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 1, p. 72-82, 2017.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Checkpoint Controls and Cancer: Volume 2: Activation and Regulation Protocols**, p. 301-311, 2004.

PRIFTIS, A. *et al.* Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 5, p. 7293-7302, 2015.

PRIFTIS, A. *et al.* Cell-specific and roasting-dependent regulation of the Keap1/Nrf2 pathway by coffee extracts. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 6, p. 8325-8331, 2018.

RABELO, M. H. S. *et al.* Sistema CIEL* a* b* e CIEL* c* h°: Avaliação da relação com o sistema de disco AGTRON/SCAA. In: IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 2015, Curitiba. **Anais eletrônicos** [...]. Curitiba, 2015. p. 01-06. Disponível em: http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/3604/189_IX-SPCB-2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 23 mar. 2023.

RAVENNA, L. *et al.* Distinct phenotypes of human prostate cancer cells associate with different adaptation to hypoxia and pro-inflammatory gene expression. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96250, 2014.

RAY, K. Caffeine is a potent stimulator of autophagy to reduce hepatic lipid content—a coffee for NAFLD?. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 10, p. 563-563, 2013.

RINCON, M.A.D. **Fracionamento do Óleo de Café Verde por Destilação Molecular**. Orientador: Rubens Maciel Filho. 2011. 182 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

RIVELLI, D. P. *et al.* Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 215-222, 2007.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre. **Comunicado Técnico on line**, v. 127, p. 0–3, 2007.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução de ferro. **Comunicado Técnico**, v. 125, p. 3–6, 2006.

SADEGHI, M. *et al.* Cancer cachexia: Diagnosis, assessment, and treatment. **Critical Reviews in Oncology/hematology**, v. 127, p. 91-104, 2018.

SAHENA, F. *et al.* Application of supercritical CO₂ in lipid extraction—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 240-253, 2009.

SAKLAR, S.; KATNAS, S.; UNGAN, S. Determination of optimum hazelnut roasting conditions. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, n. 3, p. 271-281, 2001.

SALOMONE, F.; GALVANO, F.; LI VOLTI, G. Molecular bases underlying the hepatoprotective effects of coffee. **Nutrients**, v. 9, n. 1, p. 85, 2017.

SAMOGGIA, A.; RIEDEL, B. Consumers' perceptions of coffee health benefits and motives for coffee consumption and purchasing. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 653, 2019.

SANTOS, J. C. dos. **Extração com fluido supercrítico e suas aplicações na obtenção de produtos naturais**. Orientador: Gilsane Lino von Poser. 2011. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SANTOS, O. V. dos *et al.* Yield, nutritional quality, and thermal-oxidative stability of Brazil nut oil (*Bertolletia excelsa* HBK) obtained by supercritical extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 499-504, 2013.

SARRIÁ, B. *et al.* Regularly consuming a green/roasted coffee blend reduces the risk of metabolic syndrome. **European Journal of Nutrition**, v. 57, p. 269-278, 2018.

SARRIS, A. B. *et al.* Câncer de próstata: uma breve revisão atualizada. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 1, 2018.

SAUD, S.; SALAMATULLAH, A. M. Relationship between the chemical composition and the biological functions of coffee. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7634, 2021.

SCHENKER, S.; ROTHGEB, T. The roast—Creating the Beans' signature. In: **The craft and science of coffee**. Academic Press, 2017. p. 245-271.

SCHMIT, S. L. *et al.* Coffee consumption and cancer risk in African Americans from the Southern Community Cohort Study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17907, 2020.

SCHOUTEN, M. A.; TAPPI, S.; ROMANI, S. Acrylamide in coffee: formation and possible mitigation strategies—a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 22, p. 3807-3821, 2020.

SEN, A. *et al.* Coffee and tea consumption and risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 2, p. 240-250, 2019.

SERRA, A. T. *et al.* Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 184-191, 2010.

SFANOS, K. S. *et al.* The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 1, p. 11-24, 2018.

SHAFIQUE, K. *et al.* Coffee consumption and prostate cancer risk: further evidence for inverse relationship. **Nutrition Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2012.

SHAPOSHNIKOV, S. *et al.* Coffee and oxidative stress: a human intervention study. **European Journal of Nutrition**, v. 57, p. 533-544, 2018.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17-48, 2023.

SILVA, C. W. *et al.* Green coffee extract (*Coffea canephora*) improved the intestinal barrier and slowed colorectal cancer progression and its associated inflammation in rats. **PharmaNutrition**, v. 22, p. 100314, 2022.

SILVA, *et al.* Extração de compostos fenólicos por fluido Supercrítico: revisão de literatura. In Figueiredo et al., Inovações em ciência e tecnologia de alimentos III ENAG E CITAG, 2022. **Anais eletrônicos** [...]. Bananeiras: 2022. p. 348-361
Disponível em: <https://agronfoodacademy.com/extracao-de-compostos-fenolicos-por-fluido-supercritico-revisao-de-literatura/>. Acesso em: 24 mar. 2023.

SILVA, M. de O. *et al.* Obtaining bioactive compounds from the coffee husk (*Coffea arabica* L.) using different extraction methods. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 46, 2020.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SINHA, R. A. *et al.* Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. **Hepatology**, v. 59, n. 4, p. 1366-1380, 2014.

SINKO, P.J. **Martin's physical pharmacy and Pharmaceutical sciences: physical Chemical and biopharmaceutical principles in the Pharmaceutical sciences**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

SONAGLIO, D. *et al.* Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 289-32, 2003.

SOUZA, F. C., **Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p 53 and p16 replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q**. Orientador: Eugênia Costanzi-Strauss. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SOUZA, L. dos S. *et al.* Effect of the roasting levels of *Coffea arabica* L. extracts on their potential antioxidant capacity and antiproliferative activity in human prostate cancer cells. **RSC Advances**, v. 10, n. 50, p. 30115-30126, 2020.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

TAYLOR, L. T. Supercritical fluid extraction. New York: John Wileys & Sons. **Inc, Hoboken, New Jersey, USA**, 1996.

TFOUNI, S. A. V. *et al.* Effect of roasting on chlorogenic acids, caffeine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in two Coffea cultivars: Coffea arabica cv. Catuai Amarelo IAC-62 and Coffea canephora cv. Apoatã IAC-2258. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 2, p. 406-415, 2012.

TOLEDO, P. R. A. B. *et al.* Relationship between the different aspects related to coffee quality and their volatile compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 705-719, 2016.

TORRES, L. M. **Compostos bioativos, ácidos orgânicos, atividade antioxidante e suas correlações com a qualidade da bebida de café arábica**. Orientador: Carlos José Pimenta. 2014. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

TSAI, C.; JIOE, I. P. J. The analysis of chlorogenic acid and caffeine content and its correlation with coffee bean color under different roasting degree and sources of coffee (Coffea arabica typica). **Processes**, v. 9, n. 11, p. 2040, 2021.

TVERDAL, A. Boiled coffee consumption and the risk of prostate cancer: follow-up of 224,234 Norwegian men 20–69 years. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 3, p. 576-579, 2015.

VAN ENGELAND, M. *et al.* Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1998.

VELOSO, T. G. R. *et al.* Effects of environmental factors on microbiota of fruits and soil of Coffea arabica in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14692, 2020.

VICENTE, S. J. V. *et al.* Increase of the activity of phase II antioxidant enzymes in rats after a single dose of coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 10887-10892, 2011.

VIGNOLI, J. A. *et al.* Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279-285, 2014.

VISCONTI, R; DELLA MONICA, R.; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 1-8, 2016.

VITAGLIONE, P.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Coffee, colon function and colorectal cancer. **Food & Function**, v. 3, n. 9, p. 916-922, 2012.

- VOLZ, N. *et al.* Effect of coffee combining green coffee bean constituents with typical roasting products on the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 38, p. 9631-9641, 2012.
- WACHAMO, H. L. Review on health benefit and risk of coffee consumption. **Med. Aromat. Plants**, v. 6, n. 4, p. 1-12, 2017.
- WANG, A. *et al.* Coffee and cancer risk: A meta-analysis of prospective observational studies. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 33711, 2016.
- WANG, S. *et al.* Does coffee, tea and caffeine consumption reduce the risk of incident breast cancer? A systematic review and network meta-analysis. **Public Health Nutrition**, v. 24, n. 18, p. 6377-6389, 2021.
- WILSON, K. M. *et al.* Coffee and risk of prostate cancer incidence and mortality in the Cancer of the Prostate in Sweden Study. **Cancer Causes & Control**, v. 24, p. 1575-1581, 2013.
- WRIGLEY G. **Coffee**. London, Longman, 1988.
- XIA, L. *et al.* Compositional and antioxidant activity analysis of Zanthoxylum bungeanum seed oil obtained by supercritical CO₂ fluid extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 1, p. 23-32, 2011.
- YAO, J. *et al.* Reversing ROS-mediated neurotoxicity by chlorogenic acid involves its direct antioxidant activity and activation of Nrf2-ARE signaling pathway. **BioFactors**, v. 45, n. 4, p. 616-626, 2019.
- YASHIN, A. *et al.* Antioxidant and antiradical activity of coffee. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 230-245, 2013.
- YILMAZ, B.; ACAR-TEK, N.; SÖZLÜ, S. Turkish cultural heritage: a cup of coffee. **Journal of Ethnic Foods**, v. 4, n. 4, p. 213-220, 2017.
- ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Standardized low-cost batch SFE-units for university education and comparative research. In: Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids. **Anais** [...]. Versailles, 2003. p. 577-581.
- ZHANG, Q.; LIN, L.; YE, W. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese Medicine**, v. 13, p. 1-26, 2018.
- ZHONG, S. *et al.* Coffee consumption and risk of prostate cancer: an up-to-date meta-analysis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 3, p. 330-337, 2014.
- ZHONG, Z.; SANCHEZ-LOPEZ, E.; KARIN, M. Autophagy, inflammation, and immunity: a troika governing cancer and its treatment. **Cell**, v. 166, n. 2, p. 288-298, 2016.

APÊNDICE A - INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE TORREFAÇÃO NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E NOS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE CAFÉ ARÁBICA (*COFFEA ARABICA L.*). Nutrição em foco: uma abordagem holística. Vol. 3. Editora Conhecimento livre, 2020. ISBN: 978-65-86072-39-6 | Doi: 10.37423/200601512.

Influência do processo de torrefação na capacidade antioxidante e nos teores de compostos fenólicos totais de café arábica (*Coffea arabica L.*)

Influence of the roasting process on antioxidant capacity and the contents of total phenolic compounds in arabica coffee (*Coffea arabica L.*)

Raquel Bernardo Nana de Castro¹, Júlia Montenegro¹, Rodrigo Gonçalves Gusmão de Souza¹, Isabela Porto Carrero¹, Otniel Freitas Silva², Anderson Junger Teodoro¹.

1 - Núcleo de Alimentos Funcionais, Escola de nutrição, Universidade Federal do estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Av. Pasteur, 296 Urca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP-22290-240.

2 - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro 23020-470

RESUMO

O café é amplamente consumido e possui compostos com efeitos benéficos para a saúde. Porém, o processo de torrefação afeta o conteúdo dos compostos bioativos e compostos indesejados podem ser formados. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e conteúdo de bioativos em diferentes níveis de torrefação de café. Os grãos verdes de *Coffea arabica* foram processados em torra clara, média, escura e italiana, sendo os compostos extraídos por fluido supercrítico. A capacidade antioxidante dessas amostras foi avaliada pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e ORAC. O teor total de compostos fenólicos totais foi analisado pelo método de Folin-Ciocalteu. A quantidade de cafeína e ácido clorogênico (5-CQA) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. Os extratos de café verde e torra clara apresentaram maior capacidade antioxidante. Os teores de compostos fenólicos e ácido clorogênico foram reduzidos significativamente pela ação do calor. O café verde e a torra clara apresentaram maior potencial bioativo sendo formas mais potencialmente benéficas para a saúde de utilização do café.

Palavras chave: café arábica, torrefação, antioxidante.

ABSTRACT

Coffee is widely consumed and has compounds with beneficial health effects. However, the roasting process affects the content of bioactive compounds and unwanted compounds can be formed. Therefore, the aim of the study was evaluating the antioxidant activity and bioactive content at different levels of roasted coffee. The

green beans of *Coffea arabica* were processed in light, medium, dark and italian roasts and the bioactive compounds were extracted by supercritical fluid. The antioxidant capacity of these samples was evaluated using the DPPH, ABTS, FRAP and ORAC methods. Total phenolic compounds were analyzed by Folin-Ciocalteu. Caffeine and chlorogenic acid were measured by HPLC. The extracts of green coffee and light roast showed the highest antioxidant activity. The content of phenolic compounds and chlorogenic acid was degraded due to temperature. Therefore, green coffee and light roast showed greater bioactive potential and are more potentially beneficial to the health of coffee use.

Key Words: arabic coffee, roasting, antioxidant.

INTRODUÇÃO

O café é a terceira bebida mais popular do mundo depois da água e do chá, sendo a segunda commodity mais negociada depois do petróleo. O café arábica é o café mais consumido no mundo, por seu sabor e aroma agradáveis (FARAH, 2012). O Brasil é o maior produtor e exportador de café e segundo maior consumidor da bebida no mundo (CONAB, 2018).

A composição química do café cru é influenciada pela variedade genética, condições ambientais como altitude, temperatura e umidade, e pelo processamento pós-colheita (DÚRAN, 2017). O grão do café (café verde) é composto principalmente de água, carboidratos e fibras, proteínas e aminoácidos livres, lipídios, minerais, ácidos orgânicos, ácidos clorogênicos, trigonelina e cafeína (FARAH, 2012). O café contém também ácidos clorogênicos, responsáveis por grande parte da atividade antioxidante da bebida, com potencial atividade antibacteriana, antiviral e anti-hipertensiva (NAVEED et al, 2018).

Porém, a infusão do café é um processo que produz alteração na composição química, principalmente após sua torrefação, onde compostos originais do grão são degradados e novos compostos são formados garantindo suas características de sabor e aroma (JUNG, 2017). Contudo, os teores de ácidos clorogênicos e de cafeína podem variar dependendo do processo de torrefação aplicado (DIAS; ORMAZA; ROJANO, 2017). O grão do café pode ser processado a diferentes níveis de torrefação, formando cafés de torra clara até cafés de torras mais escuras (FARAH, 2012).

As altas temperaturas observadas na torrefação levam à formação de material polimérico, ligando covalentemente os ácidos clorogênicos e outros componentes do café, como é o caso dos polissacarídeos e proteínas, podendo levar à formação de compostos castanhos de alto peso molecular denominados melanoidinas (NUNES;

COIMBRA, 2001). As melanoidinas possuem atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva (JIMENEZ-ZAMORA; PASTORIZA; RUFÍÁN-HENAREZ, 2015) A acrilamida é subproduto da reação de Maillard, e é uma substância potencialmente prejudicial à saúde, visto que tem sido considerada neurotóxica e carcinogênica (PORTO et al., 2015).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar a capacidade antioxidante e o teor de compostos bioativos (compostos fenólicos, ácido clorogênico e cafeína) no café verde e em diferentes níveis de torra.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria prima

Os grãos de *Coffea arabica* (café Arábica) foram adquiridos de regiões produtoras dos estados do Rio de Janeiro. Tais amostras foram transportadas e armazenadas no Laboratório de Diagnostico Molecular e Micologia da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, RJ.

As amostras de cafés foram processadas nas torras clara (12 minutos à 230°C); média (14 minutos à 240°C), escura (15 minutos à 245°C), e italiana (23 minutos à 250°C), realizadas no torrador Gene café®. Estes níveis de torra são classificados de acordo com a Escala Agtron (RABELO, 2015).

Obtenção dos extratos de café por CO₂ supercrítico

Após a obtenção das amostras de café moído nas torras clara, média, escura e italiana, os extratos de café foram produzidos por método de extração por CO₂ supercrítico, no Conjunto de Extração Supercrítica (modelo BR003F, Fornecedor: MAQNAGUA) no Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) e foram padronizados para os experimentos de atividade biológica. Foram realizadas três repetições para os tratamentos descritos, os quais serão submetidas à todas as análises propostas.

Conforme metodologia descrita por Zetzi, Brunner e Meireles (2003), o vaso do reator, com volume interno de 1L, foi preenchido com 40g de amostra de café arábica verde e café arábica submetido previamente a diferentes processos de torra. Em seguida, foram introduzidos no reator 200 mL de etanol. Posteriormente, o vaso foi aquecido até a temperatura de trabalho de 60°C e, após a estabilização das condições

do sistema, pressurizado com CO₂ até a pressão de trabalho de 100 bar, com auxílio de bomba hidropneumática. A partir de então, foi esperado o tempo da estabilização das condições do sistema e 2 horas para contagem do tempo de residência do material no reator. Após o tempo estipulado, a pressão do sistema foi reduzida, o CO₂ foi pressurizado para retornar ao tanque de armazenamento e o extrato foi coletado via válvula agulha para um recipiente fechado, e armazenado a -8°C em câmara fria.

Determinação de compostos fenólicos totais

A análise de fenólicos totais foi realizada de acordo com o ensaio de Folin-Ciocalteu, (SINGLETON et al., 1965). As alíquotas dos extratos supercríticos de café (250, 500 e 1000 µL) foram pipetadas e repousaram ao abrigo da luz por duas horas e após esse período, foi realizado a leitura em espectrofotômetro na absorvância de 750nm. Os resultados foram comparados com a reação do padrão ácido gálico e expresso em mg de ácido gálico (GAE)/100g de amostra.

Caracterização química dos extratos de café por HPLC

As extrações da cafeína foram realizadas com água quente e clarificadas com soluções de Carrez (TRUGO; MACRAE, 1984). A determinação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com Farah *et al.* (2006).

Os ácidos clorogênicos foram extraídos com metanol aquoso (40%) e clarificados com as soluções de Carrez. Em seguida os extratos foram analisados por CLAE de acordo com o método descrito por Farah *et al.* (2005). Para a determinação de cafeína o método usado foi baseado na extração das metilxantinas por ultrassom e fase móvel, posterior separação cromatográfica por CLAE com coluna C18 e fase móvel acetonitrila/ácido acético, utilizando detector PDA com extração a 280nm e método de padronização externa (PERRONE; DONANGELO; FARAH, 2008).

Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams & Berset (1995). Para avaliação da atividade antioxidante, as amostras em três concentrações em triplicata foram adicionadas para reação com o radical estável DPPH em uma solução de metanol. A redução do radical do DPPH foi medida através da leitura da absorvância a 515 nm

em 30 min de reação. Foi utilizado padrão de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) e a atividade antioxidante foi expressa em μmol de trolox por grama de amostra.

Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante pelo método de FRAP foi determinada de acordo com Rufino *et al.* (2006). Este método baseia-se na quantificação da capacidade de redução do complexo Fe(III)-TPTZ (cor azul clara) para o complexo Fe(II)-TPTZ (cor azul escura) em meio ácido, reação esta que é desencadeada pelo antioxidante presente na amostra. O método consiste em adicionar a 100 μL da amostra e quantificar, em 2,7 mL de reagente FRAP somado a 270 μL de água destilada. Após 30 minutos em banho-maria foi efetuada a leitura de absorbância a 595 nm. A curva padrão foi produzida com uma solução de sulfato ferroso com quatro diluições diferentes. Os resultados foram expressos em μM de sulfato ferroso por grama de amostra.

Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS^{•+}

O método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) foi utilizado como descrito por Rufino *et al.* (2007), O radical ABTS^{•+} é formado por uma reação química com persulfato de potássio. Então, o radical ABTS^{•+} é diluído em etanol até obter uma medida de absorbância de 0,70 ($\pm 0,02$) a um comprimento de onda de 734 nm. Alíquotas com três diferentes volumes em triplicata das amostras reagiram com o radical ABTS^{•+} por 6 min. Uma curva padrão com soluções de Trolox e a atividade antioxidante foi expressa em μmol equivalente de trolox por grama de amostra.

Ensaio ORAC

Este método, mede a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais peroxil que foram gerados por uma fonte radicalar, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado), a 37°C. O radical peroxil, gerado pela reação do com oxigênio atmosférico, reage com a fluoresceína para formar um produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofotometria com máxima emissão de

fluorescência em 575 nm e 578 nm. Concentrações conhecidas de trolox foram usadas para gerar uma curva padrão. A atividade antioxidante das substâncias foi determinada através da diferença entre a área abaixo da curva (AUC) da amostra subtraída pela AUC do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo. Este ensaio expressa o resultado em μmol de trolox equivalentes.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada em excel e no Programa Graph Pad Prism 5.0. Foi feito o teste de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para comparação de médias, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração é um dos processos mais utilizados para obtenção de compostos bioativos, onde um solvente age na estrutura celular do vegetal, retirando o composto de interesse. Entre os métodos mais comuns de extração, estão a maceração e percolação (extração convencional) e as metodologias consideradas como não-convencionais, como a assistida por ultrassom (US), líquido pressurizado (PLE) e fluido supercrítico (SFE). A técnica de extração utilizada foi a extração por fluido supercrítico por apresentar vantagens em relação às técnicas de extração convencionais, como menor degradação dos compostos e não gerar resíduos tóxicos. A figura 1 representa os extratos finais obtidos dos diferentes níveis de torra.

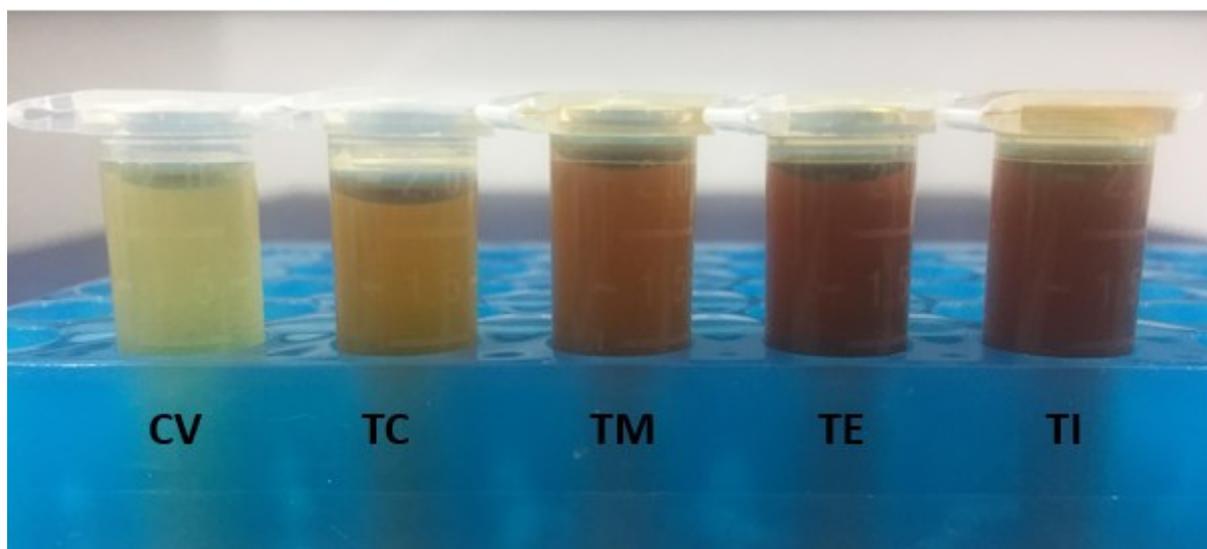


Figura 1. Amostras de café arábica extraídas por fluido supercrítico. Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, TM: torra média, TE: torra escura e TI: torra italiana.

Existem diversos ensaios para avaliar a atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais. Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como substâncias bioativas (CID; DE PEÑA, 2016). Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente, sendo assim, a atividade antioxidante foi avaliada por diferentes métodos, entre eles DPPH, ABTS, FRAP e ORAC (Figura 2).

As análises dos extratos de café pelos métodos da captura do radical ABTS e DPPH apresentaram maior potencial antioxidante quando comparado ao ensaio ORAC, onde foi observado o menor potencial antioxidante. Esse é um método mais direto do que os outros métodos, pois ocorre indução da formação de peróxido, que é instável e é formado no organismo, ao contrário dos outros radicais livres (DPPH e ABTS), que são sintéticos e instáveis, sendo considerado por muitos autores, o método que seria mais comparável ao que ocorre no organismo.

Ao comparar a capacidade antioxidante do café nos diferentes níveis de torra, pode-se observar uma mesma tendência dos resultados entre os métodos utilizados (Figura 2). No geral, a atividade antioxidante do extrato de café verde foi maior quando

comparada aos demais níveis de torra, com diminuição de acordo com o maior grau de torrefação. No método de captura do radical $ABTS^+$ não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os extratos de café verde e torra clara. Essa redução da atividade antioxidante observada de acordo com o grau de torrefação está de acordo com os resultados descritos em outros trabalhos que observaram o mesmo efeito (DEL CASTILLO; AMES; GORDON, 2002; DUARTE et al., 2005; HEČIMOVIĆ et al., 2011; LIANG et al., 2016).

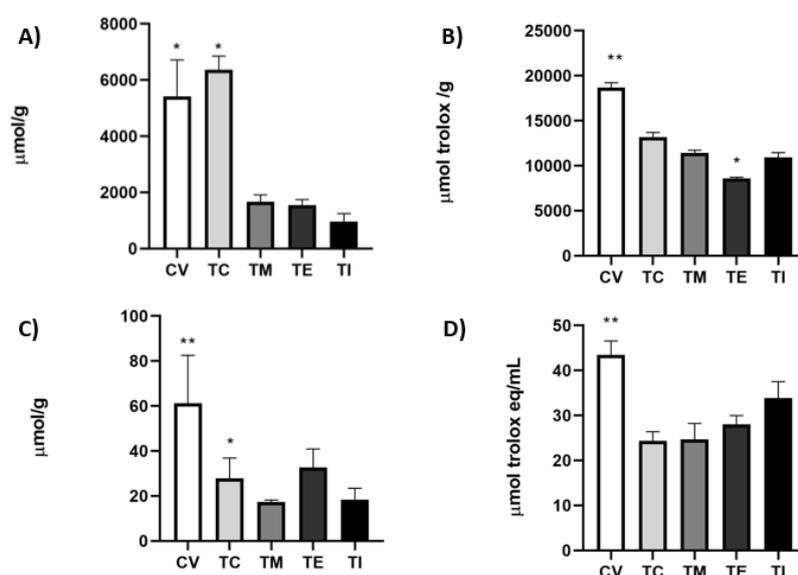


Figura 2. Capacidade antioxidante de extratos de café arábica em diferentes níveis de torra pelos métodos ABTS(A), DPPH(B), FRAP (C) e ORAD (D). Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, TM: torra média, TE: torra escura e TI: torra italiana. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Asteriscos representam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

O processo de torrefação dos grãos de café reduziu significativamente o teor de compostos fenólicos totais (Figura 3), com redução significativa ($p < 0,05$) do extrato de café verde em comparação à torra clara, seguida de nova redução após o aumento da temperatura de torrefação ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os extratos de café das torras média, escura e italiana.

Os dados Tabela 1 indicam que o teor de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) reduziu significativamente ($p < 0,05$) do extrato café verde para a torra clara, com seguidas reduções com aumento da temperatura de torrefação. Esse resultado está em concordância com a literatura, pois já foi observado que o 5-CQA é mais termolábil

do que os seus isômeros (3-CQA e 4-CQA) (KAMIYAMA et al., 2015). A degradação do 5-CQA, que é o composto fenólico em maior abundância no café verde, pode explicar a redução da atividade antioxidante observada e a redução no teor de compostos fenólicos.

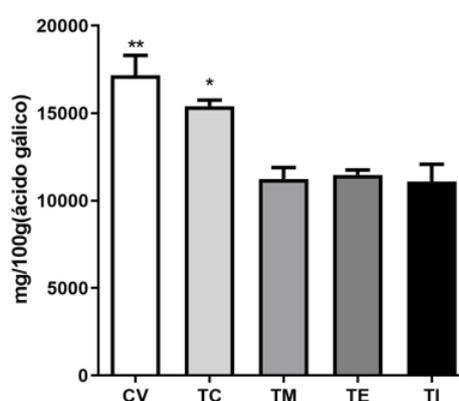


Figura 3. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de café arábica em diferentes níveis de torra extraídos por fluido supercrítico. Legenda: CV: café verde, TC: torra clara, TM: torra média, TE: torra escura e TI: torra italiana. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Tabela 1. Teores de cafeína e 5-CQA nos extratos de café arábica em diferentes níveis de torra

Extratos	Cafeína mg/ml	5-CQA mg/mL
Café verde	80	19,37
Torra clara	59,4	4,35
Torra média	57,4	0,72
Torra escura	69	0,28

Existem diversos compostos nitrogenados não proteicos no grão de café cru, tais como cafeína, teofilina, teobromina e trigonelina. De todos eles, o mais estudado é a cafeína (DÚRAN, 2017). O café possui de 1 a 2,5 % de cafeína, que é o componente mais conhecido por seus efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central, e geralmente é associada a uma melhora no estado de alerta, na capacidade de aprendizado e resistência ao esforço físico (GROSSO et al., 2017). O teor de cafeína não foi tão afetado pela torra quanto o de ácido clorogênico (Tabela 1).

CONCLUSÃO

Os extratos de café analisados apresentaram elevada capacidade antioxidante, independentemente do nível de torrefação, no entanto, os extratos de café verde e da torra clara apresentaram maior atividade antioxidante em comparação com as torras média, escura e italiana. O ácido clorogênico e os compostos fenólicos totais foram degradados durante o processo de torrefação. Os dados aqui apresentados sugerem o uso potencial do extrato aquoso de café verde e de torra clara como potencialmente benéficos à saúde.

REFERÊNCIAS

- BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CID, M. C.; DE PEÑA, M.-P. Coffee: Analysis and Composition. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 225–231, 2016.
- CONAB Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2018, 2018. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe> >. Acesso em 13 jun. 2020.
- DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3698–703, 2002.
- DÍAZ, Félix O.; ORMAZA, Angela M.; ROJANO, Benjamín A. Efecto de la Tostión del Café (*Coffea arabica* L. var. Castillo) sobre el Perfil de Taza, Contenido de Compuestos Antioxidantes y la Actividad Antioxidante. **Información tecnológica**, v. 29, n. 4, p. 31-42, 2018.
- DUARTE, S. M. DA S. et al. Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 387–393, 2005.
- DURAN, C. A. A. et al. Coffee: General Aspects and its Use beyond Drink. **Revista Virtual De Química**, v. 9, n. 1, p. 107-134, 2017.
- FARAH, A. DEPAULIS; TRUGO, T.; LC, MARTIN. PR Formation of Chlorogenic Acids Lactones in Roasted Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1105-1113, 2005.

- FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.
- CHU, Yi-Fang (Ed.). **Coffee: emerging health effects and disease prevention**. John Wiley & Sons, 2012.
- GROSSO, Giuseppe et al. Coffee, caffeine, and health outcomes: an umbrella review. **Annual review of nutrition**, v. 37, p. 131-156, 2017.
- HEČIMOVIĆ, I. et al. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 991–1000, 2011.
- JIMÉNEZ-ZAMORA, Ana; PASTORIZA, Silvia; RUFÍÁN-HENARES, José A. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 12-18, 2015.
- JUNG, Soohan et al. Cellular antioxidant and anti-inflammatory effects of coffee extracts with different roasting levels. **Journal of medicinal food**, v. 20, n. 6, p. 626-635, 2017.
- KAMIYAMA, M. et al. Role of Degradation Products of Chlorogenic Acid in the Antioxidant Activity of Roasted Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 7, p. 1996–2005, 25 fev. 2015.
- LIANG, N. et al. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 213, 2016.
- FENG, Jue et al. Potent Antioxidative Activity of Unripe Fruits of *Garcinia mangostana* L. **Natural medicines**, v. 58, n. 4, p. 156-159, 2004.
- NUNES, F.M. and COIMBRA, M.A., Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted arabica coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2001, 49(4), 1773-1782.
- PORTO, A. C. V. et al. Estimated Acrylamide Intake from Coffee Consumption in Latin America. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, 10(2), 91, 2015.
- RABELO, Mariane Helena Sances et al. Sistema CIEL* a* b* e CIEL* c* h°: Avaliação da relação com o sistema de disco Agrtron/SCAA. 2015.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2006.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

TRUGO, Luiz C.; MACRAE, Robert. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **Analyst**, v. 109, n. 3, p. 263-266, 1984.

ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Standardized low-cost batch SFE-units for university education and comparative research. In: **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**. Versailles, 2003. p. 577-581.

APÊNDICE B – CAFÉ NO DIA A DIA. Editora Conhecimento livre, 1ª ed, 2021.
ISBN: 978-65-89145-69-1 | Doi: 10.37423/2021.edcl229.



Copyright© 2021 por Editora Conhecimento Livre

1ª ed.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Teodoro, Anderson Junger
T328C Café no dia a dia

/ Anderson Junger Teodoro. Raquel Bernardo Nana de Castro. Rodrigo Gonçalves Gusmão de Souza. – Piracanjuba-GO

Editora Conhecimento Livre, 2021

38 f.: il

DOI: 10.37423/2021.edcl229

ISBN: 978-65-89145-69-1

Modo de acesso: World Wide Web

Incluir Bibliografia

1. café 2. antioxidante 3. torrefação 4. bebida I. Teodoro, Anderson Junger II. Castro, Raquel Bernardo Nana de III. Souza, Rodrigo Gonçalves Gusmão de IV. Título

CDU: 613

<https://doi.org/10.37423/2021.edcl229>

O conteúdo dos artigos e sua correção ortográfica são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.

APÊNDICE C – BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ROASTED AND GREEN COFFEE OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION DECREASE SURVIVAL AND INDUCE APOPTOSIS IN PROSTATE CANCER. Revista Observatório de La Economía Latinoamericana. V.9, n.2, p:643-676, 2023. ISSN: 1696-8352.

Bioactive compounds from roasted and green coffee obtained by supercritical fluid extraction decrease survival and induce apoptosis in prostate cancer cells

Os compostos bioativos do café torrado e verde obtidos por extracção de fluidos supercríticos diminuem a sobrevivência e induzem apoptose nas células cancerosas da próstata

Recebimento dos originais: 01/03/2023
Aceitação para publicação: 11/04/2023

Raquel Bernardo Nana de Castro

Master in Microbiology

Institution: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Address: Avenida Pasteur, 296, Urca, UNIRIO, Rio de Janeiro - RJ,
CEP: 22290-240
E-mail: nutricionistaraquelcastro@gmail.com

Carolyne Pimentel Rosado

Doctor of Science

Institution: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Address: Avenida Pasteur, 296, Urca, UNIRIO, Rio de Janeiro - RJ,
CEP: 22290-240
E-mail: carolynerosado@gmail.com

Rodrigo Gonçalves Gusmão de Souza

Bachelor of Nutrition

Institution: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Address: Avenida Pasteur, 296, Urca, UNIRIO, Rio de Janeiro - RJ,
CEP: 22290-240
E-mail: rodrigoggusmao@gmail.com

Luciana de Oliveira Silva

Master in Food and Nutrition

Institution: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Address: Avenida Pasteur, 296, Urca, UNIRIO, Rio de Janeiro - RJ,
CEP: 22290-240
E-mail: lucianadeoliveira.s@gmail.com

Otniel Freitas Silva

PhD in Chemical and Biological Engineering

Institution: Universidade Federal Rural da Amazônia
Address: Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba,
Rio de Janeiro - RJ, CEP: 23020-470
E-mail: otniel.freitas@embrapa.br



Alex Queiroz de Souza

PhD in Chemistry

Institution: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Address: Instituto de Inovação Química Verde Firjan, SENAI, Rua Moraes e Silva, 53,
BLOCO 09, Maracanã, Rio de Janeiro – RJ, CEP: 20271-030

E-mail: aqsouza@firjan.com.br

Antonio Fidalgo Neto

PhD in Teaching in Biosciences and Health

Institution: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Address: Instituto de Inovação Química Verde Firjan, SENAI, Rua Moraes e Silva, 53,
BLOCO 09, Maracanã, Rio de Janeiro – RJ, CEP: 20271-030

E-mail: aaneto@firjan.com.br

Anderson Junger Teodoro

PhD in Food Science

Institution: Universidade Federal Fluminense

Address: UFF, Laboratório de Biologia Celular e Nutrição, Rua Mario Santos Braga,
30, Niterói – RJ, CEP: 24020140

E-mail: atteodoro@gmail.com

ABSTRACT

Prostate cancer is the most frequent and lethal neoplastic disease among men worldwide. There is growing interest in the biologically active compounds in coffee for their potential chemopreventive. The present study aimed to analyze the content of bioactive compounds, the antioxidant and antiproliferative activity of green arabica coffee and different roasts extracted by supercritical fluid. The concentration of caffeine, chlorogenic acid and caffeic acid were evaluated. Additionally, the colorimetric profile, antioxidant capacity, effect on cell viability, cell cycle and apoptosis of the extracts. Caffeine, caffeic acid and chlorogenic acid content were higher in green coffee extract than in roasted coffee (80.0mg/100g, 16.76 and 19.37mg/mL, respectively). The green coffee extract showed higher antioxidant activity and total phenolic content compared to the other coffee extracts by all methods tested; and among the roasted coffee extracts, light roast coffee stands out with the highest antioxidant capacity. After 48 hours of treatment, coffee extracts caused a reduction in the viability of PC-3 cells, with light roast coffee being more effective. Green and light roast coffee extracts induced a cell cycle arrest in the S phase and increased apoptosis. The present results strongly suggest that coffee extracts have an antiproliferative effect on prostate adenocarcinoma cells.

Keywords: coffee, Cancer, prostate.

BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ROASTED AND GREEN COFFEE OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION DECREASE SURVIVAL AND INDUCE APOPTOSIS IN PROSTATE CANCER.

1. INTRODUCTION

Coffee remains the most valuable commodity globally and one of the most consumed beverages (ICO, 2020). Until 2017, 160 million bags of coffee were exported, of which 63.3% were Arabica (*Coffea arabica*) and 36.7% Robusta (*Coffea canephora*). It is estimated that the coffee industry has a worldwide turnover of more than 100 billion dollars, with up to 20 billion dollars involved in exports alone (Janda et al., 2020). Brazil is the largest producer and exporter of coffee and the second largest consumer of the beverage in the world (CONAB, 2018; FAO, 2020).

Coffee is also known to have bioactive properties that are mainly related to its antioxidant capacity (Wachamo, 2017; Naveed et al., 2018). Several studies suggest that coffee consumption helps reduce the risk of several health problems, including Alzheimer's disease, Parkinson's, heart disease, type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome (Bułdak et al., 2018; Sarriá et al., 2018). Regarding the protective effect on the risk of developing prostate cancer, the third leading cause of cancer death in men worldwide, there is evidence that coffee modulates the transcription of cancer-related genes and inflammation due to its phytochemical compounds (Chen et al., 2021). However, despite epidemiological evidence, prostate cancer and its correlation with coffee and the mechanisms by which this protection occurs are still not well understood (Tverdal, 2015; Montenegro et al., 2022).

Several studies have shown that among the substances present in coffee that affect the human body, polyphenols are highlighted, including caffeine, caffeic acid, trigonelline, chlorogenic acid and diterpenes such as cafestol and kahweol (Bułdak et al., 2018; Hu et al., 2019). However, the content of bioactive compounds in coffee depends on many conditions, such as the genetic variety, environment and management, as well as on the modifications induced during post-harvest processing, such as fermentation and degree of roasting (Durán et al., 2017; Jung et al., 2017). Among the steps in the coffee production chain, the roasting process is crucial, as it degrades or forms new compounds, mainly through Maillard reactions, as well as may

be linked to the reduction of bioactive compounds and, possibly, the protective effects (Díaz et al., 2018).

Coffee is consumed worldwide as a beverage, which is usually obtained by percolation and/or infusion methods. The supercritical fluid technique (SFE) emerges as an alternative methodology for coffee extraction, being a process that uses carbon dioxide as an extractor, in which it is neither flammable nor toxic, which means that it does not produce contaminants for the environment. In addition, it can penetrate solid matrices more efficiently when compared to liquid solvents, a technique that has advantages over conventional extraction techniques (Nasti et al., 2021).

To clarify possible associations between coffee consumption and prostate cancer, the present study aimed to evaluate the phytochemical composition and antioxidant properties of arabica coffee extracts, obtained by supercritical fluid, from green coffee and different degrees of roasting, and antiproliferative effects on PC-3 metastatic cell line progression.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

The *Coffea arabica* (*Arabica coffee*) beans were purchased from producing regions in the states of Rio de Janeiro. Such samples were transported and stored at the Laboratory of Molecular Diagnostics and Mycology at EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, RJ.

The coffee samples were processed in light roasts (12 minutes at 230°C); medium (14 minutes at 240°C) and dark (15 minutes at 245°C), carried out in the Gene café® roaster (Bauer et al., 2018; Montenegro et al., 2021; De Souza et al., 2020) These roasting levels are classified according to the Agrtron Scale (Rabelo et al., 2015).

2.2 Obtaining coffee extracts by supercritical CO₂

After obtaining the light, medium and dark coffee samples, the coffee extracts were produced using the supercritical CO₂ generation method, in the Supercritical Extraction Set (model BR003F, supplier MAQNAGUA) at the National Learning Service Industrial (SENAI) and were impressive for biological activity experiments.

According to the methodology described by Zetzi et al. (2003), the reactor vessel, with an internal volume of 1L, was filled with 40g of arabica green coffee sample

and arabica coffee previously submitted to different roasting processes. Then, 200 mL of ethanol were introduced into the reactor. Subsequently, the vessel was heated to a working temperature of 60°C and, after stabilizing the system conditions, pressurized with CO₂ to a working pressure of 100 bar, with the aid of a hydropneumatic pump. From then on, the time for stabilization of the system conditions was expected and 2 hours for counting the residence time of the material in the reactor. After the stipulated time, the system pressure was reduced, the CO₂ was pressurized to return to the storage tank and the extract was collected via a needle valve into a closed container and stored at -8°C in a cold chamber.

2.3 Total Phenolic Content and Antioxidant activity

The total phenolic concentration was determined according to the Folin-Ciocalteu method using gallic acid as the standard. Antioxidant activity was analyzed by various methods, including DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate)), FRAP (ferric reducing antioxidant potential), and ORAC (oxygen radical absorption capacity) assays. Experiments were performed using three concentrations of each coffee extract in triplicate.

2.4 Phytochemical composition

Contents were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC) in a Waters-Alliance 2695 chromatograph, with photodiode array detector (PDA) 2996 and Empower® software (Waters, Massachusetts, USA).

For determination of caffeine content, a BDS Hypersil C18 column (5 cm × 4.6 mm and 2,6 μm - Thermo Scientific, Massachusetts, USA) was used, using the technique of Perrone et al. (2008). The determination of chlorogenic acid (5-CQA) was performed using a BDS Hypersil C18 column (5 cm × 4.6 mm and 2.6 μm – Thermo Scientific, Massachusetts, USA), using the technique of Trugo & Macrae (1984). For caffeic acid content, samples were extracted, with the mobile phase for 10 min in ultrasound and filtered (FHUP 0.45 μm) and injected into the HPLC, using the technique of (Rivelli et al., 2007).

2.5 Cell assays

Prostate adenocarcinoma cell lines PC-3 were kindly provided by the Brazilian National Cancer Institute (INCA). The prostate cell lines were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/ streptomycin and 1% amphotericin, pH 7.4, under 5% CO₂ atmosphere and 37 °C temperature. Controls used in cell assays were the cell lines in the same medium without any extract.

2.5.1 MTT cell viability assay

Cell viability was determined using the MTT (3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay (Mosmann, 1983). The cells were plated in 96-well microplates with 2.0×10^4 cells/ well. Cells were treated with eight distinct concentrations of the samples and then incubated for 24, 48 and 72 h. Ten microliters of MTT solution (5 g/L) were added to each well. After incubation for 4 h, the culture medium was removed and 50 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to solubilize the formazan. Samples were read in an ELISA reader (Bio-Rad iMARK) at 570 nm. Cell viability was calculated in comparison with the control (100%).

2.5.2 Cell cycle analysis

Cells were plated in 6-well microplates with 5.0×10^5 /well. Prostate cancer cells incubated for 48 h in the presence and in absence of the four samples at different concentrations (1,000 μ g/mL and 5,000 μ g/mL) were detached using trypsin solution at 25 °C. The cell suspension was analyzed for DNA content by a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Vindlov's reagent was used, to read 30,000 cells for each replicate (Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004). Cells with lower DNA content than G1 in the cell cycle distribution were considered hypodiploid cells (subG1). Relative proportions of diploid G0/G1 (2n), S (>2n, but < 4n), and G2/M (4n) indicative of DNA content were acquired using Cell Quest iPro. The percentage of cell population in each specific phase was estimated with the FlowJo v 10.0.6 software and compared to the control.

2.5.3 Apoptosis assays

Phosphatidylserine externalization was observed through the Annexin-V assay using the flow cytometry technique (Van Engeland et al., 1998) to indicate the percentage of cells that were probably viable, in apoptosis or non-apoptotic cell death.

Prostate adenocarcinoma cells were incubated in a 6-well microplate using 5.0×10^5 cells/well with the extracts for 48 h. The cells were detached using a trypsin solution, and then the propidium iodide and annexin markers were added. Detection was carried out with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) using the CellQuest iPro software, to count 30,000 cells units/ replicate. The cell populations analyzed were recognized by their forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) properties. Fluorescein isothiocyanate (FITC) green fluorescence was measured at 530 ± 30 nm (FL1 detector) and propidium iodide red fluorescence was measured at 585 ± 42 nm (FL2). The percentage of viable cells, and those cells in early or late apoptosis or non-apoptotic death was calculated using the FlowJo v 10.0.6 software.

2.6 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm Standard Deviation (SD) and statistical differences were determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a post hoc Tukey's test for multiple comparisons. For the analysis of cell cycle and apoptosis assays, were tested 99% and 99.9% of confidence as well. Spearman test were used for correlation analysis for calculations between the content of caffeine, CGA and caffeic acid and the methods for antioxidant activity. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism (version 5.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

3.1 Measurements of colorimetric parameters of coffee extracts

The colorimetric analysis (Table 1) showed that the color of the extracts was different according to the degree of roasting. In the CIE $L^* a^* b^*$ color diagrams, the parameter L^* corresponds to the luminosity, so the values can range from 0 (black) to 100 (white), a^* would be the chromatic coordinate of red (+) to green (-) and b^* , chromatic coordinate from yellow (+) to blue (-). The extract with the highest light intensity from white was from the GC sample, evidenced by the highest L^* value ($42,86 \pm 0,17$).

The a^* and b^* chromatic values were positive in all preparation methods in the different roasting profiles, indicating, respectively, that the drinks had the color intensity red (ranging from +5.83 to +15.71) and yellow (ranging from +4.69 to +24.00). The Chroma c (C^*) and the Hue angle (h^*) correspond, respectively, to the intensity and saturation of the color. Among the analyzed coffee beverages, the values of C^* and h^* are inversely proportional to the degree of roasting; indicating, therefore, that the drinks become, with the progression of roasting, with more opaque and saturated colors ($p < 0.05$).

Table 1. Colorimetric analysis of Arabica coffee supercritical fluid samples by different roasting degree.

Sample s	Colorimetric variables					Digital color	Real color
	L^*	a^*	b^*	C^*	h^*		
GC	42.86±0.17	5.83±0.15	24.00±0.27	24.69±0.25	76.34±0.42		
LRC	34.10±0.05	14.31±0.18	13.11±0.10	19.41±0.21	42.49±0.13		
MRC	31.56±0.16	15.71±0.08	10.47±0.28	18.89±0.09	33.69±0.84		
DRC	27.31±0.29	11.99±0.35	4.69±0.48	12.89±0.17	21.39±2.53		

Data are expressed as mean \pm SD. Means with different letters (a,b) in the same column denote significant differences according Tukey's test at the 5% level.. Abbreviations: GC – green coffee; LRC – light roasted coffee; MRC – medium roasted coffee; DRC – dark roasted coffee.* L , lightness; a^* , Chroma a; b^* , Chroma b; C^* , Chroma c; h^* , Hue angle.

3.2 Phytochemical profile and antioxidant activity of coffee extracts

The caffeine, caffeic acid and chlorogenic acid content (5-caffeoylquinic acid) of coffee extracts obtained by supercritical fluid were presented in this study (Table 2).

The 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) content reduced significantly from the green coffee extract to the light roast (16.76 ± 0.81 to 0.85 ± 0.12 , $p < 0.05$), with subsequent reductions with increase in roasting temperature (Table 2).

The caffeine and chlorogenic acid content are higher in green coffee (80.0 ± 2.20 and 19.37 ± 1.25 mg/mL, respectively). Considering the roasting profiles, the caffeine content increased slightly and reached the highest level in the dark roasting condition (69.0 ± 4.30 mg/mL). Therefore, the effect of roasting on the caffeine level needs to be further investigated to clearly state the influence of roasting on the content of this bioactive compound.

In this research, the light roast extract (LRC) showed a 25.7% reduction in its caffeine level compared to the green bean (GC), while the MRC and DRC extracts had, respectively, a loss of 28% and 13.7%. This fluctuation in caffeine content can be explained by the higher solubility of caffeine in water as the roasting temperature increases.

The chlorogenic acid content, after roasting, showed a decline (Table 2) and reached the lowest level in dark roasted coffee (0.28 mg/mL). The roasting temperature in this work was around 200 °C, suggesting that most of the chlorogenic acid in this experiment was converted to chlorogenic acid lactone.

The profile and concentration of biologically active compounds in coffee beans depend mainly on the degree of roasting, which, in turn, affects the antioxidant activity and chemopreventive character of coffee.

Among the samples of coffee extracts, in relation to the content of total phenolic compounds, the roasting process of coffee beans significantly reduced the content as the roasting temperature increased (Table 2), with the lowest value shown on the GC extract (17.42 ± 1.13 g GAE/100g; $p < 0.05$) compared to LRC extract (15.11 ± 0.35 g GAE/100g; $p < 0.05$), followed by a further reduction after increasing the roasting temperature. There was no statistical difference ($p > 0.05$) between MRC (10.93 ± 0.64 g GAE/100g) and DRC (11.68 ± 0.27 g GAE/100g) extracts.

Antioxidant activity of green coffee and in different roasts were evaluated by DPPH, FRAP, ABTS and ORAC methods (Table 2). When comparing the antioxidant

capacity of coffee at different levels of roasting, one can observe the same trend in the results between the methods used.

Green coffee extract showed the highest antioxidant activity compared to roasted coffee extracts; and among roasted coffee extracts, TC stands out with the highest antioxidant potential.

In DPPH assay, a statistically significant reduction ($p < 0.01$) in the potential antioxidant of GC (18.94 ± 0.52 mmol TE/g) for LRC (13.52 ± 0.53 mmol TE/g) was observed. There was no statistical difference between LRC and MRC (11.13 ± 0.31 mmol TE/g), and DRC (8.17 ± 0.14 mmol TE/g) was significantly lower than LRC and MRC.

According to the FRAP method, antioxidant capacity increased ($p > 0.01$) was observed in GC (61.22 ± 21.31 μ mol FSE/g). No significant difference was observed between LRC (27.81 ± 9.08 μ mol FSE/g), MRC (17.35 ± 0.83 μ mol FSE/g) and DRC (32.66 ± 8.24 μ mol FSE/g).

In the ABTS assay, there was no statistically significant difference between GC (5.16 ± 1.35 mmol TE/g) and LRC (6.50 ± 0.39 mol TE/g) and between MRC (1.03 ± 0.20 mmol TE/g) and DRC (1.57 ± 0.16 mmol TE/g). But GC and LRC have significantly higher antioxidant potential ($p > 0.05$) than MRC and DRC.

As observed with the ORAC assay, antioxidant activity decreased ($p < 0.01$) from GC (43.50 ± 3.06 mmol TE/g). There was no statistically significant difference ($p < 0.01$), according to the progression of the roasting process (LRC, 27.86 ± 2.04 mmol TE/g; MRC, 31.23 ± 3.54 mmol TE/g; and DRC, 25.68 ± 1.97 mmol TE/g).

Table 2. Antioxidant capacity, caffeine content and phenolic compounds of green arabica coffee extracts and at different levels of roasting.

Coffee extracts	Caffeine content (mg/100g)	Phenolic Compounds		Total phenolic content (g GAE/100g)	Antioxidant analysis			
		Caffeic acid content (mg/mL)	Chlorogenic acid content (mg/mL)		DPPH (mmol TE/g)	FRAP (mcmol Fe ₂ SO ₄ /mL)	ABTS (mmol TE/g)	ORAC (mcmol TE/mL)
GC	80.0 \pm 2.2*	16.76 \pm 0.81*	19.37 \pm 1.25**	17.42 \pm 1.13**	18.94 \pm 0.52**	61.22 \pm 21.31**	5.16 \pm 1.35*	43.50 \pm 3.06**
LRC	59.4 \pm 3.6	0.85 \pm 0.12	4.35 \pm 0.36*	15.11 \pm 0.35*	13.52 \pm 0.53	27.81 \pm 9.08*	6.50 \pm 0.39*	27.86 \pm 2.04
MRC	57.6 \pm 1.5	2.23 \pm 1.20	0.72 \pm 0.15	10.93 \pm 0.64	11.13 \pm 0.31	17.35 \pm 0.83	1.03 \pm 0.20	31.23 \pm 3.54
DRC	69.0 \pm 4.3	0.98 \pm 0.32	0.28 \pm 0.08	11.68 \pm 0.27	8.17 \pm 0.14*	32.66 \pm 8.24	1.57 \pm 0.16	25.68 \pm 1.97

Results are expressed as mean \pm standard deviation; Values were compared using the One-way ANOVA test, with Tukey's post-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$). Same letters mean significantly different. Abbreviations: GC – green coffee; LRC – light roasted coffee; MRC – medium roasted coffee; DRC – dark roasted coffee.

3.3 Bioactive compounds from coffee extracts promote cytostatic effects on prostate cancer cells

In this study, we evaluated the effect of supercritical coffee extracts on PC-3 cells. The effect of supercritical coffee extracts on the PC-3 cell cycle after 48 hours of incubation are presented in Table 3. No statistical difference was observed in the number of cells when compared to the control in subG1. The GC samples induced a reduction of cells right at the beginning of the cell cycle, in G0/G1, at concentrations of 5mg/ml (40.57% \pm 5.58) and 10mg/ml (58.83% \pm 6.52), while in the LRC they induced an increase in cells ($p < 0.001$) in the G0/G1 phase, at concentrations of 5mg/ml and 10mg/ml, with an increase in the percentage of cells of 77.43% \pm 1.96 and 77.37% \pm 1.86, respectively. In phase S, only LRC at 5mg/ml (6.29% \pm 0.69) and 10mg/ml (5.60% \pm 2.11) showed a significant reduction in the percentage of cells. And, in G2/M, the LRC was also the only sample that showed a significant reduction in 5mg/ml (5.7% \pm 2.03) and 10mg/ml (5.57% \pm 1.34), when compared to the untreated PC-3 cells.

Table III. Effect of coffee arabic extracts on cell cycle progression and on apoptosis in PC-3 cells after 48 hours.

Samples	Concentration	SubG1	G0/G1	S	G2/M
Control	-	1.45 \pm 0.43	60.63 \pm 1.93	9.25 \pm 1.33	8.59 \pm 0.30
GC	5mg/ml	0.04 \pm 0.00	40.57 \pm 5.58 *	10.93 \pm 1.48	9.93 \pm 0.38
GC	10mg/ml	0.04 \pm 0.01	58.83 \pm 6.52*	10.94 \pm 1.13	8.87 \pm 0.29
LRC	5mg/ml	0.35 \pm 0.16	77.43 \pm 1.96**	6.29 \pm 0.69*	5.70 \pm 2.03*
LRC	10mg/ml	0.19 \pm 0.05	77.37 \pm 1.86**	5.60 \pm 2.11*	5.57 \pm 1.34*

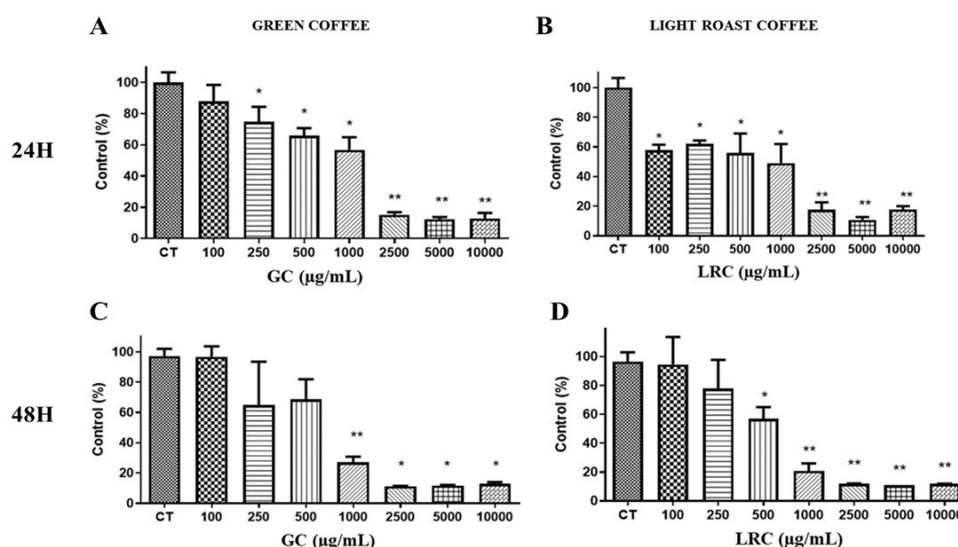
Results are expressed as a percentage of total cells. Significant differences between untreated cells (Control) and cells treated with coffee extracts were compared (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$). Abbreviations: GC – green coffee; LRC – light roasted coffee; MRC – medium roasted coffee; DRC – dark roasted coffee.

3.4 Bioactive compounds from coffee extracts reduce viability and induce apoptosis on prostate cancer cells

The cytotoxic effects of supercritical coffee extracts were evaluated through the metabolization of the MTT salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) into formazan by the mitochondrial enzymes of PC malignant cells -3.

In Figure 1 presents observed in 24 hours, all GC concentrations, exception of 100µg/ml, showed a significant reduction in cell viability in PC-3 cells. GC showed a significant reduction at concentrations 250, 500 and 1000µg/ml ($p < 0.05$), and, at concentrations 2500, 5000 and 10000µg/ml a reduction with statistical significance of $p < 0.001$. While, in 48 hours, GC showed a significant reduction only at the 1000µg/ml concentration ($p < 0.001$) and a statistically significant reduction at $p < 0.05$ at 5000 and 10000µg/ml.

Figure 1: Viability of PC-3 cells treated with different concentrations of extracts of green (GC) and light roast (LRC) arabica coffee extracts was tested by the MTT assay. Significant differences between untreated cells (control) and cells treated with coffee extracts were compared * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.



The LRC extract, in 24 hours, induced a reduction in the cell viability of PC-3 cells in all tested concentrations. There was a statistical significance of $p < 0.001$ at the highest concentrations (2500, 5000 and 10000µg/ml). In 48 hours, LRC was able to reduce the cell viability of PC-3 cells at the five highest concentrations tested. There was a statistically significant reduction of $p < 0.001$ at concentrations 1000, 2500, 5000 and 10000µg/ml.

The effects of the different coffee extracts on the PC-3 cell line undergoing apoptosis are shown in Table 4. There was a significant reduction in the number of

viable cells when compared to the control, this reduction occurred in GC 10mg/ml (89%±0.7) and LRC 5mg/ml (82.48%±0.66), and a greater reduction was observed at LRC 10mg/ml (75.93%±2.58). Only, GC 10mg/ml showed a significant increase in cell number during early apoptosis (5.6%±1.78). In late apoptosis, it was shown that there was a significant increase in the number of cells in LRC 5mg/ml (10.64%±2.83), and a more expression increase with 10mg/ml (23.18%±2.77). In the necrosis process, only LRC 5mg/ml showed a significant increase in cells (6.48%±3.29).

Table 4. Effect of coffee arabic extracts on apoptosis in PC-3 cells after 48 hours.

Samples	Concentration	Viable cells	Early apoptosis	Late apoptosis	Necrosis
Control	-	94.13 ± 2.34	1.33 ± 0.78	5.93 ± 3.13	0.40 ± 0.23
GC	5mg/ml	93.95 ± 0.96	0.58 ± 0.23	4.96 ± 0.37	0.52 ± 0.33
GC	10mg/ml	89.00 ± 0.70*	5.60 ± 1.78**	5.38 ± 1.18	0.03 ± 0.02
LRC	5mg/ml	82.48 ± 0.66*	0.39 ± 0.67	10.64 ± 2.83*	6.48 ± 3.29*
LRC	10mg/ml	75.93 ± 2.58**	0.76 ± 0.74	23.18 ± 2.77**	0.13 ± 0.07

Results are expressed as a percentage of total cells. Significant differences between untreated cells (Control) and cells treated with coffee extracts were compared (*p < 0.05; ** p < 0.001). Abbreviations: GC – green coffee; LRC – light roasted coffee; MRC – medium roasted coffee; DRC – dark roasted coffee.

In Figure 2, A is the control, B and C are the PC-3 cells after treatment with 5 and 10 mg/ml of GC, and, D and E are the PC-3 cells after treatment with 5 and 10 mg/ml of LRC. Among the different extracts of GC and LRC tested, LRC 10mg/ml was able to cause the greatest reduction in cell viability (p<0.001). GC 10mg/ml was the concentration that most induced early apoptosis (p<0.001), while LRC 10mg/ml, late apoptosis (p<0.001). And only LRC 5mg/ml induced necrosis (p<0.05).

Figure 2: Induction of apoptosis within 48h in PC-3 prostate cancer cells by different extracts of green and light roast arabica coffee. (A) Control PC-3 cells. (B and C) PC-3 cells, respectively, after treatment with 5.000 and 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ green coffee extract. (D and E) PC-3 cells, respectively, after treatment with 5.000 and 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ light roast coffee extract.

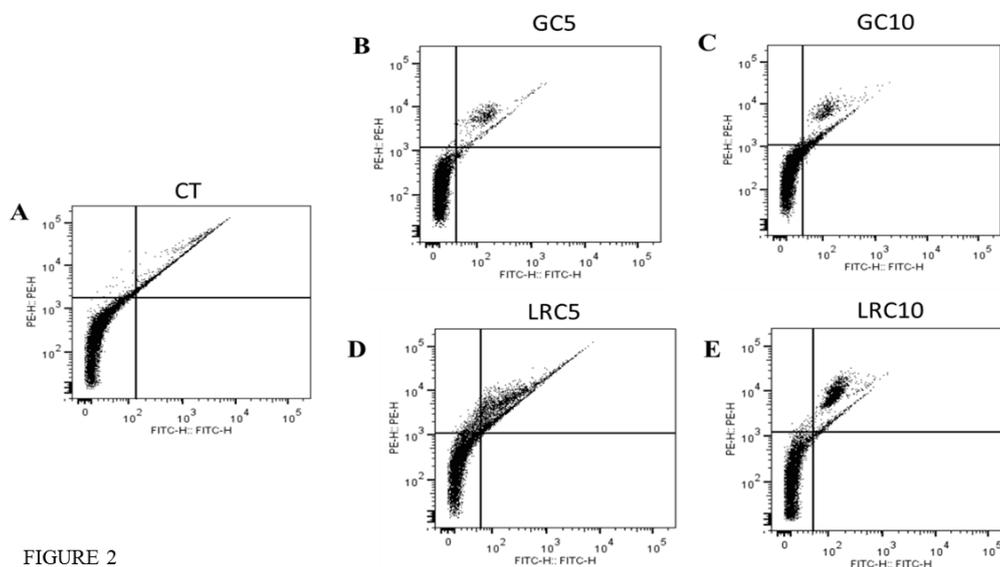
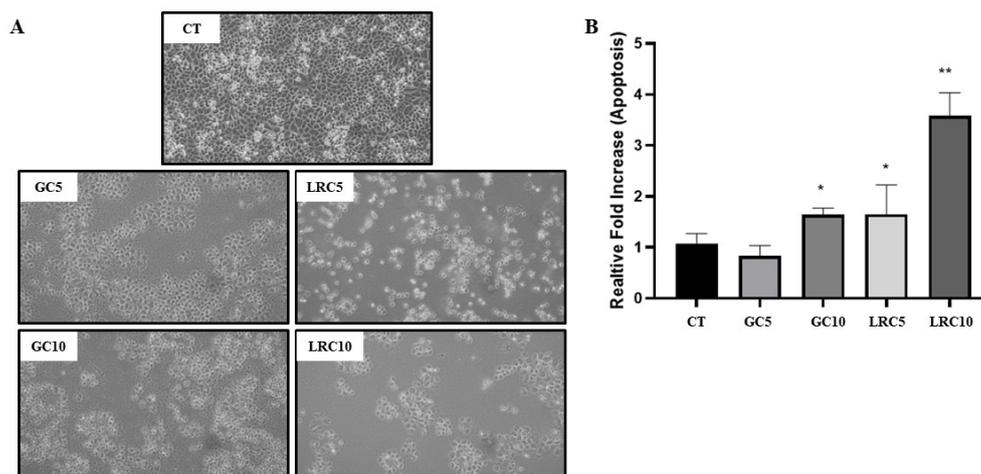


FIGURE 2

The relative fold increase in apoptosis after treatment with green and light roast arabica coffee extracts is observed in Figure 3. In (A), microscopic images of control PC-3 cells (CT), treated with 5mg/ml of extract of green coffee (GC5), 10mg/ml of green coffee extract (GC10), 5mg/ml of light roast coffee (LRC5) and 10mg/ml light roast coffee extract (LRC10). In the images, it is possible observe the reduction in the number of PC-3 cells in GC10, LRC5 and LRC10, confirming with the graph presented in (B), which indicates the increase in significant relative fold apoptosis in GC10 and LRC 5 ($p < 0.05$) and with statistical significance of $p < 0.001$ in LRC10.

Figure 3: Increase in apoptosis after treatment with green and light roast arabica coffee extracts. (A) Microscope images showing PC3 prostate cancer cells of Control [CT], treated with 5000 µg/mL green coffee extract [GC5], treated with 10.000 µg/mL green coffee extract [GC10], treated with 5.000 µg/mL light roast coffee extract [LRC5] and treated with 10.000 µg/mL light roast coffee extract [LRC10]. (B) Relative increase in apoptosis induction by different green and light roast arabica coffee extracts in PC-3 prostate cancer cells. Significant differences between untreated cells (control) and cells treated with coffee extracts were compared *p < 0.05; ** p<0.001.



4. DISCUSSION

Color of coffee is an important indicator for controlling and ascertaining the quality of the coffee roasting process (Saklar et al., 2001). Reductions in L^* values with increasing roasting time and temperature may be due to the formation of brown pigments through non-enzymatic browning (Maillard reaction) and degradation of phospholipids, as well as thermal oxidation of polyphenols (Budryn et al., 2009, Patras et al., 2010).

Coffee color saturation indicates the browning process and is generally considered an indirect measure of the content of pigment compounds produced from browning reactions. In this way, color saturation can be related in coffee to the products of the Maillard reaction, which are brown colored compounds with a typical aroma and functional properties, including antioxidant potential. Therefore, the data suggest that light roasting may have the highest antioxidant activity, and that the progression of roasting promotes the degradation of compounds related to the beverage's antioxidant potential (Mehaya & Mohammad, 2020).

Several potentially chemopreventive and antioxidant effects of coffee have been discussed in the literature, correlated mainly to the content of total phenolic compounds, caffeine, caffeic acid and 5-caffeoylquinic acids (Tverdal, 2015, (Bauer et al., 2018; Montenegro et al., 2021; Nigra et al., 2021).

Recent studies that investigated the effect of roasting on the caffeine content and phenolic compounds in green coffee showed that degradation of phenolic compounds occurred with the roasting process (de Souza et al., 2020; Liczbinski & Bukowska, 2022). These results are in line with what was observed in this study.

However, when analyzing the caffeine data from the present study, a fluctuation in the content of this bioactive compound was observed throughout the roasting process. Since the caffeine content in the dark roast coffee extract increased by about 16% and 20%, respectively, when compared to the light roast and medium roast extract (Table 2). This fluctuation in caffeine content can be explained by the greater solubility of caffeine in water as the roasting temperature increases. Furthermore, the reduction in caffeine content can be attributed to a drag by water vapor released from the coffee bean structure during roasting (Baggenstoss et al., 2008). Therefore, the higher apparent caffeine content in darker roasts (Table 2) may be due to the decrease in moisture content as the roasting time increases (Vignoli et al., 2014)

Caffeine is reported in the literature as a thermostable molecule, with a melting point of 238 °C (Mehaya & Mohammad, 2020). This fact was observed by Kitzberger et al. (2014) and Tsai & Jioe (2021), who described the stability of caffeine during the roasting process in coffee cultivars subjected to the same management conditions. Therefore, as there is a mass loss of thermolabile compounds during the roasting process, caffeine tends to concentrate in the grain (Mehaya & Mohammad, 2020). However, research has observed a significant reduction in the caffeine content of coffee beans during the roasting process (Król et al., 2020). Thus, the effect of roasting on caffeine level needs to be further investigated to clearly state the influence of roasting on the content of this bioactive compound.

Also in our study, it was observed that caffeic acid levels decreased significantly with the roasting process and its progression (Table 2), in line with previous studies

(Bauer et al., 2018; Montenegro et al., 2021). Therefore, the degradation of caffeic acid, which is the most abundant phenolic compound in green coffee, may explain the reduction in antioxidant activity and the content of phenolic compounds with roasting and, consequently, with the increase in coffee roasting temperature (Castro et al., 2018).

Research indicates that, as roasting progresses, chlorogenic acid is converted to chlorogenic acid lactone (Farah et al., 2005). In our study, the extracts showed a decline in their chlorogenic acid concentrations with the use of temperature, predominating the highest concentrations of this phenolic compound in the green bean (19.37 mg/mL) and in the light roasted (4.35 mg/mL). This behavior is consistent with what has been reported in the literature, which associates the consumption of chlorogenic acids and their degradation products during roasting (Mehaya & Mohammad, 2020; Ludwig et al., 2014; Moon & Shibamoto, 2009). A study by Dawidowicz & Typek (2017) investigated the accumulation of chlorogenic lactone around 170–200°C and observed that the chlorogenic lactone content decreases at temperatures above 200°C. Thus, the roasting temperature condition in the present study, around 200°C, may have contributed to the fact that most of the chlorogenic acid in the LRC, MRC and DRC extracts was converted into chlorogenic acid lactone.

Regarding antioxidant activity, considering that no single method can reflect the exact "total antioxidant potential" of a food matrix due to the complexity and diversity of its bioactive compounds, we used assays based on different mechanisms of action (Hou et al., 2004). As mentioned, the green coffee extract showed superior antioxidant activity than the roasted coffee bean extracts, in all methods tested, which is consistent with its higher caffeine content and phenolic compounds. In addition, the LRC extract showed the highest antioxidant activity among the samples that were submitted to roasting, due to the degradation of bioactive compounds. Previous studies (Bauer et al., 2018; Silva et al., 2020; Montenegro et al., 2021) and other authors (Díaz et al., 2018; Farah & Lima, 2019) also observed this reduction in antioxidant activity according to the degree of coffee roasting.

Furthermore, this reduction in antioxidant capacity and content of phenolic compounds can be explained by a possible degradation of 5-CQA acid (Abrahão et al., 2010; Castro et al., 2018), the most abundant phenolic compound in green coffee.

Since, 5-CQA is more thermolabile than its isomers (3-CQA and 4-CQA) (Kamiyama et. al.; 2015).

Analyzes of coffee extracts by radical capture ABTS and DPPH methods showed higher antioxidant potential when compared to the ORAC assay, where the lowest antioxidant potential was observed. ORAC is a more direct method than the others, as it induces the formation of peroxide, which is unstable and is formed in the body, unlike other free radicals (DPPH and ABTS), which are synthetic and unstable, being considered by many authors, the method that would be most comparable to what occurs in the organism (Alves et al., 2010; Sucupira et al., 2012; Yashin et al., 2013).

In general, the antioxidant activity of the light roast was slightly higher than the green bean sample and then the antioxidant activity decreased with the highest degree of roasting, corroborating with results described in other works in the literature (Del Castilho et al., 2002; Duarte et al.; 2005; Hecimovic et al., 2011; Bauer et al., 2018; Liang et al., 2016; Mehaya & Mohammad, 2020; De Souza et al., 2020).

These results demonstrate that green coffee and light roasting would be more effective in preventing and possibly treating prostate cancer and are in line with previous studies (Montenegro et al., 2021; De Souza et al., 2020; Bauer et al., 2018), who observed a significant reduction in the viability of the PC-3 strain in 48 hours, mainly in green coffee samples, even at lower concentrations (De Souza et al., 2020; Bauer et al., 2018).

During to Maillard Reation, the condensation of asparagine and reducing sugars forms acrylamide during coffee roasting (Bertuzzi et al., 2020; Schouten, Tappi & Romani, 2020). The cell cycle alterations caused by GC and LRC extracts in the PC-3 cell line, observed in the present study, may have been caused by the effects of acrylamide. Still, the arrest of the G2 phase in the cell cycle can be promoted by trigonelline, which is also known to regulate this cycle, therefore, this substance may have been responsible for the results observed in this phase (Mohamadi et al., 2018).

The early development of cancer is related to disturbances in cell cycle regulation, as there is a checkpoint in the S phase to identify DNA replication and it confirms that there are no areas of unrepaired DNA damage from earlier stages of cell cycle. Thus, that DNA damage checkpoint for cells in the S phase, depending on the phase of the cell cycle in which the damage occurred. Checkpoints can also cause

DNA repair and regulate cancer progression, in addition to inducing cell cycle arrest (Visconti, Della Monica & Grieco, 2016). Our supercritical coffee extract induced an S-phase cell cycle arrest by GC and LRC, therefore our samples may have promoted repair or, in the case of irreparable damage, stimulated cell death.

The PC-3 prostate cancer cell line has moderate to high metastatic potential and has a greater number of genes related to inflammation (Ravenna et al., 2014; Kwon et al., 2018). Our results indicate that the coffee extract acted effectively against cells with greater metastatic potential, corroborating previous studies that used spray-drying extraction (Silva et al., 2020) and microwave-assisted extraction (Montenegro et al., 2021) arabica coffee in PC-3 and DU-145 cells.

The antioxidants present in coffee can induce direct antitumor effects, but also through the activation of endogenous antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and gamma-glutamylcysteine synthetase. It is possible, in different cell types, to prevent mitochondrial damage by protecting against oxidative stress, which in turn plays a fundamental role in apoptosis, since the initial process of apoptosis is associated with the mitochondrial fragmentation of pro-apoptotic proteins (Nigra et al., 2021).

However, the induction of apoptosis and cell cycle modulation can be achieved by obtaining the isomerization and hydrolysis of 5-CQA (Bauer et al., 2018). This may explain the greater induction of apoptosis observed with the LRC extract. Some authors in the literature have studied the mechanisms that coffee and its bioactive compounds induce apoptosis in prostate cancer cells. Kolberg et al. (2016) observed that coffee increased apoptosis and modulated the expression of several genes related to inflammation in prostate cancer PC-3 cells and xenografts, the authors identified that coffee was able to inhibit the activity of NF- κ B, induced by TNF- α and DNA binding in PC-3 cells. Still, Iwamoto et al. (2018), observed that kahweol acetate and cafestol, two diterpenes present in coffee, synergistically inhibited the proliferation and migration of prostate cancer cells in a dose-dependent manner.

Caffeine, caffeic acid, chlorogenic acids and kahweol have been described as having antimutagenic properties, antioxidants and the ability to inhibit the action of carcinogens in studies that used animal models and human cell cultures, indicating

that they may have a protective role against colorectal cancer, from breast and prostate (Buldak et al., 2018; Bauer et al., 2018; Bartolomeu et al., 2022; Hu et al., 2019; Montenegro et al., 2021; Nigra et al., 2021; Silva et al., 2020). Pounis et al. (2017) suggested the inhibitory effect of caffeine on adhesion, motility and proliferation of DU-145 and PC-3 prostate cancer cells.

Cohort data elaborated by Kakizaki et al. (2013), as well as Shafique et al. (2012), Lu et al. (2014), Huang et al. (2014) and the meta-analysis of Zhong et al. (2014) suggest a protective association between coffee consumption and the risk of developing prostate cancer.

According to the literature, coffee extract has therapeutic potential in prostate cancer due to its various effects, antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and apoptotic, previously mentioned (Bauer et al., 2018; Silva et al., 2020; Montenegro et al., 2021). The possible pathways by which coffee-mediated biological activity can be correlated with the promotion of programmed cell death (apoptosis), cell cycle regulation and increased pro-apoptotic activity through the pathway involving caspases, bax and p53 (He et al., 2003).

Although many bioactive compounds in arabica coffee are widely known, there are still others that are poorly studied. Thus, further studies are needed to elucidate the role of chemical compounds in coffee in cancer in experimental studies with animals and clinical trials in humans to assess whether the observed effects are maintained in vivo models.

5. FINAL CONSIDERATIONS

Arabica coffee has a high antioxidant capacity, the extraction technique used obtained similar results with other techniques tested in studies, with green and light roast coffee extracts having greater antioxidant activity compared to medium and dark roast coffee extracts. Green and light roasted coffee also caused a greater reduction in cell viability and apoptosis in PC-3 cells, with emphasis on light roasted coffee.

Therefore, these samples would probably be effective in the prevention and treatment of prostate cancer, however, more experiments with cells are needed to confirm this effectiveness and evaluate molecular mechanisms, in addition to toxicity studies, since the method used is not conventional and does not correspond to the

domestically produced coffee. In addition, in vivo and clinical tests would be needed to allow the recommendation of consumption of these types of coffee for the prevention of prostate cancer.

Thus, the antioxidants present in coffee can induce direct antitumor effects, but also through the activation of endogenous antioxidant enzymes. It was estimated that the higher concentration of chlorogenic acids in the extracts would cause a greater change in apoptosis.

Acknowledgments

The financial support of Brazilian funding agencies (FAPERJ 211.039/2019 and 204.244/2021) is greatly acknowledged.

REFERENCES

- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2022). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. In *Quim. Nova* (Vol. 33, Issue 10).
- Abrahão, S.A., Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira, R., Maris da Silveira Duarte, S., Ribeiro Lima, A., Junqueira Alvarenga, D., & Batista Ferreira, E. (2010). Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.) Coffee (*Coffea arabica* L.) bioactive compounds and antioxidant activity. In *Ciênc. agrotec* (Vol. 34, Issue 2).
- Baggenstoss, J., Poisson, L., Kaegi, R., Perren, R., & Escher, F. (2008). Coffee roasting and aroma formation: application of different time-temperature conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14), 5836–5846. <https://doi.org/10.1021/jf800327j>
- Bartolomeu, A. R., Romualdo, G. R., Lisón, C. G., Besharat, Z. M., Corrales, J. A. M., Chaves, M. Á. G., & Barbisan, L. F. (2022). Caffeine and Chlorogenic Acid Combination Attenuate Early-Stage Chemically Induced Colon Carcinogenesis in Mice: Involvement of oncomiR miR-21a-5p. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23116292>
- Bauer, D., Abreu, J., Jordão, N., da Rosa, J. S., Freitas-Silva, O., & Teodoro, A. (2018). Effect of roasting levels and drying process of *coffea canephora* on the quality of bioactive compounds and cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113407>
- Benzie, I.F., & Devaki, M.P. (2017). The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch5>
- Bertuzzi, T., Martinelli, E., Mulazzi, A., & Rastelli, S. (2020). Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagine and low molecular weight sugars. *Food chemistry*, 303, 125372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125372>

- Budryn, G., Nebesny, E., Podsedek, A. et al. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *Eur Food Res Technol* 228, 913–922 (2009).
- Buđak, R. J., Hejmo, T., Osowski, M., Buđak, Ł., Kukla, M., Polaniak, R., & Birkner, E. (2018). The impact of coffee and its selected bioactive compounds on the development and progression of colorectal cancer in vivo and in vitro. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23123309>
- Castro, A. C. C. M., Oda, F. B., Almeida-Cincotto, M. G. J., Davanço, M. G., Chiari-Andréo, B. G., Cicarelli, R. M. B., Peccinini, R. G., Zocolo, G. J., Ribeiro, P. R. V., Corrêa, M. A., Isaac, V. L. B., & Santos, A. G. (2018). Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. *Food chemistry*, 246, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.153>
- Chen, J. H., Yang, C. H., Wang, Y. S., Lee, J. G., Cheng, C. H., & Chou, C. C. (2013). Acrylamide-induced mitochondria collapse and apoptosis in human astrocytoma cells. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 51, 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.025>
- Chen, X., Zhao, Y., Tao, Z., & Wang, K. (2021). Coffee consumption and risk of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. In *BMJ Open* (Vol. 11, Issue 2). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-038902>
- CONAB CDA (2018). Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2018. Available in: http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab_safra2018_n2.pdf. Access in 12/20/2022.
- Dawidowicz, A. L., & Typek, R. (2017). Transformation of chlorogenic acids during the coffee beans roasting process. *European Food Research and Technology*, 243(3), 379–390. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2751-8>
- Del Castillo, M. D., Ames, J. M., & Gordon, M. H. (2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(13), 3698–3703. <https://doi.org/10.1021/jf011702g>
- De Souza, L. D. S. De, Carrero Horta, I. P., De Souza Rosa, L., Barbosa Lima, L. G., Santos Da Rosa, J., Montenegro, J., Da Silva Santos, L., Nana De Castro, R. B., Freitas-Silva, O., & Teodoro, A. J. (2020). Effect of the roasting levels of: *Coffea arabica* L. extracts on their potential antioxidant capacity and antiproliferative activity in human prostate cancer cells. *RSC Advances*, 10(50), 30115–30126. <https://doi.org/10.1039/d0ra01179g>
- Díaz, F. O., Ormaza, A. M., & Rojano, B. n. A. (2018). Effect of coffee roasting (*Coffea Arabica* l. var. Castillo) on cup profile, antioxidant compound content and antioxidant activity. *Informacion Tecnologica*, 29(4), 31–42. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642018000400031>
- Duarte, S.M.S, Abreu, C.M.P, Menezes, H. C., Santos, M.H & Gouvêa, C.M.C.P. (2005). Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25: 387–393.
- Durán, C. A. A., Tsukui, A., Santos, F. K. F., Martinez, S. T., Bizzo, H. R., & Rezende, C. M. (2017). Coffee: General aspects and its use beyond drink. In *Revista Virtual de Química* (Vol. 9, Issue 1, pp. 107–134). Sociedade Brasileira de Química. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170010>
- FAO (2020). FAOSTAT Online Database. Available in: <https://www.tridge.com/intelligence-data>. Access in 12/28/2022.

- Farah, A., & Lima, J. de P. (2019). Consumption of chlorogenic acids through coffee and health implications. *Beverages*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/beverages5010011>
- Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1505–1513. <https://doi.org/10.1021/jf048701t>
- Gaascht, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2015). Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer. *Genes & nutrition*, 10(6), 51. <https://doi.org/10.1007/s12263-015-0501-3>
- Górecki, M., & Hallmann, E. (2020). The Antioxidant Content of Coffee and Its In Vitro Activity as an Effect of Its Production Method and Roasting and Brewing Time. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 9(4), 308. <https://doi.org/10.3390/antiox9040308>
- He, Z., Ma, W. Y., Hashimoto, T., Bode, A. M., Yang, C. S., & Dong, Z. (2003). Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer research*, 63(15), 4396–4401.
- Hećimović, I., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., & Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food chemistry*, 129(3), 991–1000. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.059>
- Hou, D. X., Fujii, M., Terahara, N., & Yoshimoto, M. (2004). Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2004(5), 321–325. <https://doi.org/10.1155/S1110724304403040>
- Hu, G. L., Wang, X., Zhang, L., & Qiu, M. H. (2019). The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. *Food & Function*, 10(6), 3113–3126. <https://doi.org/10.1039/C9FO00288J>
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(16), 4437–4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>
- International coffee organization, ICO (2018). Historical data on the global coffee trade. International Coffee Organization-Historical Data on the Global Coffee Trade (ico.org). Available in: https://www.ico.org/new_historical.asp. Access in 12/18/2022.
- Iwamoto, H., Izumi, K., Natsagdorj, A., Naito, R., Makino, T., Kadomoto, S., Hiratsuka, K., Shigehara, K., Kadono, Y., Narimoto, K., Saito, Y., Nakagawa-Goto, K., & Mizokami, A. (2019). Coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol synergistically inhibit the proliferation and migration of prostate cancer cells. *The Prostate*, 79(5), 468–479. <https://doi.org/10.1002/pros.23753>
- Janda, K., Jakubczyk, K., Baranowska-Bosiacka, I., Kapczuk, P., Kochman, J., Rębacz-Maron, E., & Gutowska, I. (2020). Mineral Composition and Antioxidant Potential of Coffee Beverages Depending on the Brewing Method. *Foods* (Basel, Switzerland), 9(2), 121. <https://doi.org/10.3390/foods9020121>
- Jung, S., Kim, M. H., Park, J. H., Jeong, Y., & Ko, K. S. (2017). Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coffee Extracts with Different Roasting Levels. *Journal of medicinal food*, 20(6), 626–635. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3935>
- Kakizaki, M., Inoue, K., Kuriyama, S., Sone, T., Matsuda-Ohmori, K., Nakaya, N., Fukudo, S., Tsuji, I., & Ohsaki Cohort Study (2008). Sleep duration and the risk of prostate cancer: the Ohsaki Cohort Study. *British journal of cancer*, 99(1), 176–178. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604425>

- Kamiyama, M., Moon, J. K., Jang, H. W., & Shibamoto, T. (2015). Role of degradation products of chlorogenic acid in the antioxidant activity of roasted coffee. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(7), 1996–2005. <https://doi.org/10.1021/jf5060563>
- Kitzberger, C. S. G., Scholz, M. B. dos S., & Benassi, M. de T. (2014). Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. *Food Research International*, 61, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.031>
- Kolberg, M., Pedersen, S., Mitake, M., Holm, K. L., Bøhn, S. K., Blomhoff, H. K., Carlsen, H., Blomhoff, R., & Paur, I. (2016). Coffee inhibits nuclear factor-kappa B in prostate cancer cells and xenografts. *The Journal of nutritional biochemistry*, 27, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.028>
- Król, K., Gantner, M., Tatarak, A., & Hallmann, E. (2020). The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *European Food Research and Technology*, 246(1), 33–39. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03388-9>
- Kwon, O. K., Jeon, J. M., Sung, E., Na, A. Y., Kim, S. J., & Lee, S. (2018). Comparative Secretome Profiling and Mutant Protein Identification in Metastatic Prostate Cancer Cells by Quantitative Mass Spectrometry-based Proteomics. *Cancer genomics & proteomics*, 15(4), 279–290. <https://doi.org/10.21873/cgp.20086>
- Liang, N., Xue, W., Kennepohl, P., & Kitts, D. D. (2016). Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food Chemistry*, 213, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.041>
- Liczbiński, P., & Bukowska, B. (2022). Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations. *Industrial crops and products*, 175, 114265. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114265>
- Lu, Y., Zhai, L., Zeng, J., Peng, Q., Wang, J., Deng, Y., Xie, L., Mo, C., Yang, S., Li, S., & Qin, X. (2014). Coffee consumption and prostate cancer risk: an updated meta-analysis. *Cancer causes & control: CCC*, 25(5), 591–604. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0364-8>
- Ludwig, I. A., Mena, P., Calani, L., Cid, C., Del Rio, D., Lean, M. E., & Crozier, A. (2014). Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: what are we drinking?. *Food & function*, 5(8), 1718–1726. <https://doi.org/10.1039/c4fo00290c>
- Mehaya, F. M., & Mohammad, A. A. (2020). Thermostability of bioactive compounds during roasting process of coffee beans. *Heliyon*, 6(11), e05508. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05508>
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science* (London, England: 1979), 84(4), 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- Mohamadi, N., Shariffar, F., Pournamdari, M., & Ansari, M. (2018). A Review on Biosynthesis, Analytical Techniques, and Pharmacological Activities of Trigonelline as a Plant Alkaloid. *Journal of dietary supplements*, 15(2), 207–222. <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1329244>
- Montenegro, J., dos Santos, L. S., de Souza, R. G. G., Lima, L. G. B., Mattos, D. S., Viana, B. P. P. B., da Fonseca Bastos, A. C. S., Muzzi, L., Conte-Júnior, C. A., Gimba, E. R. P., Freitas-Silva, O., & Teodoro, A. J. (2021). Bioactive compounds, antioxidant activity and antiproliferative effects in prostate cancer cells of green and roasted coffee extracts obtained by microwave-assisted extraction (MAE). *Food Research International*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110014>

- Montenegro, J., Freitas-Silva, O., & Teodoro, A. J. (2022). Molecular Mechanisms of Coffee on Prostate Cancer Prevention. In *BioMed Research International* (Vol. 2022). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/3254420>
- Moon, J. K., Yoo, H. S., & Shibamoto, T. (2009). Role of roasting conditions in the level of chlorogenic acid content in coffee beans: correlation with coffee acidity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(12), 5365–5369. <https://doi.org/10.1021/jf900012b>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nasti, R., Galeazzi, A., Marzorati, S. et al. (2021). Valorisation of Coffee Roasting By-Products: Recovery of Silverskin Fat By Supercritical CO₂ Extraction. *Waste Biomass Valor* 12, 6021–6033. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01435-9>
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 97, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- Nigra, A. D., Guimarães, D. D. A. B., Pucca, C. G., Freitas-Silva, O., Teodoro, A. J., & Gil, G. A. (2021). Antitumor Effects of Freeze-Dried Robusta Coffee (*Coffea canephora*) Extracts on Breast Cancer Cell Lines. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5572630>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Patras, A., Brunton, Nigel. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>
- Perrone, D., Donangelo, C. M., & Farah, A. (2008). Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food chemistry*, 110(4), 1030–1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.012>
- Pounis, G., Tabolacci, C., Costanzo, S., Cordella, M., Bonaccio, M., Rago, L., D'Arcangelo, D., Filippo Di Castelnuovo, A., de Gaetano, G., Donati, M. B., Iacoviello, L., & Facchiano, F. (2017). Reduction by coffee consumption of prostate cancer risk: Evidence from the Moli-sani cohort and cellular models. *International Journal of Cancer*, 141(1), 72–82. <https://doi.org/10.1002/ijc.30720>
- Pozarowski, P., & Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 281, 301–311. <https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:301>
- Rabelo, M. H. S., Ribeiro, D. E., de Miranda, F. M., Alves, A. P. de C., de Lima, R. R., Pinheiro, A. C. M., Borém, F. M., & Pereira, R. G. F. A. (2015). SISTEMA CIEL *a*b* E CIEL *c*h*: AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO COM O SISTEMA DE DISCO AGTRON/SCAA. 1–6.
- Ravenna, L., Principessa, L., Verdina, A., Salvatori, L., Russo, M. A., & Petrangeli, E. (2014). Distinct phenotypes of human prostate cancer cells associate with different adaptation to hypoxia and pro-inflammatory gene expression. *PloS one*, 9(5), e96250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096250>

- Rivelli, D. P., Vitoriano da Silva, V., Dislich Ropke, C., Varella Miranda, D., Leite Almeida, R., Cristina Higashi Sawada, T., & Berlanga de Moraes Barros, S. (2007). Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. In *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 43, Issue 2).
- Saklar, S., Katnas, S., & Ungan, S. (2001). Determination of optimum hazelnut roasting conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(3), 271–281. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00457.x>
- Sarriá, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J. L., García-Diz, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2018). Regularly consuming a green/roasted coffee blend reduces the risk of metabolic syndrome. *European journal of nutrition*, 57(1), 269–278. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1316-8>
- Schouten, M. A., Tappi, S., & Romani, S. (2020). Acrylamide in coffee: formation and possible mitigation strategies - a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(22), 3807–3821. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1708264>
- Shafique, K., McLoone, P., Qureshi, K., Leung, H., Hart, C., & Morrison, D. S. (2012). Coffee consumption and prostate cancer risk: further evidence for inverse relationship. *Nutrition journal*, 11, 42. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-11-42>
- Silva, M. de O., Honfoga, J. N. B., Medeiros, L. L. de, Madruga, M. S., & Bezerra, T. K. A. (2020). Obtaining Bioactive Compounds from the Coffee Husk (*Coffea arabica* L.) Using Different Extraction Methods. *Molecules*, 26(1), 46. <https://doi.org/10.3390/molecules26010046>
- Singleton, V.L (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144–158.
- Sobel, R. E., & Sadar, M. D. (2005). Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *The Journal of urology*, 173(2), 342–359. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000141580.30910.57>
- Sucupira, N. R., Silva, A. B., Pereira, G., & Costa, J. N. (2012). Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. In 263 *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* (Vol. 14, Issue 4).
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). Chlorogenic acid composition of instant coffees. *The Analyst*, 109(3), 263–266. <https://doi.org/10.1039/an9840900263>
- Tsai, C.F. & Jioe, I.P.J. (2021). The Analysis of Chlorogenic Acid and Caffeine Content and Its Correlation with Coffee Bean Color under Different Roasting Degree and Sources of Coffee (*Coffea arabica Typica*). *Processes* 9: 2040.
- Tverdal A. (2015). Boiled coffee consumption and the risk of prostate cancer: follow-up of 224,234 Norwegian men 20-69 years. *British journal of cancer*, 112(3), 576–579. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.645>
- Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19980101)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r)
- Vignoli, J. A., Viegas, M. C., Bassoli, D. G., & Benassi, M. de T. (2014). Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Research International*, 61, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.006>

- Visconti, R., Della Monica, R., & Grieco, D. (2016). Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 35(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0433-9>
- Wachamo, H. L. (2017). Review on Health Benefit and Risk of Coffee Consumption. *Medicinal & Aromatic Plants*, 06(04). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000301>
- Yashin, A., Yashin, Y., Wang, J. Y., & Nemzer, B. (2013). Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 2(4), 230–245. <https://doi.org/10.3390/antiox2040230>
- Zetzi, C., Brunner, G. & Meireles, M. (2003). Standardized low-cost batch SFE-units for university education and comparative research. In: *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*, 577–581 p.
- Zhong, S., Chen, W., Yu, X., Chen, Z., Hu, Q., & Zhao, J. (2014). Coffee consumption and risk of prostate cancer: an up-to-date meta-analysis. *European journal of clinical nutrition*, 68(3), 330–337. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.256>

APÊNDICE D – ANTIOXIDANT AND ANTICARCINOGENIC EFFECTS OF COFFEE AND ITS BIOACTIVE COMPOUNDS IN BREAST CANCER: A REVIEW. Submetido à Revista Pharmanutrition.

PHANU-D-23-00226 - Confirming your submission to PharmaNutrition

1 mensagem

PharmaNutrition <em@editorialmanager.com>
Responder a: PharmaNutrition <support@elsevier.com>
Para: Anderson Teodoro <atteodoro@gmail.com>

2 de setembro de 2023 às 10:16

This is an automated message.

Antioxidant and Anticarcinogenic Effects of Coffee and its Bioactive Compounds in Breast Cancer: a review.

Dear Dr. Teodoro,

We have received the above referenced manuscript you submitted to PharmaNutrition. It has been assigned the following manuscript number: PHANU-D-23-00226.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/phanu/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
PharmaNutrition

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

#AU_PHANU#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

PharmaNutrition
Antioxidant and Anticarcinogenic Effects of Coffee and Its Bioactive Compounds in Breast Cancer: a review.
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Review Article
Keywords:	Coffee; green coffee; roast coffee; chlorogenic acids; breast cancer
Corresponding Author:	Anderson Teodoro BRAZIL
First Author:	Raquel Castro
Order of Authors:	Raquel Castro Carolyne Rosado, Dra. Rodrigo Souza German Gil Anderson Junger Teodoro, Dr.
Manuscript Region of Origin:	South America
Abstract:	<p>Background: Breast cancer is the most common type of cancer in women in Brazil. Several studies have found that bioactive compounds have an anticancer and/or immunomodulatory effect on breast cancer. Among them, studies with coffee indicate several beneficial effects of bioactive compounds in coffee on human health, including cancer prevention.</p> <p>Objective: The aim of this study is to review the antioxidant and anticarcinogenic effects of coffee and its bioactive components on breast cancer in the literature.</p> <p>Methods: A systematic review following the PRISMA methodology was designed to identify original articles that analyzed the effects of coffee beverages and extracts of coffee or coffee bioactive compounds in the prevention and treatment of breast cancer, from 2017 to 2022 through PubMed, Science Direct, Lilacs, and Scielo. To control bias, we examined Cochrane Handbook recommendations.</p> <p>Results: Epidemiological studies have shown controversial results regarding the relationship between coffee consumption and breast cancer risk in premenopausal women, however, an inverse relationship has been observed between coffee consumption dose-dependent and breast cancer risk in postmenopausal women. Factors such as postmenopausal hormone replacement and nutritional status may influence the chemopreventive effects of coffee. Meanwhile, experimental studies have shown strong evidence for the antiproliferative and proapoptotic effects of green and light roast coffee extracts and their isolated compounds in breast cancer cells and different cancer cell lines.</p> <p>Conclusions: Through this review, it was possible to identify the molecular pathways by which bioactive compounds in coffee reduce breast tumor growth and the risk of metastasis and increase apoptosis.</p>