



MARIA ELIZA DE CASTRO MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACOLÓGICO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)
VERDE E TORRADO**

LAVRAS - MG

2013

MARIA ELIZA DE CASTRO MOREIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) VERDE E TORRADO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Moreira, Maria Eliza de Castro.

Avaliação do potencial farmacológico de café (*Coffea arabica* L.) verde e torrado / Maria Eliza de Castro Moreira. – Lavras: UFLA, 2013.

113 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Rosemary Gualberto Fonseca A. Pereira

Bibliografia.

1. Atividade anti-inflamatória 2. Atividade antioxidante. 3. Ácidos clorogênicos. 4. Trigonelina. 5. DPPH.I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.93

MARIA ELIZA DE CASTRO MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.) VERDE E TORRADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 15 de abril de 2013.

Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula	UNIFAL
Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento	UNIFAL
Dra. Sandra Bragança Coelho	UFLA
Dr. Michel Cardoso de Angelis Pereira	UFLA

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira, pela orientação, pelo constante apoio, aprendizado e paciência nos ensinamentos. À Prof^ª. e amiga Dra. Danielle Ferreira Dias, por poder contar com vocês nos inúmeros momentos em que precisei. Pela animada e prazerosa companhia no laboratório.

À Prof^ª. Dra. Stella Maris da Silveira por se mostrar prontamente a me ajudar na busca de uma vaga na Pós-Graduação da UFLA. Agradeço também toda a sua colaboração na realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pela colaboração e ensinamentos presentes neste trabalho.

Agradeço as orientações dos professores do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal na condução das análises realizadas.

Aos professores, alunos e funcionários do Laboratório de Fisiologia que me auxiliaram nos experimentos.

À fazenda Ipanema Agro Indústria Ltda. por ter cedido amostras de café.

Aos colegas de curso, companheiros e amigos, pela gratificante convivência e troca de informações. Agradeço principalmente à Flávia Della Lucia, Rafaela Bergman e Alessandra Danziger pela agradável companhia durante as viagens a Lavras.

Aos colegas do Polo de Tecnologia em Qualidade do Café, Fernanda, Vanderlei, Katiany, Bruno, Adriene, Miriam e Natália pela ajuda na realização dos experimentos. Gostaria também de agradecer a ajuda do Édson (técnico do Polo).

Ao pessoal do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal, pelo apoio e ajuda na realização dos experimentos. Em especial agradeço ao Thiago,

Claudinei, Isael, Vanessa, Jaqueline, Ederson e João pela constante ajuda na realização das análises dos dados.

Aos professores e funcionários da pós-graduação da UFLA, pelo apoio e amizade durante esse período.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Raul e Mercês, que em oração estiveram sempre comigo. Por todo apoio recebido de todos os meus irmãos.

Ao João Victor e Micaela, meus queridos filhos que muitas vezes me permitiram ausentar para concluir este trabalho.

Ao Marcelo, pelo amor, carinho, incentivo, contribuições fundamentais para execução deste trabalho e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

A Deus, que me permitiu concretizar este trabalho, pois sem Ele nada teria significado.

RESUMO

O café é uma das matérias-primas com maior importância no comércio internacional e uma das bebidas mais apreciadas em todo mundo, principalmente por seus atributos sensoriais e efeito estimulante. Devido ao seu elevado e distribuído consumo mundial, os potenciais efeitos na saúde tem sido estudados em diversos modelos experimentais, tendo sido provado que seu consumo pode contribuir para a redução de ocorrência de doenças como Parkinson, diabetes, Alzheimer, perda de peso e hepatopatias. Os grãos de café possuem uma grande quantidade e variedade de polifenóis e flavonoides. O processo de torra altera a composição do café, afetando principalmente os polifenóis, podendo gerar outros compostos pela reação de *Maillard*. Muitos desses compostos possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante. Neste trabalho os extratos aquosos de café verde (AGCa) e torrado (ARCa) e os extratos etanólicos de café verde (EGCa) e torrado (ERCa), foram investigados quanto a sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, utilizando modelos animais e *in vitro* (DPPH). No teste da formalina, todos os extratos de *Coffea arabica* L. inibiram a lambida de pata na última fase (20-30 min.) analisada. A redução do edema de pata na terceira hora foi demonstrada em todos os extratos testados. Os extratos aquosos e etanólicos de café foram capazes de diminuir o número de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais quando estimulados pelo lipopolissacarídeo de *E coli*. A atividade antioxidante dos extratos de café verde foram maiores do que os padrões utilizados (butilidroxitolueno e ácido ascórbico). Os resultados indicam que os extratos de café possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante.

Palavras-chave: Inflamação. Atividade antioxidante. Ácidos clorogênicos. Café. Edema de pata. Polifenóis.

ABSTRACT

Coffee has been enjoyed as a drink by millions of people worldwide for at least one thousand years. Due to their unique taste and flavour, coffee brews are among the most consumed beverages in Europe and America. Coffee is consumed for social engagements, leisure, enhancement of work performance and well-being. Epidemiological and experimental studies have indicated positive effects of regular coffee consumption on various aspects of health, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, diabetes, gonad and liver function and cancer. Green coffee contains a large quantity and variety of polyphenols and flavonoids. The roasting affects the composition of the polyphenols in coffee, due to the formation of compounds generated by Maillard reaction, which can have anti-inflammatory or antioxidant potential. The anti-inflammatory and antioxidant effects of aqueous extract of green (AGCa), aqueous extract of roasted (ARCa), ethanol extract of green (EGCa) and ethanol extract of roasted (ERCa) coffee beans were investigated in animal models and using a DPPH radical scavenging test. In the formalin test the extracts reduced licking activity only in the late phase. The extracts of *Coffea arabica* L. significantly reduced paw edema at three hours after stimulus. Leukocyte recruitment into the peritoneal cavity was inhibited by the extracts. The antioxidant activities of the extracts were higher than the reference antioxidants, ascorbic acid and butylated hydroxytoluene. These results indicate that coffee extracts exhibit anti-inflammatory and antioxidant properties.

Keywords: Inflammatory. Antioxidant activity. Chlorogenic acid. Coffee. Oedema. Polyphenols.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	O café	11
2.1.1	Produção e consumo do café	12
2.1.2	Classificação do café	14
2.1.3	Composição química	16
2.1.4	Alterações que ocorrem no café decorrente da torração	22
2.2	Antioxidantes	25
2.2.1	Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO)	25
2.2.2	Defesa antioxidante	27
2.3	Inflamação	29
2.4	O café como fonte de compostos bioativos: “Café e Saúde”	35
3	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	56
	ARTIGO 1 Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green <i>Coffea arabica</i> L.	56
	ARTIGO 2 Ethanol extracts of <i>Coffea arabica</i> L. attenuate inflammation	89

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das matérias-primas com maior importância no comércio internacional. É igualmente uma das bebidas mais apreciadas em todo mundo, por seus atributos sensoriais e efeitos fisiológicos, principalmente sua ação estimulante.

Dado o seu elevado e distribuído consumo, os potenciais efeitos na saúde causados por essa bebida suscitaram, desde cedo, o interesse da comunidade científica. Por isso existem vários estudos de atividades do café verde e especialmente do café torrado usado para preparar os diferentes tipos de bebida.

Inicialmente, o foco de estudo era direcionado principalmente à cafeína, porém, com o avanço no conhecimento sobre a composição química dos grãos, foram descobertos compostos com atividade antioxidante e conseqüentemente foram iniciadas pesquisas sobre outros efeitos do café na saúde humana. O café é uma fonte primária de antioxidante, sendo que diferentes compostos conferem ao café essa propriedade, tais como: cafeína, polifenóis incluindo ácidos clorogênicos, compostos voláteis e heterocíclicos. O processo de torração, o preparo da bebida e a concentração do café usado para esse preparo, levam a profundas mudanças na composição química e atividades biológicas do café. Os compostos fenólicos, por exemplo, podem sofrer degradação parcial ou total em função do tipo de torração, enquanto produtos da reação de *Maillard* com propriedades antioxidantes são formados. Estudos demonstraram maior atividade antioxidante no café verde em relação ao café torrado com reduções significativas com a intensificação do processo de torração.

O estabelecimento das propriedades terapêuticas de vários alimentos e a possibilidade de substituição de certas drogas e redução ou eliminação de seus efeitos colaterais é foco importante de pesquisa de várias áreas interdisciplinares. Em relação ao café, estudos epidemiológicos e experimentais mostraram que o consumo regular de café interferiu de forma benéfica em respostas psicoativas, doenças neurológicas como doença de Alzheimer e doença de Parkinson, diabetes, disfunção das gônadas e do fígado e câncer (DÓREA; DA COSTA, 2005). O café possui importantes componentes químicos presentes em alimentos funcionais, como por exemplo, os flavonoides. Outros importantes compostos bioativos presentes no café incluem: ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênicos, ácido tânico e cafeína. Muitos desses compostos apresentam elevada atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória (FROST-MEYER; LOGOMARSINO, 2012; MOREIRA et al., 2013). Diante do exposto, este trabalho visou determinar o poder antioxidante e a atividade anti-inflamatória de diferentes extratos do café em modelos *in vitro* e em animais a fim de investigar a ação modulatória. Os relatos na literatura sobre a atividade anti-inflamatória do café são escassos assim este estudo pode além de fornecer resultados inéditos, subsidiar futuras pesquisas para a descoberta de novas moléculas ou extratos que possam vir a ser usados como nutracêuticos ou agregar mais valor à bebida do café.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O café

Originário da Abssínia (atual Etiópia), ao longo de centenas de anos, o café conquistou o paladar de inúmeros povos, de diversas regiões do planeta. O café foi introduzido em nosso País por volta de 1730, originário de plantações na América Central e na Guiana Francesa. É uma planta arbustiva aparentada com a gardênia e a quina, com duas espécies principais sendo mais conhecidas e exploradas: a *Coffea arabica*, considerada mais nobre e de melhor qualidade e sabor, e a *Coffea canephora* (robusta africana). Dos grãos dos frutos do cafeeiro é obtida uma bebida universal que faz parte da cultura, dos costumes e do dia a dia, principalmente, do povo brasileiro (FERRÃO, 2004). A cafeicultura é uma atividade de grande importância no cenário do agronegócio brasileiro. O café é o segundo produto mais comercializado do mundo, depois do petróleo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ - ABIC, 2013).

A qualidade do café gira em torno de uma multiplicidade de fatores relacionados ao cultivo, processamento, beneficiamento, industrialização e preparo da bebida para o consumo, que afetam as centenas de componentes que originarão o aroma e o sabor característicos. O café desperta prazer ao ser degustado, além disso, possui importantes componentes para o ser humano, sendo que o componente mais conhecido e valorizado é a cafeína, responsável pelo estímulo do sistema nervoso central. No entanto, outros compostos presentes no café têm despertado o interesse de diversos pesquisadores devido as suas funções biológicas. Nesses casos, os compostos fenólicos, como os ácidos clorogênicos e seus derivados, parecem desempenhar papel relevante. Todos apresentam intensa atividade antioxidante (BREZOVÁ; ŠLEBODOVÁ;

STAŠKO, 2009; NICOLI et al., 1997), antimutagênica (KIM; LEVIN, 1998) e anti-inflamatória (PANDEY; RIZVI, 2009).

Estudos comparando os efeitos na saúde de consumidores de café mostraram que a ingestão de doses diárias da bebida foi capaz de diminuir os riscos de doenças coronarianas e de doenças inflamatórias em relação às pessoas que não ingeriam a bebida (KLEEMOLA et al., 2000; WU et al., 2008). De acordo com Duarte (2004), a ingestão de café filtrado pode ter efeito na saúde humana por ter atividade redutora, quelante de metais, sequestrante de radicais livres, inibitória da peroxidação lipídica e da ação de agentes mutagênicos, além de não interferir nos níveis de colesterol total, HDL-c, triacilgliceróis e ácido úrico.

2.1.1 Produção e consumo do café

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café sendo responsável por 32% do mercado internacional. Apresenta, atualmente, um parque cafeeiro estimado em 2,3 milhões de hectares, com cerca de 5,7 bilhões de pés - pouco mais da metade só no Estado de Minas Gerais (BRASIL, 2013). De acordo com a ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café) são cerca de 290 mil produtores que, fazendo parte de associações e cooperativas, distribuem-se em 15 Estados: Acre, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo. Dentre outros grandes produtores mundiais de café tem-se Colômbia, México e Guatemala (*Coffea arabica* L.); e Indonésia, Vietnã, Costa do Marfim, Índia, Uganda e Etiópia onde predomina o plantio do café robusta (BRASIL, 2013).

No Brasil, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Rondônia e Bahia são Estados notoriamente produtores de café. Juntos representam 96% do

café brasileiro, concentrando-se a produção de *Coffea arabica* em Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Bahia (BRASIL, 2013). O Estado do Espírito Santo é o grande produtor de *Coffea canephora* - conilon (DEMARCHI, 2001) embora os Estados de Rondônia, Minas Gerais e Bahia estejam ampliando as suas produções (BRASIL, 2013). O maior produtor de café no Brasil é o Estado de Minas Gerais, concentrando 47% da produção seguido do Espírito Santo com 19%. Na terceira colocação situa-se São Paulo, com 13%, e o Paraná, quarto maior produtor com 7% do café nacional, seria o terceiro se considerada apenas a produção de café arábica (DEMARCHI, 2001). Os principais destinos das exportações brasileiras de café verde são Estados Unidos, Alemanha, Itália e Japão; café solúvel - Estados Unidos, Rússia, Ucrânia e Japão; e o café torrado e moído Estados Unidos, Itália, Japão e Argentina (BRASIL, 2013).

O consumo de café representa um hábito mundial e sua bebida é uma das mais apreciadas no mundo. O sabor e aroma são atrativos que justificam e estimulam a grande aceitação e consumo dessa bebida. No Brasil entre novembro de 2011 e outubro de 2012, o consumo de café atingiu 20,33 milhões de sacas de 60 kg, um crescimento de 3,09% em comparação com o mesmo período anterior. Já o consumo *per capita* foi de 6,23 kg de café em grão cru ou 4,98 kg de café torrado, aproximadamente 83 litros para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 2,10% em relação ao período anterior. O consumo da bebida de café entre os brasileiros aumentou, e foi diversificado, adicionando ao café filtrado consumido nos lares, também os cafés expressos, *cappuccinos* e outras combinações com leite. Esse consumo *per capita* é o maior consumo já registrado no Brasil. O consumo *per capita* brasileiro continua sendo um dos mais elevados mesmo quando comparado com o de países europeus. Os campeões de consumo são: Finlândia, Noruega e Dinamarca - com um volume próximo dos 13 quilos por habitante por ano (ABIC, 2013).

2.1.2 Classificação do café

A planta do café pertence à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea*. O cafeeiro é uma planta perene, dicotiledônea, de porte arbustivo ou arbóreo, de caule lenhoso, folhas persistentes e flores hermafroditas. O cafeeiro arábica tem a altura média de 3 a 5 metros, podendo chegar a 10 metros. Seu tronco tem de 8 a 10 centímetros de diâmetro e suas raízes podem chegar até 1,5 m de profundidade. As flores possuem fragrância de jasmim e seus frutos vão do verde ao vermelho quando maduros, passando pelo amarelo (CLARKE; MACRAE, 1989).

As espécies de maior importância econômica são *Coffea arabica* L., responsável por cerca de 70% da produção mundial de café e *Coffea canephora* Pierre (robusta). O café arábica é uma espécie de grande significado econômico para as Américas e demais regiões que a cultivam. Seu produto é de qualidade superior (aroma e sabor mais apreciados no mundo inteiro), mais fino e de maior aceitação em todos os mercados, sendo por isso mais valorizado comercialmente. Já *C. canephora*, variedade robusta produz o café conilon, resiste mais facilmente ao ataque de pragas durante o seu cultivo e é especialmente utilizado para aumentar o corpo e a espuma de algumas bebidas, assim como para a produção de café solúvel (SMITH, 2002). Quimicamente, essas espécies diferenciam-se pelos teores de diversos componentes: cafeína (em média, o dobro no café robusta), minerais, compostos fenólicos, trigonelina, aminoácidos, aminas biogénicas, diterpenos, ácidos graxos, esteróis, β -carbolinas, dentre muitos outros (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

Os cafés arábica e conilon diferem consideravelmente em preço, qualidade e aceitabilidade. Os grãos de arábica são verde claro e de forma ovalar, enquanto que o conilon tende a ser mais arredondado e castanho (ILLY; VIANI, 1995). Porém, após a torração e moagem, não se distinguem as espécies

visualmente e, como pertencem ao mesmo gênero, possuem poucas diferenças físico-químicas que permitam a detecção e/ou quantificação da adição de café conilon, de menor valor comercial, ao arábica (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2006). Da espécie *C. arabica* são cultivadas no Brasil variedades como Amarelo de Botucatu, Sumatra, Maragogipe, Bourbon Vermelho, Bourbon Amarelo, Caturra Amarelo, Caturra Vermelho, sendo a Mundo Novo, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho, Icatu e Acaíá as mais cultivadas atualmente, enquanto da *C. canephora* cultiva-se apenas a variedade conillon (SOUZA et al., 2004).

A qualidade do café é determinada após a classificação pelo tipo, aspecto, tamanho e forma dos grãos e pelo sabor, aroma da bebida. Segundo a Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA) os padrões de bebida e suas características são:

- a) estritamente mole: sabor suavíssimo e adocicado;
- b) mole: sabor suave, agradável e adocicado;
- c) dura: áspero e adstringente (sensação de secura na boca);
- d) riada: sabor ligeiramente químico, que lembra ao iodo;
- e) rio: sabor forte e desagradável; lembra sabor de bebida riada;
- f) rio Zona: apresenta o forte gosto químico das bebidas riada e rio, sabor e odor intoleráveis.

Não há legislação nacional para qualificação do café torrado e moído quanto à qualidade sensorial. A ABIC concede aos seus associados à permissão para utilização das seguintes denominações:

Cafés *Gourmets*: são constituídos de café 100% arábica de origem única ou blendados, de bebida apenas mole ou estritamente mole e que atendam aos requisitos de qualidade global resultando em um café muito bom à excelente, sendo encorpado, com baixa acidez, amargor típico, sabor equilibrado e limpo, e

com ausência total de qualquer sabor residual e adstringência. Possuem somente atributos de qualidade positivos, elevado valor agregado.

Cafés Superiores: são constituídos de cafés arábica blendados com café robusta (conillon), esses com limite de até 15% no *blend*, desde que limpos, com bebida que varia de dura à mole e que são classificados como razoavelmente bons. Apresentam sabor e aroma característico, acidez e amargor moderados, sabor residual moderado devido à presença de conillon e razoavelmente encorpado.

Cafés Tradicionais: são constituídos de cafés arábica e/ou blendados de conillon, esses com limite de até 30% no *blend*, desde que limpos, com bebida mole a rir e que atendam aos requisitos de qualidade global da bebida. São considerados cafés regulares e ligeiramente bons, com aroma fraco, acidez baixa, amargor que pode variar de fraco a intenso.

2.1.3 Composição química

O café cru, café torrado e a bebida dele preparada possuem uma composição muito complexa, pois possuem mais de 1000 componentes químicos, incluindo alcaloides como cafeína, minerais, ácidos clorogênicos, ácidos alifáticos, lipídeos, carboidratos, aminoácidos e compostos voláteis (CLARKE; MACRAE, 1989; GEORGE; RAMALAKSHMI; JAGAN MOHAN RAO, 2008). O sabor característico do café se deve a presença de vários compostos químicos voláteis e não voláteis, destacando-se dentre eles ácidos, aldeídos, cetonas, proteínas, aminoácidos e ácidos graxos (FERNANDES et al., 2001).

A composição e a qualidade do café dependem da espécie e variedade do cafeeiro e também de outros fatores como métodos de cultivo, grau de maturação dos frutos e dos procedimentos adotados na pós-colheita. Os

processos tecnológicos para o preparo e tratamento industrial dos grãos verdes, assim como o modo de preparar a bebida podem levar a consideráveis mudanças químicas responsáveis pelo aroma e sabor final da bebida, sendo o café um dos produtos mais modificados durante o processamento (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

A água é um componente importante do café e seu conteúdo é de 10 a 13% (p/p) no café verde, enquanto o café torrado pode conter até 5% (p/p). O café é capaz de reter água em camadas monomoleculares e polimoleculares, nas superfícies internas e externas, ou por capilaridade através de microporos e macroporos presentes na matriz (CLARKE, 1989).

O café possui de 1-2,5% de cafeína, que é um alcaloide do grupo das xantinas (Fig. 1) identificado como 1,3,7-trimetilxantina, cuja estrutura contém um esqueleto de purina, sendo a substância estimulante mais utilizada no mundo (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). A quantidade de cafeína varia de uma espécie para outra ou mesmo dentro de uma mesma espécie, mas geralmente, o café conilon apresenta maior concentração de cafeína do que o café arábica (DE MARIA; MOREIRA, 2007). Ela é o componente mais estudado até o momento, pois é o principal responsável pelas propriedades estimulantes que deram popularidade a bebida (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). Embora uma parcela pequena da população consuma cafeína na forma de fármacos, como por exemplo, antigripais, grande parte desse alcaloide é ingerida na forma de bebidas energéticas, chás e principalmente café (DURRANT, 2002). Uma xícara de café pode conter em média cerca de 80 mg de cafeína, enquanto uma lata de refrigerante em torno de 34-41 mg (ANDRADE et al., 1995). A cafeína é inodora e possui sabor amargo bastante característico, que contribui com uma nota de amargor importante para o aroma e sabor da bebida do café (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Esse alcaloide é um dos compostos mais

estáveis durante a torração, apresentando pequenas perdas percentuais que geralmente não ultrapassam 5%.

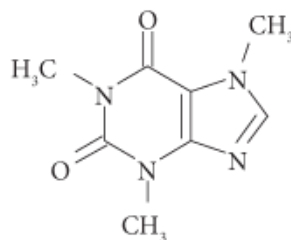


Figura 1 Cafeína
Fonte: Morais et al. (2009)

Na Tabela 1 é representada a composição química em grãos crus e torrados de café arábica e robusta. Os carboidratos constituem 50 a 60% do peso do café verde em grão, contendo grupos de polissacarídeos e açúcares de baixo peso molecular, incluindo tri-, di- e monossacarídeos. A sacarose é o açúcar livre presente em maior concentração no café verde, sendo rapidamente perdida durante a torração, chegando a 100% de degradação na torra escura (CLARKE; MACRAE, 1989).

Tabela 1 Composição química de grãos de café (arábica e robusta) crus e torrados (g/100g base seca)

	Arábica Verde	Arábica Torrado	Robusta Verde	Robusta Torrado
Cafeína	0,9-1,2	~1,0	1,6-2,4	~2
Trigonelina	1,0-1,2	0,5-1,0	0,6-0,75	0,3-0,6
Minerais	3,0-4,2	3,0-4,5	4,0-4,5	4,6-5,0
Ácidos				
Clorogênicos Totais	5,5-8,0	1,2-2,3	7,0-10,0	3,9-4,6
Ácidos alifáticos	1,5-2,0	1,0-1,5	1,5-2,0	1,0-1,5
Oligossacarídeos	6,0-8,0	0,0-3,5	5,0-7,0	0,0-3,5
Polissacarídeos	50,0-55,0	24,0-39,0	37,0-47,0	25,0-37,0
Proteínas	11,0-13,0	13,0-15,0	11,0-13,0	13,0-15,0
Aminoácidos	2,0	0,0	2,0	0,0
Lipídeos	12,0-18,0	14,5-20,0	9,0-13,0	11,0-16,0

Fonte: Clarke e Macrae (1989)

Os componentes presentes no café verde são precursores dos componentes integrantes do sabor e aroma da bebida de café (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). Um deles é a trigonelina (Fig. 2) que está presente em torno de 1 g% no grão verde, é um alcaloide, como a cafeína, de grande importância no café, gerando com sua degradação térmica uma importante classe de compostos, os pirróis, que são de relevante importância para o aroma do café e conferem desde notas de pão e caramelo à de carne bovina (CASAL; OLIVEIRA; FERREIRA, 2000; TRUGO; MOREIRA; DE MARIA, 1999). Além disso, a trigonelina sofre desmetilação na torrefação, para formar a niacina, uma vitamina do complexo B, em quantidades que podem chegar próximo a 20 mg%, dependendo do grau de torrefação. Por outro lado, diversos componentes voláteis, como piridinas e pirróis são também formados (TRUGO, 2001).

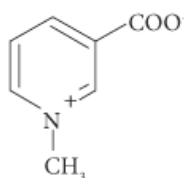


Figura 2 Trigonelina
Fonte: Morais et al. (2009)

Os compostos fenólicos contribuem de maneira significativa para o sabor do café. São responsáveis pela adstringência dos frutos e contribuem para o sabor e o aroma característico do café (ABRAHÃO et al., 2008; MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 2000). Os ácidos clorogênicos são progressivamente degradados durante a torra, contribuindo para a formação do aroma e sabor, podendo ocorrer perdas de até 90% do conteúdo inicial após torração severa dos grãos (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010). Os ácidos clorogênicos (Fig. 3) compõem um conjunto de cinco grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros formados principalmente pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico: ácido cafeico e felúrico ou *p*-cumárico. Esses grupos são ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, feruloilquínico, ácido *p*-cumaroilquínico e ácido cafeoilferuloilquínicos. O isômero majoritário no café é o ácido-5-cafeoilquínico (CLIFFORD et al., 2006). Os ácidos clorogênicos e/ou seus derivados, tem despertado o interesse de diversos pesquisadores devido a suas funções biológicas. Todos apresentam intensa propriedade antioxidante, que por si só já desfruta de relevância na neutralização de radicais livres.

A sacarose é o açúcar de baixo peso molecular mais abundante no café. A natureza e o conteúdo desse açúcar são de primordial importância para o “*flavor*” do café, para a formação de pigmentos e outros compostos de alto peso

molecular, formados pela condensação e caramelização durante o processo de torrefação (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). Não somente a sacarose como também outros glicídios e polissacarídeos são de importância para o aroma do café. A principal família de compostos voláteis gerada por esses açúcares são os furanos, que contribuem consideravelmente para as características sensoriais do café torrado (TRUGO; MOREIRA; DE MARIA, 1999).

Ácidos Clorogênicos (ACG)

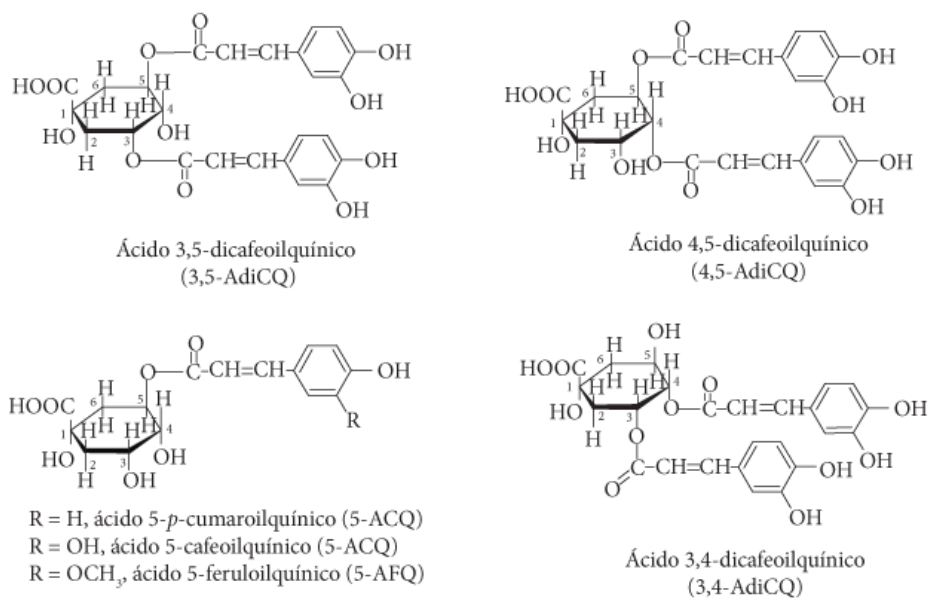


Figura 3 Ácidos Clorogênicos
 Fonte: Morais et al. (2009)

Durante a torração dos grãos de café, as proteínas são desnaturadas e degradadas em moléculas menores, exercendo papel importante na geração de pigmentos. Algumas proteínas também reagem com carboidratos, através da reação de *Maillard* (que envolve a condensação do grupo carbonila de açúcares redutores com o grupo amino de aminoácidos ou proteínas) originando também

compostos voláteis importantes para o *flavor*, como os pirróis, alquil-furanos, pirazinas e alquil-pirazinas, principalmente a partir de hidróxi-aminoácidos (TRUGO, 2001). Os aminoácidos livres podem ser degradados durante a torração, ou combinados com outros componentes, gerando uma mistura de complexos voláteis e não voláteis. Muitos desses voláteis são de grande importância para o aroma e, conseqüentemente, para a qualidade do café torrado (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Os lipídeos são outra classe de compostos importantes do café, considerando não apenas a quantidade em que se encontram no grão, mas também a composição dessa fração. Relacionam-se à qualidade da bebida, à coloração do café cru e ao potencial de exploração industrial do produto com outros fins, que não visem cafés torrado/moído e solúvel (SALVA; LIMA, 2007). O conteúdo de lipídeos nos grãos de café depende da espécie. Grãos do café arábica possuem 15% de lipídeos em sua constituição, e o café robusta apenas 10%. Os triacilglicerídeos representam a maior porcentagem dos lipídeos totais, cerca de 75%, havendo ainda a presença de ácidos graxos livres, sendo predominantes os ácidos palmítico e linoleico; diterpenos, como o caveol e o cafestol; esteróis, tocoferóis, entre outros (CLARKE; MACRAE, 1989). Com o processo de torração, os lipídios sofrem uma degradação oxidativa, gerando, dentre os componentes voláteis do café, aldeídos e álcoois alifáticos e aromáticos. Entre os álcoois, destacam-se o metanol e o etanol (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

2.1.4 Alterações que ocorrem no café decorrente da torração

O processo de torração pode ser definido como o tratamento térmico dos alimentos cuja finalidade é o desenvolvimento de compostos aromáticos e da cor dos produtos, além de transformar a textura do alimento em questão, facilitando

a moagem e em muitos casos a extração da água (SALVA; LIMA, 2007). Para que o café possa ser consumido, deve ser torrado. Além disso, o processo de torração é determinante na característica final da bebida, pois é nessa etapa que se desenvolve o sabor e aroma do café produzindo uma das bebidas mais populares do mundo (MENDONÇA, 2005).

Durante o processo de torração, a água residual dentro de cada célula é convertida em vapor e ocorre uma série de reações químicas complexas entre os açúcares, proteínas, lipídeos e minerais contidos no seu interior. Os amidos transformam-se em açúcares simples, surgem algumas espécies de ácidos enquanto outros são eliminados, a estrutura celular básica do grão acaba por se desintegrar, fazendo com que ocorra expansão e as proteínas são desmembradas transformando-se em peptídeos. A trigonelina e os ácidos clorogênicos são compostos fortemente afetados pelas condições térmicas de torrefação (MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 2000).

Os atributos sensoriais da bebida são conferidos por compostos voláteis e não voláteis produzidos durante o processo de torração. A torração consiste no aquecimento dos grãos a 200- 240°C por 10 -15 min, esse processo causa mudanças químicas e físicas marcantes no grão do café (ILLY; VIANI, 1995). Os grãos mudam da cor verde no grão cru para várias tonalidades de marrom no grão torrado, com redução do peso e aumento de volume dos grãos. Essa é a mudança física mais evidente que ocorre durante a torração. Com o aumento do grau da torração da tonalidade “clara” para a “escura”, por exemplo, a bebida apresenta um notável acréscimo da acidez com consideráveis mudanças no “*flavor*” e no paladar da bebida (CLARKE; MACRAE, 1989). No entanto, a acidez do café também pode ser afetada por outros fatores incluindo espécie, tipo de processamento e tempo de armazenamento dos grãos (DALLA ROSA; BARBANTE; LERICI, 1990).

As principais mudanças citadas acima são atribuídas à reação de *Maillard*, que ocorre durante o processo de torração (CLARKE; MACRAE, 1989). Além da sua influência sobre a cor e o aroma, estudos demonstraram a habilidade que esses produtos apresentam de afetar a estabilidade oxidativa de muitos alimentos processados e desempenhar um importante papel como fator protetor da saúde (O'BRIEN; MORRISSEY, 1989), parecendo suprir o corpo humano com proteção antioxidante exógena.

Durante a torração, os grãos são aquecidos a 200-240° C por 10-15 minutos, dependendo do grau de torração requerido, que é geralmente avaliado pela perda de peso da amostra tratada termicamente. O processo de torração provoca mudanças na composição bioquímica e atividade biológica do café: transformações de substâncias que ocorrem naturalmente no café verde; geração de compostos derivados da reação de *Maillard*, caramelização de carboidratos, e pirólise de compostos orgânicos (CLARKE; MACRAE, 1989).

Na industrialização dos grãos, diversas transformações químicas ocorrem principalmente devido às altas temperaturas utilizadas na torrefação. A trigonelina presente em torno de 1% no grão cru, durante o processo de torra, pode formar a niacina e diversos componentes voláteis, como piridinas e pirróis, que contribuem para o aroma final da bebida. Os compostos fenólicos são parcialmente isomerizados, hidrolisados ou degradados em compostos voláteis de baixa massa molecular. Durante a torração do café, partes desses constituintes fenólicos são incorporados às melanoidinas ou polimerizados, formando misturas complexas (MORAIS et al., 2009). Os ácidos clorogênicos reagem durante a torração, produzindo compostos ácidos, lactonas e outros derivados fenólicos que contribuem para o aroma e sabor do café, acidez final e adstringência da bebida (LÓPEZ-GALILEA; PAZ DE PEÑA; CID, 2007). Em princípio, os teores de cafeína não apresentam diferenças significativas em relação a torra (FARAH et al., 2005). As proantocianidinas juntamente com os

polifenóis, apresentam sabor adstringente típico, interferindo no sabor e aroma após a torra justificando, assim, e em parte, a menor qualidade da bebida preparada somente a partir de grãos de café conilon (MORAIS et al., 2009).

2.2 Antioxidantes

2.2.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os radicais livres são moléculas altamente instáveis, com meia vida curtíssima e quimicamente muito reativos. Denominam-se radicais livres as espécies químicas com existência independente, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, o que implica em maior reatividade, pois necessitam completar seus pares de elétrons para se estabilizarem. Ao reagirem com uma molécula adicional, geram outro radical livre, iniciando uma reação em cadeia e devido a isso possuem uma vida muito curta (MARZZOCO; TORRES, 2007; ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com incorporação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). No entanto 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não são completamente reduzidos a água, podendo ser convertidos a intermediários reativos como o radical superóxido (O_2^-) e hidroxil (OH^-) e também a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (HALLIWELL, 2006). O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir os radicais formados pela redução do O_2 em radical superóxido (O_2^-), e o radical hidroxil (OH^-), mas também alguns não radicais derivados do oxigênio como H_2O_2 e o oxigênio singlete (O_2^*). Além desses existe ainda as espécies reativas de

nitrogênio (ERN) sendo o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO⁻) os principais representantes (CHONG; LI; MAIESE, 2005).

Tais radicais podem ser gerados a partir de fontes externas ao organismo vivo, tais como luz ultravioleta, raio X e raios gama (GÜLÇİN; ALICI; CESUR, 2005). Além disso, em processos comuns do próprio organismo, a formação das ERO e ERN pode ocorrer em diferentes locais, como citoplasma, mitocôndrias e membranas celulares. Ela acontece durante os processos oxidativos biológicos, formadas fisiologicamente a partir de compostos endógenos ou originadas do metabolismo de compostos exógenos. Geralmente ela se dá por ação catalítica de enzimas durante as transferências de elétrons no metabolismo celular (MARZZOCO; TORRES, 2007).

As ERO e ERN são produzidos naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (como exemplo, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação de drogas; e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos. Fontes ambientais, tais como irradiação ultravioleta (UV), irradiação ionizante, e poluentes, também podem produzir espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL, 2006).

Muitas dessas espécies são geradas em baixos níveis, durante condições fisiológicas normais, em resposta a estímulos internos e externos. Baixos níveis de ERO podem ser indispensáveis em diversos processos, incluindo sinalização intracelular de proliferação ou apoptose, imunidade e defesa contra microrganismos. Por outro lado, altas concentrações ou remoção inadequada das ERO por sistemas antioxidantes endógenos resultam em estresse oxidativo, que pode causar disfunções metabólicas severas e danos a macromoléculas

biológicas. Ou seja, as células normalmente são capazes de balancear a produção de oxidantes e antioxidantes para manter um equilíbrio de oxirredução. O estresse oxidativo ocorre quando esse equilíbrio é quebrado pelo excesso de ERO e/ou pela depleção das defesas antioxidantes (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).

2.2.2 Defesa antioxidante

Evidências sugerem que altos níveis de ERO e ERN podem causar sérios distúrbios no estado redox do nosso organismo. A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Cabe salientar que a composição das defesas antioxidantes difere de tecido a tecido, de tipo de célula a tipo de célula e possivelmente de célula a célula do mesmo tipo, em um dado tecido (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Assim, de acordo com Halliwell (2006), é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em um determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos.

Antioxidantes são definidos como substâncias que em baixas concentrações são capazes de atrasar ou inibir uma oxidação de forma eficaz. Isso ocorre por vários mecanismos, como: impedimento da formação dos radicais livres (formação de radical hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio), do reparo de lesões (causadas pelos radicais livres) ou sequestro dos radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, e conseqüentemente, impedindo o ataque aos lipídeos, aminoácidos, proteínas,

duplas ligações dos ácidos graxos e bases nitrogenadas do DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Em condições normais do metabolismo celular, os mecanismos de defesa contra as ERRO e ERN permitem homeostase. Entretanto, a concentração dessas espécies pode aumentar mediante maior geração intracelular das mesmas ou pela deficiência dos mecanismos de defesa. Com isso, há um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, causando o estresse oxidativo resultando na indução de danos celulares que podem gerar várias doenças como câncer, aterosclerose, doença de Parkinson, inflamação, dentre outras (MARZZOCO; TORRES, 2007).

O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A catalase desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 , a GPx também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG), removendo H_2O_2 e formando água (FERRARI et al., 1985). Já o sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros, ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas-flavonoides (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção do organismo. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Além disso, os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque

sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta à geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

2.3 Inflamação

Por muito tempo, a inflamação foi considerada como doença, e somente a partir do século XVIII é que Hunter propôs ser ela uma resposta benéfica. Desde Celsus (contemporâneo de Cristo) que se caracteriza a inflamação por quatro sinais “cardinais”: Rubor, Calor, Tumor e Dor. Virchow, no século XIX, acrescentou um quinto sinal; a perda da função (LAPA et al., 2007).

A inflamação é uma resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos circunjacentes, sempre que há lesão ou destruição celular. É uma reação do tecido vivo vascularizado a uma injúria local, ou seja, é um mecanismo de defesa ou resposta protetora normal do organismo contra uma lesão tecidual causada por trauma mecânico, radiação, calor, frio e outros agentes físicos, substâncias irritantes, álcalis e outras substâncias químicas ou biológicas, provocadas por microrganismos tais como fungos, bactérias, vírus ou protozoários (FLOWER; PERRETTI, 2005; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é fundamental à sobrevivência. Cada estímulo provoca um padrão característico de resposta que, apesar da diversidade e complexidade dos mediadores

químicos, apresentam variação relativamente pequena (STVRTINOVÁ; JAKUBOVSKÝ; HULÍN, 1995). No processo de inflamação, células imunologicamente competentes são acionadas e agem no sentido de inativar ou destruir microrganismos invasores, remover substâncias irritantes e proteínas antigênicas, além de iniciar a reparação tecidual. Quando o processo reparatório se completa, naturalmente a inflamação e seus sinais desaparecem (FLOWER; PERRETTI, 2005).

A inflamação é uma resposta celular e humoral de magnitude variável com repercussões meramente locais, loco-regionais ou sistêmicas, cujo disparo é produtor de uma cascata de eventos que envolvem complementos, cininas, fibrinolíticos e coagulantes estimulados, juntos, com a ativação de fagócitos e das células endoteliais (STVRTINOVÁ; JAKUBOVSKÝ; HULÍN, 1995). A inflamação é mediada por diferentes mecanismos, e ocorre em três fases distintas, sendo:

- a) fase aguda – evento transitório caracterizado por vasodilatação localizada e aumento da permeabilidade vascular;
- b) fase subaguda retardada, onde se nota, predominantemente, a infiltração leucocitária e células fagocitárias;
- c) fase crônica, onde a proliferação é fator de destaque, com a ocorrência de degeneração tissular e de reparação fibrótica (LAPA et al., 2007). Essas três fases são desejáveis e importantes, e podem ser consideradas benignas dentro de padrões em que as atividades celulares e dos mediadores permanecem apropriadamente regulados (REUTER et al., 2010). Acredita-se que intervenções no processo inflamatório seja um potencial alvo terapêutico para reduzir o risco de doenças e incapacidades (BEAVERS; BRINKLEY; NICKLAS, 2010).

As alterações locais notáveis no processo inflamatório são provenientes da dilatação de arteríolas e aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores da inflamação. Há aumento no fluxo sanguíneo na área lesada, produzindo calor e eritema. Com aumento da temperatura, as reações metabólicas ocorrem com maior rapidez e liberam calor adicional. O edema surge com o aumento da permeabilidade, podendo extravasar fatores da coagulação sanguínea para os tecidos (REUTER et al., 2010). Na resposta inflamatória observam-se: vasodilatação, expansão dos vasos sanguíneos com um aumento da circulação sanguínea na área afetada; permeabilidade vascular aumentada, que permite a difusão de componentes para penetrar no local da inflamação; infiltração celular, por quimiotaxia, ou o movimento direto de células inflamatórias pelos vasos sanguíneos no interior do local de injúria; variações, biossintética, metabólica e no perfil catabólico de muitos organismos; e ativação de células do sistema imune, bem como o sistema enzimático complexo do plasma sanguíneo. Assim, os níveis de cada ocorrência são normalmente proporcionais à severidade da injúria e à extensão da infecção (STVRTINOVÁ; JAKUBOVSKÝ; HULÍN, 1995).

Várias células inflamatórias e da resposta imune inata, por exemplo, mastócitos, neutrófilos, leucócitos, macrófagos, monócitos, eosinófilos, células dendríticas, fagócitos e células naturais *killers* são recrutadas no local da infecção ou inflamação e em resposta a estímulos pró-inflamatórios produzem espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (KUNDU; SURH, 2008) promovendo a indução de um grande número de fatores transcricionais, como o fator nuclear *kappa* β (NF- κ B), bem como a perda dos estoques energéticos celulares, rompimento de mitocôndrias com liberação de enzimas líticas, peroxidação e destruição de membranas e dano em DNA (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Dentre as células envolvidas na inflamação, algumas estão normalmente presentes nos tecidos (células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos teciduais) e outras (plaquetas e leucócitos) têm acesso à área de inflamação a partir do sangue. Os macrófagos teciduais representam a primeira linha de defesa contra a infecção. Logo no início da inflamação eles já começam a exercer a função de limpeza (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Os mastócitos e basófilos podem ser ativados diretamente por uma variedade de substâncias biológicas, como peptídeos, citocinas, anafilotoxinas e derivados do complemento (DONATH et al., 2009). Eles são bem hábeis para liberar mediadores inflamatórios, como histamina, proteases, fatores quimiotáticos, citocinas e metabólitos do ácido araquidônico (REUTER et al., 2010).

Os neutrófilos constituem os primeiros leucócitos sanguíneos a alcançar a área da reação inflamatória. Têm capacidade de englobar, matar e digerir microrganismos. Os neutrófilos dispõem de mecanismos microbicidas extremamente eficientes, porém morrem depois de exercida sua fagocitose. Os monócitos migram do sangue para a área lesada dentro de várias horas após os neutrófilos. Nos tecidos os monócitos são transformados em macrófagos. Eles fagocitam um grande número de microrganismos, além de removerem restos celulares e resíduos provenientes de tecidos lesados, sendo essenciais para a reparação tecidual (DONATH et al., 2009).

Os macrófagos ativados produzem citocinas como TGF- β (fator de crescimento transformador) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), além de outros fatores de crescimento e proliferação celular. Esses fatores induzem: a) proliferação e migração de fibroblastos; b) neoformação de capilares sanguíneos; c) síntese de componentes da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e proteoglicanos. Portanto, os macrófagos são células essenciais para promover a limpeza dos tecidos afetados pela inflamação, fagocitando restos celulares e promovendo síntese de componentes da matriz

extracelular e formação de novos vasos, necessários para reparo dos tecidos lesados (REUTER et al., 2010).

A inflamação é desencadeada pela liberação de mediadores químicos originados em fontes celulares ou humorais. Esses mediadores são os responsáveis pela uniformidade quase estereotipada da reação inflamatória, independente do agente agressor (LAPA et al., 2007). Os mediadores químicos específicos variam de acordo com o tipo de processo inflamatório: podem ser aminas, como histamina e 5-dihidroxitriptamina; lipídeos, como as prostaglandinas; pequenos peptídeos, como a bradicinina; e peptídeos maiores, como a interleucina-1 (LAPA et al., 2007; REUTER et al., 2010). O tipo e a quantidade relativa de cada mediador variam de acordo com a fase de desenvolvimento da resposta e, em certos aspectos, conforme o tipo do estímulo que desencadeou o processo. Mediadores de ação rápida, tais como aminas vasoativas, eicosanoides e produtos do sistema cininérgico, modulam a resposta imediata. Em seguida, mediadores neossintetizados, como os leucotrienos e interleucinas, são liberados e passam a controlar o acúmulo e a ativação de células no local inflamado (LAPA et al., 2007).

Histamina e serotonina são mediadores pré-formados, armazenados em grânulos, e estão entre os primeiros a serem liberados durante a inflamação. São responsáveis pela vasoconstrição inicial e, juntamente com outros mediadores, por vasodilatação subsequente e aumento da permeabilidade vascular (ALLER et al., 2006; GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). As prostaglandinas são sintetizadas a partir de um precursor primário, o ácido araquidônico (Fig. 4). Esse ácido é liberado de fosfolipídeos das membranas celulares pela ação da fosfolipase A2, através de um processo controlado por hormônios e outros estímulos. As prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina são obtidas através da ação catalítica das enzimas ciclooxigenases. Foram identificadas três ciclooxigenases, a COX-1, que é

constitutiva e amplamente distribuída, a COX-2, produzida em resposta a um estímulo inflamatório e a COX-3 que é uma variante da COX-1 (derivada do mesmo gene) e expressa em maior quantidade no córtex cerebral e coração (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). As prostaglandinas contribuem para a vasodilatação, permeabilidade capilar, bem como a dor e febre que acompanham a inflamação. As prostaglandinas estáveis (PGE1 e PGE2) induzem a inflamação e potencializam os efeitos da histamina e outros mediadores químicos envolvidos na inflamação. O tromboxano A2 promove a agregação plaquetária e a vasoconstrição (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2007).

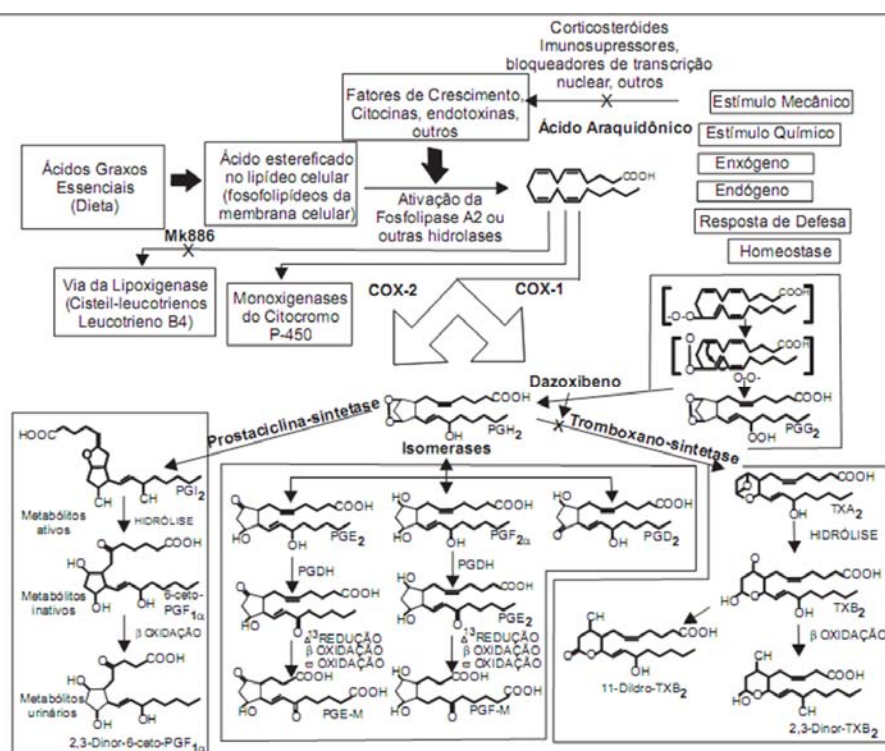


Figura 4 Síntese das prostaglandinas
 Fonte: Adaptado de Vane, Bakhle, Botting (1998)

Os produtos da inflamação, em situação normal, não produzem praticamente nenhuma lesão ao tecido do hospedeiro, pois os agentes agressores são removidos rapidamente e a produção de mediadores da inflamação é atenuada. Se a resposta inflamatória é direcionada contra o próprio organismo, não é efetiva na remoção do agente agressor ou não é regulada efetivamente, os tecidos então são destruídos pela ativação crônica dos leucócitos (REUTER et al., 2010).

2.4 O café como fonte de compostos bioativos: “Café e Saúde”

O café é um produto com a composição extremamente complexa. Mais de 1000 substâncias fazem parte dessa bebida (CLARK; MACRAE, 1989). Além da cafeína, o café apresenta outras substâncias bioativas como a trigonelina, compostos fenólicos (em que se destacam os ácidos clorogênicos) e compostos resultantes da reação de *Maillard*, como as melanoidinas (MORAIS et al., 2009; NEHLIG, 2004). Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de antioxidantes naturais. Eles são largamente distribuídos em frutos, legumes, grãos, sementes, folhas, raízes, cascas, dentre outros materiais. Esses constituintes são capazes de retardar o envelhecimento e o aparecimento de doenças (MORAIS et al., 2009).

O alto consumo de café no mundo tem estimulado muitos pesquisadores a estudar outras possíveis atividades biológicas relacionadas ao grão verde e especialmente ao café torrado, usado para preparar diferentes tipos de bebida. Existe uma vasta literatura que relata o potencial dos compostos bioativos ou componentes funcionais na ação contra os males da hipertensão, doenças cardiovasculares, câncer entre outras. Nos últimos anos, devido ao interesse crescente em encontrar alimentos funcionais, a relação café e saúde tem sido amplamente investigada (DÓREA; DA COSTA, 2005; GEORGE;

RAMALAKSHMI; JAGAN MOHAN RAO, 2008). No café encontra-se uma série de compostos com atividade biológica, tais como antioxidantes (BORRELLI et al., 2002; NICOLI et al., 1997), anticancerígenos (GIOVANNUCCI, 1998), anti-inflamatórios (FROST-MEYER; LOGOMARSINO, 2012; MOREIRA et al., 2013) e antimutagênicos (KIM; LEVIN, 1998). A atividade antioxidante da bebida do café resulta da presença de cafeína, trigonelina, ácido cafeico, produtos da reação de *Maillard*, compostos voláteis tais como furanos e pirróis e compostos fenólicos (CASTILLO; AMES; GORDON, 2002).

A cafeína é um dos alcaloides com atividade biológica mais ingerida no planeta. Os efeitos da cafeína sobre o comportamento humano têm sido objeto de estudos há algumas décadas (DE MARIA; MOREIRA, 2007). Esses efeitos podem ser descritos como melhora da capacidade de alerta e diminuição da fadiga, com melhora no desempenho de atividades que requeiram maior vigilância, além da melhoria na capacidade de concentração, no desempenho de tarefas simples, na vigilância e diminuição da sonolência e do cansaço (NEHLIG, 2004). Estudos sugerem que o consumo de café cafeinado pode interferir no humor, na disposição e na performance cognitiva devido ao seu efeito estimulante (LIEBERMAN et al., 2002). Além disso, a cafeína é citada como indutora da perda de peso devido ao seu efeito termogênico (GREENBERG; BOOZER; GELIEBTER, 2006) e aumento da lipólise (JUNG et al., 1981).

A cafeína atua antagonizando os efeitos da adenosina, uma substância química do cérebro (neurotransmissor) que causa sono (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Ela pode ligar-se aos receptores da adenosina, bloqueando-os. Desse modo, a ação inibitória da adenosina fica impedida, sendo o efeito da cafeína, conseqüentemente estimulante. No entanto, o consumo de cafeína pode afetar negativamente o controle motor e a qualidade do sono, bem como causar

irritabilidade em indivíduos com quadro de ansiedade (SMITH, 2002). Alguns autores concluíram que a eficácia da cafeína no alívio das dores de cabeça induzidas pela sua privação (que leva a vasodilatação cerebral) reflete as suas propriedades vasoconstritoras a nível central. Em outros tipos de cefaleia, como as de tensão, a cafeína parece ter um papel ativo no alívio da dor, sendo o efeito dependente da dose ingerida (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

O efeito da ingestão de cafeína e sua influência na pressão sanguínea são muito inconsistentes, referindo associações positivas, inversas e inexistentes. De um modo geral, não existe uma clara relação causal entre o consumo de café e hipertensão. Seu consumo regular parece elevar a pressão arterial de forma persistente e, dessa forma, indivíduos com hipertensão, doença coronariana e arritmia cardíaca deveriam ser encorajados a reduzir seus níveis de ingestão de cafeína (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

Com relação à homeostase de cálcio, dados compilados em uma revisão indicam que a cafeína não é prejudicial ao metabolismo ósseo de indivíduos cujo consumo de cálcio é adequado as suas necessidades metabólicas (HEANEY, 2002). Um estudo sobre os efeitos da cafeína na saúde humana indicou que seu consumo moderado (máximo de 4,6 mg/kg de peso), praticado por adultos saudáveis em idade reprodutiva, não está associado a efeitos adversos à saúde humana, desde a gestação até o final da vida (NAWROT et al., 2003).

O consumo de café cafeinado parece estar envolvido na redução do risco de desenvolver a doença de Parkinson (SÄÄKSJÄRVI et al., 2008). Essa doença é causada por uma degeneração severa dos neurônios dopaminérgicos da substância negra do cérebro, causando incapacidade do controle voluntário dos movimentos e levando ao tremor, aquinésia, rigidez e instabilidade postural (ERIKSEN; WSZOLEK; PETRUCELLI, 2005). Os mecanismos através dos quais esse efeito protetor ocorre não se encontram totalmente esclarecidos, mas parecem estar relacionados com a atividade antagonista da cafeína sobre os

receptores da adenosina A1 e A2A, no sistema nervoso central (CHEN et al., 2001). Outros compostos químicos presentes no café torrado poderão contribuir para uma associação inversa verificada entre a doença de Parkinson e café. As β -carbonilas harmana e nor-harmana referidas como compostos envolvidos na prevenção dessa doença, devido à sua capacidade de inibir competitiva e irreversivelmente as monoaminoxidases A e B (enzimas envolvidas no metabolismo da dopamina e outros neurotransmissores). Elas se formam essencialmente durante a torra do café, através de uma reação entre indoletilaminas (exemplo: L-triptofano) e compostos carbonílicos como acetaldéido ou formaldeído (HERRAIZ; CHAPARRO, 2006).

Alguns estudos epidemiológicos apontam para um papel neuroprotetor da cafeína em relação ao desenvolvimento da doença do Alzheimer (MAIA; MENDONÇA, 2002). A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa, que resulta na diminuição progressiva das capacidades cognitivas, por aumento dos níveis cerebrais da proteína β -amiloide. Relata-se que o aumento do estresse oxidativo no cérebro possui um papel essencial na patogênese (ARENDASH et al., 2006). O mecanismo dessa proteção não se encontra totalmente esclarecido. Um estudo realizado com culturas de células nervosas animais sugere que o antagonismo dos receptores A2A da adenosina protege as células nervosas contra a neurotoxicidade induzida pela proteína β -amiloide (DALL'LGNA et al., 2003).

A trigonelina e os produtos provenientes de sua degradação térmica têm recebido considerável atenção devido à sua importância do ponto de vista nutricional e sensorial. A trigonelina é um composto nitrogenado encontrado em maiores quantidades no café verde. Ela é importante para o sabor e aroma da bebida do café. Ela é rapidamente degradada durante a torra originando, entre outros compostos, a niacina, também designada por ácido nicotínico ou vitamina B3 (FARAH et al., 2005). O consumo moderado da bebida do café pode

contribuir para a prevenção do desenvolvimento da pelagra, que é uma doença caracterizada por dermatite, diarreia e demência. Ocorre em situações de desnutrição, quando se verifica uma carência de niacina ou de aminoácidos essenciais como triptofano (RAMOS E SILVA; FILGUEIRA, 1989). A trigonelina tem ação sobre os hepatócitos (aumentando seu metabolismo), na produção da bile e na redução da mortalidade celular em modelos de hepatite química por tetracloreto de carbono. Ela também pode impedir o desenvolvimento de placas bacterianas e a formação de cáries, através da formação de barreiras protetoras e na redução da colonização do *Streptococcus mutans* na superfície dentária, podendo dessa forma ser eficaz na prevenção da queda de dentes induzida pelo *S. mutans* (MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 2000).

Os componentes fenólicos presentes nos vegetais têm recebido considerável atenção por serem os principais componentes antioxidantes. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos tem sido atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção e neutralização de radicais livres (BASILE et al., 2005). Os ácidos clorogênicos constituem os principais e mais abundantes compostos fenólicos com propriedades antioxidantes no café e são de grande interesse econômico devido à sua degradação, durante a torração, originando pigmentos e compostos voláteis do aroma, como fenol e vinilguaiacol (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Em estudos realizados em ratos, o consumo de ácidos clorogênicos e produtos de sua degradação durante a torração provocaram uma diminuição da concentração de glicose e um aumento da sensibilidade à insulina, respectivamente (SHEARER et al., 2003). Diversos mecanismos de ação dos ácidos clorogênicos foram estudados, em animais e *in vitro*, com o objetivo de clarear os seus efeitos benéficos no metabolismo da glicose, entre os quais pode citar: redução da absorção de glicose no intestino (inibição da glicose-6-fosfato

translocase 1); aumento subsequente dos níveis de peptídeo-1 semelhante ao glucagon (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003); redução da libertação da glicose hepática (por inibição da glicose-6-fosfatase); efeito antioxidante (CLIFFORD, 1999), uma vez que o estresse oxidativo desempenha um papel no desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo II (HAMILTON; CHEW; WATTS, 2007); ação quelante de metais, modificando a composição mineral dos tecidos e melhorando a tolerância à glicose, como por exemplo o aumento das concentrações de magnésio no fígado (RODRIGUEZ DE SOTILLO; HADLEY, 2002); e inibição da formação de compostos N-nitrosos no trato gastrintestinal, que seriam tóxicos para as células beta do pâncreas (VAN DAM et al., 2006).

Durante as últimas décadas, estudos *in vitro* e *in vivo* levaram os pesquisadores a atribuir diferentes funções farmacológicas aos ácidos clorogênicos, tais como:

- a) anti-inflamatório em modelo de edema de pata induzido por carragenina e também como antinociceptivo em modelos animais (DOS SANTOS et al., 2006);
- b) antidepressivos e atuação no desejo de consumir álcool e drogas: influencia diretamente a atuação da dopamina, uma substância responsável pelas sensações de alegria e bem-estar, e que é controlada por receptores opioides (BOUBLIK et al., 1983);
- c) atividade inibitória sobre as integrases que participam na replicação do vírus HIV (ZHU et al., 1999);
- d) efeito indutor na replicação e na mobilidade de macrófagos, o que acarretaria o aumento da imunidade (TATEFUJI et al., 1996) e característica antimutagênica (STICH; ROSIN; BRYSON, 1982).

Os diterpenos cafestol e caveol, presentes na fração lipídica do café possuem atividade quimioprotetora e anticarcinogênica. As atividades quimioprotetoras desses compostos parecem estar associadas com modificações benéficas no metabolismo de xenobióticos que incluem inibição de enzimas do citocromo P450, com conseqüente redução na ativação de substâncias mutagênicas/carcinogênicas (CAVIN et al., 2002). Dados experimentais suportam a ideia que o caveol reduziu o processo inflamatório do edema de pata induzido por carragenina (KIM; KIM; JEONG, 2006).

A relação entre o consumo do café e o câncer de bexiga é controversa, apesar dos muitos estudos publicados nas últimas décadas. Alguns trabalhos referem um risco de câncer na bexiga ligeiramente mais elevado nos consumidores de café, comparativamente com aquelas pessoas que não são consumidoras, não sendo dependente da quantidade de café ingerida. Não se sabe ainda, se essa leve associação é casual ou se é devida a algum outro fator, como por exemplo, o uso associado de tabaco (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Alguns estudos indicam um ligeiro aumento no risco de desenvolvimento de câncer do pâncreas em indivíduos que ingerem elevadas quantidades de café, mas a maioria das investigações não encontrou qualquer associação positiva, especialmente para um consumo moderado. Não há evidências claras de que a ingestão de café possa causar câncer. Algumas investigações referem até um papel positivo do café na prevenção de determinado câncer, como: mama, ovários, pele, fígado, cólon e reto (GEORGE; RAMALAKSHMI; JAGAN MOHAN RAO, 2008).

Estudos epidemiológicos apontam para o papel protetor do café em relação ao desenvolvimento de cirrose hepática, especialmente cirrose alcoólica. Diversos ensaios demonstraram uma diminuição dos níveis da enzima hepática gama-glutamyltransferase e uma redução da atividade alanina aminotransferase sérica (marcadores da função hepática). Esse efeito benéfico pode ser devido a

vários componentes do café como: cafeína, o cafestol, o caveol e os polifenóis (KENDRICK; DAY, 2007).

Os estudos realizados com consumidores moderados da bebida do café sugerem que os sintomas usuais da asma podem ser reduzidos e, além disso, esse consumo pode prevenir as manifestações clínicas da asma. A cafeína pode ser um dos componentes responsáveis por essa atividade, pois exerce a função broncodilatadora, além de reduzir a fadiga dos músculos respiratórios (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

Nesse contexto, o café tem sido estudado em diversos modelos experimentais tendo sido provado que seu consumo pode contribuir para a prevenção de doenças como Parkinson (ASCHERIO; CHEN; SCHWARZSCHILD, 2003; SÄÄKSJÄRVI et al., 2008), diabetes (SMITH et al., 2006, VAN DAM et al., 2006), Alzheimer (BARRANCO QUINTANA et al., 2007), perda de peso (GREENBERG; BOOZER; GELIEBTER, 2006) e hepatopatias (KLATSKY et al., 2006). Por outro lado não se demonstrou relação entre o consumo de café e um aumento do risco cardiovascular (KLEEMOLA et al., 2000), entretanto a relação entre o consumo de café e o risco de doenças cardiovasculares foi analisada em muitos estudos, mas os resultados ainda são controversos (LOPEZ-GARCIA et al., 2006; SOFI et al., 2007; VAN TOL et al., 1997; VERHOEF et al., 2002). Contudo, em diversos estudos publicados, existe uma verdade incontestável: a ingestão moderada de café não representa qualquer risco para a saúde (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os extratos (aquoso e etanólico) de café verde e torrado possuem propriedades de gerar efeito anti-inflamatório nos modelos de edema de pata induzido por carragenina, formalina e peritonite induzida por LPS quando comparados com compostos anti-inflamatórios padrões. Esse efeito pode ser devido à presença no café de compostos com atividade antioxidante, como os flavonoides, ácidos clorogênicos, dentre outros, que foram determinados por métodos químicos e cromatográficos de análise. Além disso, esses resultados demonstraram que os extratos de café verde possuem maior capacidade antioxidante medidas pelo radical DPPH. Os extratos de café verde e de café torrado (aquoso e etanólico) poderão ser utilizados no desenvolvimento de formulações para tratamento de desordens que envolvam processos oxidativos e inflamatórios. Novos estudos poderão ser realizados na busca da elucidação dos mecanismos de ação, além da determinação da segurança e toxicidade dos extratos e assim agregar maior valor ao café.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1799-1804, dez. 2008.

ALLER, M. A. et al. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, New York, v. 12, p. 225- 234, out. 2006.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 2169-2180, set. 2009.

ANDRADE, J. B. et al. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova**, São Paulo, v. 18, p. 379-381, jan. 1995.

ARENDASH, G. W. et al. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. **Neuroscience**, Oxford, v. 142, p. 941-952, Nov. 2006.

ASCHERIO, A.; CHEN, H.; SCHWARZSCHILD, M. A. et al. Caffeine, postmenopausal estrogen, and risk of Parkinson's disease. **Neurology**, Minneapolis, v. 60, p. 790-795, mar. 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. **Indicadores da indústria de café no brasil**. Disponível em: <http://www.abic.com.br/estatisticas.html>. Acesso em : 18 fev. 2013.

BARRANCO QUINTANA, J. L. et al. Alzheimer's disease and coffee: a quantitative review. **Neurological Research**, Chicago, v. 29, n. 1, p. 91-95, Jan. 2007.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 102, p. 32-36, Oct. 2005.

BEAVERS, K. M.; BRINKLEY, T. E.; NICKLAS, B. J. Effect of exercise training on chronic inflammation. **Clinica Chimica Acta**, Buenos Aires, v. 411, p. 785-793, June 2010.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago. 1999.

BORRELLI, R. C. et al. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 22, p. 6527-33, Oct. 2002.

BOUBLIK, J. H. et al. Coffee contains potent opiate receptor binding activity. **Nature**, London, v. 301, p. 246-248, Jan. 1983.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília, 2013. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em: 17 fev. 2013

BREZOVÁ, V.; ŠLEBODOVÁ, A.; STAŠKO, A. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. **Food Chemistry**, London, v. 114, p. 859-868, June 2009.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 48, p. 137-158, mar./abr. 1998.

CASAL, S.; OLIVEIRA, B.; FERREIRA, M. A. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. **Food Chemistry**, London, v. 68, p. 481-485, mar. 2000.

CASTILLO, M. D. del; AMES, J.; M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 13, p. 3698-3703, Aug. 2002.

CAVIN, C. et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, p. 1155-1163, Aug. 2002.

CHEN J. F. et al. Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 21, p. 1-6, Nov. 2001.

CHONG, Z. Z.; LI, F.; MAIESE, K. Oxidative stress in the brain; novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 75, p. 207-246, Feb. 2005.

CLARKE, R. J.; MACRAE, K. (Ed.). "**Coffee Vo1 2**". London: Elsevier, 1989.

CLARKE, R. J. Water e mineral contents. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee chemistry**. London: Elsevier, 1989. p. 42-82, v. 1.

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

CLIFFORD, N. et al. Characterization by LC-MSn of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oxford, v. 54, n. 6, p. 1957-1969, mar. 2006.

DALLA ROSA, M.; BARBANTI, D.; LERICI, C. R. Changes in coffee brews in relation to storage temperature. **Journal of the Science and Food Agricultural**. Oxford, v. 50, p. 227-235, Sept. 1990.

DALL'IGNA, O. P. et al. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 138, p. 1207-1209, Apr. 2003.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 99-105, Jan./Feb. 2007.

DEMARCHI, M. **Café: aspectos econômicos**. Curitiba: SEAB, 2001.

DONATH, M. Y. et al. Islet inflammation impairs the pancreatic b-cell in type 2 diabetes. **Physiology**, Bethesda, v. 24, p. 325-331, Dec. 2009.

DÓREA, J. G.; DA COSTA, T. H. Is coffee a functional food? **British Journal of Nutrition**, London, v. 93, p. 773-782, Nov. 2005.

DOS SANTOS, M. D. et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, p. 2236-2240, Aug. 2006.

DUARTE, G. S.; PEREIRA, A. A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, London, v. 118, p. 851-855, Feb. 2010.

DUARTE, S. M. S. **Atividade antioxidante e antimutagênica in vivo e in vitro da bebida café**. 2004. 114p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

DURRANT, K. L. Known and hidden sources of caffeine in drug, food, and natural products. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, Washington, v. 42, p. 625–637, July/Aug. 2002.

ERIKSEN, J. L.; WSZOLEK, Z.; PETRUCCELLI, L. Molecular pathogenesis of Parkinson disease. **Archives of Neurology**, Chicago, v. 62, p. 353-357, Mar. 2005.

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

FERNANDES, S. M. et al. Avaliação química da qualidade dos grãos de café torrados de duas cooperativas do sul de minas gerais. **Revista Brasileira de Armazenamento, Especial Café**, Viçosa, MG, v. 3, p. 35-38, mar. 2001.

FERRÃO, A. M. A. **Arquitetura do café**. Campinas: UNICAMP, 2004. 296 p.

FERRARI, R. et al. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defenses against oxygen toxicity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, New York, v.17, p. 937-945, Oct. 1985.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 201, p. 671-674, Mar. 2005.

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

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia aplicada: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 545 p.

GEORGE, S. G.; RAMALAKSHMI, K.; JAGAN MOHAN RAO, L. A. A perception on health benefits of coffee. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, p. 464-486, May 2008.

GIOVANNUCCI, E. Meta-analysis of coffee-consumption and risk of colorectal cancer. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 147, p. 1043-1052, nov. 1998.

GREENBERG, J. A.; BOOZER, C. N.; GELIEBTER, A. Coffee, diabetes, and weight control. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 84, p. 682-693, Apr. 2006.

GÜLÇİN, İ.; ALICI, H. A.; CESUR, M. Determination of in vitro Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. **Chemical & Pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 53, n. 3281, p. 281-285, Mar. 2005.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Krakow, v. 54, p. 469-487, Apr. 2003.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 141, p. 312-322, June 2006.

HAMILTON, S. J.; CHEW, G. T.; WATTS, G. F. Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes and Vascular Disease Research**, Birmingham, v. 4, p. 89-102, June 2007.

HEANEY, R. P. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. **Food Chemistry and Toxicology**, Oxford, v. 40, p. 1263-1270, Sept. 2002.

HERRAIZ, T.; CHAPARRO, C. Analysis of monoamine oxidase enzymatic activity by reversed-phase high performance liquid chromatography and inhibition by beta-carboline alkaloids occurring in foods and plants. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1120, p. 237-243, July 2006.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee**: the chemistry of quality. London: Academic, 1995. 253 p.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 78, p. 728-733, Oct. 2003.

JUNG, R. T. et al. Caffeine: its effects on catecholamines and metabolism in lean and obese subjects. **Clinical Science**, Melbourne, v. 60, p. 527-35, Mar. 1981.

KENDRICK, S. F. W.; DAY, C. P. A coffee with your brandy, Sir? **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 46, p. 980-982, Dec. 2007.

KIM, J.; LEVIN, R. E. Mechanism of caffeine repression of mitomycin C induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA94. **Microbios**, Cambridge, v. 53, p. 181-190, June 1998.

KIM, J. Y.; KIM, D. H.; JEONG, H. G. Inhibitory effect of the coffee diterpene kahweol on carrageenan-induced inflammation in rats. **Bio Factors**, Oxford, v. 26, p. 17-28, 2006.

KLATSKY, A. L. et al. Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. **Archives of internal medicine**, Chicago, v. 166, n. 11, p. 1190-1195, 2006.

KLEEMOLA, P. et al. Coffee consumption and the risk of coronary heart disease and death. **Archives of internal medicine**, Chicago, v. 160, p. 3393-3400, Aug. 2000.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 659, p. 15-30, Sept. 2008.

LAPA, A. J. et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. 5. ed. São Paulo: UNIFESP/EPM, 2007.

LIEBERMAN, H. R. et al. Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. *Sea-Air-Land. Psychopharmacology*, Berlin, v. 164, p. 250-261, Nov. 2002.

LÓPEZ-GALILEA, I.; PAZ DE PEÑA, I.; CID, C. Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influence of the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oxford, v. 55, p. 6110-6117, July 2007.

LOPEZ-GARCIA, E. et al. Coffee consumption and coronary heart disease in men and women: a prospective cohort study. **Circulation**, Boston, v. 113, n. 17, p. 2045-2053, Feb. 2006.

MAIA, L.; MENDONÇA, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? **European journal of neurology**, Oxford, 9, p. 377-382, July 2002.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 1286 p.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in bioscience**, Tampa, v. 4, p. 339-345, Apr. 1999.

MENDONÇA, L. M. V. L. et al. Parâmetros bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 239-243, abr./jun. 2005.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 637-641, dez. 2005.

MORAIS, S. A. L. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 327-331, mar. 2009.

MOREIRA, M. E. C. et al. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L. **Journal of Functional Food**, Toronto, v. 5, n. 4, p. 66-474, Jan. 2013.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Compostos voláteis do café torrado. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 195-203, jul. 2000.

NAWROT, P. et al. Effects of caffeine on human health. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, p. 1-30, Jan. 2003.

NEHLIG, A. **Em coffee, tea, chocolate, and the brain**. Boca Raton: CRC, 2004, p. 53-71.

NICOLI, M. C. et al. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Letters**, Virginia, v. 114, p. 71-74, Mar. 1997.

O'BRIEN, J.; MORRISSEY, P. A. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard reaction in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, p. 211-248, June 1989.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 87, p. 315 -424, Jan. 2007.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2, p. 270-278, Nov./Dec. 2009.

RAMOS E SILVA, M.; FILGUEIRA, A. L. Pelagra. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 5, p. 249-252, set./out. 1989.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 49, p. 1603-1616, Dez. 2010.

RODRIGUEZ DE SOTILLO, D. V.; HADLEY, M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. **Journal of nutritional biochemistry**, Stoneham, v. 13, n. 12, p. 717-726, Dec. 2002.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, mai. 2001.

SÄÄKSJÄRVI, K. et al. Prospective study of coffee consumption and risk of Parkinson's disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 5, n. 1, p. 908-915, Mai. 2008.

SALVA, T. J. G.; LIMA, V. B. A composição química do café e as características da bebida e do grão. **O Agrônomo**, Campinas. v. 59, n. 1, p. 57-59, jun. 2007.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niteroi, v. 10, n. 4, p. 1-6, jul./ago. 2004.

SHEARER, J. et al. Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, p. 3529-3532, Nov. 2003.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, Oxford, v. 18, p. 385-405, set. 2004.

SMITH, A. Effects of caffeine on human behaviour. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 9, p. 1243-1255, set. 2002.

SMITH, B. et al. Does coffee consumption reduce the risk of type 2 diabetes in individuals with impaired glucose? **Diabetes Care**, Alexandria, v. 29, n. 11, p. 2385-90, nov. 2006.

SOFI, F. et al. Coffee consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Milano, v. 17, n. 3, p. 209-223, mar. 2007.

SOUZA, F. D. et al. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa, 2004. 21 p. (Documentos, 93).

STICH, H. F.; ROSIN, M. P.; BRYSON, L. Inhibition of mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 95, p. 119-128, Aug. 1982.

STVRTINOVÁ, V.; JAKUBOVSKÝ, J.; HULÍN, I. **Inflammation and fever**. Slovakia: Academic, 1995.

TATEFUJI, T. et al. Isolation and identification of compounds from brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 19, p. 966-970, July 1996.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafês arábica e robusta antes e após a torração. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 965-971, jul. 2006.

TRUGO, L. C. Café: composição e potencial nutracêutico. In: MERCADANTE, A. Z. et al. (Ed.). **Ciência de alimentos: avanços e perspectivas**. Campinas: Unicamp, 2001. p. 206-208, v. 2.

TRUGO, L. C.; MOREIRA, R. F.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: compostos heterocíclicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 209-217, jul. 1999.

VAN DAM, R. M. et al. Coffee, Caffeine, and Risk of Type 2. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 29, p. 398-403, Oct. 2006.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. - Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology**, Tucson, v. 38, p. 97-120, jun. 1998.

VAN TOL, A. et al. The cholesterol-raising diterpenes from coffee beans increase serum lipid transfer protein activity levels in humans. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 132, n. 2, 251-254, July 1997.

VERHOEF, P. et al. Contribution of caffeine to the homocysteine-raising effect of coffee: a randomized controlled trial in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 76, n. 6, p. 1244-1248, Dec. 2002.

WU, J. N. et al. Coffee consumption and risk of coronary heart diseases: A meta-analysis of 21 prospective cohort studies. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 137, n. 3, p. 216-225, Nov. 2008.

ZHU, K. et al. Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, p. 3309-3316, Jan. 1999.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

**ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS OF
ROASTED AND GREEN *COFFEA ARABICA* L.**

Journal of Functional Foods, v. 5, 4, p. 66-474, jan. 2013.

Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L.

ABSTRACT

Green coffee contains a large quantity and variety of polyphenols and flavonoids. The roasting affects the composition of the polyphenols in coffee, due to the formation of compounds generated by Maillard reaction, which can have anti-inflammatory or antioxidant potential. The anti-inflammatory and antioxidant effects of aqueous extracts of green (AGCa) and roasted (ARCa) coffee beans were investigated in animal models and using a DPPH radical scavenging test. In the formalin test the extracts reduced licking activity only in the late phase. The inhibitory values of oedema at 3 h post-carrageenan were 53 and 74% for 100 and 300 mg/kg of the AGCa extract and 36% for ARCa (300 mg/kg). Leukocyte recruitment into the peritoneal cavity was inhibited by the extracts. The antioxidant activities of the extracts were higher than the reference antioxidants, ascorbic acid and butylated hydroxytoluene. These results indicate that coffee extracts exhibit anti-inflammatory and antioxidant properties.

Key-words: inflammatory; antioxidant activity; chlorogenic acid; coffee; oedema; polyphenols.

1. INTRODUCCION

Coffee has been enjoyed as a drink by millions of people worldwide for at least one thousand years. Due to their unique taste and flavour, coffee brews are among the most consumed beverages in Europe and America (Brezová et al., 2009). Coffee is consumed for social engagements, leisure, enhancement of work performance and well-being.

Epidemiological and experimental studies have indicated positive effects of regular coffee consumption on various aspects of health, such as psychoactive responses, neurological behaviour (e.g., infant hyperactivity), Alzheimer's disease, Parkinson's disease, diabetes, gonad and liver function and cancer (Dórea & Da Costa, 2005; Kempf et al., 2010; Nawrot et al., 2003).

Coffee is also known to be a rich source of compounds with potent antioxidant activities (Nicoli et al., 1997; Svilaas et al., 2004). Several different compounds contribute to coffee's antioxidant capacity, including caffeine (Nawrot et al., 2003); polyphenols, including chlorogenic acids and volatile aroma compounds and heterocyclic compounds, including pyrroles, oxazoles, furans, thiazoles, thiophenes, imidazoles and pyrazines (Brezová et al., 2009). Many of these compounds are efficiently absorbed and plasma antioxidants increase after coffee intake (Dórea & Da Costa, 2005).

Coffee is a primary source of dietary antioxidants (Svilaas et al., 2004). Green coffee beans extract contains high percentage of total polyphenol antioxidants. This extract is a potent antioxidant, also a highly bioavailable ingredient for adding increased functionality to nutrition based products (George et al., 2008). Depending on the roasting conditions, natural coffee antioxidants are partially decomposed or bound to polymer structures (Nicoli et al., 1997). Roasting markedly affects its composition and some antioxidant properties are lost; however, the overall antioxidant properties of coffee brews are maintained

or even enhanced due to the formation of compounds possessing antioxidant activity, including Maillard reaction products (Nicoli et al., 1997). Other roasting by-products include biogenic amines (serotonin, spermidine and agmatine), which are formed in relation to the degree of roasting (Dórea & Costa, 2005).

Roasted coffee is a complex chemical mixture composed of more than 1000 different chemicals (Clarke & Macrae, 1989; George et al., 2008), some of which may possess biological activities that could be considered potentially beneficial, such as antioxidants. Coffee contains important chemical constituents known to exist within functional foods: flavonoids (catechins, anthocyanins), caffeic acid, and ferulic acid. Additional biologically active components found in coffee include nicotinic acid, trigonelline, quinolinic acid, tannic acid, pyrogallol, and caffeine (Dórea & da Costa, 2005). Since inflammation is correlated with and influenced by various cytokines and chemokines, reduction of those markers should decrease the degree of overall inflammation. Coffee is a potentially beneficial substance because it contains compounds which all have antioxidant or anti-inflammatory potential (Frost-Meyer & Logomarsino, 2012). However, there are few reports on the anti-inflammatory activity of coffee (Kim et al., 2006; Paur et al., 2010). The lack of scientific studies on the pharmacological properties of coffee and the presence of anti-inflammatory substances, such as flavonoids and antioxidants that are present in this genus, has led us to study the extracts of green and roasted beans of *Coffea arabica* L. in assays of inflammation animal models.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Materials and chemicals

Green coffee (*C. arabica* L.) cv. Yellow Bourbon, sieve 16/18, without imperfections, harvested in 2010, and was kindly supplied by Ipanema Agro Indústria Ltda (Alfenas, MG, Brazil). The beans obtained by the dry process, which yields natural coffees and by the semi-dry process were roasted (Probatino Leogap - Probat®, Brazil) in a two-step laboratory roaster with a 1 kg capacity at 200°C for sufficient time to yield medium-roasted samples. The beans were finely commercially ground and packed in non-permeable polypropylene/aluminium/polyethylene bags hermetically sealed under vacuum and stored at -10°C for 24 h. Afterwards the extracts were prepared at room temperature (25°C).

Reference standards such as caffeine, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid; CGA), caffeic acid, gallic acid, trigonelline, Folin-Ciocalteu's reagent, quercetin, carrageenan, indomethacin, ascorbic acid, butylated hydroxytoluene 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) and sodium citrate and phosphate buffered saline (PBS) reagents were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. HPLC solvents, such as acetonitrile and acetic acid were purchased from Carlo Erba, Milan, Italy.

2.2. Colour analysis

Colour analysis of the ground coffee was conducted using a tristimulus colorimeter (Chromameter-2 Reflectance, Minolta, Osaka, Japan) equipped with a CR-300 measuring head. The instrument was standardised against a white tile before each measurement. Colour was expressed in L*, a* and b* International Commission on Illumination (CIE) scale parameters. Five measurements were performed on each sample and the coefficients of variation were expressed as the percentage ratio between the standard deviation and the mean value, which was less than 5%.

2.3. Preparation of extracts and reference drugs

Samples of powered green (not roasted) and roasted coffee beans (100 g) were extracted with 1000 ml of 90°C water followed by filtration. The water was removed using a freeze-dryer (LIOBRAS L101, São Paulo, Brazil), producing a powder for further use in the experiments. The aqueous extracts of the green (AGCa) or roasted (ARCa) coffee beans were administered in 30, 100 and 300 mg/kg doses after being suspended in a vehicle (water). The control group animals received the same experimental handling as those of the test groups, except that the drug treatment was replaced with appropriate volumes of the dosing vehicle. Indomethacin (10 mg/kg, p.o.) and morphine sulphate (1 mg/kg, i.p.) in vehicle were used as reference drugs. These time points and the doses of extracts and drugs used in the present study were chosen on the basis of previous studies (Moreira et al., 2008; Vilela et al., 2010; Santa-Cecilia et al., 2011).

2.4. HPLC profile of coffee beans

The liquid chromatography (HPLC) profile was obtained using Shimadzu LC-100 equipment with a UV/Vis Detector (monitoring 254 nm), an automatic injector and LC solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan). The HPLC apparatus was equipped with a C18 column (Shimadzu CLC-ODS; 4.6 x 250 mm; 5 µm). The mobile phase consisted of 0.5 mM aqueous acetic acid (A) and acetonitrile (B) with a flow rate of 0.7 ml/min. The following elution profile was used: 0-5 min 95:5 (v/v; A:B) (isocratic); 5-13 min 87:13 (v/v; linear); 13-27 min 87:13 (v/v; isocratic) and 27-30 min 95:5 (v/v; linear). An equilibration period of 10 min was included between runs.

2.5. Determination of total phenolic and flavonoid content

The total content of phenolic phytochemicals was measured using the Folin-Ciocalteu method (Singleton et al., 1999). The total phenolic content is expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of extract. Samples were analysed in triplicate. The flavonoid content was measured using a previously developed colorimetric assay (Kalia et al., 2008). The flavonoid content was expressed as mg of quercetin equivalent (QE) per g of extract. Samples were analysed in triplicate.

2.6. DPPH free radical-scavenging activity

The property to scavenge DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radicals was measured according to the method described by Yen et al. (2005). Various concentrations of aqueous extracts of green (AGCa) or roasted (ARCa) coffee beans (*Coffea arabica* L.) in an ethanol solution (4.0 mL) were mixed

with 1.0 mL DPPH (0.02% in ethanol). After incubation for 30 min in the dark at room temperature, the absorbance was recorded at 517 nm. The controls contained all of the reaction reagents except the extracts or the positive control (ascorbic acid - AA or butylated hydroxytoluene - BHT). The scavenging property was estimated based on the percentage of DPPH radicals scavenged using the following equation: scavenging effect (%) = [(control absorbance - sample absorbance) / (control absorbance)] x 100. The values are presented as the mean of triplicate analyses. The IC₅₀ value is the effective concentration that could scavenge 50% of the DPPH radicals. Ascorbic acid and BHT standards were used as positive controls.

2.7. Pharmacological procedures

2.7.1. Animals

Adult male Wistar rats (180-220 g) and adult male Swiss mice (25-35 g), obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas, were housed under controlled light (12:12 h light-dark cycle; lights on at 06:00 am) and temperature conditions (22 ± 1°C) with access to water and food *ad libitum*. At the end of experiment, rats were euthanised using an overdose of halothane anesthetic. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas (290/2010).

2.7.2. Evaluation of anti-inflammatory activity

2.7.2.1. Formalin-induced nociception

A formalin solution (5% in saline; 20 μ l per paw) was injected into the hind paw plantar surface (i.pl.) and the animals were individually placed in transparent observation chambers as previously described (Milano et al., 2008). Oral treatments (p.o.) with the vehicle, indomethacin and the coffee extracts AGCa or ARCa were administered 1 h prior to formalin injection (n = 8 per group). Morphine was administered (i.p.) 30 min before the test. The time spent licking the injected paw was recorded and expressed as the total licking time during the early phase (0-5 min) and late phase (20-30 min) after formalin injection.

2.7.2.2. Carrageenan-induced rat paw oedema

Pedal inflammation in the rat was produced as described previously (Vinegar et al., 1969), following an overnight fast with free access to water. Paw oedema was measured with a plethysmometer (Model 7140, Ugo Basile, Rome, Italy), which consists of the immersion of the animals paws in a vat, containing transducer ionic solution, was utilized to measure the edematogenic process and the volume of the paw was established directly in ml, through a digital system. The basal volume of the right hind paw was determined before the administration of any drug. After determination of the basal volume, the animals (n = 6 per group) were divided into experimental groups in such a way that the mean volumes of the different groups were similar. The vehicle, the coffee extracts AGCa and ARCa (30, 100, 300 mg/kg) or indomethacin (10 mg/kg) were orally administered 1 h before the injection of carrageenan (1 mg, i.pl.).

The paw volume was measured 1, 2, 3 and 4 h after injection of the inflammatory stimulus.

2.7.2.3. Peritonitis induced by lipopolysaccharide in mice

To assess the possible effect of AGCa and ARCa on leukocyte recruitment into the peritoneal cavity, the animals (n = 8 per group) were orally pre-treated with the vehicle, extracts (30, 100, 300 mg/kg) or indomethacin and 1 hour after, lipopolysaccharide from *E. coli* serotype 026:B6 (LPS, 500 µg/kg; i.p.) dissolved in pyrogen-free sterile saline were administered. The mice were sacrificed four hours after the injection of LPS and the cells from the peritoneal cavities were collected by injection of 3 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% sodium citrate buffer. The abdomens were gently massaged and the blood-free cell suspension was carefully aspirated with a syringe. Abdominal washings were placed into plastic tubes and total cell counts were performed immediately in a Neubauer chamber (Cunha et al., 1989).

2.8. Statistical analysis

Data were analysed using the GraphPad software program Version 5.0 and expressed as the mean ± S.E.M. Statistically significant differences between the groups were calculated using analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test. A nonlinear regression was performed on the antioxidant activity data to obtain the IC₅₀ values (concentrations that inhibit the presence of free radicals by 50.0%) and the curves were compared statistically using F test (Woode et al., 2008). P-values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Chemical characterisation

According to the L*, a* and b* colour space of the CIE (International Commission on Illumination) parameters, our roasted coffee beans were classified as ‘medium roast’.

The results of the HPLC analysis are presented in Table 1. Bioactive compounds, such as chlorogenic acid (CGA), caffeine, caffeic acid and trigonelline, were identified by comparison of the sample retention times with standards. The amount of each compound present was quantified using an external standard calibration. The retention times for the standards of chlorogenic acid, caffeine, caffeic acid and trigonelline were 23.28, 24.22, 24.92 and 3.96 min, respectively.

Table 1. Concentrations of chlorogenic acid (CGA), trigonelline, caffeine and caffeic acid in the aqueous extracts of green (AGCa) and roasted (ARCa) coffee beans (*Coffea arabica* L.) (g/100g of ground).

	CGA	Trigonelline	Caffeine	Caffeic acid
AGCa	0.6471±0.006 ^a	0.4522±0.005 ^a	0.9189±0.001 ^a	0.2723±0.006 ^a
ARCa	0.07703±0.002 ^b	0.1444±0.001 ^b	0.9172±0.001 ^a	0.2124±0.016 ^b

*Values are expressed as mean ± SD (n = 3). ^{a, b} Means within a column, followed by different letters are significantly different by Newman test, $p < 0.05$.

The total phenolic content, obtained by the Folin-Ciocalteu method, was expressed in gallic acid equivalents. The results indicate that the levels of polyphenolics in the AGCa and ARCa extracts were 60.6 and 63.8 mg/g extract,

respectively. The contents of total flavonoids were 4.36 and 4.86 mg as quercetin equivalents per g of the AGCa and ARCa extracts, respectively.

3.2. Radical-scavenging activity

As presented in Table 2, the extract of AGCa demonstrated similar scavenging activity compared with the ARCa extract. The antioxidant activities of the ARCa extract (7.1 and 4.4 fold for the references) and AGCa extract (8.1 and 5.0 fold, respectively) were higher than the reference antioxidants, ascorbic acid and BHT.

Table 2. Scavenging activity of DPPH• of aqueous extracts of green (AGCa) and roasted (ARCa) coffee beans (*Coffea arabica* L.) DPPH and the standard ascorbic acid (AA) and butylated hydroxytoluene (BHT).

Sample	IC ₅₀ (µg/ml)	S D
AGCa	1.134 ^a	0.360
ARCa	1.298 ^a	0.527
AA	9.185 ^b	0.665
BHT	5.721 ^b	1.259

^{a, b.} Means within a column, followed by different letters are significantly different by F test, p<0.05.

3.3. Anti-inflammatory activity

3.3.1. Formalin-induced nociception

At doses of 30-300 mg/kg p.o., a significant antinociceptive activity was observed in comparison with the control, but only during the late phase (F_{5,50}=

11.43; $p < 0.0001$ for ARCa and $F_{5,51} = 11.62$; $p < 0.0001$ for AGCa). However, the analgesic activity of the extracts during the early phase pain was not significant. The reference drug, indomethacin, suppressed only the second phase of the formalin test, whereas morphine inhibited both phases of the pain stimulus ($p < 0.001$; Fig. 1 and 2).

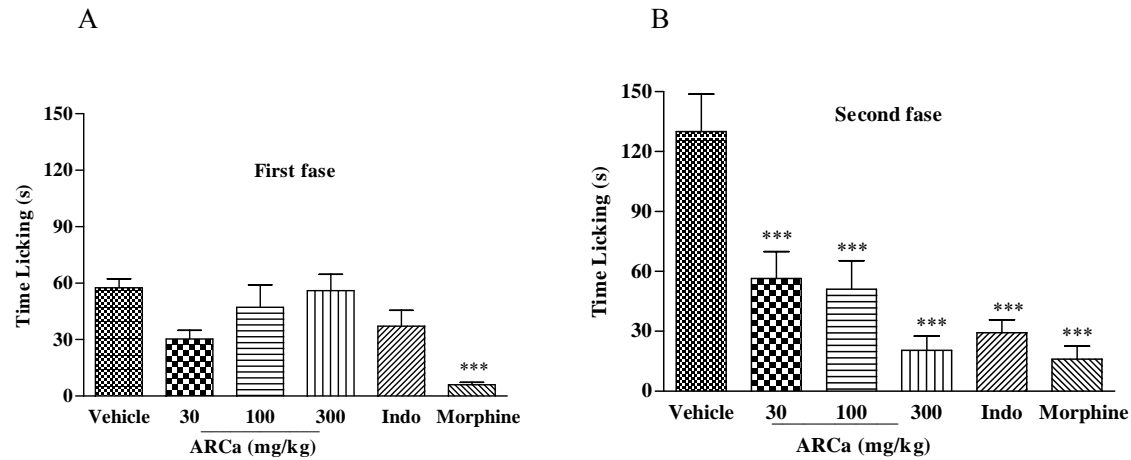


Figure 1. Effects of *Coffea arabica* aqueous extracts roasted (ARCa) given orally on the licking induced by formalin in mice. The animals were pretreated orally with vehicle, ARCa (doses 30, 100 and 300 mg/kg), indomethacin (Indo: 10 mg/kg) or morphine (1 mg/kg) prior to formalin. The total time spent licking the hind-paw was measured in the first (Panel A) and second (Panel B) phases after intraplantar injection of formalin. Each column represents the mean with S.E.M. for eight mice in each group. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group:***p<0.001.

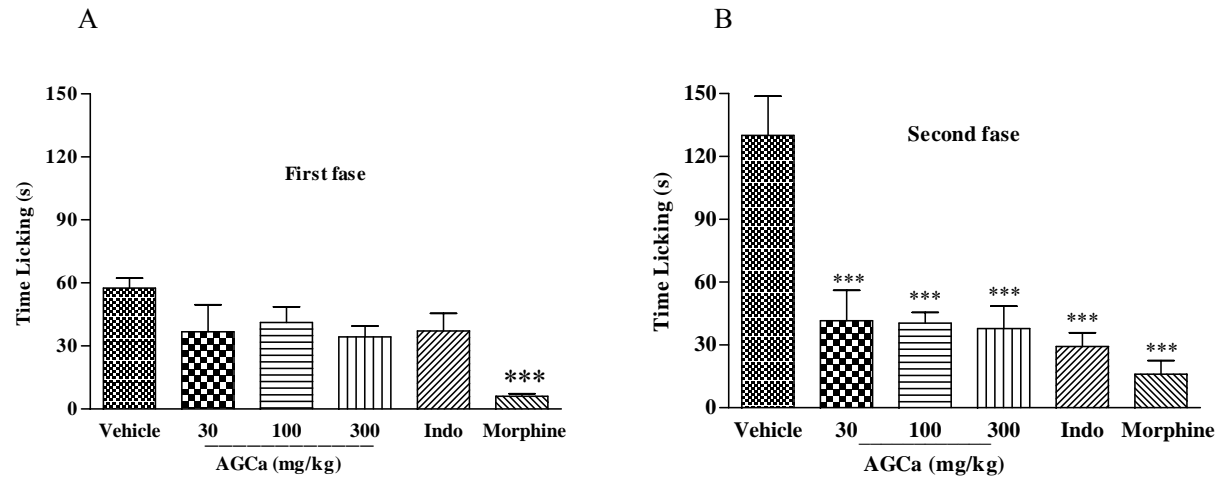


Figure 2. Effects of *Coffea arabica* aqueous extracts green (AGCa given orally on the licking induced by formalin in mice. The animals were pretreated orally with vehicle, AGCa (doses 30, 100 and 300 mg/kg), indomethacin (Indo: 10 mg/kg) or morphine (1 mg/kg) prior to formalin. The total time spent licking the hind-paw was measured in the first (Panel A) and second (Panel B) phases after intraplantar injection of formalin. Each column represents the mean with S.E.M. for eight mice in each group. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group: *** $p < 0.001$.

3.3.2. Carrageenan-induced rat paw oedema.

Fig. 3A (ARCa) and Fig. 3B (AGCa) illustrate the significantly inhibited carrageenan-induced rat paw oedema ($F_{4,58} = 7.11$; $p < 0.0001$ and $F_{4,58} = 15.92$; $p < 0.0001$, respectively) at the 3rd hour. The inhibitory values of oedema at 3 h post-carrageenan were 53 and 74% for 100 and 300 mg/kg, respectively, of the AGCa extract ($p < 0.001$, Newman-Keuls), and 36% for the ARCa extract (300 mg/kg, $p < 0.05$, Newman-Keuls). This result is quite similar to that observed for the group treated with indomethacin (10 mg/kg), which inhibited oedema formation by 46%.

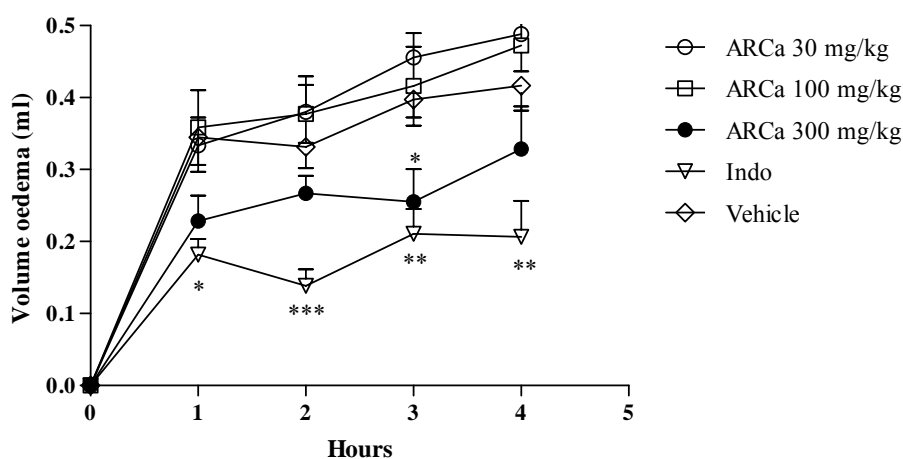


Figure 3A. Effects of the administration of the *Coffea arabica* L. aqueous extracts roasted - ARCa at doses 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or indomethacin (Indo: 10 mg/kg, p.o.) on rat paw oedema induced by intraplantar carrageenan injection (1 mg per paw). Each point represents the mean \pm S.E.M. of eight animals. The asterisks denote the significance levels when compared with the vehicle group: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

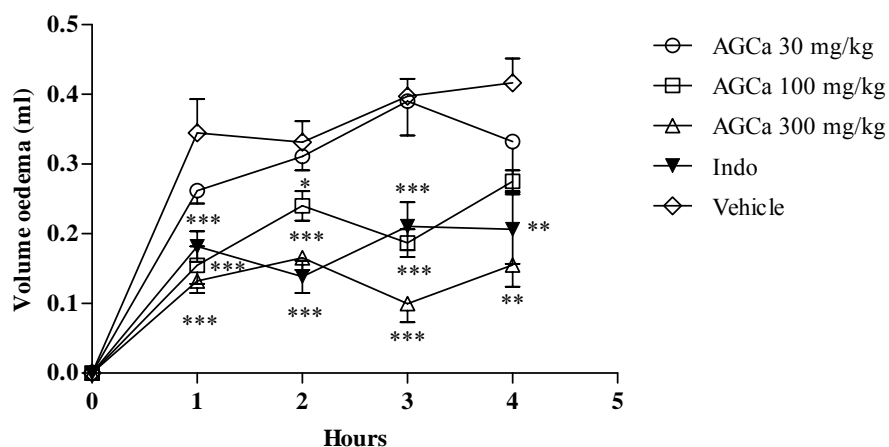


Figure 3B. Effects of the administration of the *Coffea arabica* L. aqueous extracts green - AGCa at doses 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or indomethacin (Indo: 10 mg/kg, p.o.) on rat paw oedema induced by intraplantar carrageenan injection (1 mg per paw). Each point represents the mean \pm S.E.M. of eight animals. The asterisks denote the significance levels when compared with the vehicle group: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

3.3.3. Peritonitis induced by lipopolysaccharide in mice

Fig. 4 illustrates that the ARCa (A) and AGCa (B) extracts significantly inhibited leukocyte recruitment into the peritoneal cavity in rats ($F_{6,52} = 26,78$; $p < 0.001$ and $F_{6,52} = 25,97$; $p < 0.001$, respectively). The inhibitory values of leukocyte recruitment at 4 h post-LPS were 46, 52 and 41% for 30, 100 and 300 mg/kg of the ARCa extract, respectively, while the inhibitory effect of non-steroidal indomethacin (10 mg/kg) was 42%. The assay of AGCa extract inhibited by 45, 39 and 36% with 30, 100 and 300 mg/kg, respectively, while indomethacin presented a mean reduction of 38%.

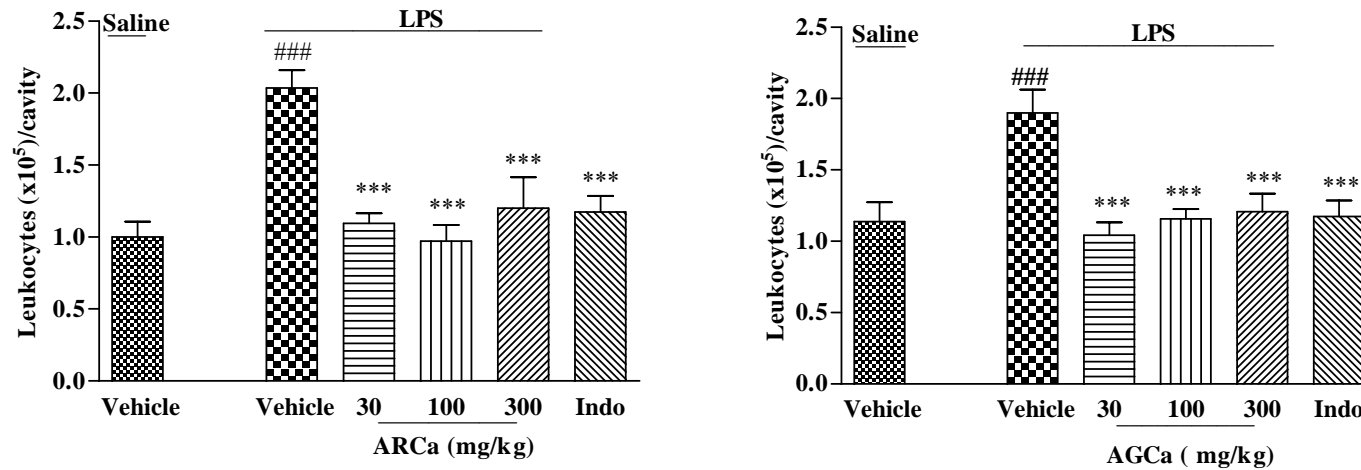


Figure 4. Effects of the administration of the *Coffea arabica* aqueous extracts roasted - ARCa (Panel A) and green - AGCa (Panel B), at doses 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or indomethacin (Indo: 10 mg/kg, p.o.) on lipopolysaccharide-induced recruitment of leukocytes into the peritoneal cavity of rats. Each column represents the mean \pm S.E.M. of eight animals per group. ***p<0.001 compared with the saline + vehicle group. ## p<0.01 and ### p<0.001 compared with LPS + vehicle group.

4. DISCUSSION

Coffee is consumed for its desirable flavour and medicinal benefits (Dórea & Da Costa, 2005). In this study, we sought to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant properties of the extracts of roasted and green coffee beans.

Colour analysis of the ground coffee is in agreement with results reported (Nicoli et al., 1997). The contents of caffeine, trigonelline, CGA and caffeic acid in commercial coffee may be greatly influenced by the coffee species, variety, geographical origin and roasting conditions (Clarke & Macrae, 1989). AGCa contained the greatest concentrations of trigonelline, caffeic acid and chlorogenic acids compared with ARCa ($p < 0.05$). Furthermore, the values observed were in strong agreement with those reported in the literature (Duarte et al., 2010; Niseteo et al., 2012; Perrone et al., 2008), where they were measured using diverse methodologies.

The roasting process caused a significant decrease in the trigonelline content, which has previously been reported in the literature (Farah et al., 2006). Roasting also greatly contributed to the aroma and flavour of the final drink. This behaviour is expected because trigonelline is thermally labile and degrades during the roasting process (Perrone et al., 2008). The average loss of total trigonelline from green to roasted beans was 68%. Trigonelline losses of 50–80% after roasting have previously been reported (Farah et al., 2006).

According to the results of the HPLC analysis performed in our study, AGCa beans were the richest source of CGA, while the lowest CGA content was observed in the ARCa beans. Chlorogenic acids are heavily degraded during roasting. The thermal degradation of CGA during roasting results in the formation of phenolic substances that contribute to bitterness and aromatic compounds like phenols (Duarte et al., 2010). The average reduction of total

CGA from green to roasted beans was 88%. Farah et al. (2006) found similar values of CGA reduction (93%). Caffeic acid is a product of thermal degradation of CGA during roasting (Clarke & Macrae, 1989). Based on the obtained results, AGCa beans provide greater caffeic acid contents than ARCa beans.

Caffeine, a xanthine derivative, presents a characteristic bitter taste that is reportedly important to coffee flavour (Farah et al., 2006). Caffeine was observed in all coffee extracts. As expected, roasting did not affect the caffeine content, which is in agreement with the results of Clarke & Macrae (1989) and Farah et al. (2006).

The scavenging activity of DPPH• is based on the reduction of the purple DPPH• to a yellow hydrazine compound. When the purple DPPH• reacts with hydrogen donors (RH) or other radicals [A•] (Yen et al., 2005), a decrease in the absorbance can be detected spectrophotometrically at $\lambda = 515\text{-}528$ nm. This study can suggest that the scavenging activity of the extracts is likely due to the high concentration of phenolic compounds obtained through extraction with water at high temperatures (90-100°C).

Phenolic compounds in this beverage (chlorogenic acids, ferulic acid and *p*-coumaric acid) have a strong antioxidant capacity (Brezová et al., 2009), which reduces the risk of endothelial dysfunction and expression of inflammatory molecules (Pandey & Rizvi, 2009). Although not fully understood, several action mechanisms are proposed to explain *in vivo* anti-inflammatory action. One of the important mechanisms is an inhibition of eicosanoid-generating enzymes, including phospholipase A2, cyclooxygenases and lipoxygenases, thereby reducing the concentrations of prostanoids and leukotrienes (Kim et al., 2004).

A variety of biological effects have been ascribed to flavonoids (Calixto et al., 2004). Much attention has been given to their antioxidant (Svilaas et al., 2004) and anti-inflammatory properties *in vitro* and *in vivo* (Calixto et al., 2004;

Kim et al., 2004) and their analgesic activity (Garcia-Leme et al., 1973). Coffee brews represent a remarkable source of antioxidants, with contents comparable to those of the bioactive compounds in tea and wine (Niseteo et al., 2012; Svilaas et al., 2004).

Epidemiological studies have found that coffee is associated with reduced biomarkers of oxidative stress (Lee et al., 2004). Inflammation is closely related to oxidative stress. Reactive oxygen and nitrogen species are involved in the redox regulation of cell functions. Oxidative stress is increasingly viewed as a major upstream component in the signalling cascade involved in inflammatory responses and the stimulation of adhesion molecule and chemoattractant production (Surh & Packer, 2005).

Formalin-induced nociception measures the ability of the substance to attenuate moderate continuous pain generated by injured tissue (Tjolsen et al., 1992). In the present study, AGCa and ARCa produced antinociception only against the inflammatory phase of formalin, suggesting that they may be more effective against inflammatory pain. Drugs that act primarily as central analgesics inhibit both phases, whereas the second phase (inflammatory phase) is characterised by the emergence of a local inflammatory process, where mediators of inflammation are produced (Tjolsen et al., 1992). Inhibition of the late phase is due to inflammation causing the release of serotonin, histamine, bradykinin and prostaglandins, which, at least to some degree, can cause sensitisation of the central nociceptive neurons (Verma et al., 2005).

The most widely used primary test for screening anti-inflammatory agents is carrageenan-induced oedema in the mouse hind paw (Moreira et al., 2008), which has frequently been used to assess the anti-oedematogenic effect of natural products (Santa-Cecília et al., 2011). After intraplantar injection of carrageenan into rat paws, there are two successive inflammatory phases, followed by a third, no characteristic phase. Within the first hour after

carrageenan injection, vascular permeability increases, mediated by histamine and serotonin release; in the second hour, permeability increases as a result of the liberation of kinins and finally, within the third hour, prostaglandins come into action (Moreira et al., 2008). The treatment of animals with AGCa and ARCa extracts one hour before carrageenan application also demonstrated mean inhibition at the third hour after stimulus, suggesting another action mechanism derived from arachidonic acid pathways (DiRosa et al., 1971).

By analysing the extracts of green and roasted coffee, one can observe that green coffee extracts (AGCa) in doses of 100 and 300 mg/kg were mostly effective in the inhibition of oedema induced by carrageenan. This result can be attributed to an increased amount of chlorogenic acids present in the green coffee beans. During roasting, chlorogenic acids are progressively degraded (Trugo & Macrae, 1986).

Consistent with previous studies, LPS-induced peritonitis was followed by a significant increase in the number of leukocytes in the peritoneal cavity of rats, compared with the control group treated only with the vehicle (Cunha et al., 1989). In this test, our results demonstrated that AGCa and ARCa extracts significantly reduced leukocyte migration to the peritoneal cavity, demonstrating that the extracts most likely contain active anti-inflammatory agents. Cell recruitment during inflammation depends on the orchestrated release of local mediators, which is responsible for local vascular and tissue changes and the recruitment of host defence cells (Thomazzi et al., 2010).

A reduction of the late phase behavioural response to an i.pl. formalin injection was observed, demonstrating the anti-inflammatory activity produced by extracts. The results obtained from the carrageenan-induced rat paw oedema and lipopolysaccharide-induced peritonitis tests also confirmed this effect. These results are in agreement with those of Kim et al. (2006), who reported that kahweol, a coffee-specific diterpene, significantly reduced the paw oedema

induced by carrageenan and also markedly reduced the level of PGE₂ production in the inflamed paw. Furthermore, Paur et al. (2010) reported that dark-roasted coffee correlates with the efficiency of dampening inflammation-induced nuclear factor κ B activity. However, Ramalakshmi et al. (2009), in another inflammation model (J774A.1 cell assay), demonstrated that the methanolic extracts of low-grade green coffee induced limited anti-inflammatory activity.

Corroborating our results, Dos Santos et al. (2006) demonstrated that chlorogenic acids inhibited carrageenan-induced paw oedema beginning at the 2nd hour of the experimental procedure. CGA also inhibited the number of flinches in the late phase of the formalin-induced pain test. Such activities may be derived from the inhibitory action of CGA in the peripheral synthesis/release of inflammatory mediators involved in these responses. Yonathan et al. (2006) concluded in another study that chlorogenic acids contribute to the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*.

5. CONCLUSIONS

Results reported here suggest that aqueous extracts of *Coffea arabica* L. display considerable anti-inflammatory action by alleviating paw oedema, formalin-induced pain and reducing LPS-induced leukocyte migration in the peritonitis test. The mechanism of effect may be due to the presence of anti-inflammatory substances like flavonoids and antioxidants, which are present in *Coffea*, as evidenced by previous reports. Our results suggest a better anti-inflammatory effect for the extract of green coffee compared with roasted coffee. In the future, the extracts of *Coffea arabica* L. may have potential therapeutic value in the treatment of inflammatory disorders.

6. ABBREVIATIONS

AGCa: aqueous extracts of green coffee beans; ARCa: aqueous extracts of roasted coffee beans; DPPH: 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH[•]: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; AA: ascorbic acid; BHT: butylhydroxytoluene; 5-CQA: chlorogenic acid; CGA: chlorogenic acid; CIE: International Commission on Illumination; p.o.: per oral; i.p.: intraperitoneal; i.pl.: intraplantar; HPLC: high performance liquid chromatography; UV/Vis: ultraviolet/ visible; GAE: gallic acid equivalent; QE: quercetin equivalent; PGE₂: prostaglandin E₂; IC₅₀: 50% inhibitory concentration; LPS: lipopolysaccharide; PBS (phosphate buffered saline).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Ipanema Agro Indústria Ltda, FAPEMIG, CNPq, FINEP and CAPES.

Conflict of interest: These authors contributed equally to this work. The authors declare no conflicts of interest and approve the content of this paper.

REFERENCES

Brezová, V., Šlebodová, A., & Staško, A. (2009). Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry* 114, 859-868.

Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., & Santos, A.R.S. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin: II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*, 70, 93-103.

Clarke, R.J., & Macrae, R. (Ed.) Coffee: chemistry. 2.ed. New York: Elsevier, p.305, 1989.

Cunha, F.Q., Souza, G.E., Souza, C.A., Cerqueira, B.C., & Ferreira, S.H. (1989). In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. *British Journal of Experimental Pathology* 70, 1-8.

DiRosa, M., Giroud, J.P., & Willoughby, D.A.(1971). Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of Pathology* 104, 15-29.

Dórea, J.G., & da Costa, T.H. (2005). Is coffee a functional food? *British Journal Nutrition* 93, 773-782.

Dos Santos, M.D., Almeida M.C., Lopes M.P., & Souza G.E.P. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29, 2236-2240.

Duarte, G.S., Pereira, A.A., & Farah, A. (2010). Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *Food Chemistry* 118, 851-855.

Farah, A., Monteiro, M.C., Calado, V., Franca, A.S., & Trugo, L.C. (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry* 98, 373-380.

Frost-Meyer, N., & Logomarsino, J.V. (2012). Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *Journal of Functional Foods* 4, 819-830.

Garcia-Leme, J., Nakamura L., Leite M.P., & Rocha e Silva, M. (1973). Pharmacological analysis of the acute inflammation process induced in rat's paw by local injection of carrageenan and heating. *British Journal of Pharmacology* 64, 91-98.

George, S.E., Ramalakshmi, K., & Mohan Rao, L.J. (2008). A perception on health benefits of coffee. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 464-486.

Kalia, K., Sharma, K., Singh, H.P., & Singh, B. (2008). Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 10129-10134.

Kempf, K., Herder, C., Erlund, I., Kolb, H., Martin, S., Carstensen, M., Koenig, W., Sundvall J., Bidel, S., Kuha, S., & Tuomilehto, J. (2010). Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2

diabetes: a clinical Trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91, 950-957.

Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* 96, 229-245.

Kim, J.Y., Kim, D.H., & Jeong, H.G. (2006). Inhibitory effect of the coffee diterpene kahweol on carrageenan-induced inflammation in rats. *BioFactors* 26, 17-28.

Lee, D.H, Blomhoff, R., & Jacobs, D.R.Jr. (2004). Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radical Research* 38, 535-539.

Milano, J., Oliveira, S.M., Rossato, M.F., Sauzem, P.D., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Mello, C.F., Rubin, M.A., Ferreira, J., & Bonacorso, H.G. (2008). Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *European Journal Pharmacology* 581, 86-96.

Moreira, M.E.C., dos Santos, M.H., Zolini, G., Wouters, A., Carvalho, J.C.T., & Schneedorf, J.M. (2008). Anti-inflammatory and cicatrizing activity of a carbohydrate fraction isolated from sugary kefir. *Journal of Medicinal Food* 11, 356-361.

Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants* 20, 1-30.

Nicoli, M.C., Anese, M., Manzocco, L., & Lericci, C.R. (1997). Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *LWT – Food Science and Technology* 30, 292-297.

Niseteo, T., Komes, D., Belscak-Cvitanovic, A., Horzic, D., & Budec, M. (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry* 134, 1870-1877.

Pandey, K.B., & Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 270-278.

Paur I., Balstad T.R., & Blomhoff R. (2010). Degree of roasting is the main determinant of the effects of coffee on NF- κ B and EpRE. *Free Radical Biology & Medicine* 48, 1218-1227.

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, 1030-1035.

Ramalakshmi, K., Rao, L.J.M., Takano-Ishikawa, Y., & Goto, M. (2009). Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food Chemistry* 115, 79-85.

Santa-Cecília, F.V., Freitas, L.A.S., Vilela, F.C., Veloso, C.C., Rocha, C.Q., Moreira, M.E.C, Dias, D.F. Giusti-Paiva, A., & Dos Santos, M.H. (2011). Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. *European Journal Pharmacology* 670, 280-285.

Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Packer, L. (Ed.), *Oxidants and Antioxidants, Part A. Methods in Enzymology* 299, 152-178 .

Surh, Y.; & Packer, L. *Oxidative Stress, Inflammation, and Health*. CRC Press; 1 edition. 660p. 2005.

Svilaas, A., Sakhi, A.K., Andersen, L F., Svilaas, T., Ström, E.C., Jacobs, D.R. Jr., Ose, L., & Blomhoff, R. (2004). Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *Journal of Nutrition* 134, 562-567.

Thomazzi, S.M., Silva, C.B., Silveira, D.C.R., Vasconcellos, C.L.C., Lira, A.F., Cambui, E.V.F., Estevam, C.S., & Antonioli, A.R. (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). *Journal of Ethnopharmacology* 127, 451-456.

Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17.

Trugo, L. C., & Macrae, R. (1986). An investigation of coffee roasting using high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 19, 1-9.

Verma, P. R., Johrapurkar, A. A., Chatpalliwar, V. A., & Asnani, A. (2005). Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 298-301.

Vinegar, R., Schreiber, W., & Hugo, R. (1969). Biphasic development of carrageenin edema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 166, 96-103.

Woode, E., Ainooson, G.K., Boakye-Gyasi, E., Ansah, C., Obiri, D.D., Koffour, G.A., Mensah, A. & Duwiejua M. (2008). Anti-arthritis and antioxidant properties of the ethanolic stem bark extract of *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seaman ex Bureau (Bignoniaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* 2(8), 180-188.

Yen, W. J., Chang, L. W. & Duh, P. D. (2005). Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. *LWT - Food Science and Technology* 38, 193-200.

Yonathan, M. Asres, K., Assefa, A., & Bucar, F. (2006). In vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinose*. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 462-470.

SUPPLEMENTARY DATA

Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L.

Table S1: DPPH radical scavenging activity (%) of aqueous extract of green (AGCa) and roasted (ARCa) coffee beans and standards butylhydroxytoluene (BHT) and ascorbic acid (AA).

[ARCa], µg/ml	Scavenging effect (%)		
3.125	51.88	51.84	54.16
6.25	55.49	56.21	57.92
12.5	60.88	56.56	61.28
25	72.75	74.04	75.04
50	76.79	81.31	79.00
100	67.41	77.00	75.94
200	70.27	70.18	64.81

[AGCa], µg/ml	Scavenging effect (%)		
3.125	56.92	58.04	61.44
6.25	60.79	60.31	64.56
12.5	66.00	70.80	70.80
25	78.96	81.47	84.48
50	76.63	79.67	75.79
100	80.29	81.75	82.86
200	75.2	79.67	78.34

[AA], µg/ml	Scavenging effect (%)		
3.125	15.65	22.38	27.04
6.25	11.60	25.17	29.44
12.5	66.82	65.21	69.76
25	97.93	98.16	98.08
50	98.09	94.66	98.34
100	97.45	98.52	98.50
200	99.05	98.37	98.34

Table S1, continuation

[BHT], µg/ml	Scavenging effect (%)		
3.125	32.82	34.18	39.36
6.25	41.91	47.29	47.92
12.5	61.60	61.97	65.12
25	71.49	69.79	67.37
50	78.22	78.93	55.49
100	85.21	83.68	85.86
200	86.17	85.31	87.07

The EC_{50} was obtained by nonlinear regression equation three parameters (GraphPad software program Version 5.0):

$$y = \frac{T}{1 + (EC_{50}/C)^s}$$

C: sample concentration

EC_{50} : concentration that produces 50% of reduction

T: the upper limit of kidnapping (the top)

s: variable Hill coefficient (slope factor).

ARTIGO 2

**ETHANOL EXTRACTS OF *COFFEA ARABICA* L. ATTENUATE
INFLAMMATION**

Artigo submetido ao periódico revista Food and Function

Ethanol extracts of *Coffea arabica* L. attenuate inflammation

ABSTRACT

Our aim in this study was to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant effects of ethanol extracts of roasted (ERCa) and green (EGCa) coffee beans (*Coffea arabica* L.) using animal models and a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging test. Paw licking induced by formalin, carrageenan-induced paw oedema and peritonitis tests were used to investigate the anti-inflammatory activities of the extracts. In the formalin test, the second phase of paw licking was significantly inhibited by both extracts. The extracts of *Coffea arabica* L. significantly reduced paw oedema at three hours after stimulus. Leukocyte recruitment into the peritoneal cavity was inhibited by the extracts. The DPPH radical scavenging ability was also investigated, and the results confirmed the antioxidant activity of the extracts. These results indicate that coffee extracts exhibit anti-inflammatory and antioxidant properties due to the activities of coffee-derived compounds.

Key words: antioxidant activity, anti-inflammatory activity, coffee, oedema; polyphenols.

1 INTRODUCTION

Coffee is a major commodity worldwide and is one of the most commonly consumed beverages. The high consumption of coffee around the world has stimulated research regarding the biological activity of roasted and green coffee beans. In recent years, the biological and health effects of coffee have been extensively investigated in various animals and in vitro model systems, as well as in humans.¹ For example, its positive effects on performance and protection against some types of cancers, liver disease, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and diabetes have been documented.^{2,3}

Coffee contains a substantial amount of antioxidants, which may explain some of its potential beneficial activities. Several other important active components have also been identified.⁴ Phenolic compounds in coffee are known to have antioxidant activity. The most prevalent of these compounds is hydroxycinnamic acid, and a major component of this class is caffeic acid, which is present in foods primarily as esters called chlorogenic acids (CGAs). Coffee is the major source of CGA in the human diet.⁵ Roasting markedly affects the composition of the coffee beans, and antioxidant properties are lost during roasting. However, the overall antioxidant properties of brewed coffee are maintained or even enhanced due to the formation of compounds possessing antioxidant activity, including Maillard reaction products.⁴

In their review, Frost-Meyer and Logomarsino (2012)⁶ suggested that coffee is a promising anti-inflammatory agent. However, there are few reports on the anti-inflammatory activity of coffee.^{1,7} We have previously demonstrated that aqueous extracts of *Coffea arabica* L. have considerable anti-inflammatory effects.⁸ As a continuation of our studies on Brazilian coffee, we performed a chemical analysis of the bioactive compounds in coffee and studied the ethanol

extracts of coffee in inflammation assays in animal models. The results of this study can aid in the development of phytotherapeutics from coffee.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials and chemicals

Green coffee (*C. arabica* L.) cv. Yellow Bourbon, sieve 16/18, without imperfections, harvested in 2010 was kindly supplied by Ipanema Agro Indústria Ltda (Alfenas, MG, Brazil). The beans were obtained using the dry process, which yields natural coffee, and were roasted (Probatino Leogap - Probat®, Brazil) in a two-step laboratory roaster with a 1 kg capacity at 200°C for a sufficient time to yield medium-roasted samples. The beans were finely commercially ground and packed in non-permeable polypropylene/aluminium/polyethylene bags that were hermetically sealed under vacuum and stored at -10°C. The extracts were prepared at room temperature (25°C).

Reference standards, including caffeine, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid, CGA), caffeic acid, gallic acid and trigonelline; Folin-Ciocalteu's reagent; quercetin; carrageenan; indomethacin; ascorbic acid; butylhydroxytoluene; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); carboxymethylcellulose (CMC); sodium citrate; and PBS (phosphate-buffered saline) reagents were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. HPLC solvents, including acetonitrile and acetic acid, were purchased from Carlo Erba, Milan, Italy.

2.2 Colour analysis

Colour analysis of the ground coffee was performed using a tristimulus colorimeter (Chromameter-2 Reflectance, Minolta, Osaka, Japan) equipped with a CR-300 measuring head. The instrument was standardised using a white tile

before each measurement. Colour was expressed using the colour parameters L*, a*, and b* specified by the International Commission on Illumination (CIE). Five measurements were taken for each sample, and the coefficients of variation, expressed as the percentage ratio of the standard deviation to the mean value, were less than 5%.

2.3 Preparation of extracts and reference drugs

Samples of powered green (not roasted) and roasted coffee beans (100 g) were extracted with 1000 ml of ethanol (tree times) followed by filtration. The solvent was removed under reduced pressure and then dried with a spray dryer (LIOBRAS L101, São Paulo, Brazil).

The ethanol extract of roasted coffee beans (ERCa) and the ethanol extract of green coffee beans (EGCa) were administered at doses of 30, 100 and 300 mg/kg in vehicle (aqueous solution of 0.5% CMC). The control group animals received the same experimental handling as the test groups, except that the drug solution was replaced with the appropriate volume of the vehicle (10 ml/kg). Indomethacin (10 mg/kg, p.o.) and morphine sulphate (1 mg/kg, i.p.) in vehicle were used as reference drugs.

2.4 HPLC profile of coffee beans

The liquid chromatography (HPLC) profiles were determined using a Shimadzu LC-100 system with a UV/Vis Detector (monitoring 254 nm), an automatic injector and LC solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan). The HPLC apparatus was equipped with a C18 column (Shimadzu CLC-ODS; 4.6 x 250 mm; 5 µm). The mobile phase consisted of 0.5 mM aqueous acetic acid (A) and acetonitrile (B) with a flow rate of 0.7 ml/min. The following elution profile

was used: 0-5 min, 95:5 (v/v; A:B) (isocratic); 5-13 min, 87:13 (v/v; linear); 13-27 min, 87:13 (v/v; isocratic) and 27-30, 95:5 (v/v; linear). An equilibration period of 10 min was included between runs.

2.5 Determination of the total phenolic and flavonoid contents

The total content of phenolic phytochemicals was measured using the Folin–Ciocalteu method.⁹ The total phenolic content is expressed in milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of extract. The flavonoid content was measured using a previously developed colourimetric assay.¹⁰ The flavonoid content was expressed as milligrams of quercetin equivalents (QE) per gram of extract. Samples were analysed in triplicate.

2.6 DPPH free radical-scavenging activity

The DPPH assay was performed according to the method of Yen, Chang and Duh.¹¹ Different concentrations of ERCa or EGCa in ethanol (4.0 ml) were mixed with 1.0 ml of DPPH (0.02% diluted in ethanol). After incubation of the samples in the dark at room temperature, the absorbance was recorded at 517 nm. The controls contained all the reaction reagents except the extracts and also contained the positive control reagents (ascorbic acid - AA or butylhydroxytoluene - BHT). The results were estimated based on the percentage of DPPH radicals scavenged using the following equation: Scavenging effect (%) = $([\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}]/\text{control absorbance}) \times 100$. The values are presented as the means of triplicate analyses. The 50% effective concentration (IC₅₀) value is the effective concentration that could scavenge 50% of the DPPH radicals.

2.7 Pharmacological procedures

2.7.1 Animals

Adult male Wistar rats (180-220 g) and adult male Swiss mice (25-35 g), which were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas, were housed under controlled light (12:12 h light-dark cycle; lights on at 06:00 am) and temperature conditions ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with access to water and food ad libitum. At the end of experiment, the rats were euthanised using an overdose of halothane anaesthetic. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas (290/2010).

2.7.2 Evaluation of anti-inflammatory activity

2.7.2.1 Formalin-induced nociception

A formalin solution (5% in saline; 20 μl /paw) was injected into the hind paw plantar surface (i.pl.), and the animals were individually placed in transparent observation chambers, as previously described.¹² Oral treatments (p.o.) with vehicle, indomethacin, ERCa or EGCa were administered 1 h prior to formalin injection (n=8 per group). Morphine was administered (i.p.) 30 min before the test. The time spent in licking the injected paw was recorded and expressed as the total licking time in the early phase (0-5 min) and late phase (20-30 min) after formalin injection.

2.7.2.2 Carrageenan-induced rat paw oedema

Paw oedema was measured with a plethysmometer (Model 7140, Ugo Basile, Rome, Italy). The basal volume of the right hind paw was determined before the administration of any drug. After determination of the basal volume, the animals (n=6 per group) were divided into experimental groups in such a way that the mean volumes of the different groups were similar. Vehicle, ERCa and EGCa or indomethacin was orally administered 1 h before the i.pl. injection of carrageenan (1 mg -100 μ l). The paw volume was measured 1, 2, 3 and 4 h after injection of the inflammatory stimulus. The results are presented as the paw volume (ml) variation in relation to the basal values.¹³

2.7.2.3 Peritonitis induced by lipopolysaccharide in mice

To assess the possible effects of ERCa and EGCa on leukocyte recruitment into the peritoneal cavity, animals (n=8 per group) were orally pre-treated with vehicle, extracts or indomethacin, and 1 hour later, lipopolysaccharide from *E. coli* serotype 026:B6 (LPS, 500 μ g/kg; i.p.) dissolved in pyrogen-free sterile saline was administered. Four hours after the injection of LPS, mice were killed, and the cells in the peritoneal cavities were collected by injection of 3 ml of PBS containing 0.5% of sodium citrate buffer. The abdomens were gently massaged, and the blood-free cell suspension was carefully aspirated with a syringe. The abdominal washings were placed into plastic tubes, and total cell counts were performed immediately using a Neubauer chamber.¹⁴

2.8 Statistical analysis

Data were analysed using the GraphPad software program Version 5.0 and expressed as the mean \pm S.E.M. Statistically significant differences between the groups were calculated using analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test. A nonlinear regression was performed on the antioxidant activity data to obtain the IC₅₀ values (concentrations that decrease the concentration of free radicals by 50.0%), and the curves were compared statistically using an F test. P-values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered statistically significant.

3 RESULTS

3.1 Chemical characterisation

According to the L*, a*, and b* ICI (International Commission on Illumination) parameters, our roasted coffee beans were classified as medium roast. The results of the HPLC analysis and the polyphenol and flavonoid contents are presented in Table 1. Bioactive compounds, such as CGA, caffeine, caffeic acid and trigonelline, were identified by comparison of the sample retention times with those of standards, and the amount of compound present was quantified using an external standard calibration. The retention times for the standards of CGA, caffeine, caffeic acid and trigonelline were 22.95, 24.06, 24.69 and 4.05 min, respectively.

Table 1. Chemical contents of coffee extracts. ^{a,b} Means within a line, followed by different letters are significantly different by Newman test, $p < 0.05$.

	EGCa	ERCa
CGA (g/100g extract)	0.890±0.006 ^a	0.037±0.001 ^b
Trigonelline (g/100g extract)	0.466±0.005 ^a	0.139±0.001 ^b
Caffeine (g/100g extract)	1.520±0.004 ^a	1.422±0.007 ^b
Caffeic acids (g/100g extract)	0.505±0.006 ^a	0.140±0.019 ^b
Flavonoids (mg quercetin/g extract)	3.87	5.74
Polyphenols (mg gallic acid/g extract)	68.4	69.9

As shown in Table 2, the scavenging capacity of EGCa was greater than that of ERCa at all concentrations. EGCa was more active than the BHT and AA

standards, and this activity was dose dependent; i.e., there were increases in protection with increasing concentration.

Table 2. Scavenging activity of DPPH• of ethanol extracts of green (EGCa) and roasted (ERCa) coffee beans (*Coffea arabica* L.) DPPH and the standard ascorbic acid (AA) and butylated hydroxytoluene (BHT).^{a,b,c} Means within a column, followed by different letters are significantly different by F test, $p < 0.05$.

Samples	IC ₅₀ (µg/ml)
ERCa	16.8±3.00 ^a
EGCa	4.26±0.68 ^b
AA	9.14±0.75 ^c
BHT	7.66±0.88 ^c

3.2 Anti-inflammatory activity

3.2.1 Formalin-induced nociception

In the formalin test, the vehicle-treated mice had mean licking times of 58±5 s in the first phase (0–5 min) and 130±19 s in the second phase (15–30 min). As shown in Figures 1 and 2, mice pre-treated with both ERCa and EGCa showed a reduced response to formalin only in the second phase (inflammatory phase) ($F_{5,50} = 11.43$; $p < 0.001$ for ERCa and $F_{5,51} = 11.62$; $p < 0.001$ for EGCa) for the 30, 100 and 300 mg/kg doses. The analgesic activity of the extracts during the early phase was not found to be significant. The reference drug, morphine, significantly blocked the pain response to formalin during both phases (first-phase, 6±1 s and second-phase, 16±6 s). However, indomethacin exhibited significant activity ($p < 0.001$) only during the second phase.

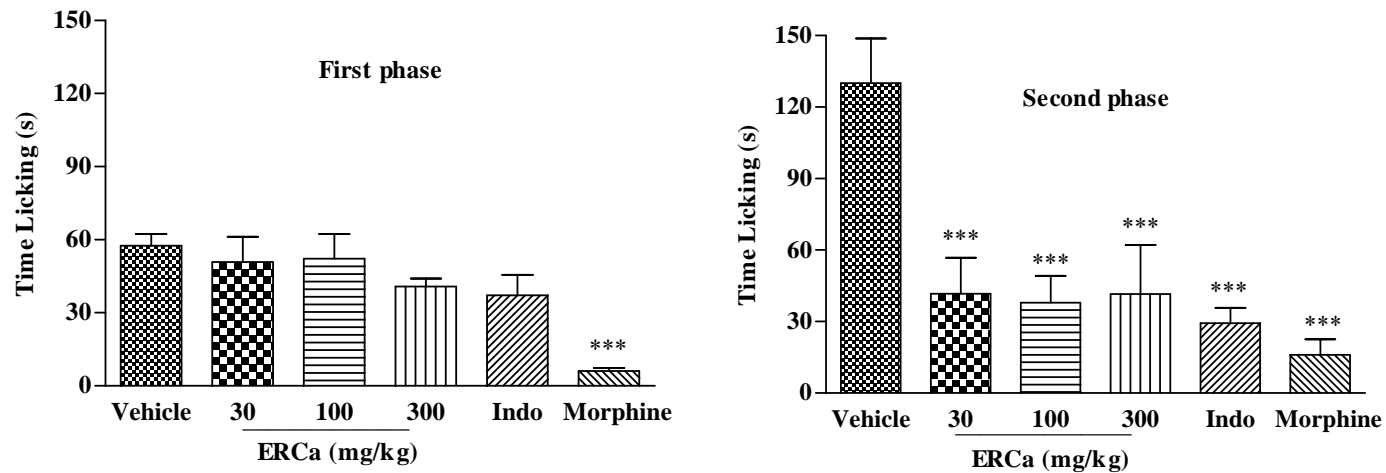


Figure 1. Effects of *Coffea arabica* ethanol extracts roasted (ERCa) given orally on the licking induced by formalin in mice. The animals were pretreated orally with vehicle, ERCa (doses 30, 100 and 300 mg/kg), indomethacin (Indo: 10 mg/kg) or morphine (1mg/kg) prior to formalin. The total time spent licking the hind-paw was measured in the first (Panel A) and second (Panel B) phases after intraplantar injection of formalin. Each column represents the mean with S.E.M. for eight mice in each group. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group: *** p <0.001.

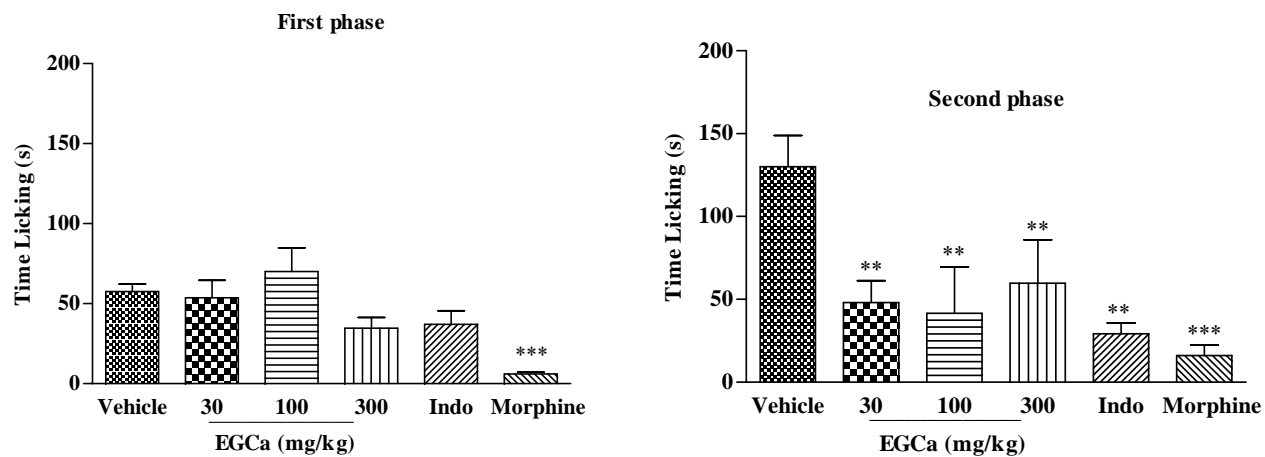


Figure 2. Effects of *Coffea arabica* ethanol extracts green (EGCa) given orally on the licking induced by formalin in mice. The animals were pretreated orally with vehicle, EGCa (doses 30, 100 and 300 mg/kg), indomethacin (Indo: 10 mg/kg) or morphine (1mg/kg) prior to formalin. The total time spent licking the hind-paw was measured in the first (Panel A) and second (Panel B) phases after intraplantar injection of formalin. Each column represents the mean with S.E.M. for eight mice in each group. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

3.2.2 Carrageenan-induced rat paw oedema

Fig. 3 shows that ERCa (panel A) and EGCa (panel B) significantly inhibited carrageenan-induced rat paw oedema ($F_{4,29}=5.04$; $p<0.001$, and $F_{4,48}=11.31$; $p<0.0001$, respectively) at the 3rd hour. The per cent inhibition of oedema values at 3 h post-carrageenan administration were 46, 40 and 44% for 30, 100 and 300 mg/kg ERCa, respectively ($p<0.001$, Newman-Keuls), 31 and 26 for 30 and 100 mg/kg EGCa, respectively ($p<0.01$, Newman-Keuls), and 40% for 300 mg/kg EGCa ($p<0.001$, Newman-Keuls). These results were quite similar to that observed for the group treated with indomethacin (10 mg/kg), which inhibited the development of oedema by 50%.

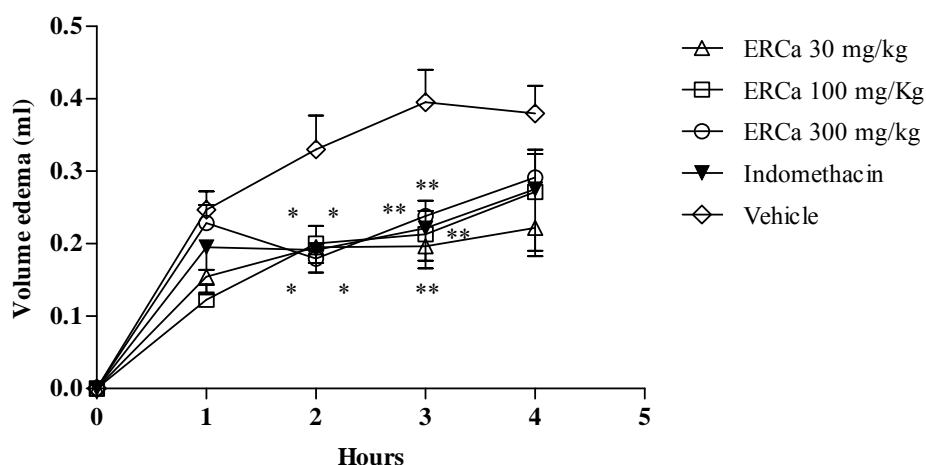


Figure 3 A. Effects of the administration of the *Coffea arabica* L. ethanol extracts roasted - ERCa (Panel A) at doses 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or indomethacin (10 mg/kg, p.o.) on rat paw edema induced by intraplantar carrageenan injection (1 mg/paw). Each point represents the mean \pm S.E.M. of eight animals. The asterisks denote the significance levels when compared with the vehicle group: *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$.

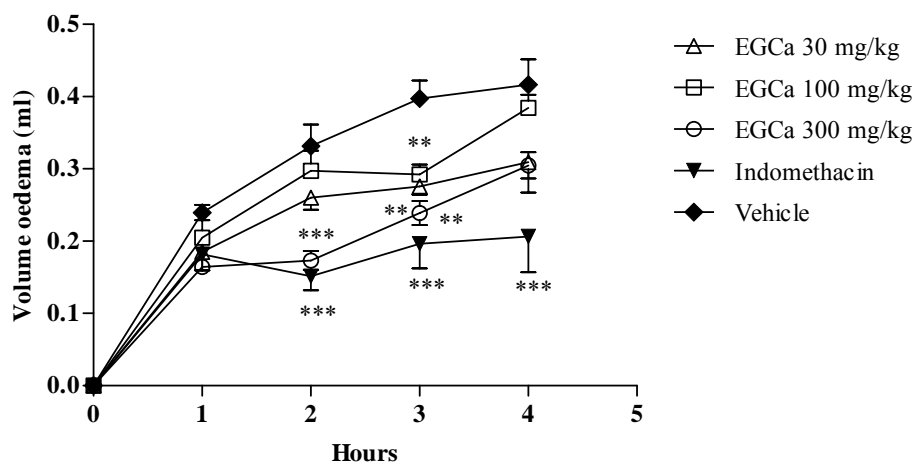


Figure 3 B. Effects of the administration of the *Coffea arabica* L. ethanol extracts green - EGCa (at doses 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or indomethacin (10 mg/kg, p.o.) on rat paw edema induced by intraplantar carrageenan injection (1 mg/paw). Each point represents the mean \pm S.E.M. of eight animals. The asterisks denote the significance levels when compared with the vehicle group: *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.

3.2.3 Peritonitis induced by lipopolysaccharide

Figure 4 shows that ERCa (A) and EGCa (B) significantly inhibited leukocyte recruitment into the peritoneal cavity in mice ($F_{6,49}=39.16$; p <0.0001, and $F_{6,51}=30.35$; p <0.0001, respectively). The per cent inhibition values for leukocyte recruitment at 4 h post-LPS administration were 28, 35 and 29% for 30, 100 and 300 mg/kg ERCa, respectively. EGCa inhibited leukocyte recruitment by 45, 35 and 39% at 30, 100 and 300 mg/kg, respectively. Indomethacin induced a mean reduction of 41%.

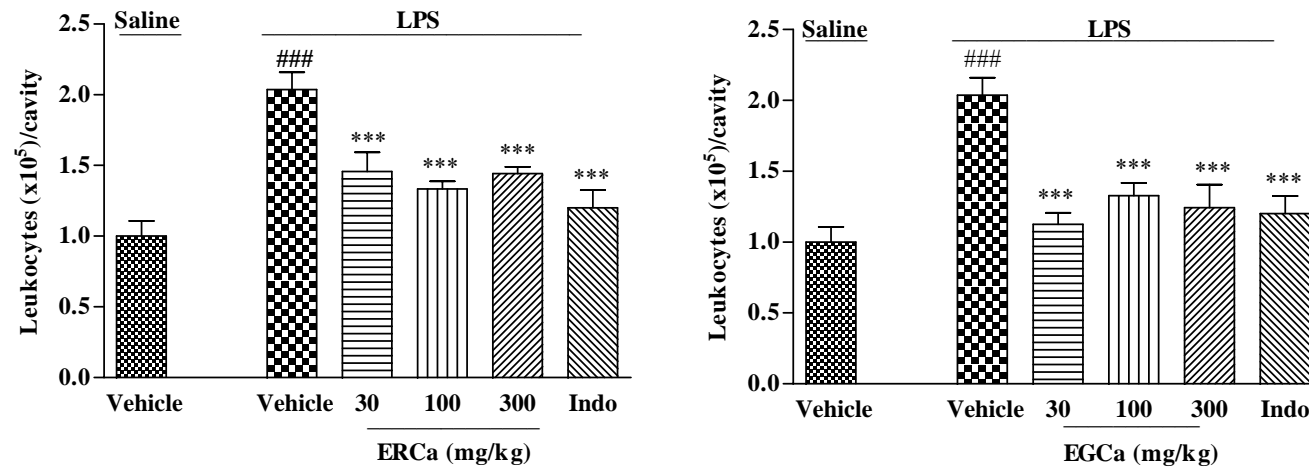


Figure 4. Effects of the administration of the *Coffea arabica* ethanol extracts roasted - ERCa (Panel A) and green - EGCa (Panel B), at doses 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or indomethacin (Indo: 10 mg/kg, p.o.) on lipopolysaccharide-induced recruitment of leukocytes into the peritoneal cavity of mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. of eight animals per group. *** p <0.001 compared with the saline + vehicle group. ### p <0.001 compared with LPS + vehicle group.

4 DISCUSSION

The high worldwide consumption of coffee has prompted the study of the biological activities of green and roasted coffee. Coffee contains multiple substances that impact inflammatory markers.⁷ In this study, we sought to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant properties of the ethanol extracts of roasted and green coffee beans.

Our colour analysis results for the ground coffee are in agreement with previously reported results.⁸ The chemical composition of green coffee depends primarily on the variety of the coffee, although slight variations are possible due to agroclimatic conditions, agricultural practices, processing and storage.² EGCa contained higher concentrations of trigonelline, caffeine, caffeic acid and chlorogenic acids than ERCa. Furthermore, the observed values were in good agreement with those reported in the literature,¹⁵⁻¹⁷ which were determined using a variety of methods. The roasting process caused significant decreases in the trigonelline (50-80%) and CGA (93%) contents after roasting, as previously reported,^{8,18} greatly contributing to the aroma and flavour of the final beverage. In this study, the average decreases in the total trigonelline and CGA contents after roasting were 70% and 96%, respectively.

The antioxidant activities of EGCa were higher than those of the references antioxidants AA and BHT (2.1 and 1.8-fold higher, respectively), whereas ERCa exhibited weak radical-scavenging activities and was 1.8 and 2.2 times less active than AA and BHT, respectively. These activities were monitored spectrophotometrically at 517 nm.²⁰ Based on these values, we can hypothesise that the scavenging activities of the extracts are likely due to the high concentrations of phenolic compounds. Corroborating our data, Daglia, Papetti, Gregotti et al. (2000)²¹ and Moreira et al. (2013),⁸ reported that green coffee has a higher antioxidant activity than roasted coffee.

Coffee is also known to be a rich source of compounds with potent antioxidant activity.²² Brewed coffee is a remarkable source of antioxidants, with levels of bioactive compounds comparable to those of tea and wine.¹⁵ The caffeine, CGA, cafestol, trigonelline and kahweol found in coffee are thought to have significant potential as antioxidants and free radical scavengers.⁷ The antioxidant activity of phenolic compounds has been attributed to their redox properties, which play an important role in the adsorption or neutralisation of free radicals.²³ Furthermore, a variety of biological effects have been ascribed to flavonoids,²⁴ such as antioxidant activity,²² anti-inflammatory properties and in vitro and in vivo^{24,25} and analgesic activity.²⁶

The formalin test consists of two distinct phases. The first phase, referred to as the neurogenic phase (immediately after formalin injection), seems to be caused by the direct effect of formalin on sensory C-fibres. The second phase, referred to as the inflammatory phase (starting approximately 20 min after injection), is associated with the development of an inflammatory response and the release of nociceptive mediators.²⁷ It has been reported that substance P and bradykinin participate in the early-phase responses and that histamine, serotonin, prostaglandin and bradykinin are involved in the late phase responses.²⁸ Centrally acting drugs, such as opioids, inhibit both phases equally, whereas peripherally acting drugs, such NSAIDs and corticosteroids, inhibit only the late phase.²⁷ In the formalin test, EGCa and ERCa had antinociceptive effects during only the inflammatory phase, suggesting that these extracts could be effective against inflammatory pain. Corroborating our data, Moreira et al. (2013)⁸ reported that aqueous extracts of coffee (green and roasted) exhibited antinociceptive effects during only the inflammatory phase in the formalin test.

Carrageenan causes a reproducible inflammatory reaction and remains the standard irritant for investigating acute inflammation and anti-inflammatory drugs.²⁹ The most widely used primary test for screening anti-inflammatory

agents is carrageenan-induced oedema in the mouse hind paw.^{30,31} The oedema reaction occurs after the intraplantar injection of carrageenan, and the reaction can be suppressed by a variety of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. These drugs can block prostaglandin synthesis and the extravasation of fluid by inhibiting cyclooxygenase.³² The treatment of animals with ERCa and EGCa 1 hour before carrageenan application also resulted in inhibition at the third hour after stimulus, suggesting that there is another mechanism of action involving the arachidonic acid pathway.³³

LPS-induced peritonitis was followed by a significant increase in the number of leukocytes in the peritoneal cavity of mice compared with the number of leukocytes in the control group treated only with vehicle.³⁴ Substances such as LPS, when injected into the peritoneal cavities of mice, induce the classical differentiation of monocytes into macrophages. These macrophages have a pro-inflammatory profile with high expression of cytokines and the efficient production of reactive oxygen and nitrogen intermediates.³⁵ Pro-inflammatory cytokines play an important role in the inflammatory response in the peritoneal cavity. Our results for the peritonitis test demonstrated that the coffee extracts significantly reduced leukocyte migration into the peritoneal cavity, showing that these extracts most likely contain active anti-inflammatory agents. Cell recruitment during inflammation depends on the orchestrated release of local mediators, which are responsible for local vascular and tissue changes and the recruitment of host defence cells.³¹

The results obtained for the carrageenan-induced rat paw oedema test, the formalin injection test and the lipopolysaccharide-induced peritonitis test indicate that the extracts have anti-inflammatory activities. These results are in agreement with those of Moreira et al. (2013),⁸ who demonstrated that the aqueous extracts of green and roasted *Coffea* have considerable anti-inflammatory activities and can alleviate paw oedema and formalin-induced pain

and can reduce LPS-induced leukocyte migration in the peritonitis test. These results can be attributed to the presence of anti-inflammatory substances like flavonoids and antioxidants in coffee beans.

Some authors have reported that the CGA is an anti-inflammatory agent based on several experimental studies in vivo.³⁶⁻³⁸ Dos Santos, Almeida, Lopes et al. (2006)³⁶ demonstrated that CGA inhibited carrageenan-induced paw oedema. Furthermore, CGA also inhibited the number of flinches in the late phase of the formalin-induced pain test. These activities may be due to the inhibitory effect of CGA on the peripheral synthesis/release of inflammatory mediators involved in these responses. In another study, Yonathan et al., (2010)³⁹ concluded that chlorogenic acid contributes to the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. Moreover, Kim, Kim, Jeong et al. (2006)⁷ reported that kahweol, a coffee-specific diterpene, significantly reduced the paw oedema induced by carrageenan and also markedly reduced the level of PGE2 production in the inflamed paw. Furthermore, Paur, Balstad and Blomhoff¹ showed that dark-roasted coffee efficiently dampens inflammation-induced nuclear factor κ B activity.

5 CONCLUSION

This study provides further evidence that the ethanol extracts of *Coffea arabica* L. have considerable anti-inflammatory effects, as demonstrated by their ability to alleviate paw oedema and formalin-induced pain and reduce number of leukocytes in the peritoneal cavity in the peritonitis induced by lipopolysaccharide. The mechanisms responsible for these effects may involve anti-inflammatory substances, such as flavonoids and antioxidants,^{4,15} which are present in *Coffea*, as evidenced by previous reports. The extracts of *Coffea arabica* L. may have potential therapeutic value in the treatment of inflammatory disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Ipanema Agro Indústria Ltda, FAPEMIG, FINEP, CNPq and CAPES.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

REFERENCES

1. I. Paur, T. R. Balstad and R. Blomhoff, *Free Radical Biol. Med.*, 2010, **48**, 1218-1227.
2. S. E. George, K. Ramalakshmi and L. J. Mohan Rao, *Crit. Rev. Food Scien. Nutr.*, 2008, **48**, 464-486.
3. J. G. Dórea and T. H. da Costa, *Br. J. Nutr.*, 2005, **93**, 773-782.
4. N. C. Nicoli, M. Anese, M. T. Parpinel, S. Franceschi and C. R. Lerici, *Cancer Lett.*, 1997, **114**, 71-74.
5. C. A. Rice-Evans, N.J. Miller and G. Paganga, *Free Radical Biol. Med.*, 1996, **20**, 953-956.
6. N. Frost-Meyer and J. V. Logomarsino, *J. Funct. Foods*, 2012, **4**, 819-830.
7. J. Y. Kim, D. H. Kim and H. G. Jeong, *BioFactors*, 2006, **26**, 17-28.
8. M. E. C. Moreira, R. G. F. A. Pereira, D. F. Dias, V. S. Gontijo, F. C. Vilela, G. O. I. Moraes, A. Giusti-Paiva and M. dos Santos, *J. Funct. Foods*, 2013, **5**, 466-474.
9. V. L. Singleton, R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventos, *Meth. Enzymol.*, 1999, **299**, 152-178.
10. K. Kalia, K. Sharma, H. P. Singh and B. Singh, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 10129-10134.
11. W. J. Yen, L. W. Chang and P.D. Duh, *LWT - Food Scien. Technol.*, 2005, **38**, 193-200.
12. A. R. Santos and J.B. Calixto, *Neuropeptides*, 1997, **31**, 381-389.
13. R. Vinegar, W. Schreiber and R. Hugo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1969, **166**, 96-103.
14. F. Q. Cunha, G. E. Souza, C. A. Souza, B. C. Cerqueira and S. H. Ferreira,

- Br. J. Exp. Pathol.*, 1989, **70**, 1-8.
15. T. Niseteo, D. Komes, A. Belscak-Cvitanovic, D. Horzic and M. Budec, *Food Chem.*, 2012, **134**, 1870-1877.
16. G. S. Duarte, A. A. Pereira and A. Farah, *Food Chem.*, 2010, **118**, 851-855.
17. D. Perrone, C. M. Donangelo and A. Farah, *Food Chem.*, 2008, **110**, 1030-1035.
18. A. Farah, M. C. Monteiro, V. Calado, A. S. França and L. C. Trugo, *Food Chem.*, 2006, **98**, 373-380.
19. İ. Gülçin, H. A. Alici and M. Cesur, *Chem. Pharm. Bull.*, 2005, **53**, 281-285.
20. T. Guo, L. Wei, J. Sun, C. Hou and L. Fan, *Food Chem.*, 2011, **127**, 1634-1640.
21. M. Daglia, A. Papetti, C. Gregotti, F. Bertè and G. Gazzani, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 1449-1454.
22. A. Svilaas, A. K. Sakhi, L. F. Andersen, T. Svilaas, E. C. Strom, D. R., Jr., Jacobs, L. Ose and R. Blomhoff, *J. Nutrition*, 2004, **134**, 562-567.
23. M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem. Toxicol.*, 2013, **51**, 15-25.
24. H. P. Kim, K.H. Son, H. W. Chang and S. S. Kang, *J. Pharmacol. Scien.*, 2004, **96**, 229-245.
25. F. C. Meotti, A. P. Luiz, M. G. Pizzolatti, C. A. Kassuya, J. B. Calixto and A. R. Santos, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, **316**, 789-796.
26. J. Garcia-Leme, L. Nakamura, M. P. Leite and M. Rocha e Silva, *Br. J. Pharmacol.*, 1973, **64**, 91-98.
27. A. Tjolsen, O. G. Berge, S. Hunskaar, J. H. Rosland and K. Hole, *Pain*, 1992, **51**, 5-17.

28. P. R. Verma, A. A. Joharapurkar, V. A. Chatpalliwar and A. Asnani, *J. Ethnopharmacol.*, 2005, **102**, 298-301.
29. C. A Winter, E. A Risley, G. W. and P. Nuss, *Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, **11**, 544-547.
30. M. E. C. Moreira, M. H. dos Santos, G. Zolini, *J Med Food*, 2008, **11**, 356-361.
31. S. M. Thomazzi, C. B. Silva, D. C. R. Silveira, C. L. C. Vasconcellos, A. F. Lira, E. V. F. Cambui, C. S. Estevam and A. R. Antonioli, *J. Ethnopharmacol.*, 2010, **127**, 451-456.
32. A. P. Almeida, B. M. Bayer, Z. Horakova, M. A. Beaven, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1980, **214**, 74-79.
33. M. DiRosa, J. P. Giroud and D. A. Willoughby, *J. Pathol.*, 1971, **104**, 15-29.
34. F. Q. Cunha, G. E. Souza and C. A. Souza, *Br. J. Exp. Pathol.*, 1989, **70**, 1-8.
35. M. W. J. A. Fieren, *Mediators of Inflammation*, 2012, doi:10.1155/2012/976241
36. M. D. Dos Santos, M. C. Almeida, M. P. Lopes MP and G. E. P. Souza, *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, **29**, 2236-2240.
37. C. Marrassini, C. Acevedo, J. Miño, G. Ferraro and S. Gorzalczany, *Phytother Res.*, 2010, **24**, 1807-1812.
38. X. Zhang, H. Huang, T. Yang, Y. Ye, J. Shan, Z. Yin and L. Luo, *Injury*, 2010, **41**, 943-949.
39. M. Yonathan, K. Asres, A. Assefa and F. Bucar, *J. Ethnopharmacol.*, 2006, **108**, 462-470.