



NAIRA POERNER RODRIGUES

**CAFÉ: COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE DESATIVADORA DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO *IN VITRO***

**COFFEE: BIOACTIVE COMPOUNDS AND *IN VITRO* SCAVENGING CAPACITY
AGAINST REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

NAIRA POERNER RODRIGUES

**CAFÉ: COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE DESATIVADORA DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO *IN VITRO***

Orientadora: Profa. Dra. Neura Bragagnolo

**COFFEE: BIOACTIVE COMPOUNDS AND *IN VITRO* SCAVENGING CAPACITY
AGAINST REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Doctorate thesis presented to the Food Science Postgraduation Programme of the School of Food Engineering of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Food Science.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Naira Poerner Rodrigues e orientada pela Profa. Dra. Neura Bragagnolo

Assinatura da orientadora

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA - CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - UNICAMP

P752c Poerner Rodrigues, Naira, 1985-
Café: compostos bioativos e capacidade desativadora
de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio *in vitro* /
Naira Poerner Rodrigues. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Neura Bragagnolo.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Coffea* spp. 2. Café solúvel. 3. Capacidade
antioxidante. 4. Ácidos clorogênicos. I. Bragagnolo,
Neura. II. Universidade Estadual de Campinas. III.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Coffee: bioactive compounds and *in vitro* scavenging
capacity against reactive oxygen and nitrogen species

Palavras-chave em Inglês:

Coffea spp.

Soluble coffee

Antioxidant capacity

Chlorogenic acid

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Neura Bragagnolo

Adriana Zerlotti Mercadante

Lilian Regina Barros Mariutti

Marta de Toledo Benassi

Severino Matias de Alencar

Data da defesa: 26-04-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Neura Bragagnolo (Orientadora)
FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante (Membro Titular)
FEA/UNICAMP

Dra. Lilian Regina Barros Mariutti (Membro Titular)
DCA-FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi (Membro Titular)
UEL

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar (Membro Titular)
ESALQ/USP

Dra. Hilary Castle de Menezes (Membro Suplente)
Pesquisadora-Campinas

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado (Membro Suplente)
FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Veridiana Vera de Rosso (Membro Suplente)
UNIFESP

*Dedico esta tese ao meu marido Eliseu, meu porto seguro,
à minha mãe Adelina, exemplo de amor, dedicação e cuidado
aos meus irmãos Andréia, Nádia e Nei, pela amizade e confiança,
e as minhas sobrinhas Eduarda, Julia e Maria, que eu tanto amo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre estar ao meu lado;

Ao meu marido Eliseu Rodrigues pelo companheirismo e amizade bem como pelo incentivo e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

À minha família por ter possibilitado o acesso ao ensino de qualidade durante todo o ensino pré-universitário e pelo apoio incondicional durante o mestrado e doutorado. Agradeço especialmente à minha mãe pelo amor, dedicação e cuidado, e aos meus irmãos Andréia, Nádia e Nei pela amizade e confiança;

Às minhas sobrinhas, Eduarda, Julia e Maria, que são motivo de alegria e orgulho desde o momento em que nasceram;

À Prof. Dra. Neura Bragagnolo pela oportunidade, orientação e valiosos ensinamentos que contribuíram para a minha formação acadêmica e para o desenvolvimento da tese de doutorado;

À Profa. Marta de Toledo Benassi pelas valiosas contribuições e parceria na realização da análise estatística multivariada;

À Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva pela parceria no trabalho desenvolvido com as sementes de café cru;

À Dra. Lilian Regina Barros Mariutti pela amizade e constante apoio;

Aos colegas do laboratório de Química de Alimentos que compartilharam muitos momentos alegres, muitas xícaras de café e cuias de chimarrão;

Ao Lucas Magalhães Campos, bolsista de treinamento técnico, que com muita dedicação me auxiliou nas inúmeras etapas de análise;

Aos membros da banca examinadora, titulares e suplentes, pelas correções e sugestões que contribuíram para a melhora da qualidade científica da tese;

À Capes pela bolsa de doutorado, à Fapesp pelo apoio financeiro ao projeto regular e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (FEA-UNICAMP) pela oportunidade de realização do doutorado e infra-estrutura.

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL	xv
GENERAL SUMMARY	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS.....	5

CAPÍTULO I

Revisão de literatura

1 Café.....	9
1.1 Composição química do café cru.....	12
1.2 Composição química do café torrado	14
2 Antioxidantes.....	15
3 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN).....	16
3.1 Radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	18
3.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	19
3.3 Radical hidroxila (HO^{\bullet}).....	20
3.4 Radical peroxila (ROO^{\bullet}) e radical alcoxila (RO^{\bullet}).....	20
3.5 Oxigênio singlete (1O_2).....	21
3.6 Ácido hipocloroso (HOCl)	22
3.7 Radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) e ânion peroxinitrito ($ONOO^-$)	22
Referências	23

CAPÍTULO II

Identification and quantification, by HPLC-DAD-MSⁿ, of bioactive compounds in coffee brews

Abstract.....	31
1 Introduction	32
2 Experimental.....	33
2.1 Materials	33

2.2 Coffee samples	34
2.3 Coffee brew preparation	34
2.4 Determination of bioactive compounds by HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS ⁿ	34
2.4.1 Equipment	34
2.4.2 Clarification of the coffee brews	35
2.4.3 Simultaneous determination of caffeine, chlorogenic acids (CGA) and derivatives	35
2.4.4 Simultaneous determinations of trigonelline, nicotinic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), theobromine, and theophylline	37
2.4.5 Method validation	37
2.5 Color measurement	38
2.6 Browened compounds	38
2.7 Statistical analysis	38
3 Results and discussion	39
3.1 Method Performance	39
3.2 Identification of caffeine, chlorogenic acids (CGA) and derivatives	41
3.2.1 Identification of chlorogenic acids (CGA)	43
3.2.2 Identification of chlorogenic acid lactones	45
3.2.3 Identification of cinnamoyl-amino acid conjugates	46
3.2.4 Identification of the free cinnamic acids	46
3.3 Identification of trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline ..	46
3.4 Levels of bioactive compounds	48
4 Conclusion	53
Acknowledgements	54
Supplementary data	54
References	54

CAPÍTULO III

Correlação, através de análise multivariada, entre a composição de compostos bioativos e a capacidade de desativar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio de bebidas de café

Resumo	65
1 Introdução	66
2. Material e métodos	67
2.1 Reagentes	67
2.2 Amostras de café e preparo das bebidas de café	68
2.3 Capacidade redutora	68
2.4 Capacidade de desativar as ERO e ERN	69
2.4.1 Capacidade de desativar o radical peroxila	69
2.4.2 Capacidade de desativar o peróxido de hidrogênio	70
2.4.3 Capacidade de desativar o radical hidroxila	70
2.4.4 Capacidade de desativar o ácido hipocloroso	70
2.4.5 Capacidade de desativar o óxido nítrico	71
2.4.6 Capacidade de desativar o peroxinitrito	71
2.5 Análise estatística	72
3 Resultados e discussão	73
3.1 Capacidade redutora e capacidade de desativar ERO e ERN	73
3.2 Correlação entre a capacidade redutora e a capacidade de desativar as ERO e ERN e o conteúdo de compostos bioativos	80
4 Conclusão	84
Agradecimentos	85
Referências	85

CAPÍTULO IV

Influência de genótipos de café no conteúdo de compostos bioativos e na capacidade de desativar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio *in vitro*

Resumo	91
1 Introdução	92
2 Material e métodos	93
2.1 Reagentes	93
2.2 Amostras de café	94
2.3 Preparo das amostras	97

2.4	Preparo dos extratos hidrofílico e lipofílico	97
2.5	Determinação da composição dos extratos por HPLC-DAD-MS ⁿ	98
2.6	Capacidade redutora e capacidade de desativar as ERO e ERN	100
2.6.1	Capacidade redutora dos extratos hidrofílicos	100
2.6.2	Capacidade de extratos hidrofílicos de desativarem o radical peroxila	101
2.6.3	Capacidade de extratos lipofílicos de desativarem o radical peroxila	101
2.6.4	Capacidade de extratos hidrofílico e lipofílico de desativarem o peróxido de hidrogênio	102
2.6.5	Capacidade de extratos hidrofílicos de desativarem o radical hidroxila.....	102
2.6.6	Capacidade de extratos hidrofílico e lipofílico de desativarem o ácido hipocloroso.....	102
2.6.7	Capacidade de extratos hidrofílico e lipofílico de desativarem o óxido nítrico... 103	
2.6.8	Capacidade de extratos hidrofílico e lipofílico de desativarem o ânion peroxinitrito.....	103
2.7	Cálculo da contribuição de cada composto bioativo na capacidade antioxidante	104
2.8	Análise estatística	105
3	Resultados.....	106
3.1	Compostos bioativos nos extratos hidrofílicos.....	106
3.2	Capacidade redutora e capacidade dos extratos hidrofílicos de desativarem as ERO e ERN	110
3.3	Estimativa da contribuição de cada composto bioativo na capacidade antioxidante ...	114
3.4	Capacidade dos extratos lipofílicos de desativarem as ERO e ERN	115
4	Discussão	117
	Agradecimentos	118
	Material Suplementar	118
	Referências	119
	CONCLUSÃO GERAL	133
	Appendix	135

RESUMO GERAL

No presente estudo foi avaliado o perfil qualitativo e quantitativo de compostos bioativos por HPLC-DAD-MSⁿ e a capacidade antioxidante de bebidas de café e de sementes de café cru de diferentes genótipos frente às principais espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) de relevância biológica. As bebidas de café foram preparadas com café torrado e moído (7 regulares e 3 descafeinados) e com café solúvel (2 regulares e 2 descafeinados), ambos comerciais. Nas bebidas de café foram identificados e quantificados 16 ácidos clorogênicos (ácido 5-cafeoilquínico foi o majoritário), 4 lactonas de ácidos clorogênicos, 2 conjugados de cinamoil-aminoácido, 2 ácidos cinâmicos livres, trigonelina, ácido nicotínico, 5-hidroximetilfurfural, teobromina, teofilina e cafeína. Este é o primeiro trabalho que relata a presença de isômeros do ácido cafeoilferuloilquínico e conjugados de cinamoil aminoácido em bebidas de café solúvel. Em geral, o perfil qualitativo de compostos bioativos foi similar entre as bebidas de café. Por outro lado, foram encontradas diferenças quantitativas destes compostos entre as bebidas de café torrado e moído e de café solúvel, e entre as bebidas de café regular e descafeinado. Estas diferenças provavelmente são devido às diferentes espécies e variedades de café usadas nos *blends*, bem como, às condições de processamento, especialmente o processo de descafeinização e o processo de elaboração do café solúvel. Apesar desta variação, todas as bebidas de café podem ser consideradas fonte de ácidos clorogênicos e de seus derivados e podem contribuir com a ingestão da vitamina niacina para os consumidores habituais de café. Além disso, as bebidas de café mostraram ser potentes desativadoras *in vitro* de todas as ERO [radical peroxila (ROO[•]), radical hidroxila (HO[•]), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido hipocloroso (HOCl)] e ERN [óxido nítrico (NO[•]) e ânion peroxinitrito (ONOO⁻)] avaliadas. A capacidade das bebidas de café de desativarem o ROO[•], o HO[•], o NO[•] e o ONOO⁻ foi relacionada principalmente aos teores de ácidos clorogênicos, enquanto que a capacidade das bebidas de café de desativarem o H₂O₂ e o HOCl foi relacionada aos teores de compostos escuros formados durante a reação de Maillard. As sementes de café cru foram provenientes de 12 genótipos de café pertencentes a 4 espécies (*Coffea kapakata*, *C. racemosa*, três cultivares de *C. arabica* e sete variedades de *C. canephora*). O perfil qualitativo de compostos bioativos foi similar entre os genótipos de café. Por outro lado,

foram encontradas variações entre os genótipos de café nos teores de ácidos clorogênicos totais (22,9 a 37,9 g/100 g), conjugados de cinamoil-aminoácido (26,5 a 1116 mg/100 g), trigonelina (3,1 a 6,7 g/100 g) e cafeína (3,9 a 11,8 g/100 g), destacando-se a maior concentração de ácidos clorogênicos do *C. canephora* e do *C. kapakata* quando comparados ao *C. arabica* e ao *C. racemosa*. A capacidade de desativar as ERO e ERN também variou entre os genótipos de café. Os extratos de *C. canephora* e de *C. kapakata* foram os mais eficientes na desativação do ROO[•], H₂O₂, HO[•], NO[•] e ONOO⁻, fato relacionado aos maiores teores de ácidos clorogênicos. Os resultados do presente estudo mostram que as bebidas de café são potentes desativadoras de todas as ERO e ERN de relevância biológica avaliadas, sendo que a eficiência de desativação é influenciada pelo conteúdo de ácidos clorogênicos e de compostos escuros formados durante a reação de Maillard. Além disso, este trabalho indica que o genótipo é uma característica determinante nos teores dos compostos bioativos presentes nas sementes de café cru e que a eficiência dos diferentes genótipos de café de desativarem as ERO e ERN é influenciada principalmente pelos ácidos clorogênicos.

GENERAL SUMMARY

The present study evaluated the qualitative and quantitative profiles of bioactive compounds by HPLC-DAD-MSⁿ and the antioxidant capacity of coffee brews and of different genotypes of raw coffee seeds against the main reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species of biological relevance. The coffee brews were prepared with commercially available ground roasted coffee (7 regular and 3 decaffeinated) and soluble coffee (2 regular and 2 decaffeinated). Sixteen chlorogenic acids (5-caffeoylquinic acid was the major compound), four chlorogenic acid lactones, two cinnamoyl-amino acid conjugates, two free cinnamic acids, trigonelline, nicotinic acid, 5-hydroxymethylfurfural, theobromine, theophylline and caffeine were identified and quantified in the coffee brews. This is the first study that reports the presence of caffeoylferuloylquinic acid isomers and cinnamoyl-amino acid conjugates in soluble coffee brews. In general, the qualitative profile of the bioactive compounds was similar in all the coffee brews. The content of these compounds differed among the brews prepared with ground roasted coffee and soluble coffee and also between the ones prepared with regular and decaffeinated coffee. Such differences can probably be attributed to the different species and varieties of coffee used in the blends, as well as to the processing conditions, especially in the process of decaffeination and soluble coffee processing. Despite this variation, all the coffee brews can be considered sources of chlorogenic acids and derivatives and can contribute to the intake of the niacin vitamin for habitual consumers of coffee. In addition, the coffee brews showed to be potent *in vitro* scavengers of all the evaluated ROS [peroxyl radical (ROO[•]), hydroxyl radical (HO[•]), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hypochlorous acid (HOCl)] and RNS [nitric oxide (NO[•]) and peroxynitrite anion (ONOO⁻)]. The capacity of the coffee brews to scavenge ROO[•], HO[•], NO[•] and ONOO⁻ was mainly related to the chlorogenic acid content, whilst their capacity to scavenge H₂O₂ and HOCl was related to the content of browned compounds formed during the Maillard reaction. The raw coffee seeds studied were from 12 coffee genotypes of 4 species (*Coffea kapakata*, *C. racemosa*, three cultivars of *C. arabica* and seven varieties of *C. canephora*). The qualitative profile of the bioactive compounds was similar among the coffee genotypes. On the other hand, variations were found in the contents of total chlorogenic acid (22.9 to 37.9 g/100 g), cinnamoyl-amino

acid conjugates (26.5 to 1116 mg/100 g), trigonelline (3.1 to 6.7 g/100 g) and caffeine (3.9 to 11.8 g/100 g) among the coffee genotypes. The higher chlorogenic acid concentrations in *C. canephora* and *C. kapakata* as compared to *C. arabica* and *C. racemosa* should be highlighted. The capacity to scavenge ROS and RNS also varied among the coffee genotypes. The *C. canephora* and *C. kapakata* extracts were the most efficient ROO[•], H₂O₂, HO[•], NO[•] and ONOO⁻ scavengers, which is related to their high chlorogenic acid contents. The results of the present study showed that coffee brews were potent scavengers of all the evaluated ROS and RNS of biological relevance, and that the scavenging efficiency was influenced by the contents of chlorogenic acid and browned compounds formed during the Maillard reaction. Moreover, this study indicated that the genotype is a determinant characteristic of the content of bioactive compounds present in the raw coffee seeds and that the efficiency of the different genotypes to scavenge ROS and RNS was mainly influence by the chlorogenic acids.

INTRODUÇÃO GERAL

O estresse oxidativo e nitrosativo é resultante do desequilíbrio entre a capacidade de defesa antioxidante das células e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). Durante este evento, alguns componentes celulares importantes, incluindo lipídios, proteínas e DNA, podem ter sua estrutura química alterada. Vários estudos demonstraram que o estresse oxidativo e nitrosativo está relacionado a um número de doenças humanas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas, patologias hepáticas, e ao processo de envelhecimento (Valko et al., 2007; Almeida et al., 2009). Por outro lado, também foi relatado que os antioxidantes consumidos na dieta são importantes na manutenção do equilíbrio das ERO e ERN, especialmente quando o sistema de defesa antioxidante endógeno não é capaz de desativar de forma eficaz as espécies reativas geradas durante o estresse oxidativo e nitrosativo (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A relação inversa entre a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes e a diminuição do risco do desenvolvimento de algumas doenças crônico-degenerativas já está bem estabelecida (Fernandez-Panchon et al., 2008). Além das frutas e vegetais, as bebidas preparadas a partir de plantas contribuem para o aumento do consumo de antioxidantes na dieta (George et al., 2008). Dentre estas bebidas, o café é uma das mais consumidas e apreciadas em diversos países no mundo tanto pelas suas características sensoriais quanto pela atividade estimulante devido ao seu conteúdo de cafeína e, mais recentemente, pelos potenciais efeitos benéficos à saúde humana (Farah, 2009; Gómez-Ruiz et al., 2008). Estes efeitos benéficos são hipoteticamente atribuídos à presença de compostos bioativos com propriedades antioxidantes (George et al., 2008).

Os grãos de café cru são ricos em compostos bioativos, destacando-se os ácidos clorogênicos, a trigonelina, a cafeína, os tocoferóis e os diterpenos (Esquivel & Jiménez, 2012; Speer & Kölling-Speer, 2006). O perfil de compostos bioativos dos grãos de café cru é influenciado principalmente por aspectos genéticos, como espécies e variedades, e fisiológicos, como o grau de maturação (Farah, 2009). Estudos relatam grande variabilidade no conteúdo de compostos bioativos nos grãos de café cru entre diferentes espécies e até mesmo entre variedades da mesma espécie (Aguiar et al., 2005). Neste contexto, o Brasil reúne uma das mais representativas coleções de *Coffea* conservadas *ex situ* contendo 16 das

principais espécies do gênero *Coffea* e também diferentes variedades das espécies *C. arabica*, *C. canephora* e *C. liberica*. Esta grande coleção permite o desenvolvimento de pesquisas visando encontrar grãos de café cru que contenham as maiores concentrações de compostos bioativos e também uma elevada capacidade antioxidante.

A capacidade antioxidante dos grãos de café cru, torrado e das bebidas de café já foi previamente relatada na literatura (Lima et al., 2010; Pérez-Martínez et al., 2010). Uma característica comum destes trabalhos é a utilização de métodos do tipo não competitivo, baseados na desativação de radicais estáveis não-biológicos como o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) e o 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH[•]). Os resultados destes trabalhos geraram informações limitadas sobre as propriedades antioxidantes do café, pois as propriedades químicas destes radicais, tais como a reatividade e a estabilidade, são muito diferentes daquelas apresentadas pelas ERO e ERN. Além disso, as ERO e ERN apresentam propriedades químicas diferentes entre si, principalmente em relação a sua reatividade, variando desde o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é pouco reativo, até o radical hidroxila (HO[•]) que é altamente reativo (Winterbourn, 2008). Assim, o perfil completo da capacidade antioxidante do café deve ser avaliado frente a diferentes ERO e ERN.

Por fim, apesar dos brasileiros serem grandes consumidores de café, pouco se sabe sobre o perfil de compostos bioativos e a capacidade antioxidante das diferentes marcas de café comercializadas no mercado brasileiro. O conteúdo desses compostos bioativos é dependente principalmente da formulação dos *blends* de grãos de café cru e do processo de torra onde são formados os produtos da reação de Maillard, as lactonas de ácido clorogênico e o ácido nicotínico (Casal et al., 2000; Monteiro & Trugo, 2005). O conteúdo destes compostos também apresenta variabilidade em função do tipo de processamento empregado, tais como o processo de descafeinização (Farah et al., 2006) e o processo de elaboração do café solúvel (Vignoli et al., 2011).

Referências

Aguiar, A. T. E., Fazuoli, L. C., Salva, T. J. G., Favarin, J. L. (2005). Chemical diversity in coffee species of genebank of Instituto Agrônomo do estado de São Paulo. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5, 460-466.

- Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L., Costa, P. C., Bahia, M. F. (2009). *In vitro* protective effect of *Hypericum androsaemum* extract against oxygen and nitrogen reactive species. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105, 222-227.
- Casal, S., Oliveira, M. B. P. P., Alves, M. R., Ferreira, M. A. (2000). Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3420-3424.
- Esquivel, P., Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46, 488-495.
- Farah, A., De Paulis, T., Moreira, D. P., Trugo, L. C., Martin, P. R. (2006). Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 374-381.
- Farah, A. (2009). Coffee as a speciality and functional beverage. In: Paquin, P. *Functional and Speciality Beverage Technology*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, cap. 15, p. 370-395.
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 649-671.
- George, S. E., Ramalakshmi, K., Rao, L. J. M. (2008). A perception on health benefits of coffee. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 464-486.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ames, J. M., Leake, D. S. (2008). Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *European Food Research and Technology*, 227, 1017-1024.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2007). The chemistry of free radicals and related reactive species. In: Halliwell, B; Gutteridge, J. M. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. New York: Oxford. cap.2.
- Lima, A. R., Pereira, R. G. F. A., Abrahão, S. A., Duarte, S. M. S., Paula, F. B. A. (2010). Compostos bioativos do café: atividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado antes e após a descafeinação. *Química Nova*, 33, 20-24.
- Monteiro, M. C., Trugo, L.C. (2005). Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Química Nova*, 28, 637-641.

- Pérez-Martínez, M., Caemmerer, B., De Peña, M. P., Cid, C., Kroh, L. W. (2010). Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2958-2965.
- Speer, K., Kölling-Speer, I. (2006). The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 201-216.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry*, 39, 44-84.
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., Benassi, M. T. B. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124, 863-868.
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4, 278-286.

OBJETIVOS

Considerando o que foi exposto na introdução geral, este trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- a) Identificar e quantificar por HPLC-DAD-MSⁿ os compostos bioativos de 14 bebidas de café preparadas com café torrado e moído e com café solúvel.
- b) Determinar a capacidade de 14 bebidas de café de desativarem as principais ERO e ERN de relevância biológica e correlacionar com o conteúdo de compostos bioativos através de análise multivariada.
- c) Identificar e quantificar por HPLC-DAD-MSⁿ os compostos bioativos de sementes de café cru de 12 diferentes genótipos da coleção do Banco de Germoplasma de Café do Instituto Agronômico (IAC).
- d) Determinar a capacidade de 12 diferentes genótipos de café cru de desativarem as principais ERO e ERN de importância biológica e correlacionar com o conteúdo de compostos bioativos através de análise multivariada.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1 Café

O café é um dos principais produtos agrícolas, sendo considerado o segundo produto em importância no comércio internacional de *commodities*. Em 2011, a produção mundial de café alcançou 8,1 milhões de toneladas, sendo os principais países produtores Brasil, Vietnã, Indonésia e Colômbia. Dentre estes países, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional desta *commodity*. Os principais países consumidores são os Estados Unidos, Brasil, Alemanha, Japão e Itália. O consumo brasileiro de café vem crescendo significativamente e atualmente corresponde a 14% da demanda mundial do produto. Se a demanda brasileira continuar a aumentar às mesmas taxas que nos anos de 2001 a 2011, logo o país ultrapassará o consumo dos Estados Unidos para se tornar o maior consumidor mundial de café. Em termos de consumo *per capita*, países do norte europeu (Finlândia, Noruega e Dinamarca) e da Europa ocidental (Luxemburgo) são responsáveis por mais do que o dobro do consumo dos Estados Unidos e Brasil (ICO, 2012).

Os cafeeiros pertencem ao gênero *Coffea* da família Rubiaceae. O gênero *Coffea* contém 103 espécies, mas a produção comercial está baseada somente em duas espécies, *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta), que representam aproximadamente 60% e 40% do mercado total de café, respectivamente (Davis et al., 2006; ICO, 2012). No Brasil, o *C. arabica* ocupa 75% do parque cafeeiro, e o *C. canephora*, os 25% restantes (ABIC, 2012).

As espécies de *C. arabica* e de *C. canephora* apresentam grandes diferenças na sua composição química, sendo o café arábica considerado de qualidade e aroma superior ao café robusta (Farah & Donangelo, 2006). Do ponto de vista agrícola, a planta de café robusta, como o nome diz, é robusta, forte, mais resistente e menos exigente do que a planta de café arábica, em vários aspectos, incluindo o clima ideal para seu desenvolvimento e o uso de pesticidas. Todos estes fatores determinam um menor preço de mercado para o café robusta (Farah, 2009). Do ponto de vista sensorial, o café robusta é caracterizado como um café neutro, de sabor fraco e, ocasionalmente com forte e pronunciado amargor, enquanto que o café arábica fornece uma bebida mais suave, frutada e acidulada (Alonso-Salces et al., 2009).

Na indústria são muito utilizadas as misturas de grãos (*blends*) de diferentes espécies, variedades e safras, com o objetivo de manter a uniformidade do produto. Apesar de o café robusta fornecer uma bebida de qualidade sensorial inferior, é um produto atraente para misturas comerciais, pois diminui os custos e ajusta a bebida à preferência ou costume dos consumidores (De Souza et al., 2010). Além disso, o emprego de café robusta de boa qualidade oferece a vantagem de um café com alto conteúdo de sólidos solúveis comparado ao arábica, o que confere mais corpo à bebida além de aumentar o rendimento (Morais et al., 2009).

O fruto de café maduro, também chamado de cereja, é constituído de um exocarpo (casca), mesocarpos externo (polpa) e interno (mucilagem), um endocarpo fibroso (pergaminho) e uma película prateada que recobre o grão - também denominado semente ou endosperma (**Figura 1**). O endosperma corresponde ao grão que, após os tratamentos pós-colheita, constituirá o café cru que é vendido no mercado internacional. Os grãos de café cru, após o beneficiamento, são submetidos ao processo de torra e moagem obtendo-se o café torrado e moído (Esquivel & Jiménez, 2012).

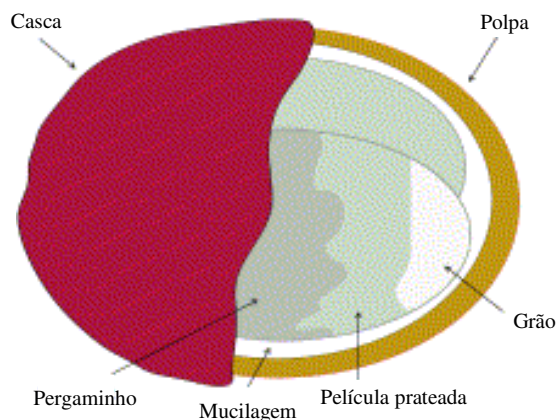


Figura 1. Camadas do fruto de café. Fonte: Esquivel & Jiménez (2012).

O café torrado e moído é classificado com relação à qualidade em três categorias: *gourmet* (somente arábica), superior (*blend* com até 15% de robusta) e tradicional (café arábica ou *blend* com robusta) (São Paulo, 2007a, 2007b, 2010). Para esta classificação, além das diferentes proporções de café robusta, também são fixadas as características mínimas de qualidade incluindo a porcentagem máxima de defeitos e a pontuação na análise sensorial (Brasil, 2010). O café solúvel é o produto resultante da desidratação do

extrato aquoso obtido exclusivamente do café torrado. A indústria de café solúvel comumente emprega o café robusta devido a maior extração de sólidos solúveis (De Souza et al., 2010). A maioria dos países, dentre estes os principais consumidores de café (Estados Unidos, Brasil, Alemanha e Itália), consomem mais de 80% do café na forma de café torrado. Por outro lado, países como Rússia, Ucrânia, Turquia e Reino Unido consomem cerca de 80% do café na forma de café solúvel (ICO, 2012).

No Brasil, estima-se que mais de 90% dos cafeeiros arábicos são provenientes de cultivares desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo (IAC), resultantes das pesquisas de melhoramento do cafeeiro (Medina-Filho et al., 2007). O IAC reúne 16 das principais espécies do gênero *Coffea*, além de diferentes variedades das espécies *C. arabica*, *C. canephora* e *C. liberica* (Aguiar et al., 2005). Atualmente, a coleção do Banco de Germoplasma de Café do IAC é uma das mais representativas coleções de *Coffea* conservadas *ex situ* (Silvestrini et al., 2008). A disponibilidade de bancos de germoplasma como este é importante por incluir as formas selvagens que podem ter características agrônomicas extremamente vantajosas, como a resistência e tolerância a doenças, nematoides, insetos, seca, geada, e outros fatores bióticos e abióticos, bem como as distintas características das plantas (sistema de raiz, caule, folhas, flores, frutos e sementes) (Aguiar et al., 2005). Além disso, estes bancos de germoplasma formam um valioso conjunto de genes para fins de reprodução, que apresentam diferenças entre características morfológicas e agrônomicas, e também a nível bioquímico e molecular (Ky et al. 2001).

Estudo realizado com sementes de café de 39 plantas pertencentes a 7 espécies (*C. canephora*, *C. liberica*, *C. congensis*, *C. eugenoides*, *C. stenophylla*, *C. racemosa* e *C. kapakata*), provenientes do Banco de Germoplasma de Café do IAC, encontrou grandes variações no conteúdo de sólidos solúveis, lipídios, ácidos clorogênicos e cafeína entre as espécies de café e entre cafés da mesma espécie, indicando a possibilidade de selecionar plantas com objetivos diversos (Aguiar et al., 2005). Silvarolla et al. (2004) estudaram 3000 cafeeiros do Banco de Germoplasma do IAC, como parte do programa de melhoramento genético para redução de cafeína, e encontraram uma introdução de *C. arabica*, da Etiópia, com sementes naturalmente descafeinadas. Esta característica poderá ser transferida para um cultivar de *C. arabica* de alta produtividade, mediante processo de melhoramento convencional.

1.1 Composição química do café cru

Os grãos de café cru são constituídos por água (12%, *m/m*), polissacarídeos (44%, *m/m*) como as arabinogalactanas, mananas e celulose, carboidratos solúveis (9%, *m/m*) como a sacarose, proteínas (12%, *m/m*), lipídios (11%, *m/m*), minerais (3%, *m/m*), cafeína (1%, *m/m*), trigonelina (1%, *m/m*) e ácidos clorogênicos totais (7%, *m/m*). Dentre estes compostos, cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos (**Figura 2**), tocoferóis e diterpenos são os principais compostos bioativos encontrados em grãos de café cru (George et al., 2008).

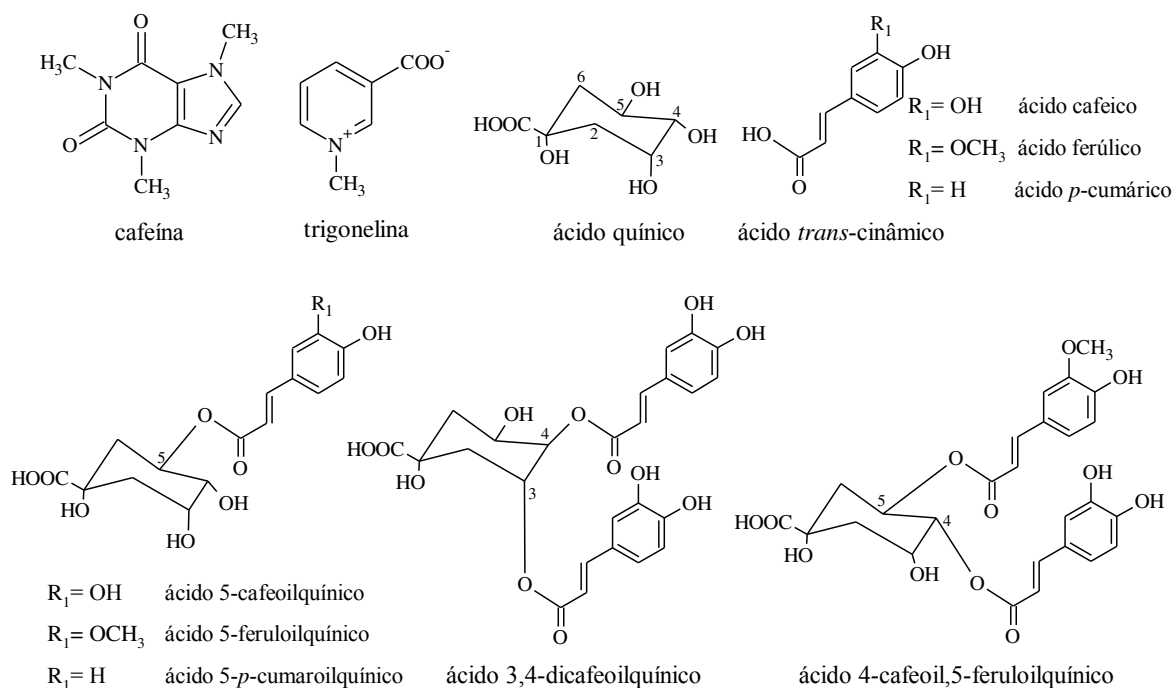


Figura 2. Estrutura da cafeína, trigonelina e dos precursores de ácidos clorogênicos - ácido quínico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico - seguido pelas principais classes de ácidos clorogênicos: ácido cafeoilquínico, ácido feruloilquínico, ácido *p*-cumaroilquínico (exemplo dos isômeros esterificados na posição 5), ácido dicafeoilquínico (exemplo do 3,4-dicafeoilquínico) e ácido cafeoilferuloilquínico (exemplo do 4-cafeoil,5-feruloilquínico).

A cafeína, principal alcaloide encontrado no café, é um derivado da xantina com características de amargor. Os metabólitos da cafeína, como a teofilina e teobromina também são encontrados no café, apesar de estarem presentes em concentrações relativamente baixas (Alonso-Salces et al., 2009; Farah, 2009). Outro alcaloide de ocorrência natural nos grãos de café cru é a trigonelina, uma N-metil betaína derivada

biologicamente da metilação enzimática do ácido nicotínico. Ela contribui para o amargor e é um precursor para a formação de diferentes classes de compostos voláteis durante o processo de torra, entre esses produtos estão as piridinas e o N-metilpirrol (Monteiro & Trugo, 2005).

A principal classe de compostos fenólicos presentes em grãos de café cru são os ácidos clorogênicos, os quais são formados pela esterificação de ácidos *trans*-cinâmicos, como os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, com o ácido quínico (**Figura 2**). Os ácidos clorogênicos podem ser subdivididos de acordo com a natureza e o número de substituintes cinâmicos e com a posição da esterificação no anel ciclohexano do ácido quínico (Clifford, 1999). As principais classes de ácidos clorogênicos presentes no café cru são os ácidos cafeoilquínicos, os ácidos dicafeoilquínicos, os ácidos feruloilquínicos, os ácidos *p*-cumaroilquínicos e os ácidos cafeoilferuloilquínicos (**Figura 2**). Em cada classe há pelo menos três isômeros que estão comumente acilados nos carbonos C3, C4 e C5 do ácido quínico (Perrone et al., 2008).

O ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) é o composto fenólico majoritário nos grãos de café cru das principais espécies de café, arábica e robusta (Alonso-Salces et al., 2009). Embora os ácidos clorogênicos (principalmente o 5-CQA) sejam amplamente distribuídos em matérias vegetais, seu conteúdo em café cru está entre os maiores encontrados em plantas (Perrone et al., 2008). O café, por ser uma das bebidas mais consumidas, é a principal fonte de ácidos clorogênicos da dieta humana. Os consumidores de café têm uma ingestão diária de 0,5-1,0 g de ácidos clorogênicos, enquanto os que não consomem café têm uma ingestão <100 mg/dia (Clifford, 1999).

Os tocoferóis e os diterpenos fazem parte da fração lipídica dos grãos de café cru (Speer & Kölling-Speer, 2006). Os tocoferóis (α , β , γ , δ) juntamente com os tocotrienóis (α , β , γ , δ) constituem a vitamina E. Nos grãos de café cru são encontrados os tocoferóis α - e β -, e em níveis de traços o γ -tocoferol. Grãos de café cru arábica contêm teores de β -tocoferol cerca de quatro vezes maiores do que robusta. O mesmo comportamento é observado para o α -tocoferol, embora a diferença nos teores seja menor (Alves et al., 2009). Os diterpenos são produzidos apenas por plantas do gênero *Coffea* e representam cerca de 20% dos lipídios totais do café (Speer & Kölling-Speer, 2006). Os principais diterpenos encontrados em grãos de café são o cafestol e caveol. O cafestol é encontrado

em endospermas de *C. arabica* e de *C. canephora*, enquanto que o caveol parece ser específico de *C. arabica* (Dias et al., 2010).

1.2 Composição química do café torrado

O grão de café cru possui pouco ou nenhum aroma, sendo as características de aroma desenvolvidas através do processo de torra. Durante este processo, a temperatura dos grãos aumenta significativamente e acontece uma série de mudanças físicas e químicas. As mudanças físicas incluem mudanças na cor, tamanho e formato do grão (Ramalakshmi & Raghavan, 2003). A composição química muda drasticamente como consequência da pirólise, caramelização e reação de Maillard, entre outras reações, com degradação de vários compostos e formação de outros, incluindo compostos bioativos e substâncias com alta e média volatilidade, que desempenham um papel importante na formação de sabor e aroma da bebida. A composição do café torrado irá variar de acordo com a matéria-prima, grau de torra e parâmetros de torra como tempo, temperatura e velocidade no qual o processo ocorre (Farah, 2009), sendo comumente utilizadas temperaturas entre 200 e 250°C (Ramalakshmi & Raghavan, 2003).

O teor de umidade do café torrado é muito inferior quando comparado com os grãos de café cru (entre 11 e 12%), variando entre 1,7 e 5,0%, dependendo do grau de torra (Farah, 2009). O conteúdo de cafeína não é significativamente alterado durante o processo de torra, embora pequenas perdas possam ocorrer por sublimação. Já a concentração de trigonelina é afetada pelo grau de torra, sendo que em condições levemente ácidas durante a torrefação do café, a trigonelina é desmetilada para a forma de ácido nicotínico, uma vitamina hidrossolúvel do complexo B também denominada niacina (Monteiro & Trugo, 2005).

As altas temperaturas do processo de torra podem causar rupturas nas ligações carbono-carbono dos ácidos clorogênicos, resultando na sua isomerização e degradação. O estudo da formação e do predomínio dos ácidos clorogênicos durante o processo de torra em duas das principais espécies de cafés comercializados (*C. arabica* cv. Bourbon; *C. arabica* cv. Longberry; e *C. canephora* cv. Robusta) mostrou que após 5 minutos de torra, sob a temperatura de 230°C, ocorre uma redução substancial nos teores de ácido 5-cafeoilquínico, enquanto que os teores de ácido 3-cafeoilquínico e 4-cafeoilquínico aumentaram cerca de duas vezes do seu teor original. O mesmo comportamento foi

observado para os ácidos feruloilquínicos (Farah et al., 2005). Estes resultados mostram que a isomerização dos ácidos clorogênicos ocorre no início do processo de torra. Além da isomerização, também é possível que ocorra a hidrólise parcial dos diésteres de ácido clorogênico com a formação dos derivados monoésteres correspondentes (Farah et al., 2005).

Durante o processo de torra outras transformações químicas podem ocorrer com os ácidos clorogênicos, como a formação de lactonas através da perda de uma molécula de água da estrutura do ácido quínico e formação de uma ligação éster intramolecular. Um tempo de torra mais longo resulta na perda de ácidos clorogênicos e de lactonas de ácidos clorogênicos, indicando que a formação de lactonas de ácidos clorogênicos é altamente dependente do grau de torra utilizado (Farah et al., 2005).

A reação de Maillard é uma das reações predominantes durante o processo de torra. Esta reação, na qual açúcares redutores reagem numa cascata de etapas com grupos amino, leva a formação de parte do desejado sabor característico do café e também da sua cor. Os produtos finais da reação de Maillard, denominados melanoidinas, são pigmentos escuros, nitrogenados e carregados negativamente. Embora, a estrutura química das melanoidinas do café seja em grande parte desconhecida devido a sua complexidade, sabe-se que estas apresentam na sua estrutura grupos fenólicos, como exemplo o ácido clorogênico, galactomananas e arabinogalactanas-proteínas (Bekedam et al., 2008).

2 Antioxidantes

Os efeitos benéficos associados ao consumo de frutas, vegetais e bebidas preparadas a partir de plantas na saúde humana são atribuídos pelo menos em parte aos compostos com propriedades antioxidantes presentes nestes alimentos (Yoo et al., 2007). O café é um alimento rico em compostos bioativos com capacidade antioxidante e com outras propriedades biológicas benéficas (Farah, 2009). Isto fica evidenciado por estudos epidemiológicos que indicam que o consumo de café está inversamente relacionado à incidência de doenças, nas quais as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas, como cirrose hepática, certas formas de câncer e desordens degenerativas (Mišík et al., 2010).

De acordo com a definição proposta por Halliwell & Gutteridge (2007), antioxidante consiste em “qualquer molécula que atrasa, previne ou remove um dano

oxidativo de uma molécula alvo”. O termo molécula alvo engloba quase todas as moléculas encontradas em alimentos e em tecidos vivos (exceto água) e inclui, por exemplo, proteínas, lipídios, carboidratos e DNA. Os antioxidantes podem atuar de diferentes formas na proteção das biomoléculas: (a) removendo espécies reativas por ação enzimática; (b) reduzindo a formação de espécies reativas; (c) suprimindo fisicamente espécies reativas; e (d) desativando espécies reativas pelos denominados “agentes de sacrifício”, que são moléculas preferencialmente oxidadas pelas espécies reativas para preservar biomoléculas de maior importância biológica (Halliwell & Gutteridge, 2007).

3 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN)

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são produtos do metabolismo celular normal e apresentam papel duplo, uma vez que podem ser benéficas ou nocivas para os sistemas vivos. Os efeitos benéficos destas espécies reativas ocorrem em concentrações baixas ou moderadas e são essenciais para a sinalização e regulação celular, detoxificação e função imunológica, sendo, portanto, continuamente produzidas pelo organismo humano (Valko et al., 2006; Winterbourn, 2008). O efeito nocivo das ERO e ERN ocorre durante o estresse oxidativo e o estresse nitrosativo. Este evento ocorre em sistemas biológicos quando de um lado há uma alta produção de ERO/ERN e de outro lado uma deficiência de antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos. O excesso de ERO pode conduzir a oxidação de macromoléculas celulares, tais como os lipídios, as proteínas e o DNA, alterando sua estrutura e conseqüentemente as suas funções normais (Valko et al., 2007). Já as alterações causadas pelas ERN levam à formação de macromoléculas nitradas através da adição de um grupo nitro (-NO₂). Os alvos biológicos modificados pela nitração incluem: resíduos de tirosina e triptofano em proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, bases do DNA e açúcares (Mazzulli et al., 2006; Valko et al., 2007). Por causa destes efeitos, os estresses oxidativo e nitrosativo podem causar doenças humanas tais como as cardiovasculares e degenerativas, diabetes, câncer, quase todas as patologias hepáticas, bem como participar do processo de envelhecimento (Almeida et al., 2009).

As espécies reativas radicalares contêm um ou mais elétrons desemparelhados e são capazes de existir independentemente. Estas espécies reativas podem ser produzidas pela

quebra de ligações covalentes no processo denominado fissão homolítica onde cada átomo permanece com um elétron. A energia requerida para dissociar as ligações covalentes pode ser fornecida na forma de calor, luz, raios X ou raios gama (γ). Por exemplo, a ação da luz ultravioleta (UV), luz visível ou calor sobre um peróxido orgânico (RO-OR) gera duas moléculas de radical alcóxila (2RO^\bullet). Outro exemplo consiste na aplicação de radiação de alta energia (radiólise), raios X ou γ , sobre a água gerando um radical de hidrogênio (H^\bullet) e o radical hidroxila (HO^\bullet). Já nos organismos vivos, o mais comum é o surgimento de espécies reativas a partir da transferência de elétrons, por meio de reações redox. Como exemplo, podemos citar a reação de Fenton, onde o Fe^{2+} (estado ferroso) reduz o H_2O_2 formando o HO^\bullet , HO^- e Fe^{3+} (estado férrico) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

As ERO são derivadas do oxigênio molecular com atividade redox, apresentando maior reatividade do que o oxigênio molecular. As ERO incluem radicais de oxigênio, como o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical hidroperoxila (HOO^\bullet), o radical peroxila (ROO^\bullet), o radical alcóxila (RO^\bullet), o radical hidroxila (HO^\bullet), o radical ânion carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) e o radical ânion dióxido de carbono ($\text{CO}_2^{\bullet-}$), bem como derivados de oxigênio não radicalares, nomeadamente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3) (Halliwell & Gutteridge, 2007). As ERN são derivadas do radical óxido nítrico (NO^\bullet) e de seus metabólitos, incluindo tanto o dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) (Mazzulli et al., 2006) quanto as espécies não radicalares ânion peroxinitrito (ONOO^-) e ânion nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-) (Halliwell, 2001). Na **Figura 3** estão apresentadas as principais vias de formação das ERO/ERN em sistemas biológicos. No decorrer do texto, serão descritas como as principais ERO e ERN são formadas e suas características de solubilidade e reatividade.

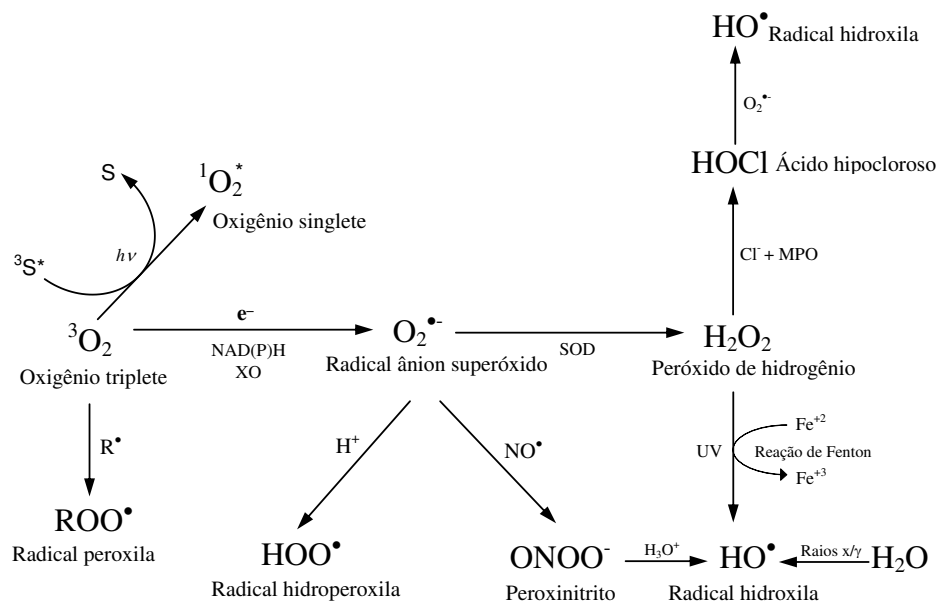


Figura 3. Formação das principais espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) em sistemas biológicos. S: sensibilizador; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; XO: xantina oxidase; SOD: superóxido dismutase; MPO: mieloperoxidase; R•: radical alquila; UV: radiação ultravioleta.

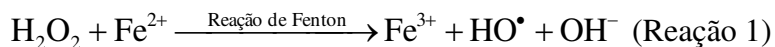
3.1 Radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é formado quimicamente ou enzimaticamente através da transferência de um elétron ao oxigênio triplete. A formação deste radical ocorre principalmente devido ao fluxo de elétrons gerados na cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria. O $O_2^{\bullet-}$ também é produzido pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase localizada nas células fagocíticas durante a resposta imune (Halliwell & Gutteridge, 2007; Winterbourn, 2008). Diversas outras enzimas reduzem O_2 a $O_2^{\bullet-}$, sendo a xantina oxidase uma das mais estudadas. Esta enzima catalisa a oxidação do substrato hipoxantina à xantina e a oxidação da xantina ao ácido úrico reduzindo o O_2 em ambas ERO, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O $O_2^{\bullet-}$ é uma base fraca, altamente solúvel em água e, portanto não atravessa facilmente as membranas lipídicas. Já, o radical hidroperoxila (HOO^{\bullet}), forma protonada do $O_2^{\bullet-}$, é mais reativo do que o $O_2^{\bullet-}$ e, como não possui carga, atravessa facilmente as membranas celulares. Em pH fisiológico a razão $[O_2^{\bullet-}]/[HOO^{\bullet}]$ é elevada (100/1 a pH= 6,8

e 1000/1 a pH 7,8) e o HOO^\bullet poderá ter alguma relevância se existirem condições propícias para sua formação, como exemplo, a diminuição do pH nos locais de geração do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O principal destino do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em pH fisiológico é a dismutação a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD), sendo que a reação de dismutação também pode ocorrer pela via não enzimática em condições ácidas (Lu et al., 2006). O H_2O_2 pode reagir com metais como o Fe^{2+} e o Cu^+ para formar o HO^\bullet através da reação de Fenton (Reação 1). O H_2O_2 também pode formar o HOCl reagindo com o Cl^- via mieloperoxidase em neutrófilos. Além disso, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ reage com o NO^\bullet para formar o ONOO^- , um forte agente oxidante e nitrosativo (Almeida et al., 2009). Portanto, apesar do $\text{O}_2^{\bullet-}$ ser relativamente pouco reativo, seus metabólitos, HOO^\bullet , HO^\bullet e ONOO^- , são altamente reativos e podem causar danos aos tecidos. Além disso, este radical pode atuar como redutor doando um elétron para metais que são catalisadores da oxidação lipídica e da reação de Fenton (Valko et al., 2007).



3.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também pode ser formado pela ação de diversas enzimas oxidases sobre a xantina, o urato e alguns aminoácidos (Choe & Min, 2006). O H_2O_2 é uma ERO que pode atuar como agente oxidante ou como agente redutor. Embora sua reatividade seja baixa, este pode ser citotóxico em elevadas concentrações. Esta ERO apresenta facilidade de difusão dentro e entre células e pode ser transformada em produtos altamente deletérios e reativos, como o HO^\bullet , gerado através da reação de Fenton, e o HOCl formado pela ação da enzima mieloperoxidase (Halliwell & Gutteridge, 2007). O H_2O_2 é solúvel em água atravessando a membrana através de canais de água (aquaporina), os quais consistem em proteínas presentes na membrana celular que regulam o fluxo de água. Esta característica possibilita que o H_2O_2 alcance o núcleo e gere o HO^\bullet *in situ*, em razão dos metais de transição ligados ao DNA, levando a uma lesão da biomolécula (Valko et al., 2006).

3.3 Radical hidroxila (HO•)

Muitos dos danos causados pelo $O_2^{\bullet-}$ e pelo H_2O_2 *in vivo* são devidos à conversão destes em espécies mais reativas, sendo, provavelmente, o radical hidroxila (HO•) a mais importante (Halliwell, 2002). Em sistemas biológicos, o HO• é formado pela reação de Fenton (Halliwell & Gutteridge, 2007). O HO• também pode ser gerado a partir da aplicação de radiação gama sobre a água e pela fissão homolítica da ligação O-O do H_2O_2 induzida por radiação UV (Choe & Min, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

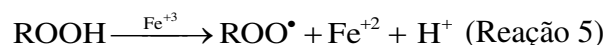
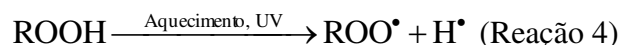
O HO• apresenta um potencial de redução muito alto, o que lhe confere alta reatividade e, assim, um tempo de vida muito curto, de aproximadamente 10^{-9} s. Devido a sua alta reatividade, quando o HO• é produzido *in vivo* ele reage próximo ao sítio de formação (Valko et al., 2007). As reações em que o HO• participa podem ser classificadas em três principais tipos: adição de hidrogênio, abstração de hidrogênio e transferência de elétrons. As reações do HO• com compostos aromáticos normalmente ocorrem por adição, como acontece nas reações com a guanina e a timina do DNA. Assim, quando o HO• é gerado próximo ao DNA, provoca danos nas suas bases (e na desoxirribose) e induz a quebra da cadeia (Halliwell & Gutteridge, 2007). O HO• é o principal responsável pela iniciação da oxidação lipídica devido a sua capacidade de abstrair um hidrogênio alílico à ligação dupla de lipídios insaturados (Choe & Min, 2006). O HO• participa ainda de reações de transferência de elétrons com íons halogenatos, como é o caso do íon cloreto (Cl^-) e do íon nitrito (NO_2^-). A reação do HO• com o íon carbonato (CO_3^{2-}) produz um radical ânion carbonato ($CO_3^{\bullet-}$), que é um poderoso agente oxidante (Halliwell & Gutteridge, 2007).

3.4 Radical peroxila (ROO•) e radical alcoxila (RO•)

Em geral, os radicais peroxila (ROO•) e alcoxila (RO•) são fortes agentes oxidantes. Estes radicais têm a capacidade de remover hidrogênio de outras moléculas, constituindo uma reação importante na peroxidação lipídica (Laguette et al., 2007).

O ROO• é formado pela reação direta entre o oxigênio triplete com o radical alquila (R•) na oxidação de ácidos graxos insaturados. Os ROO• produzem hidroperóxidos pela abstração de hidrogênio de outra molécula de ácido graxo. A maioria dos hidroperóxidos é estável a temperatura ambiente, contudo, aquecimento, luz UV ou metais de transição

aceleram a decomposição heterolítica de hidroperóxidos e produzem radicais peroxila (Reações 2 a 5). Além disso, o hidroperóxido pode sofrer decomposição homolítica gerando novas espécies radicalares, como o RO• e o HO• que irão contribuir para que se iniciem novos processos de peroxidação (Choe & Min, 2006).



3.5 Oxigênio singlete (¹O₂)

O oxigênio singlete (¹O₂) é uma molécula não radicalar que tem maior energia e é mais oxidante do que o oxigênio no estado fundamental (triplete). O principal mecanismo de formação de ¹O₂ é a fotossensibilização, na presença de um sensibilizador e do oxigênio triplete. Os sensibilizadores podem ser moléculas sintéticas (corantes orgânicos), como o azul de metileno e a eosina, bem como, biomoléculas, incluindo a riboflavina (vitamina B₂), a clorofila, a curcumina, a bilirrubina e várias porfirinas ligadas ou não a proteínas (Choe & Min, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007). Quando um fotossensibilizador é exposto à luz, este absorve energia e passa para um estado singlete excitado (¹Sen^{*}). Os sensibilizadores no estado singlete excitado retornam ao estado fundamental via emissão de luz (fluorescência), conversão interna (aquecimento) ou cruzamento intersistema. O cruzamento intersistema do sensibilizador no estado singlete excitado produz sensibilizador no estado triplete excitado (³Sen^{*}) (Choe & Min, 2006; Ogilby, 2010).

Uma vez formado, o ³Sen^{*} pode reagir por mecanismos fotoquímicos do Tipo I ou II. Na reação do Tipo I, o ³Sen^{*} pode reagir com uma biomolécula ou com outro fotossensibilizador por transferência de elétrons ou abstração de um átomo de hidrogênio. Na reação Tipo II, a energia de excitação do ³Sen^{*} pode ser transferida para o oxigênio triplete para produzir o ¹O₂ e o sensibilizador retorna ao seu estado fundamental. Estas reações podem ocorrer simultaneamente e a velocidade depende do tipo de sensibilizador e da molécula alvo, concentração da molécula alvo e de oxigênio no meio reacional (Choe & Min, 2006; Ogilby, 2010).

Devido ao caráter eletrofílico do $^1\text{O}_2$ ele pode reagir diretamente com compostos contendo uma ou mais ligações duplas formando endoperóxidos, alil hidroperóxidos ou dioxietanos. O $^1\text{O}_2$ também pode transferir sua energia de excitação para outras moléculas retornando ao seu estado fundamental. Os tocoferóis, os carotenoides, os compostos fenólicos e o ascorbato podem desativar o $^1\text{O}_2$ (Choe & Min, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

3.6 Ácido hipocloroso (HOCl)

O ácido hipocloroso (HOCl) é gerado enzimaticamente pela mieloperoxidase que usa o H_2O_2 , produzido durante o *burst* respiratório, para catalisar a oxidação de dois elétrons do cloreto (Cl^-) (Reação 6). O HOCl e sua base conjugada (^-OCl) são potentes oxidantes que atuam como agentes antimicrobianos. O HOCl é um componente chave da resposta inflamatória e é bactericida, no entanto, tem sido relacionado com diversas patologias humanas como resultado dos danos causados no tecido do hospedeiro (Pattison et al., 2009; Pennathur et al., 2010).



O HOCl é permeável a membrana celular e capaz de promover a oxidação e cloração de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos nos tecidos do hospedeiro. Esta ERO oxida os grupos sulfidril, o ascorbato, a NADPH e promove a cloração das bases do DNA, especialmente as pirimidínicas, e dos resíduos de tirosina nas proteínas. A passagem do HOCl pelas membranas celulares provoca danos nas proteínas (especialmente nos grupos SH) e nos lipídios e, se atingir o citoplasma, também reagirá com os constituintes celulares (Halliwell & Gutteridge, 2007; Pennathur, 2010).

3.7 Radical óxido nítrico (NO^\bullet) e ânion peroxinitrito (ONOO^-)

O radical óxido nítrico (NO^\bullet) é gerado em tecidos biológicos através da enzima específica óxido nítrico sintase, a qual metaboliza arginina a citrulina com formação de NO^\bullet via reação oxidativa envolvendo cinco elétrons. O NO^\bullet é um radical abundante que atua como uma importante molécula biológica de sinalização oxidativa em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea,

mecanismos de defesa, relaxamento da musculatura lisa e regulação da resposta imune (Bergendi et al., 1999). Este radical apresenta uma meia-vida de poucos segundos em ambiente aquoso, porém, em ambiente com baixa concentração de oxigênio, o NO^\bullet apresenta melhor estabilidade (meia-vida $>15\text{s}$). Em função da sua solubilidade em meio aquoso e lipídico, este radical difunde-se rapidamente pelo citoplasma e membrana plasmática (Valko et al., 2007).

Em muitas condições patológicas (incluindo inflamações, septicemia e isquemia/reperfusão), as células do sistema imunológico produzem ambos os radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ e NO^\bullet através do processo oxidativo, denominado *burst* respiratório, desencadeado durante o processo inflamatório. Sob estas condições, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o NO^\bullet podem reagir rapidamente para produzir quantidades significativas de uma molécula muito mais reativa, o ONOO^- . Este é um potente agente oxidante que pode causar oxidação e nitração de lipídios, fragmentação do DNA, nitração de resíduos de aminoácidos de proteínas, bem como a oxidação de cisteína, metionina e outros resíduos. Portanto, a toxicidade do NO^\bullet está predominantemente ligada a sua capacidade de reagir com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Valko et al., 2007; Halliwell & Gutteridge, 2007). A incomum estabilidade do ONOO^- contribui para sua toxicidade, pois possibilita sua difusão para longe do seu sítio de formação, permitindo que reaja seletivamente com diferentes componentes celulares (Beckman et al., 1994).

Referências

- ABIC - Associação Brasileira das Indústrias de Café. (2012). Café Beneficiado - safra 2012 - Parque Cafeeiro, Produção e Produtividade. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=48#2098>. Acesso em 20 jan. 2013.
- Aguiar, A. T. E., Fazuoli, L. C., Salva, T. J. G., Favarin, J. L. (2005). Chemical diversity in coffee species of genebank of Instituto Agrônômico do estado de São Paulo. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5, 460-466.
- Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L., Costa, P. C., Bahia, M. F. (2009). *In vitro* protective effect of *Hypericum androsaemum* extract against oxygen and nitrogen reactive species. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105, 222-227.

- Alonso-Salces, R. M., Serra, F., Reniero, F., Héberger, K. (2009). Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4224-35.
- Alves, R. C., Casal, S., Alves, M. R., Oliveira, M. B. (2009). Discrimination between Arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. *Food Chemistry*, 114, 295-299.
- Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., Crow, J. P. (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods in Enzymology*, 223, 229-240.
- Bekedam, E. K., Loots, M. J., Schols, H. A., Van Boekel, M. A. J. S., Smit, G. (2008). Roasting effects on formation mechanisms of coffee brew melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7138-7145.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Science*, 65, 1865-1874.
- BRASIL. (2010). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 24 de maio de 2010. Regulamento técnico para o café torrado em grão e para o café torrado e moído. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 mai. 2010. Seção 1.
- Choe, E., Min, D. B. (2006). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 1-22.
- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 362-372.
- Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., Stoffelen, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152, 465-512.
- De Souza, R. M. N. D., Canuto, G. A. B., Dias, R. C. E., Benassi, M. T. B. (2010). Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. *Química Nova*, 33, 885-890.
- Dias, R. C. E., Campanha, F. G., Vieira, L. G. E., Ferreira, L. P., Pot, D., Marraccini, P., Benassi, M. T. (2010). Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by a new high-performance liquid chromatography methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 88-93.

- Esquivel, P., Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46, 488-495.
- Farah, A. (2009). Coffee as a speciality and functional beverage. In: Paquin, P. *Functional and Speciality Beverage Technology*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, cap. 15, p. 370-395.
- Farah, A., De Paulis, T., Trugo, L. C., Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1505-1513.
- Farah, A., Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 23-36.
- George, S. E., Ramalakshmi, K., Rao, L. J. M. (2008). A perception on health benefits of coffee. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 464-486.
- Halliwell, B. (2001). Free radical reactions in human disease. In: Fuchs, J.; Packer, L. *Environmental stressors in health and disease*. New York: Marcel Dekker, cap.1.
- Halliwell, B. (2002). Food-derived antioxidants: how to evaluate their importance in food and I. In: Cadenas, E., Packer, L. *Handbook of Antioxidants*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, cap. 1.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2007). The chemistry of free radicals and related reactive species. In: Halliwell, B; Gutteridge, J. M. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. New York: Oxford, cap.2.
- ICO - International Coffee Organization. (2012). Coffee market report - august 2012. Disponível em: <<http://dev.ico.org/documents/wsiteenglish/edletter-11-e.htm>>. Acesso em 20 jan. 2013.
- Ky, C. L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., Noirot, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acid and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75, 223-230.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- Lu, C., Song, G., Lin, J. (2006). Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 985-995.

- Mazzulli, J. R., Lind, S., Ischiropoulos, H. (2006). Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction. In: Luo, Y., Packer, L. *Oxidative Stress and Age-Related Neurodegeneration*. New York: Taylor & Francis Group, LLC, cap. 5, p. 107-119.
- Medina-Filho, H. P., Bordignon, R., Guerreiro-Filho, O., Maluf, M. P., Fazuoli, L. C. (2007). Breeding of arabica coffee at IAC, Brazil: objectives, problems and prospects. *Acta Horticulturae*, 745, 393-408.
- Mišík, M., Hoelzl, C., Wagner, H., Cavin, C., Moser, B., Kundi, M., Simic, T., Elbling, L., Kager, N., Ferk, F., Ehrlich, V., Nersesyan, A., Dušinská, M., Schilter, B., Knasmüller, S. (2010). Impact of paper filtered coffee on oxidative DNA-damage: Results of a clinical trial. *Mutation Research*, 692, 42-48.
- Monteiro, M. C., Trugo, L.C. (2005). Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Química Nova*, 28, 637-641.
- Morais, S. A., Aquino, F. J., Nascimento, P. M., Chang, E. A., Chang, R. (2009). Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. *Química Nova* 32, 327-331.
- Ogilby, P. R. (2010). Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chemical Society Reviews*, 39, 3181-3209.
- Pattison, D. I., Hawkins, C. L., Davies, M. J. (2009). What are the plasma targets of the oxidant hypochlorous acid? A kinetic modeling approach. *Chemical Research Toxicology*, 22, 807-817.
- Pennathur, S., Maitra, D., Byun, J., Sliskovic, I., Abdulhamid, I., Saed, G. M., Diamond, M. P., Abu-Soud, H. M. (2010). Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 205-213.
- Perrone, D., Farah, A., Donangelo, C. M., De Paulis, T., Martin, P. R. (2008). Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry*, 106, 859-867.
- Ramalakshmi, K., Raghavan, B. (2003). Coffee: a perspective on processing and products. In: Chakraverty, A., Mujumdar, A. S., Raghavan, G. S. V., Ramaswamy, H. S. *Handbook of Postharvest Technology*. New York: Marcel Dekker, cap. 24, p. 697-739.
- Speer, K., Kölling-Speer, I. (2006). The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 201-216.

- SÃO PAULO. (2007a). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Resolução SAA - 30, de 23 de Junho de 2007. Norma de Padrões Mínimos de Qualidade para Café Torrado em Grão e Torrado e Moído - Característica: Café Superior.
- SÃO PAULO. (2007b). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Resolução SAA - 31, de 22 de Junho de 2007. Norma de Padrões Mínimos de Qualidade para Café Torrado em Grão e Torrado e Moído - Característica: Café Gourmet.
- SÃO PAULO (2010). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Resolução SAA - 19, de 05 de abril de 2010. Norma de Padrões Mínimos de Qualidade para Café Torrado em Grão e Torrado e Moído - Característica: Café Tradicional.
- Silvarolla, M. B., Mazzafera, P., Fazuoli, L. C. (2004). A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature*, 429, 826.
- Silvestrini, M., Maluf, M. P., Silvarolla, M. B., Guerreiro-Filho, O., Medina-filho, H. P., Vanini, M. M. T., Oliveira, A. S., Gaspari-Pezzopane, C., Fazuoli, L. C. (2008). Genetic diversity of a Coffea Germplasm Collection assessed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 901-910.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
- Valko, M, Leibfritz, D, Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry*, 39, 44-84.
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4, 278-286.
- Yoo, K. M., Kim, D. O., Lee, C. Y. (2007). Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Science and Biotechnology*, 16, 177-182.

CAPÍTULO II

Identification and quantification, by HPLC-DAD-MSⁿ, of bioactive compounds in coffee brews

Naira Poerner Rodrigues & Neura Bragagnolo

Artigo submetido à revista *Journal of Food Composition and Analysis*.

Identification and quantification, by HPLC-DAD-MSⁿ, of bioactive compounds in coffee brews

Naira Poerner Rodrigues & Neura Bragagnolo

Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP). Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail addresses: nairapoernersa@gmail.com; neura@fea.unicamp.br

Abstract

Coffee is a beverage widely consumed worldwide because of its sensory characteristics and stimulating and beneficial health effects. This paper presents the identification and quantification of chlorogenic acids and derivatives, trigonelline, nicotinic acid, 5-hydroxymethylfurfural, theobromine, theophylline, and caffeine in brews of 10 roasted ground coffee and 4 soluble coffee determined by HPLC-DAD-MSⁿ. Among the chlorogenic acids and derivatives, 17 chlorogenic acids, 5 chlorogenic acid lactones, 2 cinnamoyl-amino acid conjugates, and 2 free cinnamic acids were identified. This is the first study that reports the presence of caffeoylferuloylquinic acid isomers and cinnamoyl-amino acid conjugates in soluble coffee brews. Regular roasted ground coffee brews showed higher contents of chlorogenic acids (4.2 g/100 g dry extract), chlorogenic acid lactones (0.78 g/100 g), *p*-coumaric acid (2.4 g/100 g), trigonelline (2.0 g/100 g), nicotinic acid (0.1 g/100 g), and caffeine (4.6 g/100 g) than regular soluble coffee brews. Decaffeinated coffee brews presented higher levels of chlorogenic acids, chlorogenic acid lactones, caffeic acid, and trigonelline when compared to the regular ones. Despite the differences in the levels of these compounds, brews of roasted ground coffee and soluble coffee, both regular and decaffeinated, represent an important source of bioactive compounds for the habitual coffee consumers.

Keywords: arabica; robusta; instant coffee; niacin; phenolic compounds; methylxanthines

Abbreviations: CGA, chlorogenic acids; CQA, caffeoylquinic acid; FQA, feruloylquinic acid; *p*-CoQA, *p*-coumaroylquinic acid; di-CQA, dicaffeoylquinic acid; CFQA, caffeoylferuloylquinic acid; CQL, caffeoylquinic lactones; FQL, feruloylquinic lactones; CTrp, caffeoyltryptophan; *p*-CoTrp, *p*-coumaroyltryptophan; 5-HMF, 5-hydroxymethylfurfural; RR, regular roasted ground coffee; DR, decaffeinated roasted ground coffee; RS, regular soluble coffee; DS, decaffeinated soluble coffee.

1 Introduction

Coffee is the second most traded commodity after oil and is a widely consumed beverage throughout the world (Fujioka & Shibamoto, 2008). Brazil is the largest producer and exporter of coffee, accounting for 30% of the international market for this commodity. In 2011, world consumption of coffee reached 8.1 million tons, and the main consumer countries were United States, Brazil, Germany, Japan, and Italy. The northern European countries (Finland, Norway, and Denmark) and Luxembourg are responsible for more than twice the *per capita* coffee consumption of the United States and Brazil (ICO, 2012a). World coffee consumption has been growing consistently for over 40 years, at a compound annual growth rate of 1.6% (ICO, 2012b), and the reasons for the high coffee consumption are related to its sensory characteristics and stimulating and beneficial health effects (Alves et al., 2009; Farah, 2009).

Coffee is the main source of chlorogenic acids (CGA) in the human diet (Clifford, 1999). Chlorogenic acids are water soluble phenolic compounds formed by the esterification of certain *trans*-cinnamic acids, such as caffeic acid, ferulic acid, and *p*-coumaric acid, with (-)-quinic acid (Clifford, 1999; Clifford et al., 2003). During the roasting process of coffee, chlorogenic acid lactones are formed by the loss of a water molecule from the quinic acid moiety and the formation of an intramolecular ester bond (Farah et al., 2005). In addition to these compounds, seven cinnamoyl-amino acid conjugates also have been reported in coffee beans (Clifford & Knight, 2004). Besides its antibacterial and anti-inflammatory activities (Almeida et al., 2006; Santos et al., 2006), the consumption of CGA has been associated with a number of health benefits such as reduction of the relative risk of cardiovascular disease, type 2 diabetes, and Alzheimer's disease (Lindsay et al., 2002; Ranheim & Halvorsen, 2005). The chlorogenic acid lactones have shown hypoglycemic effects in rats and their potential biological activities have been related to their effects on brain function, specifically, on the antagonism of the μ opioid receptor and adenosine transporter (Shearer et al., 2003; De Paulis et al., 2004).

Three methylxanthines, namely caffeine, theobromine, and theophylline, are found in coffee (Alonso-Salces et al., 2009a). Caffeine is the major alkaloid present in green coffee beans and its content is correlated with the quality of the beverage, since it contributes to brew bitterness (Farah et al., 2006b; Alonso-Salces et al., 2009b).

Methylxanthines have presented various biological activities, such as stimulation of the central nervous system, a diuretic effect, peripheral vasoconstriction, smooth muscle relaxation, and myocardial stimulation (Heck et al., 2007). Trigoneline is the second main alkaloid found in green coffee beans. During the roasting process, trigonelline suffers severe thermal degradation generating a series of volatile compounds. These compounds, such as the pyridine and pyrrole derivatives, are important to beverage flavor (Nogueira & Trugo, 2003; Monteiro & Trugo, 2005). Moreover, due to the slightly acidic conditions during the roasting of coffee, trigonelline is demethylated generating nicotinic acid, a water soluble vitamin B complex also known as niacin (Monteiro & Trugo, 2005). Furans, including 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), are degradation products of sugars and are the most abundant volatile compounds in roasted coffee (Fuster et al., 2000).

Although the contents of CGA isomers and their derivatives have already been reported in roasted ground coffee (Farah et al., 2005; Fujioka & Shibamoto, 2008; Alves et al., 2010) and the contents of CGA isomers in soluble coffee (Nogueira & Trugo, 2003), no report on the presence of caffeoylferuloylquinic acid isomers and cinnamoyl-amino acid conjugates in soluble coffee were found in the literature. Considering that these compounds may have biological importance and/or influence on the aroma and flavor of coffee, their study in coffee brews becomes relevant. Thus, the identification and quantification of caffeine, CGA and derivatives, and of trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline in roasted ground coffee and soluble coffee brews, both regular and decaffeinated, was carried out using two different HPLC-DAD-MSⁿ methods. It is worth noting that this is the first time the trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline were simultaneously determined in coffee brews.

2 Experimental

2.1 Materials

Standards of caffeine (99% purity), 5-caffeoylquinic acid (95% purity), caffeic acid (98% purity), *p*-coumaric acid (98% purity), ferulic acid (99% purity), trigonelline hydrochloride (98% purity), nicotinic acid (99.5% purity), 5-hydroxymethylfurfural (99% purity), theobromine (99% purity), and theophylline (99% purity) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol and glacial acetic acid of chromatographic grade

were supplied by J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) and formic acid, by Merck (Darmstadt, Germany). Citric acid and zinc acetate dihydrate were supplied by Quemis (Joinville, SC, Brazil), and lead(II) acetate trihydrate and potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate, by Sigma-Aldrich. Ultrapure water was obtained from a Millipore system (Billerica, MA, USA).

2.2 Coffee samples

Seven regular roasted ground coffees (RR), three decaffeinated roasted ground coffees (DR), two regular soluble coffees (RS), and two decaffeinated soluble coffees (DS) of different brands were acquired in a local market in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. The roasted ground coffees had different classifications of identity and quality (Traditional, Superior, and Gourmet) and different degrees of roasting (light to dark) according the characteristics described in the packaging (**Supplementary Table S1**).

2.3 Coffee brew preparation

The roasted ground coffee and soluble coffee brews were prepared using the coffee/water ratio recommended by the manufacturer, i.e. 5 g of roasted ground coffee/50 mL of water and 1 g of soluble coffee/50 mL of water. The roasted ground coffee (5 g) was weighed on a Whatman n° 4 filter paper and 50 mL of ultrapure water ($T = 92.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$) slowly percolated through the center of the filter paper. The final volume of the roasted ground coffee brews varied between 34 and 37 mL. The soluble coffee brews were prepared by dissolving 0.2 g of coffee in ultrapure water (room temperature) in a 10 mL volumetric flask. The roasted ground coffee and soluble coffee brews were prepared once and immediately frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80°C until analysis.

The dry extract was determined by drying 5 mL of coffee brew in an oven to constant weight (16 h at 70°C) (AOAC, 2000). The dry extract was determined in triplicate.

2.4 Determination of bioactive compounds by HPLC-DAD and HPLC-DAD-MSⁿ

2.4.1 Equipment

The quantitative analyse were carried out in a high performance liquid chromatograph (HPLC) (Shimadzu HPLC, Kyoto, Japan) equipped with a binary pump (LC-10AD), helium degasser (DGU-2A), automatic injection system (SIL-10A), and a

diode array detector (DAD) (SPD-M10A). The identification of the compounds by mass spectrometry (MS) was carried out in a HPLC (Shimadzu HPLC) equipped with a quaternary pump (LC-20AD), online degasser (DGU-20A5), Rheodyne injection valve with a 20 μL loop, a diode array detector (Shimadzu, SPD-M20A), and a mass spectrometer with an ion trap analyzer and electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, model Esquire 4000, Bremen, Germany).

2.4.2 Clarification of the coffee brews

In order to precipitate the proteins, polysaccharides, and other compounds of high molecular weight the coffee brews were treated with Carrez solution I (zinc acetate (21.6% *w/v*)) and Carrez solution II (potassium hexacyanoferrate (10.6% *w/v*)) or aqueous lead acetate (20% *w/v*). For the determination of caffeine, CGA and its derivatives, the coffee brew (1000 μL) was transferred to test tubes and 2000 μL of ultrapure water, 100 μL of each Carrez I and II solution and 800 μL of methanol added. The mixture was shaken for 30 s and allowed to stand for 10 min. The precipitate was separated by centrifugation at $2683 \times g$ for 10 min (20°C). The supernatant was collected and filtered through 0.45 μm membrane filters (Millipore, SP, Brazil) prior to injection into the HPLC-DAD or HPLC-DAD-MSⁿ. The use of Carrez reagents resulted in losses of trigonelline and nicotinic acid from the brews, specifically 84% of trigonelline and 13% of nicotinic acid in the present study. Thus, for the determination of trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline, the coffee brews were clarified with 200 μL of aqueous lead acetate (20% *w/v*). The clarification of the coffee brews was carried out in triplicate.

2.4.3 Simultaneous determination of caffeine, chlorogenic acids (CGA) and derivatives

The caffeine, CGA and its derivatives were separated in an ODS-C₁₈ Shim-pack column (5 μm , 250 x 4.6 mm id) (Shimadzu) coupled with an ODS-C₁₈ guard column (5 μm , 4 x 3 mm id) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) using a mixture of 80% (*v/v*) 10 mM citric acid (pH 2.5) and 20% (*v/v*) of methanol (solvent A) and 100% (*v/v*) methanol (solvent B) as the mobile phase (Farah et al., 2005). The gradient was programmed as follows: 100:0 (solvent A: solvent B) for 19 min, from 100:0 to 80:20 in 6 min, remaining at 80:20 for 10 min, to 60:40 in 15 min, remaining at 60:40 for 10 min, to 100:0 in 1 min,

and remaining at this proportion for an additional 9 min. The flow rate was 1.0 mL/min and the oven temperature was set at 30°C. Caffeine was monitored and quantified at 272 nm, *p*-coumaric acid at 310 nm, and 5-caffeoylquinic acid, ferulic acid and caffeic acid at 325 nm. For the MS analysis, the same separation conditions were used with minor modifications at solvent A where citric acid was replaced by 0.3% formic acid (pH 2.5), since citric acid produces fragments at *m/z* 191, which interferes in the compound identification.

The MS parameters were set as follows: negative ionization mode, dry gas (N₂) temperature: 310°C, flow: 8 L/min, nebulizer: 30 psi, MS² and MS³ fragmentation energy: 1.6 V. The energy used in the capillary voltage (2500V) was optimised using 5-caffeoylquinic acid (5-CQA). The mass spectra were acquired in a scan range from *m/z* 70 to *m/z* 600. The MS operated in data-dependent full scan Auto-MSⁿ to obtain the ion fragments. To achieve greater sensitivity and better isomer discrimination, additional targeted MS² and MS³ experiments were carried out focusing only on the compounds that produce a particular parent ion, for example, at *m/z* 353 for caffeoylquinic acids (CQA), at *m/z* 367 for feruloylquinic acids (FQA), at *m/z* 337 for *p*-coumaroylquinic acids (*p*-CoQA), at *m/z* 515 for dicaffeoylquinic acids (di-CQA) and at *m/z* 529 for caffeoylferuloylquinic acids (CFQA).

Caffeine, 5-CQA, caffeic, *p*-coumaric, and ferulic acids were identified using the combined data of the following parameters: elution order on reverse phase, co-chromatography with standards, and characteristics of UV-visible and mass spectra as compared to standards analyzed under the same conditions. The other CGA and derivatives, for which there were no commercial standards available, were identified based on the elution order on reverse phase and the UV-visible and mass spectra characteristics as compared to the literature (Clifford et al., 2003; Clifford & Knight, 2004; Farah et al., 2005; Alves et al., 2010; Jaiswal et al., 2011).

Quantification was performed using external six-point analytical curves prepared in triplicate for caffeine (2.0-290 µg/mL), 5-CQA (0.5-125 µg/mL), caffeic acid (0.2-3.2 µg/mL), *p*-coumaric acid (0.05-2.0 µg/mL), and ferulic acid (0.1-2.0 µg/mL). CGA and its derivatives were quantified using the area of the 5-CQA standard combined with the molar extinction coefficients (Farah et al., 2005). To quantify the chlorogenic acid lactones, the molar extinction coefficient of the CGA that originated each particular lactone was used. The *p*-CoQA subgroup was quantified using the area of the 5-CQA standard, due to the

unavailability of the molar extinction coefficient in the literature. The cinnamoyl-amino acid conjugates were quantified using the molar extinction coefficient of the 5-CQA as a correction factor (Clifford & Knight, 2004). The CFQA subgroup was quantified using the average molar extinction coefficient of the three di-CQA isomers (Perrone et al., 2008).

2.4.4 Simultaneous determinations of trigonelline, nicotinic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), theobromine, and theophylline

Trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline were separated using the same C₁₈ column described above and a linear gradient of 0.5% acetic acid (v/v) (pH 3) and methanol from 100:0 for 7 min, to 70:30 in 15 min, maintaining at 70:30 for 18 min, to 100:0 in 5 min, and remaining at this proportion for 7 min. The flow rate was 1.0 mL/min and the oven temperature was set at 30°C. Theobromine and nicotinic acid were monitored and quantified at 262 nm; theobromine and theophylline, at 272 nm; and 5-HMF, at 283 nm. The MS parameters were set as follows: positive ionization mode, dry gas (N₂) temperature: 310°C, flow: 8 L/min, nebulizer: 30 psi, capillary voltage: 2000V, MS² fragmentation energy: 1.6 V. The mass spectra were acquired with a scan range from *m/z* 70 to *m/z* 600.

The compounds were identified based on the combined results of the following parameters: elution order on reverse phase, co-chromatography with standards, and the characteristics of the UV-visible and mass spectra as compared to the standards analyzed under the same conditions. Quantification was carried out using external six-point analytical curves prepared in triplicate for trigonelline (10-200 µg/mL), nicotinic acid (0.5-10 µg/mL), 5-HMF (0.5-50 µg/mL), theobromine (0.2-2.0 µg/mL), and theophylline (0.2-2.0 µg/mL).

2.4.5 Method validation

The following parameters were evaluated: linearity, repeatability, recovery, and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The linearity was observed through the determination coefficients (R^2 , $p < 0.05$) of the analytical curves plotted in triplicate with six concentrations of standard solutions. The repeatability was evaluated using the standard deviation of seven analyses of the same sample. The recovery analyses were performed at three levels (**Table 1**) by the addition of standard solutions to the sample during the

clarification step. The LOD and LOQ were calculated by Equations 1 and 2, respectively, using the parameters of the analytical curves.

$$\text{LOD} = 3.3 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equation 1}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equation 2}$$

Where:

s = standard error of the analytical curve;

S = slope of the analytical curve.

2.5 Color measurement

The CIELAB color parameters (L^* , a^* , b^*) of the roasted ground coffee and of the soluble coffee were measured in a spectrophotometer (Hunter, model Color Quest XE, Reston, VA, USA) by reflectance with specular excluded, light source D65 and 10° observation angle. The hue angle (h°) value was calculated as $h^\circ = \arctan (b^*/a^*)$.

2.6 Browning compounds

The browned compounds were determined by measuring the absorbance of the sample at 420 nm in a diode array spectrophotometer (Agilent, model 8453, Santa Clara, CA, USA). The coffee brew was diluted (1:40, v/v) with ultrapure water. This measurement was employed as a convenient index for the development of caramelization and the Maillard reaction products (López-Galilea et al., 2008).

2.7 Statistical analysis

The results were analyzed using the unpaired Student t -test at the level of 95% of significance. The analytical curves were plotted by linear regression ($p < 0.05$). The software Origin[®] 8 was used for all calculations.

3 Results and discussion

3.1 Method Performance

This is the first study that simultaneously determined by HPLC-DAD trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline in roasted coffee, whilst the simultaneous determination of caffeine, CGA and derivatives was carried out according to the method previously described by Farah et al. (2005), with the modifications presented in the material and methods section.

For both separation methods, all the analytical curves were linear within the range studied, showing R^2 values higher than 0.99 ($p < 0.05$). The values for LOD and LOQ, repeatability and recovery for the two chromatographic methods are shown in **Table 1**. Recovery was close to 100% at the three concentration levels and repeatability, measured as the relative standard deviation, was lower than 10%, indicating that both methods were accurate and precise.

Table 1. Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), repeatability, and recovery at three different spike levels of standard compounds in soluble coffee brew.

Compound	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Repeatability (%) ^a	Spike level ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%) ^b
5-CQA ^c	2.04	6.19	2.5	15.0	101 (6.6)
				29.9	100 (4.6)
				49.9	104 (6.4)
Caffeine ^c	3.61	10.94	1.7	24.2	96 (10.8)
				60.6	90 (3.7)
				96.9	100 (5.0)
Caffeic acid ^c	0.09	0.27	1.3	0.3	98 (11.9)
				0.6	101 (2.6)
				0.9	99 (9.4)
<i>p</i> -coumaric acid ^c	0.01	0.04	3.6	0.15	103 (1.3)
				0.26	104 (1.5)
Trigonelline ^d	3.77	11.42	1.0	24.3	103 (1.3)
				48.5	100 (2.9)
				72.8	104 (0.9)
Nicotinic acid ^d	0.14	0.43	2.0	1.0	109 (1.6)
				2.0	100 (7.8)
				3.0	106 (0.4)
5-HMF ^d	0.99	3.02	2.1	3.8	106 (5.4)
				5.7	98 (6.3)
				8.9	105 (0.6)
Theobromine ^d	0.03	0.10	6.5	0.4	94 (5.1)
				0.7	100 (2.7)
				0.9	97 (1.3)
Theophylline ^d	0.07	0.22	3.1	0.3	89 (1.0)
				0.5	99 (1.2)
				1.0	88 (0.2)

^a Repeatability is given as the relative standard deviation (RSD, %) ^b Relative standard deviation (%) is given in parentheses (n= 3). ^c Linear gradient citric acid/methanol. ^d Linear gradient acetic acid/methanol. 5-CQA= 5-caffeoylquinic acid; 5-HMF= 5-hydroxymethylfurfural.

3.2 Identification of caffeine, chlorogenic acids (CGA) and derivatives

Figure 1 shows a typical chromatogram for the separation of caffeine, CGA and derivatives in coffee brews. Besides caffeine, 26 hydroxycinnamic derivatives were identified (**Table 2**), which can be divided into four groups: CGA, chlorogenic acid lactones, cinnamoyl-amino acid conjugates, and free cinnamic acids. The nomenclature of all the CGA isomers in the present work was based on the recommended IUPAC numbering system (IUPAC, 1976). The nomenclature of the chlorogenic acid lactones was the same as that used by Farah et al. (2005), who used the IUPAC numbering system to number the carbon atoms of the chlorogenic acid precursors of the lactones. The chemical structures of the CGA and their derivatives identified in coffee brews are shown in **Figure 2**. The UV-visible and mass spectra of the CGA isomers and their derivatives are shown in the **Appendix**.

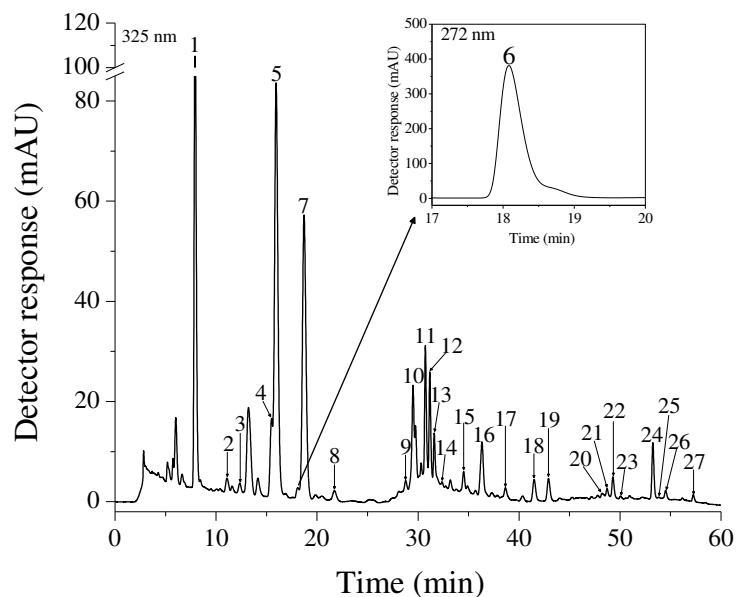


Figure 1. Chromatogram of caffeine, chlorogenic acids and their derivatives from the brew of regular soluble coffee obtained by HPLC-DAD, recorded at 325 and 272 nm (compound identification is detailed in **Table 2**).

Table 2. Chromatographic, UV-visible and mass spectrometry characteristics of the caffeine, chlorogenic acids and derivatives identified in coffee brews obtained by HPLC-DAD-MSⁿ.

Peak ^a	t _R (min) ^b	Compound (Abbreviation)	λ _{max} (nm) ^c	[M – H] ⁻ (m/z)	fragments (m/z) ^d
1	7.9	3-caffeoylquinic acid (3-CQA)	239, 326	353	MS ² [353]: 191 , 179 (51), 135 (9), 173 (5) MS ³ [353→191]: 127 , 173 (79), 85 (62), 93(35)
2	11.1	1-feruloylquinic acid (1-FQA)	-	367	MS ² [367]: 193 , 173 (20), 133 (5) MS ³ [367→193]: 133 , 149 (41)
3	12.4	3- <i>p</i> -coumaroylquinic acid (3- <i>p</i> CoQA)	226, 313	337	MS ² [337]: 163 , 147 (9) MS ³ [337→163]: 119
4	15.5	3-feruloylquinic acid (3-FQA)	236, 324	367	MS ² [367]: 193 , 133 (7), 173 (3) MS ³ [367→193]: 133 , 149 (25)
5	15.9	5-caffeoylquinic acid (5-CQA)	238, 326	353	MS ² [353]: 191 , 179 (6) MS ³ [353→191]: 127 , 173 (74), 85 (38), 111 (37)
6	18.2	caffeine (Caf)	273	-	-
7	18.7	4-caffeoylquinic acid (4-CQA)	239, 326	353	MS ² [353]: 173 , 179 (53), 191 (10), 135 (5) MS ³ [353→173]: 93 , 111 (58), 155 (44), 71 (14)
8	21.7	caffeic acid (CA)	236, 322	179	MS ² [179]: 135
9	28.9	5- <i>p</i> -coumaroylquinic acid (5- <i>p</i> CoQA)	234, 312	337	MS ² [337]: 191 , 163 (5), 173 (3)
10	29.6	3-caffeoylquinic-1,5-lactone (3-CQL)	240, 326	335	MS ² [335]: 161 , 135 (65), 173 (15), 179 (10) MS ³ [335→161]: 133
11	30.8	5-feruloylquinic acid (5-FQA)	238, 326	367	MS ² [367]: 191 , 173 (3) MS ³ [367→191]: 127 , 173 (75), 85 (47), 93 (31)
12	31.2	4-feruloylquinic acid (4-FQA)	238, 236	367	MS ² [367]: 173 , 193 (14) MS ³ [367→173]: 93
13	31.7	4-caffeoylquinic-1,5-lactone (4-CQL)	243, 329	335	MS ² [335]: 161 , 135 (20), 179 (13) MS ³ [335→161]: 133
14	32.4	<i>p</i> -coumaric acid (CoA)	241, 313	163	MS ² [163]: 119
15	34.6	3- <i>p</i> -coumaroylquinic-1,5-lactone (3- <i>p</i> CoQL)	-	319	MS ² [319]: 145 , 119 (95), 163 (59), 249 (57)
16	36.4	3-feruloylquinic-1,5-lactone (3-FQL)	238, 326	349	MS ² [349]: 175 , 149 (77), 193 (61), 133 (20)
17	38.7	4-feruloylquinic-1,5-lactone (4-FQL)	240, 327	349	MS ² [349]: 175 , 159 (19), 149 (11)
18	41.6	3,4-dicaffeoylquinic acid (3,4-diCQA)	242, 325	515	MS ² [515]: 353 , 335 (10), 173 (10), 179 (4) MS ³ [515→353]: 173 , 179 (59), 191 (39), 135 (5)
19	43.0	3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-diCQA)	323	515	MS ² [515]: 353 MS ³ [515→353]: 191 , 179 (48), 135 (9), 173 (4)
20	48.2	3-feruloyl,4-caffeoylquinic acid (3F,4CQA)	242, 328	529	MS ² [529]: 353 , 367 (78), 335 (45), 349 (37) MS ³ [529→353]: 173 , 179 (56), 191 (25)
21	48.7	3-caffeoyl,4-feruloylquinic acid (3C,4FQA)	240, 323	529	MS ² [529]: 367 , 173 (31), 335 (19) MS ³ [529→367]: 173 , 193 (29)
22	49.3	4,5-dicaffeoylquinic acid (4,5-diCQA)	244, 328	515	MS ² [515]: 353 , 179 (13) MS ³ [515→353]: 173 , 179 (55), 191 (28), 135 (4)
23	50.0	3-caffeoyl,5-feruloylquinic acid (3C,5FQA)	238, 326	529	MS ² [529]: 353 , 367 (40), 191 (17) MS ³ [529→353]: 191 , 179 (28)
24	53.3	caffeoyltryptophan (CTrp)	290, 322	366	MS ² [366]: 229 , 135 (7), 185 (4) MS ³ [366→229]: 185 , 99 (12)
25	53.8	4-feruloyl,5-caffeoylquinic acid (4F,5CQA)	241, 328	529	MS ² [529]: 367 , 173 (14) MS ³ [529→367]: 173 , 193 (64)
26	54.5	4-caffeoyl,5-feruloylquinic acid (4C,5FQA)	241, 326	529	MS ² [529]: 353 , 367 (26), 173 (10), 191 (9) MS ³ [529→353]: 173 , 179 (71), 191 (13), 135 (10)
27	57.2	<i>p</i> -coumaroyltryptophan (<i>p</i> -CoTrp)	291, 306	350	MS ² [350]: 229 , 265 (7)

^a Numbered according to the chromatogram shown in **Figure 1**. ^b Retention time on the C₁₈ column. ^c Linear gradient citric acid/methanol. ^d The base peaks are show in bold and the percentage of each fragment in parentheses.

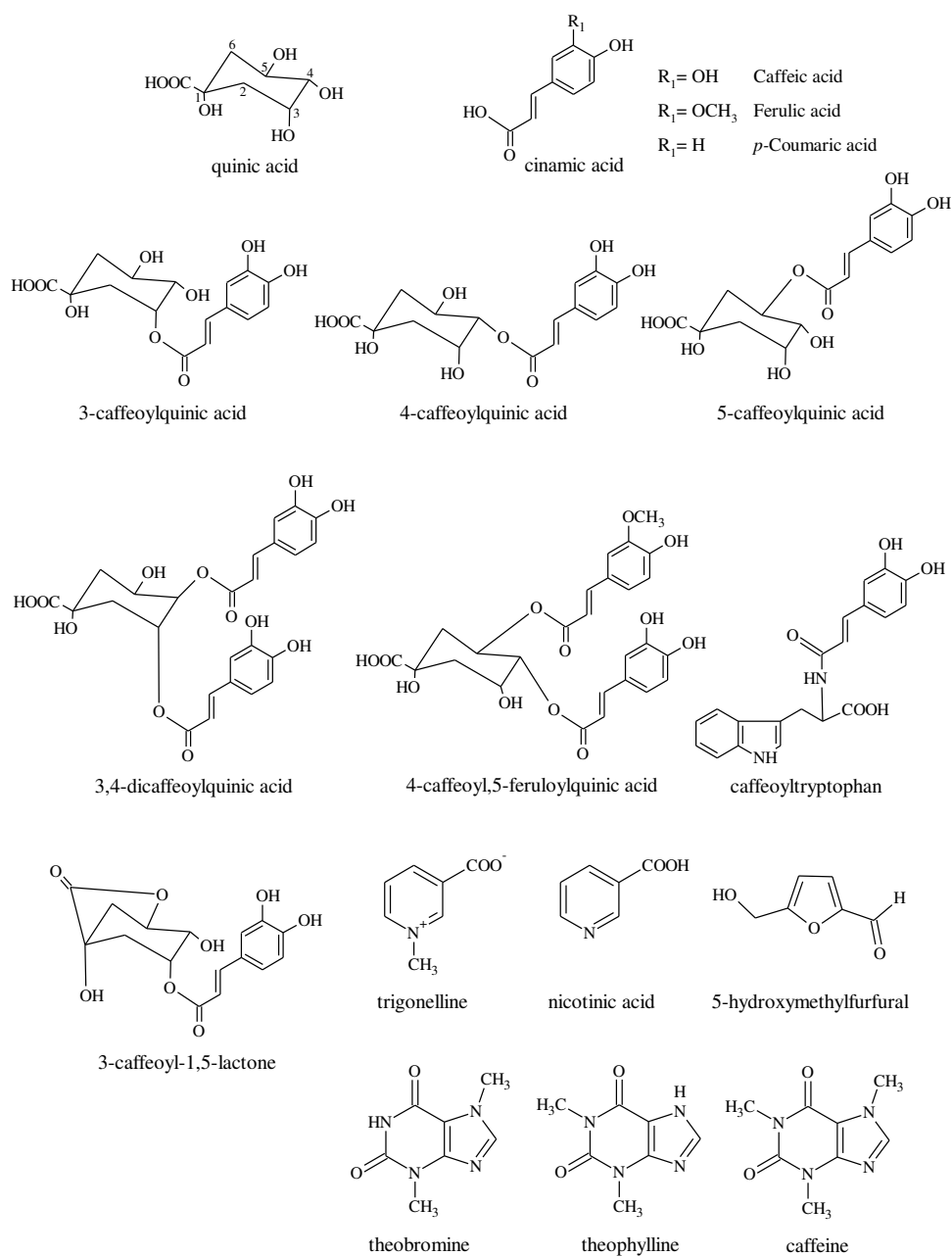


Figure 2. Chemical structures of the chlorogenic acids and their derivatives, trigonelline, nicotinic acid, 5-hydroxymethylfurfural, theobromine, theophylline, and caffeine found in coffee brews.

3.2.1 Identification of chlorogenic acids (CGA)

The CGA isomers were discriminated using their fragmentation patterns in MS² and MS³, and their relative intensities according to the hierarchical identification scheme described by Clifford et al. (2003).

Peaks 1, 5, and 7 presented the same deprotonated molecule ($[M-H]^-$) at m/z 353 and UV-visible spectrum (λ_{max} at 326 nm), indicating that these compounds were CQA isomers

(MW= 354 g/mol). These three isomers were differentiated by the MS² fragmentation pattern. The 4-CQA (peak 7) showed a MS² base peak at m/z 173 ([quinic acid-H-H₂O]⁻) due to dehydration of the quinic acid ion, a feature of the cinnamoyl group bonded to the quinic acid moiety at position 4. The 3-CQA (peak 1) and 5-CQA (peak 5) showed the same MS² base peak at m/z 191 ([quinic acid-H]⁻) and could be distinguished by comparing the relative intensity of the secondary ion from the caffeoyl moiety ([caffeic acid-H]⁻) at m/z 179 (Clifford et al., 2003), which corresponded to 51% of the base peak in 3-CQA and to 6% in 5-CQA (**Table 2**). Moreover, peak 5 eluted at the same retention time and presented the same UV-visible and MS spectra and MS² fragmentation pattern as the 5-CQA standard.

Peaks 2, 4, 11, and 12 presented the same [M-H]⁻ at m/z 367 and the UV-visible spectrum (λ_{\max} at 326 nm) characteristic of FQA (MW= 368 g/mol). The fragmentation patterns (Clifford et al., 2003) and the elution order on the C₁₈ column (Perrone et al., 2008; Alves et al., 2010) of these four FQA isomers allowed for their differentiation and identification. The 1-FQA (peak 2) and 3-FQA (peak 4) showed the MS² base peak at m/z 193 ([ferulic acid-H]⁻), 4-FQA (peak 12) at m/z 173 ([quinic acid-H-H₂O]⁻), and 5-FQA (peak 11) at m/z 191 ([quinic acid-H]⁻). The 1-FQA and 3-FQA were differentiated by the relative intensity of the secondary ion at m/z 173, which corresponded to 20% of the base peak in 1-FQA and to 3% in 3-FQA.

Peaks 3 and 9 presented the same [M-H]⁻ at m/z 337 and the UV-visible spectrum (λ_{\max} at 310 nm) characteristic of *p*-CoQA (MW= 338 g/mol). The behavior of the *p*-CoQA isomers was similar to that of the FQA isomers, yielding the same kind of ions as the MS² base peaks. The 3-*p*CoQA (peak 3) showed an MS² base peak at m/z 163 ([*p*-coumaric acid-H]⁻) and 5-*p*CoQA (peak 9) at m/z 191 ([quinic acid-H]⁻), as previously reported in the literature (Clifford et al., 2003).

Peaks 18, 19, and 22 presented the same [M-H]⁻ at m/z 515, which is characteristic of di-CQA (MW= 516 g/mol). The 3,4-diCQA (peak 18) and 4,5-diCQA (peak 22) yielded the same dehydrated quinic residue ion as the MS³ base peak at m/z 173 ([quinic acid-H-H₂O]⁻), indicating that one of the caffeoyl moieties was bonded to the quinic acid at position 4, which allowed for the differentiation between them and the 3,5-diCQA (peak 19), which produced a MS³ base peak at m/z 191 ([quinic acid-H]⁻). The 3,4-diCQA was differentiated from 4,5-diCQA and 3,5-diCQA by the presence of the

dehydrated ion as the MS² base peak at m/z 335 ([CQA-H-H₂O]⁻), which is not generated by molecules acylated at position 5 (Clifford et al., 2003).

Peaks 20, 21, 23, 25, and 26 showed the same [M-H]⁻ at m/z 529 characteristic of CFQA (MW= 530 g/mol). The 3C,5FQA (peak 23) was identified due to the absence of an intense MS³ secondary peak of the dehydrated quinic acid moiety at m/z 173, indicating that there were no substitutions at position 4, and by the presence of the MS² base peak at m/z 353. The 4F,5CQA (peak 25) and 4C,5FQA (peak 26) were characterized by the absence of a dehydrated ion (m/z 335) as the MS² base peak, indicating the presence of molecules acylated at position 5. The 4F,5CQA was differentiated from the 4C,5FQA by the presence of the MS² base peak at m/z 367 and m/z 353, respectively. Peak 20 was identified as 3F,4CQA, due to the MS² base peak at m/z 353 and to the secondary fragment ion in MS³ at m/z 179; while 3C,4FQA (peak 21) showed the fragment at m/z 367 as MS² base peak and the ion at m/z 193 as the secondary fragment of MS³ as previously reported by Clifford et al. (2003).

The presence of six CFQA was previously reported in green coffee beans. These compounds eluted in three pairs, and in each pair, the compound that eluted faster was present at a lower concentration than the one that eluted slowly (Clifford et al., 2003). The same behavior occurred in coffee brews (**Figure 1**) and the elution of two pairs was verified: 3F,4CQA (peak 20) and 3C,4FQA (peak 21), and 4F,5CQA (peak 25) and 4C,5FQA (peak 26). It was not possible to observe the third pair, since only the 3C,5FQA (peak 23) was detected. Although CFQA isomers were previously found in roasted coffee (Perrone et al., 2008; Alves et al., 2010), this is the first study in which each CFQA isomer was identified and quantified separately in roasted ground coffee and soluble coffee brews.

3.2.2 Identification of chlorogenic acid lactones

The 3-CQL (peak 10) and 4-CQL (peak 13) showed the same [M-H]⁻ at m/z 335, 3-FQL (peak 16) and 4-FQL (peak 17) at m/z 349, and 3-*p*CoQL (peak 15) at m/z 319. These deprotonated molecules correspond to the chlorogenic acid precursors of the lactones less one molecule of water due to the formation of lactones. The chlorogenic acid lactones were identified based on the fragments generated in MS and MS² (Perrone et al., 2008; Jaiswal et al., 2011) and on the elution order on C₁₈ column (Farah et al., 2005).

3.2.3 Identification of cinnamoyl-amino acid conjugates

Caffeoyltryptophan (CTrp) (peak 24) and *p*-coumaroyltryptophan (*p*CoTrp) (peak 27) showed a MS² base peak at *m/z* 229, which is a characteristic of the presence of the amino acid tryptophan due to the loss of a vinylphenol fragment from the cinnamic acid residue. These two cinnamoyl conjugates were identified by the deprotonated molecule and by the characteristics of the UV-visible spectrum (Clifford & Knight, 2004). CTrp presented its [M-H]⁻ at *m/z* 365 and λ_{max} at 322 nm, while *p*CoTrp presented [M-H]⁻ at *m/z* 349 and λ_{max} at 306 nm.

3.2.4 Identification of the free cinnamic acids

Caffeic acid (peak 8) showed its [M-H]⁻ at *m/z* 179 ([caffeic acid-H]⁻) and the fragment at *m/z* 135 ([caffeic acid-H-CO₂]⁻) due to decarboxylation as the MS² base peak. The *p*-coumaric acid (peak 14) showed the same behavior and presented [M-H]⁻ at *m/z* 163 ([*p*-coumaric acid-H]⁻) and the fragment at *m/z* 119 ([*p*-coumaric acid-H-CO₂]⁻) as the MS² base peak.

Ferulic acid was not detected in roasted ground coffee brews and in the soluble coffee brews since coeluted with an unidentified compound with λ_{max} at 373 nm. Moreover, the deprotonated molecule corresponding to ferulic acid was not detected in the MS spectrum of either coffee brews.

3.3 Identification of trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline

Figure 3 shows a chromatogram of the separation of trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline in coffee brews, and **Table 3** shows the characteristics of the UV-visible and mass spectra of these compounds. The chemical structures of trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline are shown in **Figure 2**.

Trigonelline (MW= 137 g/mol), nicotinic acid (MW= 123 g/mol), 5-HMF (MW= 126 g/mol), theobromine (MW= 180 g/mol), and theophylline (MW= 180 g/mol) were identified by comparison of their UV-visible and mass spectra with those of authentic standards. Ionization in the positive mode generated the protonated molecule ([M+H]⁺) for trigonelline (*m/z* 138), nicotinic acid (*m/z* 124), 5-HMF (*m/z* 127), theobromine (*m/z* 181) and theophylline (*m/z* 181) (**Table 3**). Both theobromine and theophylline produced the

fragment at m/z 163, resulting from the loss of a water molecule as the MS² base peak, whilst the MS² secondary peak fragment at m/z 123 (intensity of 94%), due to the loss of a methyl group and further fragmentation of the ring system, was only found in theophylline (Alonso-Salces et al., 2009a).

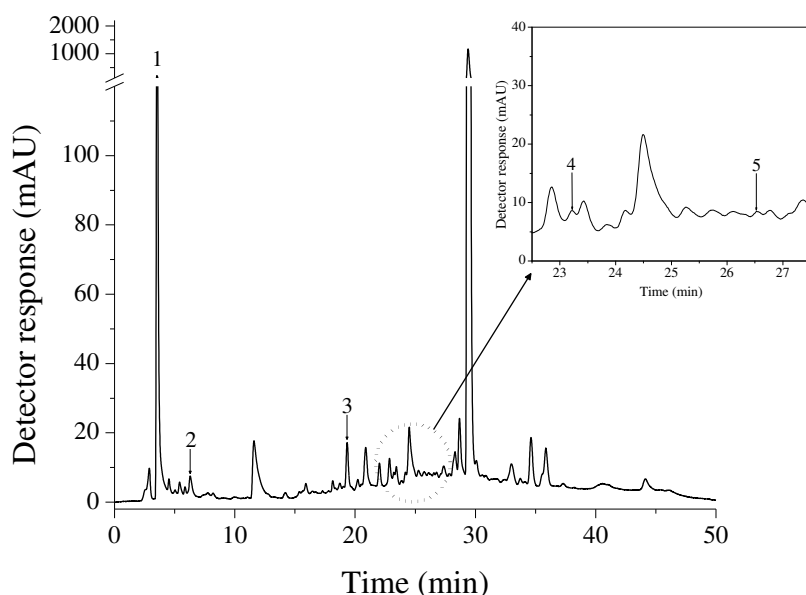


Figure 3. Chromatogram of the trigonelline, nicotinic acid, 5-hydroxymethylfurfural, theobromine, and theophylline from brew of roasted ground coffee obtained by HPLC-DAD, recorded at 272 nm (compound identification is detailed in **Table 3**).

Table 3. Chromatographic, UV-visible and mass spectrometry characteristics of the trigonelline, nicotinic acid, 5-hydroxymethylfurfural, theobromine, and theophylline identified in coffee brews, obtained by HPLC-DAD-MSⁿ.

Peak ^a	t_R (min) ^b	Compound	Abbreviation	λ_{max} (nm) ^c	$[M + H]^+$ (m/z)	fragments (m/z) ^d
1	3.5	Trigonelline	Trig	265	138	MS ² [138]: 110 , 120 (70), 94 (36)
2	6.3	Nicotinic acid	Nic	262	124	MS ² [124]: 142 , 124 (67), 88 (44)
3	19.3	5-Hydroxymethylfurfural	5-HMF	283	127	MS ² [127]: 109
4	23.2	Theobromine	Theobr	272	181	MS ² [181]: 163 , 137 (20), 161 (19)
5	26.5	Theophylline	Theoph	274	181	MS ² [181]: 163 , 123 (94), 161 (28)

^a Numbered according to the chromatogram shown in **Figure 3**. ^b Retention time on the C₁₈ column. ^c Linear gradient acetic acid/methanol. ^d The base peaks are shown in bold and the percentage of each fragment in parentheses.

3.4 Levels of bioactive compounds

The roasted ground coffees (L^* = 19.7 to 22.8; h° = 45.0 to 51.0) evaluated in this work presented a medium to dark degree of roasting according to the lightness (L^*) and hue angle (h°) values described in the literature (Campanha et al., 2010; De Souza et al., 2010) (**Supplementary Table S1**). The soluble coffees presented higher L^* and h° values (L^* = 24.3 to 27.6; h° = 55.7 to 57.8) than the roasted ground coffees. In soluble coffee, the color parameters are influenced by the degree of roasting and drying process (Clarke, 2001). The contents of browned compounds in the coffee brews was evaluated, and the soluble coffee brews presented higher contents of browned compounds (0.35 ± 0.04) than the roasted ground coffee brews (0.20 ± 0.02) (**Supplementary Table S1**).

Among the 26 hydroxycinnamic acids identified in coffee brews, only 1-FQA and 3-*p*CoQL were not quantified due to co-elution with other compounds, which was observed by alterations in the UV-visible spectra characteristics. The major subgroups of CGA isomers found in coffee brews were CQA, FQA, and di-CQA, and the minor were *p*-CoQA and CFQA (**Supplementary Table S2**). The most abundant compounds of each subgroup were 5-CQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 5-*p*CoQA and 4C,5FQA (**Supplementary Table S2 and S3**). In the coffee brews, high levels of caffeoylquinic lactones (3-CQL and 4-CQL) and low levels of feruloylquinic lactones (3-FQL and 4-FQL) were found, and the major isomers were 3-CQL and 3-FQL (**Supplementary Table S3**).

Regular roasted ground coffee brews showed about 2 to 4 times higher values for total CGA (4.2 g/100 g dry extract) and chlorogenic acid lactone (0.78 g/100 g dry extract) contents than regular soluble coffee brews, which presented 2.1 g of total CGA/100 g dry extract and 0.22 g of chlorogenic acid lactones/100 g dry extract (**Table 4**). The CGA levels of soluble coffee brews are probably affected by the raw material and processing conditions. The formulation of soluble coffee blends employs large amounts of *C. canephora*, which has higher levels of CGA than the *C. arabica*. However, during the roasting process (medium to very dark), the CGA present in the *C. canephora* are degraded more rapidly than in the *C. arabica*, resulting in low levels of CGA in the *C. canephora* (Perrone et al., 2010). Furthermore, in soluble coffee production, the beans, after roasting and grinding, pass through an additional pressurized thermal extraction at high temperature (Vignoli et al., 2011) that may help reduce the levels of CGA.

Decaffeinated coffee brews presented higher total CGA and chlorogenic acid lactone contents than regular coffee brews, and these levels were 36% and 43% higher in roasted ground coffee brews and 170% and 22% higher in soluble coffee brews, respectively (**Table 4**). This difference in the levels of CGA is probably related to the decaffeination process. During decaffeination, there is lixiviation of water soluble compounds such as carbohydrates, which are responsible for about 46% of the *C. arabica* composition (dry matter), resulting in concentration of the minor compounds, such as CGA (Farah et al., 2006a).

Regular soluble coffee brews presented higher levels of caffeic acid than regular roasted ground coffee brews (**Table 4**), indicating that the release of this acid may have been favored during the processing of soluble coffee extracted at high temperatures. In addition, the decaffeination process may cause the hydrolysis of CGA (Farah et al., 2006a) explaining the high levels of this cinnamic acid in decaffeinated coffee brews. A similar behavior was not observed for *p*-coumaric acid (**Table 4**).

Soluble coffee brews presented higher levels of cinnamic derivatives at positions 3 and 4 in relation to the isomer at position 5 (**Supplementary Table S2**). This isomerization of the cinnamoyl substituent in the position 5 of the quinic acid to the positions 3 and 4 typically occurs in CGA molecules in the presence of heat (Farah et al., 2006a). Another consequence of heating is the presence of higher levels of 5-HMF in soluble coffee brews (256.6 mg/100 g dry extract) as compared to roasted ground coffee brews (32.6 mg/100 g dry extract) (**Table 5**). Furthermore, the levels of chlorogenic acid lactones were lower in soluble coffee brews, corresponding to 6.3% of the total CGA content, than in roasted ground coffee brews, in which the lactones corresponded to 19% of the total CGA content. The formation of chlorogenic acid lactones is highly dependent on the degree of the roasting. The maximum amount of lactones is found in light medium roasts whereas darker roasts yield lower amounts (Farah et al., 2005).

Five CFQA isomers (3F,4CQA; 3C,4FQA; 3C,5FQA; 4F,5CQA; 4C,5FQA) were found in soluble coffee brews, which were present in high concentrations in decaffeinated coffee brews. In roasted ground coffee brews, only three CFQA isomers (3C,4FQA; 4F,5CQA; 4C,5FQA) were found (**Table 4, Supplementary Table S3**).

Table 4. Total chlorogenic acid subgroups (CQA, FQA, *p*-CoQA, di-CQA, CFQA), chlorogenic acid lactone subgroups (CQL, FQL), cinnamoyl-amino acid conjugates (CTrp, *p*-CoTrp), and free cinnamic acid (caffeic acid, *p*-coumaric acid) contents in coffee brews.

Coffee brews ^a	CQA Total	FQA Total	<i>p</i> -CoQA Total	di-CQA Total	CFQA Total	CQL Total	FQL Total	CTrp	<i>p</i> -CoTrp	Caffeic acid	<i>p</i> -coumaric acid
Regular roasted ground coffee											
RR1	2718.4 ± 37.0	331.9 ± 33.4	46.7 ± 0.6	83.8 ± 1.6	17.0 ± 0.4	497.5 ± 5.5	164.3 ± 4.2	78.8 ± 1.8	13.2 ± 0.2	4.9 ± 0.4	2.1 ± 0.05
RR2	2722.2 ± 25.6	235.8 ± 11.1	38.4 ± 2.1	81.0 ± 1.1	11.2 ± 0.4	507.6 ± 7.6	146.2 ± 3.4	54.5 ± 0.6	10.4 ± 0.2	5.7 ± 0.3	2.0 ± 0.2
RR3	2138.8 ± 8.1	161.9 ± 9.6	35.3 ± 0.4	64.1 ± 1.1	13.1 ± 0.2	398.2 ± 1.3	119.8 ± 12.1	49.5 ± 4.1	8.0 ± 0.1	5.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1
RR6	4178.8 ± 39.8	505.8 ± 25.5	48.9 ± 0.8	164.6 ± 3.5	31.0 ± 1.3	723.9 ± 12.8	281.0 ± 6.3	104.4 ± 1.4	16.1 ± 0.3	5.8 ± 0.4	2.9 ± 0.1
RR7	3907.2 ± 68.6	477.8 ± 7.7	49.3 ± 1.1	127.9 ± 4.8	20.0 ± 1.0	681.1 ± 14.5	242.7 ± 11.1	68.1 ± 1.6	10.8 ± 0.3	6.2 ± 0.4	2.8 ± 0.02
RR8	4586.5 ± 47.1	552.5 ± 11.4	56.2 ± 2.3	185.4 ± 3.8	31.0 ± 0.6	702.8 ± 13.5	244.9 ± 2.7	103.7 ± 0.9	16.9 ± 0.3	6.5 ± 0.2	3.0 ± 0.1
RR9	4910.3 ± 105.9	283.8 ± 10.7	71.8 ± 1.7	200.2 ± 4.3	9.1 ± 0.1	661.6 ± 14.5	72.2 ± 1.4	13.2 ± 0.1	3.5 ± 0.4	6.7 ± 0.2	2.5 ± 0.05
Mean RR ^b	3667.4 ± 979.4 ^B	368.9 ± 139.5 ^C	50.3 ± 11.3 ^B	132.8 ± 51.2 ^C	18.6 ± 8.9 ^C	606.0 ± 114.4 ^B	184.7 ± 73.1 ^B	67.5 ± 30.6 ^{AB}	11.5 ± 4.5 ^{AB}	5.9 ± 0.7 ^D	2.4 ± 0.5 ^{AB}
Decaffeinated roasted ground coffee											
DR4	4713.4 ± 25.1	718.2 ± 16.7	61.5 ± 0.6	190.2 ± 3.0	33.5 ± 0.8	884.0 ± 13.1	267.0 ± 1.2	74.7 ± 0.6	11.8 ± 0.3	7.2 ± 0.9	2.8 ± 0.1
DR5	4194.0 ± 30.8	609.4 ± 4.2	56.1 ± 1.6	163.2 ± 2.0	27.2 ± 0.8	794.7 ± 6.0	224.6 ± 2.9	61.6 ± 0.4	10.1 ± 0.1	nd ^f	2.3 ± 0.1
DR10	5249.7 ± 32.0	644.8 ± 1.8	67.7 ± 2.2	225.6 ± 0.5	26.8 ± 0.5	933.3 ± 20.5	225.4 ± 1.4	37.2 ± 1.5	8.9 ± 0.1	8.9 ± 0.02	2.8 ± 0.1
Mean DR ^c	4719.0 ± 457.9 ^A	657.5 ± 48.9 ^C	61.8 ± 5.2 ^A	193.0 ± 27.1 ^B	28.8 ± 3.0 ^B	870.7 ± 62.1 ^A	239.0 ± 21.1 ^A	57.8 ± 16.5 ^{AB}	10.3 ± 1.3 ^A	8.1 ± 1.1 ^C	2.6 ± 0.3 ^A
Regular soluble coffee											
RS51	1870.3 ± 35.9	368.4 ± 38.5	21.5 ± 0.4	84.3 ± 2.2	24.5 ± 2.4	133.6 ± 2.2	99.8 ± 3.3	61.0 ± 2.0	11.3 ± 0.5	12.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1
RS54	1495.0 ± 71.7	226.6 ± 16.5	22.0 ± 0.7	53.1 ± 1.3	10.9 ± 0.3	138.1 ± 5.4	69.1 ± 2.7	34.4 ± 1.4	6.9 ± 0.1	8.4 ± 0.8	1.2 ± 0.2
Mean RS ^d	1752.5 ± 197.3 ^C	325.8 ± 75.8 ^C	21.7 ± 0.5 ^C	74.9 ± 15.2 ^D	21.5 ± 6.3 ^C	135.0 ± 3.8 ^D	90.6 ± 15.2 ^C	53.0 ± 13.0 ^B	10.0 ± 2.2 ^{AB}	11.4 ± 2.1 ^B	1.4 ± 0.1 ^C
Decaffeinated soluble coffee											
DS52	4651.1 ± 28.6	791.2 ± 7.2	45.5 ± 0.3	272.1 ± 7.1	79.6 ± 1.6	187.7 ± 4.5	99.7 ± 1.0	74.4 ± 1.0	9.4 ± 0.5	22.0 ± 0.3	2.1 ± 0.1
DS53	4250.4 ± 32.3	817.7 ± 15.1	45.1 ± 0.2	256.1 ± 8.1	81.7 ± 1.8	163.8 ± 4.2	85.6 ± 0.8	69.2 ± 0.9	7.1 ± 0.7	22.7 ± 0.3	2.1 ± 0.1
Mean DS ^e	4450.8 ± 221.2 ^{AB}	804.5 ± 18.0 ^A	54.3 ± 0.3 ^B	264.1 ± 11.1 ^A	80.9 ± 1.9 ^A	175.8 ± 13.7 ^C	91.0 ± 6.9 ^C	71.8 ± 2.9 ^A	8.3 ± 1.4 ^B	22.3 ± 0.5 ^A	2.1 ± 0.1 ^B

^a The results correspond to the average (n= 3) ± standard deviation, expressed as mg/100 g dry extract of coffee brews. Means with different superscript capital letters in the same column are significantly different (p<0.05). ^b RR: regular roasted ground coffee; ^c DR: decaffeinated roasted ground coffee; ^d RS: regular soluble coffee; ^e DS: decaffeinated soluble coffee. ^f nd: not detected (Limit of detection: caffeic acid= 0.09 µg/mL).

Two cinnamoyl-amino acid conjugates were found in the coffee brews, CTrp and *p*CoTrp. Coffee brews presented CTrp contents about 6 times higher than *p*CoTrp. The contents of each conjugate was similar in both roasted ground coffee brews and soluble coffee brews (**Table 4**). It is noteworthy that two coffee brews (RR9 and DR10), prepared with 100% *C. arabica* (Gourmet coffee), showed lower levels of CTrp and *p*CoTrp than the other coffee brews. This can be explained by the high content of these two cinnamoyl-amino acid conjugates in *C. canephora* beans (Alonso-Salces et al.; 2009b; Alves et al., 2010).

Roasted ground coffee brews presented higher levels of trigonelline (2326.2 mg/100 g dry extract) and nicotinic acid (92.1 mg/100 g dry extract) than soluble coffee brews, which showed 862.4 mg of trigonelline/100 g dry extract and 34.3 mg of nicotinic acid/100 g dry extract (**Table 5**). The trigonelline contents vary according to the bean species, and *C. arabica* has higher levels than *C. canephora* (Casal et al., 2000a). The RR9 and DR10 coffee brews, prepared only with *C. arabica* beans, showed higher levels of trigonelline when compared with the other roasted ground coffee brews prepared with a blend containing *C. canephora*. In addition, the RR9 and DR10 coffee brews, classified as Gourmet, were less drastically roasted, which probably contributed to the higher levels of trigonelline and lower levels of nicotinic acid in these roasted ground coffee brews. The lowest levels of trigonelline found in the soluble coffee brews were probably due to the use of greater proportions of *C. canephora* in the blend formulation and the heating during the soluble coffee production (extraction and drying process).

A high negative correlation was observed between the trigonelline and nicotinic acid contents for both the soluble coffee brews ($r^2 = -0.93$) and roasted ground coffee brews ($r^2 = -0.90$), indicating a strong relationship between the degradation of trigonelline and the formation of nicotinic acid during the roasting process. The nicotinic acid content increases and the trigonelline level decreases during the first 15 min of roasting of both *C. arabica* and *C. canephora*, and is followed by a gradual decrease in the nicotinic acid content (Casal et al., 2000b).

Table 5. Trigonelline, nicotinic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), caffeine, theobromine, and theophylline contents in coffee brews.

Coffee brews ^a	Trigonelline	Nicotinic acid	5-HMF ^f	Caffeine	Theobromine	Theophylline
Regular roasted ground coffee						
RR1	1566.9 ± 7.0	133.8 ± 5.6	15.6 ± 0.1	4892.8 ± 54.8	12.9 ± 0.3	nd
RR2	1719.6 ± 21.6	124.1 ± 1.6	15.9 ± 0.2	4487.9 ± 89.8	14.3 ± 0.2	10.2 ± 0.1
RR3	1572.2 ± 52.7	128.0 ± 6.5	13.3 ± 0.6	4032.0 ± 94.6	nd ^g	5.3 ± 0.2
RR6	1913.8 ± 16.0	92.2 ± 2.7	21.0 ± 0.2	4945.0 ± 54.8	12.4 ± 0.1	3.7 ± 0.1
RR7	1807.6 ± 30.7	95.3 ± 5.3	21.0 ± 0.9	5090.3 ± 72.7	11.8 ± 0.8	nd
RR8	2031.2 ± 47.8	81.0 ± 2.3	25.5 ± 0.8	4980.9 ± 234.4	12.5 ± 0.4	nd
RR9	3694.8 ± 115.7	48.7 ± 2.7	82.9 ± 3.2	3349.5 ± 67.1	10.9 ± 1.4	7.5 ± 0.1
Mean RR ^b	2043.7 ± 710.7 ^B	100.4 ± 29.2 ^A	28.5 ± 23.8 ^B	4565.2 ± 619.3 ^A	12.5 ± 1.2 ^A	6.7 ± 2.8 ^{AB}
Decaffeinated roasted ground coffee						
DR4	2852.2 ± 43.8	74.9 ± 1.7	33.9 ± 0.4	100.8 ± 0.4	nd	4.8 ± 1.0
DR5	2803.0 ± 107.0	76.7 ± 7.4	38.6 ± 1.8	82.5 ± 6.9	nd	nd
DR10	3300.7 ± 42.9	66.5 ± 1.2	52.8 ± 0.7	130.6 ± 0.9	9.4 ± 0.5	15.7 ± 0.7
Mean DR ^c	2985.3 ± 245.4 ^A	72.7 ± 6.1 ^B	41.8 ± 8.6 ^B	104.7 ± 21.3 ^C	9.4 ± 0.5 ^B	9.2 ± 6.0 ^{AB}
Regular soluble coffee						
RS51	570.4 ± 5.6	40.6 ± 0.8	210.5 ± 4.4	3227.3 ± 55.2	10.1 ± 0.7	8.5 ± 0.3
RS54	773.2 ± 19.7	43.8 ± 0.8	277.0 ± 7.3	2610.7 ± 130.3	4.9 ± 0.3	9.0 ± 0.3
Mean RS ^d	631.3 ± 98.5 ^D	41.5 ± 1.8 ^C	230.5 ± 32.5 ^A	3042.3 ± 307.4 ^B	8.8 ± 2.5 ^B	8.6 ± 0.4 ^A
Decaffeinated soluble coffee						
DS52	1177.3 ± 1.9	20.0 ± 1.4	367.8 ± 10.4	100.5 ± 3.6	4.7 ± 0.3	5.4 ± 0.5
DS53	1318.0 ± 15.0	19.7 ± 0.3	232.4 ± 2.0	102.6 ± 3.7	5.5 ± 0.3	3.6 ± 0.3
Mean DS ^e	1247.6 ± 77.7 ^C	19.8 ± 0.8 ^D	300.1 ± 74.5 ^A	101.5 ± 3.5 ^C	5.0 ± 0.5 ^C	4.5 ± 1.1 ^B

^a The results correspond to the average (n= 3) ± standard deviation, expressed as mg/100 g dry extract of coffee brews. Means with different superscript capital letters in the same column are significantly different (p<0.05). ^b RR: regular roasted ground coffee; ^c DR: decaffeinated roasted ground coffee; ^d RS: regular soluble coffee; ^e DS: decaffeinated soluble coffee. ^f 5-HMF: 5-hydroxymethylfurfural. ^g nd: not detected (Limit of detection: Theobromine= 0.03 µg/mL; Theophylline= 0.07 µg/mL).

Among the methylxanthines evaluated, caffeine was the most abundant, both in regular and decaffeinated coffee brews (**Table 5**). Regular roasted ground coffee brews (4565.2 mg/100 g dry extract) presented higher caffeine levels than regular soluble coffee brews (3042.3 mg/100 g dry extract). Some roasted ground coffee brews presented theobromine and theophylline contents below the limit of detection. The theobromine (4.7 to 14.3 mg/100 g dry extract) and theophylline (3.6 to 15.7 mg/100 g dry extract) contents

found in coffee brews were similar to those found in commercial coffee (9 to 17 mg of theobromine/100g) (López-Martínez et al., 2003) and in green robusta coffee (8.9 mg of theophylline/100 g dry basis) (Alonso-Salces et al., 2009b).

The consumption of a cup (50 mL) of regular roasted ground coffee, decaffeinated roasted ground coffee, regular soluble coffee or decaffeinated soluble coffee could supply 33, 39, 21 or 57 mg of CGA; 6, 8, 2 or 3 mg of chlorogenic acid lactones; 0.8, 0.5, 0.4 or 0.2 mg of nicotinic acid; 36, 0.7, 31 or 1.0 mg of caffeine; and 0.2, 0.3, 2.3 or 3.0 mg of 5-HMF, respectively. Considering the brews evaluated in this study, the consumption of decaffeinated soluble coffee could supply high levels of CGA and 5-HMF, while the consumption of regular roasted ground coffee could supply high levels of chlorogenic acid lactones, nicotinic acid, and caffeine. As there are few data on the levels of 5-HMF in coffee brews, it is important to note that soluble coffee brews showed 5-HMF levels about 10 times higher than those of roasted ground coffee brews. Nicotinic acid or niacin is a vitamin which has a recommended daily intake of 16 mg/day for adults (IOM, 1998). The consumption of a cup (50 mL) of regular roasted ground coffee (0.8 mg) or two cups (100 mL) of regular soluble coffee (0.8 mg) could supply 5% of the recommended daily intake of this vitamin.

4 Conclusion

The simultaneous determination of CGA and derivatives using HPLC-DAD-MSⁿ enabled the identification of 17 chlorogenic acids, 5 chlorogenic acid lactones, 2 cinnamoyl-amino acid conjugates, and 2 free cinnamic acids in coffee brews. Moreover, by using another HPLC-DAD-MS/MS method, the simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, 5-HMF, theobromine, and theophylline was carried out in the coffee brews. Differences were observed between roasted ground coffee brews and soluble coffee brews, and between regular and decaffeinated coffee brews. This variation is probably due to the different species and varieties of coffee used in the blends, as well as the processing conditions, especially in the decaffeination process and soluble coffee processing. Despite the variation in the bioactive compound contents, the coffee brews evaluated in this study represent an important source of chlorogenic acids and derivatives, and can contribute to the intake of the vitamin niacin for habitual coffee consumers.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Funding Agencies Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP), Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES), and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) for their financial support. The authors thank Dra. Lilian Regina Barros Mariutti for suggestions and translation of this work.

Supplementary data

Supplementary Table S1. Characteristics described in the packaging of the coffee samples, CIELAB color parameters of the roasted ground coffee and soluble coffee, and browned compounds in coffee brews.

Supplementary Table S2. Caffeoylquinic acid isomers (CQA), feruloylquinic acid isomers (FQA), *p*-coumaroylquinic acid isomers (*p*-CoQA), and dicaffeoylquinic acid isomers (diCQA) content in coffee brews.

Supplementary Table S3. Caffeoylferuloylquinic acid isomers (CFQA), caffeoylquinic lactones isomers (CQL), and feruloylquinic lactones isomers (FQL) content in coffee brews.

References

- Almeida, A. A., Farah, A., Silva, D. A. M., Nunam, E. A., Glória, M. B. A. (2006). Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8738-8743.
- Alonso-Salces, R. M., Guillou, C., Berrueta, L. A. (2009a). Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionisation, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry for the on-line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 363-383.
- Alonso-Salces, R. M., Serra, F., Reniero, F., Héberger, K. (2009b). Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4224-4235.

- Alves, R. C., Casal, S., Oliveira, B. (2009). Health benefits of coffee: myth or reality? *Química Nova*, 32, 2169-2180.
- Alves, R. C., Costa, A. S. G., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Núñez, M. J., Oliveira, B. (2010). Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12221-12229.
- AOAC (2000). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17th ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists.
- Campanha, F. G., Dias, R. C. E., Benassi, M. T. B. (2010). Discrimination of coffee species using kahweol and cafestol: effects of roasting and of defects. *Coffee Science*, 5, 87-96.
- Casal, S., Oliveira, M. B. P. P., Alves, M. R., Ferreira, M. A. (2000a). Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3420-3424.
- Casal, S., Oliveira, M. B., Ferreira, M. A. (2000b). HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry*, 68, 481-485.
- Clarke, R. J. (2001). Technology III: instant coffee. In: Clarke, R. J., Vitzthum, O. G. *Coffee: recent developments*. Londres: Blackwell Science Ltd, cap. 6, p. 125-137.
- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 79, 362-372.
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911.
- Clifford, M. N., Knight, S. (2004). The cinnamoyl-amino acid conjugates of green robusta coffee beans. *Food Chemistry*, 87, 457-463.
- De Paulis, T., Commers, P., Farah, A., Zhao, J. L., McDonald, M. P., Galici, R., Martin, P. R. (2004). 4-Caffeoyl-1,5-quinide in roasted coffee inhibits [³H]naloxone binding and reverses anti-nociceptive effects of morphine in mice. *Psychopharmacology*, 176, 146-153.
- De Souza, R. M. N. D., Canuto, G. A. B., Dias, R. C. E., Benassi, M. T. B. (2010). Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. *Química Nova*, 33, 885-890.

- Farah, A. (2009). Coffee as a speciality and functional beverage. In: Paquin, P. *Functional and Speciality Beverage Technology* (pp. 370-395). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Farah, A., De Paulis, T., Trugo, L. C., Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1505-1513.
- Farah, A., De Paulis, T., Moreira, D. P., Trugo, L. C., Martin, P. R. (2006a). Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 374-381.
- Farah, A., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S., Trugo, L. C. (2006b). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98, 373-380.
- Fujioka, K., Shibamoto, T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*, 106, 217-221.
- Fuster, M. D., Mitchell, A. E., Ochi, H., Shibamoto, T. (2000). Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5600-5603.
- Heck, C. I., Mejia, E. G. (2007). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72, 138-151.
- ICO. International Coffee Organization. (2012a). Monthly coffee market report - january 2012. Retrieved March 12, 2012 from: <http://dev.ico.org/documents/wsiteenglish/edletter-11-e.htm>
- ICO. International Coffee Organization. (2012b). Monthly coffee market report - february 2012. Retrieved March 12, 2012 from: <http://dev.ico.org/documents/wsiteenglish/edletter-11-e.htm>
- IOM. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. (1998). *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline*. Washington, DC: National Academy Press.
- IUPAC. (1976). Nomenclature of cyclitols. *Biochemical Journal*, 153, 23-31.

- Jaiswal, R., Matei, M. F., Ullrich, F., Kuhnert, N. (2011). How to distinguish between cinnamoylshikimate esters and chlorogenic acid lactones by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46, 933-942.
- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hébert, R., Helliwell, B., Hill, G. B., McDowell, I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian study of health and aging. *American Journal of Epidemiology*, 156, 445-53
- López-Galilea, I., Peña, M. P., Cid, C. (2008). Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. *European Food Research and Technology*, 227, 141-149.
- López-Martínez, L., López-de-Alba, P. L., García-Campos, R., León-Rodríguez, L. M. (2003). Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 493, 83-94.
- Monteiro, M. C., Trugo, L.C. (2005). Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Química Nova*, 28, 637-641.
- Nogueira, M., Trugo, L. C. (2003). Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 269-299.
- Perrone, D., Farah, A., Donangelo, C. M., De Paulis, T., Martin, P. R. (2008). Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry*, 106, 859-867.
- Perrone, D., Donangelo, R., Donangelo, C. M., Farah, A. (2010). Modeling weight loss and chlorogenic acids content in coffee during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12238-12243.
- Ranheim, T., Halvorsen, B. (2005). Coffee consumption and human health - beneficial or detrimental? - Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 274-84.
- Santos, M. D., Almeida, M. C., Lopes, N. P., Souza, G. E. P. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antypiretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 2236-2240.

- Shearer, J., Farah, A., De Paulis, T., Bracy, D. P., Pencek, R. R., Graham, T. E., Wasserman, D. H. (2003). Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. *Nutrient Metabolism*, 133, 3529-3532.
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., Benassi, M. T. B. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124, 863-868.

Supplementary Table S1. Characteristics described in the packaging of the coffee samples, CIELAB color parameters of the roasted ground coffee and soluble coffee, and browned compounds in coffee brews.

		Brand	Quality	Degree of roast	L ^{*a}	h ^{°b}	BC ^c
Regular roasted ground coffee							
RR1	Regular	A	Traditional	Classic	20.13	48.43	0.20
RR2	Regular	A	Traditional	Dark	21.11	47.47	0.21
RR3	Regular	A	Traditional	Very dark	20.03	47.44	0.19
RR6	Regular	B	Traditional	Medium	22.70	50.76	0.22
RR7	Regular	B	Traditional	Dark	21.56	50.15	0.19
RR8	Regular	B	Traditional	Medium/Light	22.83	50.96	0.26
RR9	Regular	B	Gourmet	Medium	21.35	47.68	0.18
Decaffeinated roasted ground coffee							
DR4	Decaffeinated	A	Superior	Medium	20.98	48.03	0.18
DR5	Decaffeinated	A	Superior	Medium/Dark	19.69	45.02	0.19
DR10	Decaffeinated	B	Gourmet	Medium	21.46	47.22	0.17
Regular soluble coffee							
RS51	Regular	A	ni ^d	ni	24.70	57.63	0.39
RS54	Regular	B	ni	ni	24.26	57.79	0.38
Decaffeinated soluble coffee							
DS52	Decaffeinated	A	ni	ni	27.58	57.60	0.29
DS53	Decaffeinated	B	ni	ni	26.73	55.72	0.33

^a L*: lightness. ^b h°: hue angle. ^c BC: browned compounds. ^d ni: not informed on the label.

Supplementary Table S2. Caffeoylquinic acid isomers (CQA), feruloylquinic acid isomers (FQA), *p*-coumaroylquinic acid isomers (*p*-CoQA), and dicaffeoylquinic acid isomers (diCQA) contents in coffee brews.

Coffee brews ^a	3-CQA	4-CQA	5-CQA	3-FQA	4-FQA	5-FQA	3- <i>p</i> CoQA	5- <i>p</i> CoQA	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA
Regular roasted ground coffee^b											
RR1	676.1 ± 5.4	798.0 ± 13.5	1244.3 ± 19.4	83.5 ± 5.7	85.6 ± 9.5	162.7 ± 18.2	15.6 ± 1.0	31.1 ± 0.6	28.9 ± 0.6	31.7 ± 0.7	23.2 ± 0.3
RR2	688.1 ± 4.7	790.6 ± 8.4	1243.5 ± 20.9	57.4 ± 2.2	58.0 ± 4.0	120.4 ± 7.1	14.7 ± 1.3	23.7 ± 0.9	28.8 ± 0.5	30.4 ± 0.5	21.8 ± 0.6
RR3	540.9 ± 2.6	658.1 ± 62.9	976.1 ± 3.8	44.8 ± 3.4	35.9 ± 0.6	81.2 ± 5.6	12.7 ± 1.9	23.6 ± 0.8	22.0 ± 0.1	24.7 ± 0.7	17.4 ± 0.2
RR6	1047.3 ± 10.1	1211.5 ± 10.7	1920.1 ± 19.5	145.9 ± 7.0	118.7 ± 7.1	241.2 ± 13.6	16.4 ± 0.6	32.5 ± 1.3	59.6 ± 0.9	57.2 ± 1.0	47.7 ± 1.7
RR7	971.7 ± 16.6	1133.4 ± 21.2	1802.1 ± 31.2	137.1 ± 1.0	111.5 ± 1.6	229.1 ± 5.0	16.8 ± 0.5	32.6 ± 0.7	46.7 ± 1.5	44.4 ± 1.1	36.8 ± 2.4
RR8	1147.6 ± 11.3	1335.1 ± 13.1	2103.8 ± 22.9	157.8 ± 2.2	130.4 ± 3.4	264.3 ± 5.9	19.0 ± 0.5	37.2 ± 1.9	70.3 ± 1.5	59.2 ± 0.8	55.9 ± 1.6
RR9	1174.7 ± 25.3	1375.4 ± 30.9	2360.3 ± 49.9	67.5 ± 1.5	61.8 ± 2.9	154.5 ± 6.4	21.1 ± 0.5	50.7 ± 1.2	77.1 ± 1.8	52.1 ± 1.4	71.1 ± 1.2
Decaffeinated roasted ground coffee^c											
DR4	1152.7 ± 5.3	1330.2 ± 7.5	2230.6 ± 12.6	162.9 ± 4.1	166.7 ± 4.9	388.6 ± 9.6	21.7 ± 0.3	31.1 ± 0.6	68.2 ± 0.9	59.3 ± 0.9	62.8 ± 2.3
DR5	1026.3 ± 8.9	1183.0 ± 8.7	1984.7 ± 14.4	128.9 ± 4.7	142.5 ± 2.1	338.0 ± 4.3	20.4 ± 0.8	23.7 ± 0.9	58.0 ± 0.8	50.5 ± 1.3	54.7 ± 0.5
DR10	1281.4 ± 12.0	1480.8 ± 7.6	2487.4 ± 12.9	143.3 ± 2.0	143.2 ± 0.8	358.4 ± 0.9	22.0 ± 0.1	23.6 ± 0.8	82.7 ± 0.2	65.2 ± 0.9	77.7 ± 0.9
Regular soluble coffee^d											
RS51	572.2 ± 6.3	579.0 ± 11.3	719.0 ± 19.0	130.8 ± 11.3	98.3 ± 11.6	139.2 ± 15.8	10.7 ± 0.1	10.8 ± 0.4	29.4 ± 0.8	34.2 ± 0.5	20.7 ± 1.2
RS54	455.9 ± 24.3	458.9 ± 22.6	580.1 ± 25.0	82.3 ± 3.5	59.6 ± 5.5	84.6 ± 7.9	9.8 ± 0.3	12.2 ± 0.5	19.9 ± 0.4	19.2 ± 0.9	14.0 ± 0.2
Decaffeinated soluble coffee^e											
DS52	1455.8 ± 10.3	1410.4 ± 10.7	1784.9 ± 14.9	223.7 ± 13.3	229.5 ± 5.3	337.9 ± 6.1	20.5 ± 0.5	25.0 ± 0.3	107.5 ± 3.2	82.0 ± 1.3	82.7 ± 2.9
DS53	1341.6 ± 10.6	1286.5 ± 10.8	1622.3 ± 12.2	232.4 ± 6.8	238.8 ± 3.7	346.6 ± 4.8	21.0 ± 0.5	24.1 ± 0.3	101.6 ± 1.9	74.3 ± 1.8	80.2 ± 4.9

^a The results correspond to the average (n= 3) ± standard deviation, expressed as mg/100 g dry extract of coffee brews. ^b RR: regular roasted ground coffee; ^c DR: decaffeinated roasted ground coffee; ^d RS: regular soluble coffee; ^e DS: decaffeinated soluble coffee.

Supplementary Table S3. Caffeoylferuloylquinic acid isomers (CFQA), caffeoylquinic lactones isomers (CQL), and feruloylquinic lactones isomers (FQL) contents in coffee brews.

Coffee brews ^a	3F,4CQA	3C,4FQA	3C,5FQA	4F,5CQA	4C,5FQA	3-CQL	4-CQL	3-FQL	4-FQL
Regular roasted ground coffee^b									
RR1	nd ^f	6.1 ± 0.1	nd	nd	10.7 ± 0.3	317.5 ± 5.6	180.0 ± 0.5	121.5 ± 3.5	42.7 ± 0.7
RR2	nd	2.9 ± 0.3	nd	nd	8.3 ± 0.1	314.7 ± 5.5	192.9 ± 2.1	104.2 ± 2.0	42.0 ± 1.5
RR3	nd	7.4 ± 0.1	nd	nd	5.9 ± 0.4	248.3 ± 1.3	156.8 ± 12.2	90.6 ± 13.0	29.2 ± 0.9
RR6	nd	9.0 ± 0.4	nd	2.3 ± 0.2	19.2 ± 0.8	452.6 ± 9.0	271.3 ± 4.0	206.0 ± 4.8	75.0 ± 2.4
RR7	nd	6.2 ± 0.4	nd	1.8 ± 0.1	12.6 ± 1.2	436.5 ± 11.3	244.7 ± 4.8	178.5 ± 8.2	64.2 ± 3.0
RR8	nd	9.7 ± 0.2	nd	2.1 ± 0.2	19.2 ± 0.2	444.8 ± 9.7	258.0 ± 4.7	183.2 ± 1.5	61.7 ± 1.2
RR9	nd	nd	nd	nd	9.1 ± 0.1	414.5 ± 10.2	247.1 ± 4.4	45.4 ± 0.7	26.7 ± 0.7
Decaffeinated roasted ground coffee^c									
DR4	nd	9.9 ± 0.4	nd	2.8 ± 0.01	20.8 ± 0.2	559.3 ± 10.0	324.7 ± 4.4	194.2 ± 0.8	72.8 ± 1.6
DR5	nd	7.8 ± 0.1	nd	2.1 ± 0.1	17.3 ± 0.7	503.9 ± 6.4	290.7 ± 2.4	165.2 ± 1.8	59.4 ± 1.3
DR10	nd	6.2 ± 0.6	nd	nd	20.6 ± 0.8	581.9 ± 13.6	351.4 ± 7.0	162.6 ± 0.7	62.8 ± 0.8
Regular soluble coffee^d									
RS51	3.5 ± 0.4	7.7 ± 0.9	3.4 ± 0.6	1.4 ± 0.5	8.5 ± 0.7	102.6 ± 2.5	31.0 ± 0.3	86.9 ± 2.7	12.9 ± 0.6
RS54	1.1 ± 0.001	3.2 ± 0.2	1.8 ± 0.1	nd	4.6 ± 0.1	102.8 ± 3.9	35.4 ± 1.7	56.6 ± 2.4	12.5 ± 0.3
Decaffeinated soluble coffee^e									
DS52	10.4 ± 0.04	22.4 ± 0.3	13.1 ± 0.3	4.7 ± 0.3	28.3 ± 0.7	151.1 ± 4.0	36.7 ± 0.5	90.1 ± 0.8	9.5 ± 0.1
DS53	10.1 ± 0.6	22.8 ± 1.2	14.4 ± 0.2	5.2 ± 0.1	29.2 ± 1.1	139.7 ± 4.0	24.1 ± 0.8	78.8 ± 1.2	6.8 ± 0.9

^a The results correspond to the average (n= 3) ± standard deviation, expressed as mg/100 g dry extract of coffee brews. ^b RR: regular roasted ground coffee; ^c DR: decaffeinated roasted ground coffee; ^d RS: regular soluble coffee; ^e DS: decaffeinated soluble coffee. ^f nd: not detected.

CAPÍTULO III

Correlação, através de análise multivariada, entre a composição de compostos bioativos e a capacidade de desativar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio de bebidas de café

Naira Poerner Rodrigues, Marta de Toledo Benassi & Neura Bragagnolo

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Food Research International*.

Correlação, através de análise multivariada, entre a composição de compostos bioativos e a capacidade de desativar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio de bebidas de café

Naira Poerner Rodrigues¹, Marta de Toledo Benassi², Neura Bragagnolo¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Ciência de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil.

Resumo

Neste trabalho foi avaliada a capacidade de bebidas de café de desativarem ERO (ROO[•], H₂O₂, HO[•] e HOCl) e ERN (NO[•] e ONOO⁻), a qual foi correlacionada com seus compostos bioativos por análise multivariada. As bebidas de café foram potentes desativadoras de todas as espécies reativas testadas, sendo os IC₅₀ encontrados na ordem de µg/mL. A capacidade das bebidas de café de desativarem o ROO[•] (2523 a 3673 µmol ET/g), o HO[•] (IC₅₀= 2,24 a 4,38 µg/mL), o NO[•] (IC₅₀= 3,07 a 5,67 µg/mL) e o ONOO⁻ (IC₅₀= 1,29 a 2,88 µg/mL) foi correlacionada positivamente com os teores de ácidos clorogênicos, lactonas de ácidos clorogênicos e ácido *p*-cumárico. Já a capacidade de desativar o H₂O₂ (IC₅₀= 336 a 531 µg/mL) foi correlacionada positivamente com os teores de compostos escuros, representados fundamentalmente pelas melanoidinas. As bebidas de café apresentaram uma potente capacidade de desativar o HOCl (IC₅₀= 5,12 a 11,20 µg/mL), a qual foi correlacionada com os teores de ácido cafeico, 5-hidroximetilfurfural e compostos escuros. Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que a capacidade antioxidante frente à ERO/ERN é um dos mecanismos que pode explicar a associação entre o consumo de bebidas de café e a redução do risco de desenvolvimento de algumas doenças crônico-degenerativas.

Palavras-chave: café solúvel, café torrado e moído, capacidade antioxidante, capacidade redutora, ácidos cinâmicos, metilxantinas

1 Introdução

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo devido às suas características sensoriais e ao seu efeito estimulante (Pérez-Martínez et al., 2010). Além disso, o café tem recebido atenção devido aos seus efeitos benéficos à saúde, sendo que o consumo moderado de café foi associado à redução do risco de desenvolvimento de diversas doenças crônico-degenerativas, tais como desordens neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), cirrose, asma e diabetes do tipo II (Alves et al., 2009). Este efeito é hipoteticamente atribuído às propriedades antioxidantes de seus compostos bioativos, os quais seriam capazes de reduzir os danos oxidativos *in vivo* induzidos por espécies reativas de oxigênio (ERO) e por espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Hoelzl et al., 2010).

Os principais compostos bioativos presentes nas bebidas de café são provenientes dos grãos de café cru, tais como os ácidos clorogênicos, a trigonelina e a cafeína, e do processo de torra, onde são formados os produtos da reação de Maillard, as lactonas de ácido clorogênico e o ácido nicotínico (Casal et al., 2000; Esquivel & Jiménez, 2012). Além disso, o conteúdo de compostos bioativos presentes no café pode variar de acordo com o tipo de processamento empregado, tais como o processo de descafeinização (Farah et al., 2006) e o processo de elaboração do café solúvel (Vignoli, Bassoli & Benassi, 2011).

Dentre os compostos bioativos presentes no café, os ácidos clorogênicos têm recebido atenção especial devido à sua capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (Shahidi & Chandrasekara, 2010) e à sua elevada concentração no café, que é a principal fonte na dieta humana (Clifford, 1999). Porém, outros compostos presentes nas bebidas de café, como os produtos da reação de Maillard, a cafeína e a trigonelina também podem contribuir para o seu potencial antioxidante (López-Galilea et al., 2008).

A capacidade de bebidas de café de desativarem radicais não-biológicos, como o ABTS^{•+} e o DPPH[•], é relatada em diversos trabalhos na literatura (Cämmerer et al., 2006; López-Galilea et al., 2008, Sacchetti et al., 2009, Pérez-Martínez et al., 2010). Porém, são escassos ou inexistentes trabalhos relacionados à capacidade de bebidas de café de desativarem ERO e ERN de importância biológica. Sabe-se que as ERO e ERN apresentam propriedades químicas diferentes entre si, principalmente em relação à sua reatividade, variando desde o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é pouco reativo, até o radical hidroxila (HO[•]) que é altamente reativo (Winterbourn, 2008). Considerando que cada

espécie reativa apresenta propriedades químicas específicas, a capacidade de uma matriz desativar determinada espécie reativa não indica necessariamente que esta será capaz de desativar qualquer outra espécie reativa, o que sugere que a capacidade antioxidante de uma determinada matriz deve ser avaliada frente a diferentes ERO e ERN para que se conheça o perfil completo da capacidade antioxidante. O conhecimento do perfil completo da capacidade antioxidante poderá ser mais efetivo na interpretação de estudos que buscam correlacionar as propriedades antioxidantes *in vitro* das bebidas de café e a diminuição do risco de doenças crônico-degenerativas associadas ao estresse oxidativo.

Assim, neste trabalho determinamos a capacidade de bebidas de café de desativarem as principais ERO e ERN de importância biológica, nomeadamente o radical peroxila (ROO^\bullet), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (HO^\bullet), o ácido hipocloroso (HOCl), o radical óxido nítrico (NO^\bullet) e o ânion peroxinitrito (ONOO^-), e correlacionamos com o conteúdo de compostos bioativos através de análise multivariada. Cabe destacar que esta é a primeira vez que é relatada a capacidade de bebidas de café de desativarem o NO^\bullet .

2. Material e métodos

2.1 Reagentes

Os padrões de cafeína (99% de pureza), ácido 5-cafeoilquínico (95% de pureza), ácido cafeico (98% de pureza), ácido *p*-cumárico (98% de pureza), trigonelina (98% de pureza), 5-hidroxi-2-furaldeído (99% pureza), teofilina (99% de pureza), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (trolox, 97% de pureza), ácido ascórbico (99% de pureza), quercetina (98% pureza), cisteína (97% pureza) e rutina (94% de pureza) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e o ácido gálico da Extrasynthèse (Genay, France). Fluoresceína, 2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-hidrocloreto (AAPH), lucigenina, solução de peróxido de hidrogênio 30% (*m/v*), luminol, di-hidrorodamina 123 (DHR), N,N-dimetilformamida (DMF), solução de hipoclorito de sódio com 10-15% de cloro disponível, 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), dimetilsulfóxido (DMSO), 3-(aminopropil)-1-hidróxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno (NOC-5) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Folin-Ciocalteau foi adquirido da Dinâmica (São Paulo, SP, Brasil). Carbonato de sódio, fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio, nitrito de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio e

bicarbonato de sódio foram adquiridos da Synth (São Paulo, SP, Brasil). Fosfato de sódio tribásico dodecahidratado e 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, cloreto ferroso tetrahidratado da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), ácido cítrico e etilenodiaminotetracético (EDTA) da Quemis (Joinville, SC, Brasil). A água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação e filtração Millipore (Billerica, MA, USA).

2.2 Amostras de café e preparo das bebidas de café

Dez amostras de café torrado e moído (7 regulares e 3 descafeinados) e quatro amostras de café solúvel (2 regulares e 2 descafeinados) de diferentes marcas e graus de qualidade foram adquiridas no mercado local da cidade de Campinas, São Paulo, Brasil.

As bebidas de café torrado e moído foram preparadas por percolação com o uso de filtro de papel (Whatman n° 4) utilizando a proporção de 5 g de café torrado e moído para 50 mL de água ultrapura ($T = 92,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$). As bebidas de café solúvel foram preparadas dissolvendo 0,2 g de café com água ultrapura em balão volumétrico de 10 mL. Cada bebida de café foi preparada uma vez e após o preparo foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

O extrato seco (ES) foi determinado através da secagem de 5 mL da bebida em estufa até peso constante (16 h a 70°C) (AOAC, 2000). A determinação do extrato seco foi realizada em triplicata. O extrato seco das bebidas de café foi utilizado nos cálculos da capacidade de desativar as ERO e ERN.

2.3 Capacidade redutora

A capacidade redutora das bebidas de café foi determinada através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), o qual foi adaptado para análise em leitor de microplacas (Synergy Mx, Bio-Tek, Winooski, VT, USA). A mistura reacional continha os seguintes reagentes (volume final de 300 μL): 3 concentrações de bebidas de café (22-84 $\mu\text{g/mL}$ em água ultrapura) ou de padrões [ácido cafeico e ácido *p*-cumárico foram dissolvidos em metanol e diluídos em água ultrapura, os demais padrões (ácido 5-cafeoilquínico, trigonelina, 5-hidroximetilfurfural, cafeína e teofilina) foram dissolvidos e diluídos em água ultrapura], reagente de Folin-Ciocalteu (8,3%, *v/v*) e solução de carbonato de sódio (2,3%, *m/v*). O sinal de absorvância foi monitorado a 765 nm por 120

min (25°C). A quantificação foi realizada através de uma curva analítica do ácido gálico na faixa de 2-12,5 µg/mL e os resultados foram expressos em miligrama de equivalente ao ácido gálico por grama de extrato seco da bebida de café (mg EAG/g ES). O ácido ascórbico foi usado como controle positivo (721 ± 45 mg EAG/g).

2.4 Capacidade de desativar as ERO e ERN

Os ensaios foram realizados em um leitor de microplacas (Synergy Mx, Bio-Tek) equipado com termostato ajustado a 37°C e dois dispensadores para reagentes. Dois ensaios controle foram conduzidos em todas as microplacas, sendo um deles para verificar a interação entre a sonda e as bebidas de café, sem adição do gerador radicalar ou da espécie reativa, e no outro, um controle de qualidade analítico (controle positivo), adicionando um composto com capacidade antioxidante conhecida para desativar a espécie reativa específica. Não foi observada nenhuma interação entre a sonda e as bebidas de café, e durante os ensaios a variação nas respostas dos controles positivos foi menor que 15%. Cada ensaio correspondeu a três experimentos realizados em triplicata. Os resultados dos ensaios de desativação das ERO e ERN avaliadas, com exceção do ROO•, foram expressos como valores de IC₅₀, expressos como µg do extrato seco da bebida de café por mL (µg/mL) e calculados através de análise de regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 5.03.

2.4.1 Capacidade de desativar o radical peroxila

A capacidade de desativar o ROO• foi medida pelo monitoramento do efeito das bebidas de café no decaimento da fluorescência, devido à oxidação da fluoresceína induzida pelo ROO• (Ou, Hampsch-Woodill & Prior, 2001). O ROO• foi gerado por decomposição térmica do AAPH. A mistura reacional continha os seguintes reagentes dissolvidos em tampão fosfato 75 mM (pH 7,4) nas concentrações finais indicadas (volume final de 200 µL): fluoresceína (61 nM), 3 concentrações de bebidas de café (0,7-5,0 µg/mL) ou de padrões (ácido cafeico e ácido *p*-cumárico foram dissolvidos em acetona:água (50:50, v/v) e diluídos em tampão fosfato, os demais padrões foram dissolvidos em água ultrapura e diluídos em tampão fosfato) e AAPH (19 mM). A mistura foi pré-incubada no leitor de microplacas durante 10 min antes da adição do AAPH. O sinal de fluorescência (excitação

a 485 ± 20 nm e emissão a 528 ± 20 nm) foi monitorado a cada minuto até atingir 0,5% da fluorescência inicial. A quantificação foi realizada através de uma curva analítica de trolox na faixa de 1-12 μM e os resultados estão expressos em μmol de equivalente ao trolox por grama de extrato seco da bebida de café ($\mu\text{M ET/g ES}$). A quercetina foi usada como controle positivo ($28032 \pm 2025 \mu\text{M ET/g}$).

2.4.2 Capacidade de desativar o peróxido de hidrogênio

A capacidade de desativar o H_2O_2 foi medida pelo monitoramento da oxidação da lucigenina induzida pelo H_2O_2 (Rodrigues et al., 2012). A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 300 μL): tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), solução de lucigenina (0,8 mM) em tampão Tris-HCl, 5 concentrações de bebidas de café (50-4000 $\mu\text{g/mL}$ em tampão Tris-HCl) ou de padrões (ácido cafeico e ácido *p*-cumárico foram dissolvidos e diluídos em DMSO, os demais padrões foram dissolvidos em água ultrapura e diluídos em tampão Tris-HCl) e H_2O_2 1% (*v/v*). O sinal de quimiluminescência foi medido após 5 min de incubação. O ácido ascórbico foi usado como controle positivo ($\text{IC}_{50} = 155 \pm 18 \mu\text{g/mL}$).

2.4.3 Capacidade de desativar o radical hidroxila

A capacidade de desativar o HO^\bullet foi medida pelo monitoramento da oxidação do luminol induzida pelo HO^\bullet (Rodrigues et al., 2012). O HO^\bullet foi gerado pela reação de Fenton (FeCl_2 -EDTA- H_2O_2). A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 250 μL): tampão carbonato 0,5 M (pH 10), 5 concentrações de bebidas de café (0,8-16 $\mu\text{g/mL}$) ou de padrões em água ultrapura, solução de luminol (20 μM) em tampão carbonato, FeCl_2 -EDTA (25 μM , 100 μM) em água ultrapura e H_2O_2 (3,5 mM). O sinal de quimiluminescência foi medido após 5 min de incubação. O ácido gálico foi usado como controle positivo ($\text{IC}_{50} = 0,16 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$).

2.4.4 Capacidade de desativar o ácido hipocloroso

A capacidade de desativar o HOCl foi medida pelo monitoramento da oxidação da DHR para a rodamina 123 induzida pelo HOCl (Rodrigues et al., 2012). O HOCl foi preparado através do ajuste do pH de uma solução de NaOCl 1% (*m/v*) até 6,2 com H_2SO_4

10% (v/v). A concentração do HOCl foi determinada espectrofotometricamente a 235 nm usando o coeficiente de absorvidade molar de $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e as demais diluições foram feitas em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4). A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 300 μL): tampão fosfato 100 mM (pH 7,4), 5 concentrações de bebidas de café (0,9-34 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato) ou de padrões (ácido cafeico e ácido *p*-cumárico foram dissolvidos e diluídos em etanol, os demais padrões foram dissolvidos em água ultrapura e diluídos em tampão fosfato), DHR (5 μM) e HOCl (5 μM) dissolvidos em tampão fosfato. O sinal de fluorescência (excitação a $485 \pm 20 \text{ nm}$ e emissão a $528 \pm 20 \text{ nm}$) foi medido imediatamente após a adição do HOCl. A cisteína foi usada como controle positivo ($\text{IC}_{50} = 66,46 \pm 6,37 \mu\text{g/mL}$).

2.4.5 Capacidade de desativar o óxido nítrico

A capacidade de desativar o NO^\bullet foi medida pelo monitoramento da oxidação da 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) para a triazolofluoresceína induzida pelo NO^\bullet (Gomes et al., 2007). O NO^\bullet foi gerado pela termodecomposição do NOC-5. A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 300 μL): DAF-2 (5 μM) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4), 5 concentrações de bebidas de café (0,9-27 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato) ou de padrões (ácido cafeico e ácido *p*-cumárico foram dissolvidos e diluídos em DMSO, os demais padrões foram dissolvidos em água ultrapura e diluídos em tampão fosfato) e NOC-5 (60 μM) dissolvido em tampão fosfato. O sinal de fluorescência (excitação a $485 \pm 20 \text{ nm}$ e emissão a $528 \pm 20 \text{ nm}$) foi medido após 30 min de incubação. A rutina foi usada como controle positivo ($\text{IC}_{50} = 0,78 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$).

2.4.6 Capacidade de desativar o peroxinitrito

A capacidade de desativar o ONOO^- foi medida pelo monitoramento da oxidação da DHR para a rodamina 123 induzida pelo ONOO^- (Rodrigues et al., 2012). O ONOO^- foi sintetizado como previamente descrito por Gomes et al. (2007). A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 300 μL): DHR (5 μM) em tampão fosfato (90 mM NaCl, 50 mM Na_3PO_4 , 5 mM KCl, pH 7,4), 5 concentrações de bebidas de café (0,2-27 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato) ou de padrões (ácido cafeico e ácido *p*-cumárico foram dissolvidos e diluídos em DMSO, os demais padrões

foram dissolvidos em água ultrapura e diluídos em tampão) e ONOO⁻ (600 nM). O sinal de fluorescência (excitação a 485 ± 20 nm e emissão a 528 ± 20 nm) foi medido após 5 min de incubação. Paralelamente foi realizado um ensaio na presença de NaHCO₃ 25 mM com a finalidade de simular a concentração de CO₂ fisiológica. O trolox foi usado como controle positivo (IC₅₀= $0,20 \pm 0,005$ µg/mL e $0,20 \pm 0,01$ µg/mL na ausência e presença de NaHCO₃, respectivamente).

2.5 Análise estatística

Os resultados da capacidade redutora e da capacidade das bebidas de café de desativarem as ERO e ERN foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando o software Origin[®] 8. A análise de correlação entre os ensaios foi estimada pelos coeficientes de correlação de Pearson que foram calculados utilizando o software Statistica 6.0. A similaridade das bebidas de café quanto à capacidade redutora e capacidade de desativar as ERO e ERN foi determinada utilizando a análise de agrupamento hierárquico empregando média não ponderada e a distância Euclidiana como índice de similaridade. A análise de componentes principais foi aplicada para caracterização das bebidas de café considerando a capacidade redutora e a capacidade de desativar as ERO e ERN e o conteúdo de compostos biativos utilizando o software Statistica 6.0. A capacidade redutora e a capacidade de desativar as ERO e ERN foram utilizadas como variáveis ativas. Os teores de ácidos clorogênicos (soma do ácido cafeoilquínico, ácido feruloilquínico, ácido *p*-cumaroilquínico, ácido dicafeoilquínico e ácido cafeoilferuloilquínico), lactonas de ácidos clorogênicos (soma das lactonas do ácido cafeoilquínico e lactonas do ácido feruloilquínico), conjugados de cinamoil-aminoácido (soma do cafeoiltriptofano e do *p*-cumaroiltriptofano), ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, trigonelina, ácido nicotínico, 5-hidroximetilfurfural, teobromina, teofilina, cafeína e o conteúdo de compostos escuros foram utilizados como variáveis suplementares na derivatização das componentes principais, sendo projetadas no mesmo espaço. Os teores destes compostos nas 14 bebidas de café avaliadas neste trabalho foram determinados anteriormente por Poerner-Rodrigues & Bragagnolo (2012).

3 Resultados e discussão

Ao longo do texto foram utilizadas duas abordagens para apresentar e discutir a capacidade das bebidas de café de desativarem as ERO e ERN. Na primeira abordagem, o objetivo foi comparar a capacidade média das bebidas de café de desativarem as ERO/ERN com aquela apresentada por frutas e extratos de plantas de reconhecida capacidade antioxidante e também com padrões analíticos dos principais compostos bioativos presentes nas bebidas de café (ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido 5-cafeoilquínico, trigonelina, 5-hidroxiacetilfurfural, cafeína e teofilina). Na segunda abordagem, discute-se a correlação, determinada por análise multivariada, entre a capacidade das bebidas de café de desativarem as ERO e ERN e o conteúdo de compostos bioativos.

3.1 Capacidade redutora e capacidade de desativar ERO e ERN

Este é o primeiro relato sobre a capacidade antioxidante de bebidas de café torrado e moído e de café solúvel frente às principais espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) produzidas em sistemas biológicos (**Tabelas 1 e 2**). As bebidas de café foram capazes de desativar todas as ERO (ROO^\bullet , HO^\bullet , H_2O_2 e HOCl) e as ERN (NO^\bullet e ONOO^-), sempre com uma relação dose-dependente e com IC_{50} na ordem de $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 1**).

A capacidade redutora foi determinada com o objetivo de estimar a capacidade dos compostos bioativos presentes nas bebidas de café de doarem elétrons. O conhecimento desta capacidade é importante, visto que algumas ERO e ERN podem ser desativadas após receberem um ou mais elétrons. A capacidade redutora das bebidas de café variou entre 109 e 145 mg EAG/g ES, apresentando capacidade redutora superior a de frutas ricas em ácidos clorogênicos (valores transformados em base seca): pera (13 mg EAG/g), maçã (24 mg EAG/g), ameixa (40 mg EAG/g) e mirtilo (72 mg EAG/g) (Wu et al., 2004). Em relação aos padrões, a capacidade redutora das bebidas de café foi em média 20 vezes superior a do 5-hidroxiacetilfurfural, cafeína e teofilina (**Tabela 1**). Por outro lado, a capacidade redutora das bebidas de café foi em média 5 vezes menor do que a do ácido ascórbico (controle positivo) e a do ácido 5-cafeoilquínico e, em média 8 vezes menor do que a do ácido cafeico e a do ácido *p*-cumárico.

O ROO[•] é um forte agente oxidante que desempenha papel importante na reação em cadeia da oxidação lipídica, a qual tem sido relacionada ao desenvolvimento de aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (Laguerre, Lecomte & Villeneuve, 2007). A capacidade das bebidas de café de desativarem o ROO[•] variou entre 2523 e 3673 μM ET/g ES (**Tabela 1**), sendo esta capacidade maior do que a da pera (110 μM ET/g), maçã (292 μM ET/g), ameixa (603 μM ET/g), mirtilo (837 μM ET/g) (Wu et al., 2004) e folhas de chá preto (1629 μM ET/g) (Ou, Hampsch-Woodill & Prior, 2001). Além disso, as bebidas de café foram mais eficientes em desativar o ROO[•] do que o 5-hidroximetilfurfural e a cafeína. Entretanto, as bebidas de café apresentaram uma eficiência em desativar o ROO[•] em média 10 vezes inferior a da quercetina (controle positivo), do ácido cafeico e do ácido *p*-cumárico, e cerca de 4 vezes inferior a do ácido 5-cafeoilquínico.

O H₂O₂ é uma das ERO que pode atuar como agente oxidante ou como agente redutor. Embora sua reatividade seja fraca, este pode ser citotóxico em elevadas concentrações. Esta ERO apresenta facilidade de difusão dentro e entre células e pode ser transformada em produtos altamente deletérios e reativos, como o HO[•], gerado através da reação de Fenton, e o HOCl, formado pela ação da enzima mieloperoxidase (Halliwell, 1995; Winterbourn, 2008). A capacidade das bebidas de café de desativarem o H₂O₂ variou entre 336 e 531 μg/mL (IC₅₀) (**Tabela 1**), sendo mais eficazes em desativar o H₂O₂ do que extratos de piquiá (*Caryocar villosum*) (1000 μg/mL redução de 4-23% da oxidação) (Chisté et al., 2012), ramos e folhas de androseno (*Hypericum androsaemum*) (IC₅₀= 944 μg/mL) (Almeida et al., 2009a); apresentaram capacidade semelhante aos extratos de maná-cubiu (*Solanum sessiflorum*) (IC₅₀= 305 μg/mL) (Rodrigues, Mariutti, & Mercadante, 2013), de folhas de carvalho (*Quercus robur*) (IC₅₀= 251 μg/mL) (Almeida et al., 2008b), noqueira-comum (*Juglans regia*) (IC₅₀= 383 μg/mL) (Almeida et al., 2008a), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (IC₅₀= 389 μg/mL) (Almeida et al., 2009b) e castanheira (*Castanea sativa*) (IC₅₀= 410 μg/mL) (Almeida et al., 2008b). Em relação aos padrões, a eficiência das bebidas de café de desativarem o H₂O₂ foi semelhante a do ácido 5-cafeoilquínico e maior do que a do 5-hidroximetilfurfural, porém apresentaram eficiência em desativar o H₂O₂ em média 3 vezes menor do que a do ácido ascórbico (controle positivo), do ácido cafeico, do ácido *p*-cumárico e da trigonelina.

Tabela 1. Capacidade redutora e capacidade de bebidas de café e de padrões analíticos de desativarem o radical peroxila (ROO[•]), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical hidroxila (HO[•]) e o ácido hipocloroso (HOCl).

Bebidas de café/ padrões	Capacidade redutora ^A	ROO ^{•B}	IC ₅₀ ^C (µg/mL)		
			H ₂ O ₂	HO [•]	HOCl
<i>Café torrado e moído</i>					
RR1	110 ± 4 ^{fg}	2655 ± 113 ^{ef}	531 ± 19 ^f	3,63 ± 0,17 ^{efg}	9,51 ± 1,06 ^{de}
RR2	122 ± 6 ^c	2816 ± 290 ^{def}	455 ± 24 ^{cde}	2,86 ± 0,12 ^{bc}	8,70 ± 0,62 ^{cde}
RR3	124 ± 6 ^{de}	2684 ± 230 ^{ef}	432 ± 21 ^{bcd}	2,97 ± 0,15 ^{bcd}	7,49 ± 0,37 ^{bc}
RR6	145 ± 8 ^a	3372 ± 219 ^{ab}	480 ± 35 ^{cdef}	2,24 ± 0,11 ^a	9,02 ± 0,27 ^{cde}
RR7	144 ± 6 ^{ab}	3197 ± 229 ^b	454 ± 21 ^{cde}	2,55 ± 0,22 ^{ab}	8,83 ± 0,33 ^{cde}
RR8	132 ± 10 ^{cd}	3154 ± 234 ^{bcd}	493 ± 28 ^{def}	2,58 ± 0,13 ^{ab}	11,13 ± 0,66 ^f
RR9	124 ± 4 ^{de}	3172 ± 427 ^{cdef}	512 ± 10 ^{ef}	2,95 ± 0,13 ^{bcd}	11,20 ± 0,73 ^f
DR4	140 ± 6 ^{abc}	3673 ± 238 ^a	422 ± 13 ^{bc}	2,88 ± 0,09 ^{bc}	7,95 ± 0,36 ^{bcd}
DR5	138 ± 5 ^{abc}	3163 ± 146 ^{bc}	491 ± 14 ^{def}	3,17 ± 0,21 ^{cde}	10,36 ± 0,46 ^{ef}
DR10	135 ± 5 ^{bc}	3404 ± 195 ^{ab}	428 ± 20 ^{bc}	3,45 ± 0,03 ^{def}	9,51 ± 0,80 ^{de}
<i>Café solúvel</i>					
RS51	118 ± 4 ^{ef}	2637 ± 184 ^f	336 ± 9 ^a	3,58 ± 0,27 ^{efg}	8,37 ± 0,29 ^{bcd}
RS54	117 ± 4 ^{efg}	2523 ± 213 ^f	375 ± 7 ^{ab}	3,75 ± 0,14 ^{fg}	9,48 ± 0,48 ^{de}
DS52	112 ± 4 ^{fg}	2729 ± 182 ^{ef}	491 ± 28 ^{def}	4,04 ± 0,22 ^{gh}	6,90 ± 0,19 ^b
DS53	109 ± 5 ^g	3028 ± 177 ^{bcd}	480 ± 21 ^{cdef}	4,38 ± 0,23 ^h	5,12 ± 0,44 ^a
<i>Média das bebidas^E</i>	126 ± 13 (19%)	2985 ± 375 (13%)	456 ± 55 (12%)	3,20 ± 0,62 (19%)	8,80 ± 1,73 (20%)
<i>Padrões analíticos</i>					
Ácido cafeico	1121 ± 54	30593 ± 1872	138 ± 8	0,31 ± 0,01	17,69 ± 0,72
Ácido <i>p</i> -cumárico	1009 ± 58	33027 ± 2319	137 ± 3	0,20 ± 0,003	74,25 ± 1,44
Ácido 5-cafeoilquínico	557 ± 38	12131 ± 347	457 ± 43	0,54 ± 0,004	70,91 ± 1,85
Trigonelina	NA ^{D(417 µg/mL)}	NA ^(625 µg/mL)	185 ± 6	500 ^{(12%)*}	NA ^(833 µg/mL)
5-hidroximetilfurfural	7,53 ± 0,16	118 ± 11	1018 ^{(42%)*}	506 ^{(30%)*}	497 ± 19
Cafeína	5,23 ± 0,13	6,83 ± 0,60	NA ^(1004 µg/mL)	502 ^{(12%)*}	837 ^{(29%)*}
Teofilina	6,70 ± 0,05	NA ^(628 µg/mL)	NA ^(1104 µg/mL)	NA ^(502 µg/mL)	920 ^{(29%)*}

^A mg equivalente ao ácido gálico/g extrato seco da bebida de café ou g de padrão (média das triplicatas ± desvio padrão).

^B µmol equivalente ao trolox/g extrato seco da bebida de café ou g de padrão (média das triplicatas ± desvio padrão).

^C IC₅₀= concentração inibitória, *in vitro*, necessária para reduzir em 50% o efeito oxidativo das espécies reativas no meio reacional testado (média das triplicatas ± desvio-padrão). Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes (*p*<0,05). ^D NA= nenhuma atividade foi encontrada na máxima concentração avaliada (sobrescrito). ^E Média das bebidas de café ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %). RR: café torrado e moído regular; DR: café torrado e moído descafeinado; RS: café solúvel regular; DS: café solúvel descafeinado.

* Capacidade desativadora (sobrescrito) na máxima concentração (µg/mL) avaliada.

Tabela 2. Capacidade de bebidas de café e de padrões analíticos de desativarem o óxido nítrico (NO•) e o ânion peroxinitrito (ONOO⁻).

Bebidas de café/ Padrões	IC ₅₀ ^A (µg/mL)		
	NO•	ONOO ⁻	
		Ausência de NaHCO ₃	Presença de NaHCO ₃ 25 mM
Café torrado e moído			
RR1	5,67 ± 0,16 ⁱ	2,57 ± 0,21 ^e	2,83 ± 0,27 ^e
RR2	4,47 ± 0,23 ^{fg}	2,88 ± 0,10 ^e	3,14 ± 0,06 ^e
RR3	4,31 ± 0,10 ^{efg}	2,07 ± 0,16 ^{cd}	1,85 ± 0,06 ^{bcd}
RR6	3,07 ± 0,15 ^a	1,68 ± 0,13 ^{abc}	1,61 ± 0,09 ^b
RR7	3,76 ± 0,15 ^{bcde}	1,58 ± 0,09 ^{ab}	1,59 ± 0,13 ^b
RR8	4,12 ± 0,17 ^{def}	1,41 ± 0,17 ^{ab}	1,50 ± 0,07 ^b
RR9	3,36 ± 0,12 ^{abc}	1,29 ± 0,09 ^a	1,56 ± 0,20 ^b
DR4	3,92 ± 0,22 ^{cdef}	1,61 ± 0,11 ^{ab}	1,66 ± 0,10 ^b
DR5	3,35 ± 0,21 ^{abc}	1,79 ± 0,32 ^{bcd}	0,83 ± 0,04 ^a
DR10	3,22 ± 0,15 ^{ab}	1,80 ± 0,12 ^{bcd}	1,75 ± 0,09 ^{bc}
Café solúvel			
RS51	4,93 ± 0,25 ^{gh}	2,15 ± 0,15 ^d	1,86 ± 0,10 ^{bcd}
RS54	5,15 ± 0,31 ^{hi}	1,84 ± 0,03 ^{bcd}	2,19 ± 0,11 ^d
DS52	3,96 ± 0,21 ^{def}	1,81 ± 0,03 ^{bcd}	1,75 ± 0,10 ^{bc}
DS53	3,64 ± 0,12 ^{abcd}	1,49 ± 0,14 ^{ab}	2,06 ± 0,11 ^{cd}
Média das bebidas^C	4,01 ± 0,75 (19%)	1,92 ± 0,49 (26%)	1,84 ± 0,50 (27%)
Padrões analíticos			
Ácido cafeico	0,49 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,48 ± 0,01
Ácido <i>p</i> -cumárico	4,71 ± 0,54	0,75 ± 0,01	1,12 ± 0,05
Ácido 5-cafeoilquínico	7,22 ± 0,26	0,35 ± 0,002	0,46 ± 0,01
Trigonelina	NA ^B	NA	NA
5-hidroximetilfurfural	368 ± 27	365 ± 5	485 ± 32
Cafeína	NA	837 ^{(42%)*}	833 ^{(49%)*}
Teofilina	NA	NA	NA

^A concentração inibitória, *in vitro*, para reduzir em 50% o efeito oxidativo das espécies reativas no meio reacional testado (média das triplicatas ± desvio-padrão). Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). ^B NA= nenhuma atividade foi encontrada na máxima concentração avaliada (833 µg/ml). ^C Média das bebidas de café ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %). RR: café torrado e moído regular; DR: café torrado e moído descafeinado; RS: café solúvel regular; DS: café solúvel descafeinado.

* Capacidade desativadora (sobrescrito) na máxima concentração (µg/mL) avaliada.

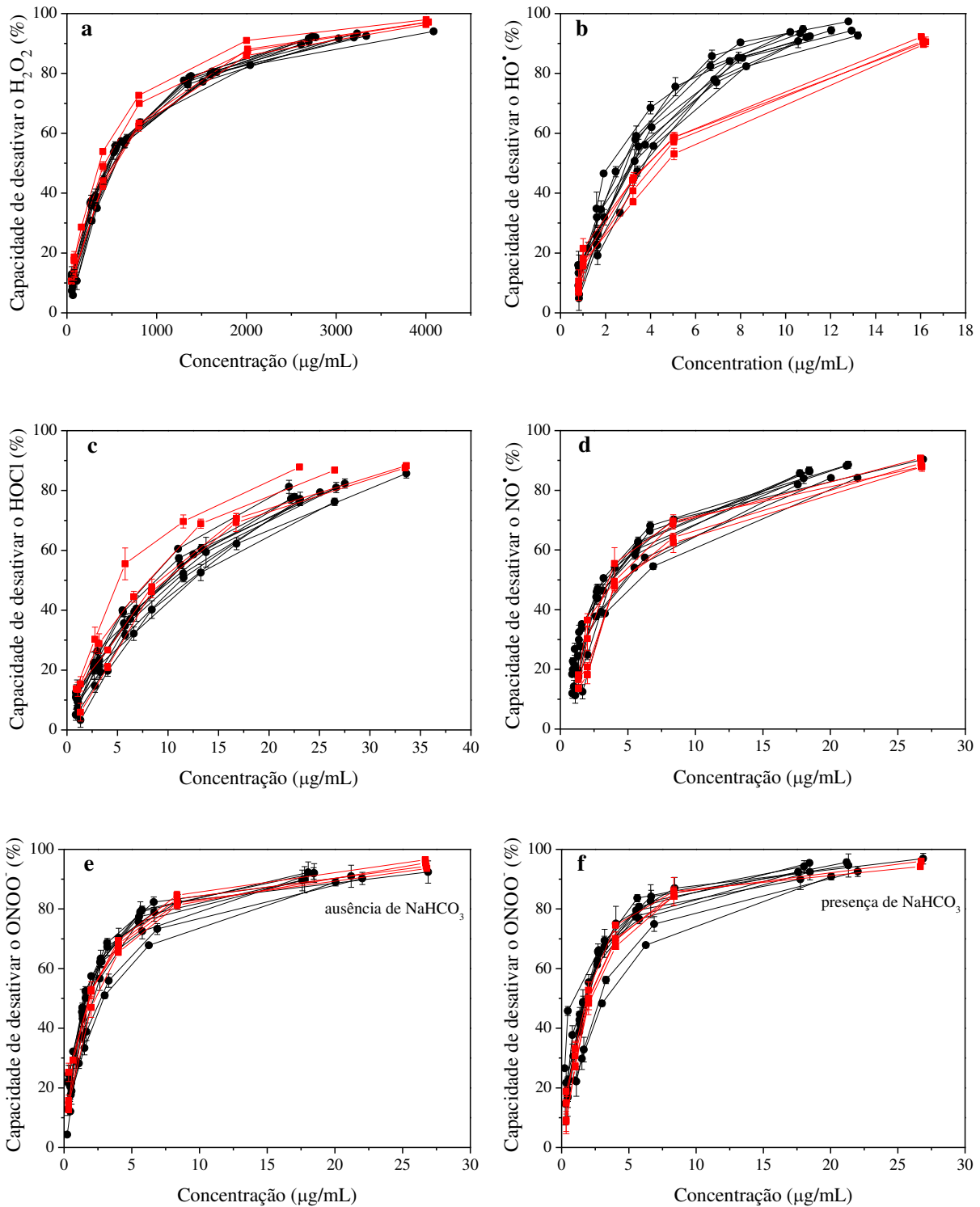


Figura 1. Capacidade das bebidas de café desativarem (a) peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (b) radical hidroxila (HO^\bullet), (c) ácido hipocloroso (HOCl), (d) óxido nítrico (NO^\bullet), (e) ânion peroxinitrito (ONOO^-) na ausência de NaHCO_3 e (f) ONOO^- na presença de NaHCO_3 . Legenda: café torrado e moído (círculo preto); café solúvel (quadrado vermelho).

Muitos dos danos *in vivo* causados pelo $O_2^{\bullet-}$ e pelo H_2O_2 são devidos à conversão destes em espécies mais reativas, sendo, provavelmente, o HO^{\bullet} a mais importante. O HO^{\bullet} apresenta um potencial de redução muito alto, o que lhe confere alta reatividade e, quando produzido *in vivo* reage próximo ao sítio de sua formação provocando danos nas biomoléculas (Halliwell, 1995). Este radical pode iniciar a oxidação lipídica devido a sua alta capacidade de abstrair um hidrogênio alílico à ligação dupla de lipídios insaturados (Choe & Min, 2006). A capacidade das bebidas de café de desativarem o HO^{\bullet} variou entre 2,24 e 4,38 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) (**Tabela 1**). Estes valores foram superiores ao do extrato de maná-cubiu ($IC_{50}= 36 \mu\text{g/mL}$) (Rodrigues et al., 2013). As bebidas de café também foram mais efetivas em desativar o HO^{\bullet} do que a trigonelina, o 5-hidroximetilfurfural e a cafeína. Porém, a eficiência das bebidas de café de desativarem o HO^{\bullet} foi em média 11 vezes menor do que a do ácido gálico (controle positivo), ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico.

O HOCl é um componente chave da resposta inflamatória atuando como agente antimicrobiano devido ao seu poder oxidante. No entanto, o mesmo mecanismo utilizado para destruir os patógenos invasores pode causar danos no tecido do hospedeiro e, por isso, o HOCl tem sido relacionado com diversas condições patológicas, incluindo doenças inflamatórias (Pennathur et al., 2010; Pattison et al., 2009). A capacidade das bebidas de café de desativarem o HOCl variou entre 5,12 e 11,20 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) (**Tabela 1**), sendo esta capacidade superior a do extrato de maná-cubiu ($IC_{50}= 13 \mu\text{g/mL}$) (Rodrigues et al., 2013). Em relação aos padrões, a capacidade das bebidas de café desativarem esta ERO foi em média 8 vezes maior do que a da cisteína (controle positivo), do ácido *p*-cumárico e do ácido 5-cafeoilquínico, e cerca de 2 vezes maior do que a do ácido cafeico. As bebidas de café também foram mais eficientes em desativar o HOCl do que o 5-hidroximetilfurfural, a cafeína e a teofilina.

O NO^{\bullet} é um radical abundante que atua como uma importante molécula biológica de sinalização celular (Valko et al., 2007). Por outro lado, a superprodução de NO^{\bullet} está envolvida em certas condições patológicas, inflamação e várias desordens degenerativas como, isquemia cerebral e doenças de Alzheimer e de Parkinson (Gomes et al., 2006). As bebidas de café apresentaram capacidade de desativar o NO^{\bullet} entre 3,07 e 5,67 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) (**Tabela 2**), sendo esta capacidade semelhante à de extratos de folhas de castanheira

(3,10 $\mu\text{g/mL}$), carvalho (3,13 $\mu\text{g/mL}$) (Almeida et al., 2008b), eucalipto (3,36 $\mu\text{g/mL}$) (Almeida et al., 2009b) e extrato aquoso de piquiá (4,8 $\mu\text{g/mL}$) (Chisté et al., 2012) e menor do que a de extratos de folhas de nogueira-comum (1,95 $\mu\text{g/mL}$) (Almeida et al., 2008a) e de ramos e folhas de androseno (2,2 $\mu\text{g/mL}$) (Almeida et al., 2009a). Além disso, as bebidas de café foram mais eficientes em desativar o NO^\bullet do que o ácido *p*-cumárico, o ácido 5-cafeoilquínico e o 5-hidroximetilfurfural, porém foram em média 6 vezes menos eficientes do que a rutina (controle positivo) e o ácido cafeico.

Em muitas condições patológicas (incluindo inflamações, septicemia e isquemia/reperfusão) pode ocorrer a produção simultânea do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e do NO^\bullet , levando potencialmente à formação de uma molécula mais reativa, o ONOO^- (Valko et al., 2007). As bebidas de café (IC_{50} entre 1,29 e 2,88 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram capacidade de desativar o ONOO^- (ausência de NaHCO_3) (**Tabela 2**) semelhante a de extratos de folhas de carvalho (0,95 $\mu\text{g/mL}$) (Almeida et al., 2008b), androseno (1,2 $\mu\text{g/mL}$) (Almeida et al., 2009a), eucalipto (1,27 $\mu\text{g/mL}$) (Almeida et al., 2009b), castanheira (1,49 $\mu\text{g/mL}$) (Almeida et al., 2008b) e nogueira-comum (1,66 $\mu\text{g/mL}$) (Almeida et al., 2008a) e maior capacidade do que a de extrato aquoso de piquiá (17,0 $\mu\text{g/mL}$) (Chisté et al., 2012) e de maná-cubiu (27 $\mu\text{g/mL}$) (Rodrigues et al., 2013). Em relação aos padrões, as bebidas de café foram mais eficientes em desativar o ONOO^- do que o 5-hidroximetilfurfural e a cafeína. Entretanto, as bebidas de café foram menos eficientes em desativar o ONOO^- do que o trolox (controle positivo), o ácido cafeico, o ácido *p*-cumárico e o ácido 5-cafeoilquínico.

A capacidade das bebidas de café de desativarem o ONOO^- também foi avaliada na presença de NaHCO_3 com o objetivo de simular as concentrações fisiológicas de CO_2 . Nesta condição o CO_2 pode modular a reatividade do ONOO^- devido à rápida reação entre estes dois compostos gerando o dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) e o radical ânion carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), que são os principais radicais responsáveis pelas reações de oxidação e nitração observadas *in vivo* (Squadrito & Pryor, 1998). Em geral, as bebidas de café mantiveram o seu valor de IC_{50} (**Tabela 2**) no ensaio realizado na presença de NaHCO_3 , indicando que as bebidas de café também são efetivas em desativar o NO_2^\bullet e $\text{CO}_3^{\bullet-}$.

Em resumo, as bebidas de café foram mais eficientes em desativar as ERO e as ERN do que os padrões de trigonelina, 5-hidroximetilfurfural, cafeína e teofilina. Além disso, as bebidas de café apresentaram uma potente capacidade de desativar o HOCl .

3.2 Correlação entre a capacidade redutora e a capacidade de desativar as ERO e ERN e o conteúdo de compostos bioativos

A análise de agrupamento hierárquico (**Figura 2**) e a análise de componentes principais (**Figura 3c**), considerando a capacidade redutora e a capacidade das bebidas de café de desativarem ERO e ERN, mostrou a formação de 3 grupos. O primeiro grupo foi formado por 7 bebidas de café torrado e moído (regulares e descafeinadas); o segundo grupo por 2 bebidas de café solúvel (descafeinadas) e o terceiro grupo por bebidas de café regulares (3 de café torrado e moído e 2 de café solúvel).

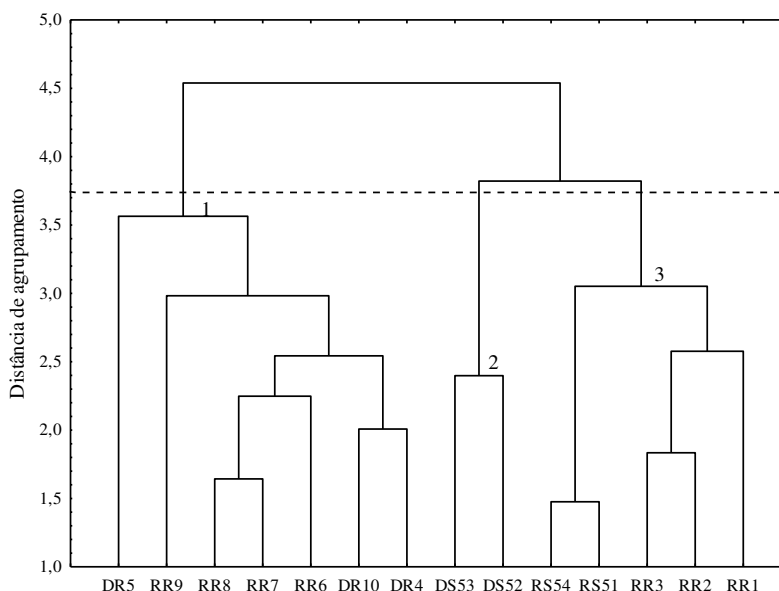


Figura 2. Dendrograma obtido na análise de agrupamento hierárquico usando a capacidade redutora e a capacidade das bebidas de café de desativarem as ERO e ERN. Legenda: RR: café torrado e moído regular; DR: café torrado e moído descafeinado; RS: café solúvel regular; DS: café solúvel descafeinado.

As bebidas de café pertencentes ao primeiro grupo (torrado e moído regulares e descafeinadas) apresentaram elevada capacidade redutora e capacidade de desativar o ROO^\bullet , o HO^\bullet , o NO^\bullet e o ONOO^- sendo esta capacidade correlacionada positivamente com os teores de ácidos clorogênicos (CGA), lactonas de ácidos clorogênicos (CGL) e ácido *p*-cumárico (CoA) (**Figuras 3a e 3b**). Dentre estes compostos, destaca-se o ácido 5-cafeoilquínico que está em maior concentração nas bebidas de café, representando 33% (*m/m*) dos compostos fenólicos (Poerner-Rodrigues & Bragagnolo, 2012). Conforme é mostrado nas **Tabelas 1 e 2**, o padrão de ácido 5-cafeoilquínico foi especialmente eficiente em desativar o ROO^\bullet , o HO^\bullet , o NO^\bullet e o ONOO^- .

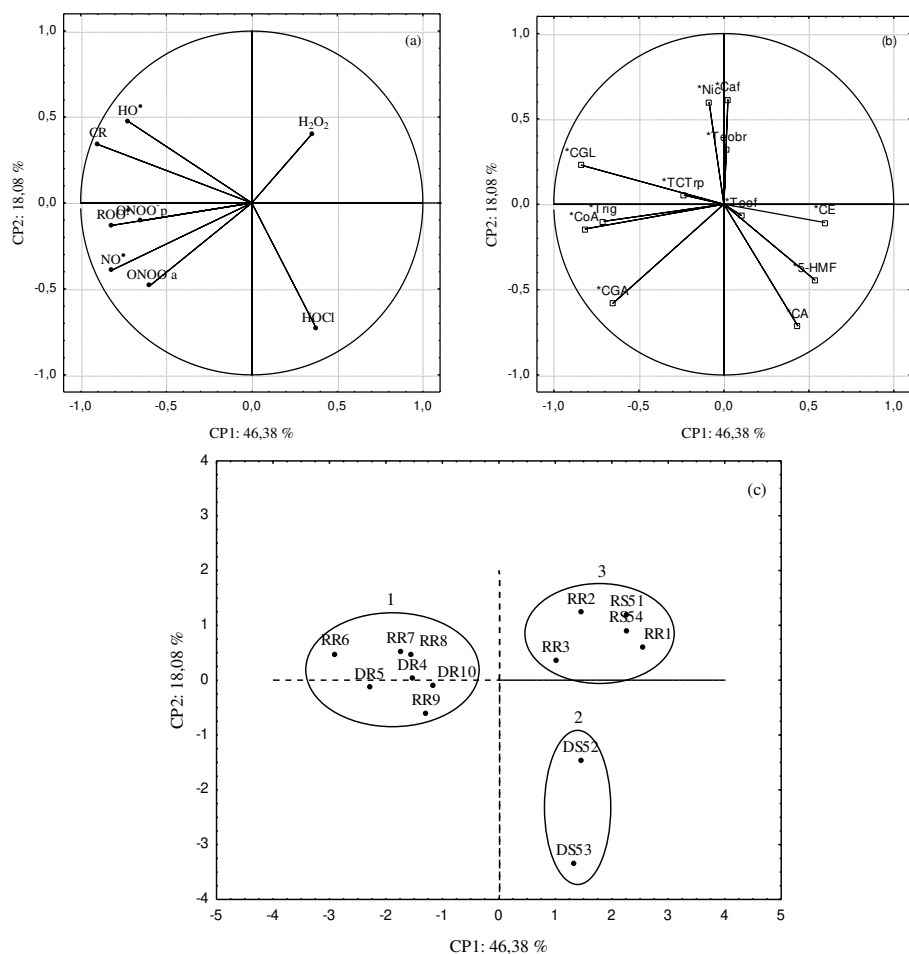
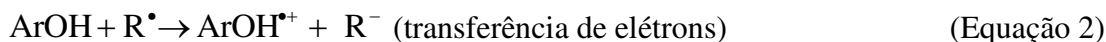
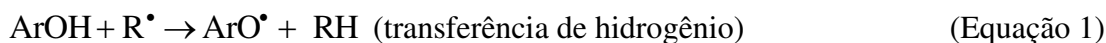


Figura 3. Análise de componentes principais da capacidade redutora e da capacidade das bebidas de café de desativarem as ERO e ERN: projeção das variáveis ativas (a), projeção das variáveis suplementares (b) e gráfico das bebidas de café (c). Legenda: CR: capacidade redutora; ROO[•]: radical peroxila; HO[•]: radical hidroxila; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HOCl: ácido hipocloroso; NO[•]: óxido nítrico; ONOO[•]a: peroxinitrito (ausência de NaHCO₃); ONOO[•]p: peroxinitrito (presença de NaHCO₃); CGA: ácidos clorogênicos; CGL: lactonas de ácidos clorogênicos, TCTrp: conjugados de cinamoil-aminoácido totais (soma de cafeoiltriptofano e *p*-cumaroiltriptofano); CA: ácido cafeico; CoA: ácido *p*-cumárico; Trig: trigonelina; Nic: ácido nicotínico; 5-HMF: 5-hidroximetilfurfural; Caf: cafeína; Teobr: teobromina; Teof: teofilina; CE: compostos escuros; RR: café torrado e moído regular; DR: café torrado e moído descafeinado; RS: café solúvel regular; DS: café solúvel descafeinado.

Foram relatados três mecanismos pelos quais os compostos fenólicos podem desativar o ROO[•] e o HO[•]: transferência de átomos de hidrogênio (Equação 1), transferência de elétrons (Equação 2) e adição à ligação dupla (Equação 3) (Horstman et al., 2002; Anouar et al., 2009). Apesar dos três mecanismos poderem ocorrer, os compostos fenólicos desativam o ROO[•] principalmente pela transferência de um átomo de hidrogênio do grupo hidroxila fenólico para o ROO[•], originando um radical do composto fenólico estabilizado por ressonância e um hidroperóxido (Ou, Hampsch-Woodill & Prior, 2001).



O ONOO⁻ pode ser desativado pelos compostos fenólicos através de dois mecanismos, dependendo das suas características estruturais. Os monofenóis atuam preferencialmente através da nitração e os catecóis através da doação de elétrons (Pannala et al., 1998). Os catecóis avaliados neste trabalho, ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico, apresentaram elevada correlação entre a capacidade redutora e a capacidade de desativar o ONOO⁻, indicando que os catecóis desativaram o ONOO⁻ através da doação de elétrons. Já o ácido *p*-cumárico (monofenolato) apresentou uma capacidade redutora semelhante a do ácido cafeico (catecol), porém foi 4,4 vezes menos eficiente em desativar o ONOO⁻ do que o ácido cafeico, sugerindo que o ácido *p*-cumárico desativa o ONOO⁻ preferencialmente através da nitração e que este mecanismo é menos eficiente quando comparado à doação de elétrons (**Tabelas 1 e 2**).

As bebidas de café pertencentes ao terceiro grupo (torrado e moído regulares e solúvel regulares) apresentaram elevada capacidade de desativar o H₂O₂, que foi correlacionada positivamente com os teores de compostos escuros (**Figura 3**), que são formados na reação de Maillard e na caramelização. Dentre estes compostos, as melanoidinas estão em maior concentração no café, constituindo até 25% do extrato seco da bebida de café (Borrelli et al., 2002). As melanoidinas são os produtos finais da reação de Maillard definidas como pigmentos escuros, nitrogenados e carregados negativamente. Embora, a estrutura química das melanoidinas do café seja em grande parte desconhecida devido a sua complexidade, sabe-se que estas apresentam grupos fenólicos na sua estrutura, como exemplo o ácido clorogênico, as galactomananas e as arabinogalactanas-proteínas (Bekedam et al., 2008). Assim, provavelmente a desativação do H₂O₂ pelas melanoidinas envolveu a transferência de dois elétrons (Winterbourn, 2008), o que é facilitado considerando a grande densidade eletrônica na estrutura das melanoidinas.

A elevada capacidade de desativar o HOCl das bebidas pertencentes ao segundo grupo (solúvel descafeinadas) foi correlacionada positivamente com os teores de ácido cafeico (CA), 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) e compostos escuros (BC) (**Figura 3**). Já foi

relatado que os compostos fenólicos são capazes de desativar o HOCl através da doação de dois elétrons, formando uma orto-quinona derivada do fenólico (Kono et al., 1995). O 5-hidroxiacetilfurfural provavelmente desativa o HOCl devido ao efeito doador de elétrons do oxigênio presente no anel furano, gerando um composto dicarbonila (Ohki et al., 1993). As melanoidinas presentes nas bebidas de café provavelmente desativam o HOCl através da doação de dois elétrons.

A elevada capacidade *in vitro* das bebidas de café de desativarem o HOCl, um oxidante ligado à oxidação do tecido em doenças inflamatórias, corrobora conclusões anteriores de estudos *in vivo* e epidemiológicos de que o café está associado com a redução de marcadores inflamatórios e na melhora da inflamação crônica. Esta redução na inflamação crônica pode resultar em menor prevalência de diversas doenças crônicas que tem algum grau de inflamação na sua formação, como diabetes, artrite, aterosclerose e câncer (Frost-Meyer & Logomarsino, 2012).

A análise de componentes principais (**Figura 3**) indica que a capacidade redutora e a capacidade das bebidas de café desativarem as ERO/ERN parecem ser mais influenciadas pelo processamento (processo de torra, produção do café solúvel) do que pela matéria-prima (espécie de café). Por exemplo, as bebidas de café torrado e moído situadas ao lado esquerdo da CPI (grupo 1), que sofreram provável processo de torra menos intenso (maior teor de compostos termolábeis, como trigonelina e lactonas de ácidos clorogênicos), apresentaram maior capacidade redutora e capacidade de desativar o ROO[•], o HO[•], o NO[•] e o ONOO⁻. Já as bebidas de café situadas à direita da CPI (grupos 2 e 3), que sofreram tratamento térmico adicional no processo de elaboração do café solúvel ou um processo de torra provavelmente mais intenso (maior conteúdo de compostos escuros), apresentaram maior capacidade de desativar o H₂O₂ e o HOCl. Portanto, observamos uma atuação diferente das bebidas de café frente às ERO/ERN de acordo com o processamento empregado.

A capacidade redutora das bebidas de café apresentou alta correlação positiva (correlação de Pearson) com a capacidade de desativar o ROO[•] ($r= 0,78$, $p<0,01$), o HO[•] ($r= 0,81$, $p<0,01$) e o NO[•] ($r= 0,61$, $p<0,05$) (**Tabela 3**), indicando que parte da desativação destas espécies reativas envolve o mecanismo de transferência de elétrons. Com exceção da correlação positiva significativa encontrada entre a capacidade de

desativar o NO^\bullet e o ROO^\bullet ($r=0,69, p<0,01$) e entre o NO^\bullet e o ONOO^- ($r=0,58, p<0,05$), os ensaios de capacidade de desativar ERO e ERN não apresentaram boa correlação entre si (**Tabela 3**), o que provavelmente está relacionado às diferentes propriedades químicas das espécies reativas. Estes resultados reforçam a ideia de que a capacidade antioxidante de uma determinada matriz deve ser avaliada frente a diferentes ERO e ERN para que se conheça o perfil completo da capacidade antioxidante.

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson dos ensaios de capacidade redutora e de capacidade de desativar ERO e ERN.

	CR	ROO^\bullet	H_2O_2	HO^\bullet	HOCl	NO^\bullet	ONOO^-_a
ROO^\bullet	0,78**						
H_2O_2	-0,05	-0,21					
HO^\bullet	0,81**	0,49	-0,20				
HOCl	-0,46	-0,06	0,04	-0,49			
NO^\bullet	0,61*	0,69**	-0,37	0,38	-0,01		
ONOO^-_a	0,31	0,43	-0,27	0,22	-0,01	0,58*	
ONOO^-_p	0,52	0,38	-0,18	0,20	-0,28	0,55*	0,39

* $p<0,05$. ** $p<0,01$. CR: capacidade redutora; ROO^\bullet : radical peroxila; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; HO^\bullet : radical hidroxila; HOCl: ácido hipocloroso; NO^\bullet : óxido nítrico; ONOO^-_a : peroxinitrito (ausência de NaHCO_3); ONOO^-_p : peroxinitrito (presença de NaHCO_3).

4 Conclusão

As bebidas de café são capazes de desativar o ROO^\bullet , o HO^\bullet , o H_2O_2 , o HOCl, o NO^\bullet , o ONOO^- , e possivelmente o NO_2^\bullet e o $\text{CO}_3^{\bullet-}$, sempre com uma relação dose-dependente. A capacidade das bebidas de café de desativarem o ROO^\bullet , o HO^\bullet , o NO^\bullet e o ONOO^- está relacionada principalmente aos teores de ácidos clorogênicos, enquanto que a capacidade das bebidas de café de desativarem o H_2O_2 e o HOCl está relacionada aos teores de compostos escuros formados durante a reação de Maillard.

Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que a capacidade antioxidante frente a espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio é um dos mecanismos que pode explicar a associação entre o consumo de bebidas de café e a redução do risco de desenvolvimento de algumas doenças crônico-degenerativas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq.

Referências

- Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Costa, P. C., & Bahia, M. F. (2008a). Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chemistry*, 106, 1014-1020.
- Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Costa, P. C., & Bahia, M. F. (2008b). Protective effect of *Castanea sativa* and *Quercus robur* leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 91, 87-95.
- Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Costa, P. C., & Bahia, M. F. (2009a). *In vitro* protective effect of *Hypericum androsaemum* extract against oxygen and nitrogen reactive species. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105, 222-227.
- Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Costa, P. C., Bahia, M. F. (2009b). Oxygen and nitrogen reactive species are effectively scavenged by *Eucalyptus globulus* leaf water extract. *Journal of Medicinal Food*, 12, 175-83.
- Alves, R. C.; Casal, S.; & Oliveira, M. B. P. P. (2009). Health benefits of coffee: myth or reality? *Química Nova*, 32, 2169-2180.
- Anouar, E., Kosinová, P., Kozłowski, D., Mokrini, R., Duroux, J. L., & Trouillas, P. (2009). New aspects of the antioxidant properties of phenolic acids: a combined theoretical and experimental approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11, 7659-7668.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 17th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, 2000.
- Bekedam, E. K., Loots, M. J., Schols, H. A., Van Boekel, M. A. J. S., & Smit, G. (2008). Roasting effects on formation mechanisms of coffee brew melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7138-7145.
- Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6527-6533.

- Cämmerer, B., & Kroh, L. W. (2006). Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, 223, 469-474.
- Casal, S., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A. (2000). HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry*, 68, 481-485.
- Chisté, R. C., Freitas, M., Mercadante, A. Z., & Fernandes, E. (2012). The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 135, 1740-1749.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 1-22.
- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 362-372.
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46, 488-495.
- Farah, A., De Paulis, T., Moreira, D. P., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2006). Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 374-381.
- Frost-Meyer, N. J., & Logomarsino, J. V. (2012). Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *Journal of Functional Foods*, 4, 819-830.
- Gomes, A., Costa, D., Lima, J. F. C., & Fernandes, E. (2006). Antioxidant activity of β -blockers: an effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species? *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 4568-4577.
- Gomes, A., Fernandes, E., Silva, A. M. S., Santos, C. M. M., Pinto, D. C. G. A., Cavaleiro, J. A. S., & Lima, J. L. F. C. (2007). 2-Styrylchromones: novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 6027-6036.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49, 1341-1348.
- Hoelzl, C., Knasmüller, S., Wagner, K., Elbling, L., Huber, W., Kager, N., Ferk., F., Ehrlich, V., Nersesyan, A., Neubauer, O., Desmarchelier, A., Marin-Kuan, M., Delatour, T., Verguet, C., Bezençon, C., Besson, A., Grathwohl, D., Simic, T., Kundi, M., Schilter, B., Cavin., C. (2010). Instant coffee with high chlorogenic acid levels

- protects humans against oxidative damage of macromolecules. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 1722-1733.
- Horstman, J. A., Wrona, M. Z., & Dryhurst, G. (2002). Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. *Bioorganic Chemistry*, 30, 371-382.
- Kono, Y., Shibata, H., Kodama, Y., Ueda, A., Sawa, Y. (1995). Chlorogenic acid as a natural scavenger for hypochlorous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217, 972-978.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- López-Galilea, I., De Peña, M. P., & Cid, C. (2008). Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. *European Food Research and Technology*, 227, 141-149.
- Ohki, T., Maeda, K., Sakakibara, J., Suzuki, E., & Yamanaka, N. (1993). Structural analysis of oxidation products of urofuran by hypochlorous acid. *Lipids*, 28, 35-41.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- Pannala, A. S., Razaq, R., Halliwell, B., Singh, S., & Rice-Evans, C. A. (1998). Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 594-606.
- Pattison, D. I., Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2009). What are the plasma targets of the oxidant hypochlorous acid? A kinetic modeling approach. *Chemical Research Toxicology*, 22, 807-817.
- Pérez-Martínez, M., Caemmerer, B., De Peña, M. P., Cid, C., & Kroh, L. W. (2010). Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2958-2965.
- Pennathur, S., Maitra, D., Byun, J., Sliskovic, I., Abdulhamid, I., Saed, G. M., Diamond, M. P., & Abu-Soud, H. M. (2010). Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 205-213.

- Poerner-Rodrigues, N. & Bragagnolo, N. (2012). Identification and quantification, by HPLC-DAD-MSⁿ, of bioactive compounds in coffee brews. Submitted to the *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Rodrigues, E., Mariutti, L. R. B., Faria, A. F., & Mercadante, A. Z. (2012). Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 134, 704-711.
- Rodrigues, E., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2013). Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacity against reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: 10.1021/jf3054214.
- Sacchetti, G., Di Mattia, C., Pittia, P., & Mastrocola, D. (2009). Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *Journal of Food Engineering*, 90, 74-80.
- Shahidi, F., & Chandrasekara, A. (2010). Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochemistry Reviews*, 9, 147-170.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Squadrito, G. L., & Pryor, W.A. (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 392-403.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry*, 39, 44-84.
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., & Benassi, M. T. B. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124, 863-868.
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4, 278-286.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.

CAPÍTULO IV

Influência de genótipos de café no conteúdo de compostos bioativos e na capacidade de desativar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio *in vitro*

Naira Poerner Rodrigues, Terezinha de Jesus Garcia Salva & Neura Bragagnolo

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Phytochemistry*.

Influência de genótipos de café no conteúdo de compostos bioativos e na capacidade de desativar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio *in vitro*

Naira Poerner Rodrigues¹, Terezinha de Jesus Garcia Salva², Neura Bragagnolo¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil.

² Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café “Alcides Carvalho”, Instituto Agrônômico (IAC), Caixa Postal 28, 13012-970, Campinas, São Paulo, Brasil

Resumo

Neste trabalho, avaliamos a influência do genótipo de café no perfil qualitativo e quantitativo de compostos bioativos e na capacidade de desativar *in vitro* as principais espécies reativas de oxigênio (ERO) [radical peroxila (ROO^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^\bullet) e ácido hipocloroso (HOCl)] e de nitrogênio (ERN) [radical óxido nítrico (NO^\bullet) e ânion peroxinitrito (ONOO^-)] de importância biológica. Para tanto, extratos hidrofílicos e lipofílicos de sementes de café cru foram obtidos. Dentre os 12 genótipos de café avaliados, 8 são cultivados comercialmente. O perfil qualitativo de compostos bioativos presentes nos extratos hidrofílicos foi similar entre os 12 genótipos de café. Por outro lado, foram encontradas variações entre os genótipos de café nos teores de ácidos clorogênicos totais (22,9 a 37,9 g/100 g), conjugados de cinamoil-aminoácido (26,5 a 1116 mg/100 g), trigonelina (3,1 a 6,7 g/100 g) e cafeína (3,9 a 11,8 g/100 g). A capacidade de desativar as ERO e ERN variou de acordo com o tipo de extrato, hidrofílico ou lipofílico, e com o genótipo de café. Os extratos hidrofílicos foram capazes de desativar todas as ERO e ERN avaliadas neste estudo. Já os extratos lipofílicos foram capazes de desativar apenas o ROO^\bullet , o HOCl e o NO^\bullet . Os extratos hidrofílicos de *C. canephora* e de *C. kapakata* foram os mais potentes desativadores do ROO^\bullet , H_2O_2 , HO^\bullet , NO^\bullet e ONOO^- devido aos teores de ácidos clorogênicos em média 30% superiores aos encontrados no *C. arabica* e no *C. racemosa*. Os resultados deste estudo mostram que o genótipo é uma característica determinante nos teores dos compostos bioativos do café e na capacidade antioxidante.

Palavras-chave: Rubiaceae, cultivares, variedades, banco de germoplasma, capacidade redutora, compostos fenólicos, metilxantinas

1 Introdução

Os cafeeiros pertencem à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, o qual contém 103 espécies. Apenas as espécies *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta) são utilizadas para produção comercial, representando cerca de 60% e 40% do mercado mundial de café, respectivamente (Davis et al., 2006; ICO, 2012). As demais espécies, embora não apresentem expressão comercial, são importantes para o melhoramento genético de cafeeiros, pois constituem reservas gênicas de resistência às pragas, doenças e condições adversas do ambiente. As espécies de café apresentam grande variabilidade nas suas características morfológicas, agrônômicas e bioquímicas (Aguiar et al., 2005). As diferenças bioquímicas são responsáveis pela variação da composição química entre as espécies de café e até mesmo entre diferentes genótipos da mesma espécie de café (Aguiar et al., 2005; Bertrand et al., 2003).

Os grãos de café cru são ricos em compostos bioativos destacando-se a cafeína, a trigonelina, os ácidos clorogênicos (Esquivel & Jiménez, 2012), os tocoferóis (α , β , γ) e os diterpenos (principalmente caveol e cafestol) (Speer & Kölling-Speer, 2006). A cafeína apresenta diversas atividades biológicas como, estimulação do sistema nervoso central, efeito diurético, vasoconstrição periférica, relaxamento do músculo liso e estimulação do miocárdio (Heck et al., 2007). A trigonelina atua na modulação do metabolismo da glicose reduzindo o risco de desenvolver o diabetes Tipo 2 (Butt & Sultan, 2011). O consumo de ácidos clorogênicos tem sido relacionado a uma série de benefícios à saúde como a redução do risco de doenças cardiovasculares, do diabetes Tipo 2 e do mal de Alzheimer (Lindsay et al., 2002; Ranheim & Halvorsen, 2005), além de apresentarem atividade antibacteriana, anti-inflamatória (Almeida et al., 2006; Santos et al., 2006) e antioxidante (Shahidi & Chandrasekara, 2010). Os tocoferóis constituem, juntamente com os tocotrienóis, a vitamina E, e são potentes antioxidantes, agentes anti-inflamatórios e anticarcinogênicos (Ju et al., 2010). Os diterpenos apresentam propriedades anticarcinogênicas e de estimulação dos mecanismos de defesa antioxidante intracelular (Nkondjock, 2009).

Estudos recentes demonstraram que o consumo de extratos de café cru produz efeito anti-hipertensivo em ratos e humanos (Kozuma et al., 2005), melhora na vasorreatividade em humanos (Ochiai, et al., 2004), efeito inibitório sobre o acúmulo de gordura e sobre o aumento do peso corporal em ratos e humanos (Tanaka et al., 2009; Vinson et al., 2012), e

modulação do metabolismo da glicose em seres humanos (Butt & Sultan, 2011). Todos estes efeitos foram associados aos ácidos clorogênicos presentes nos grãos de café cru.

O perfil de compostos bioativos dos grãos de café cru é influenciado principalmente por aspectos genéticos, como espécie e variedade, e fisiológicos, como o grau de maturação (Farah, 2009). Foi previamente relatado que grãos de café cru *C. canephora*, *C. liberica*, *C. congensis*, *C. eugenioides*, *C. stenophylla*, *C. racemosa* e *C. kapakata* apresentam grande variação no conteúdo de ácidos clorogênicos (3,29 a 6,22% base seca) e cafeína (0,96 a 2,12% base seca) (Aguiar et al., 2005). Além disso, já foi demonstrado que *C. arabica* (10,79 mg/100 g base seca) apresenta maiores teores de tocoferóis do que *C. canephora* (3,61 mg/100 g base seca) (Alves et al., 2009). Com relação aos diterpenos, o cafestol é encontrado em endospermas de *C. arabica* e de *C. canephora*, enquanto que o caveol parece ser específico de *C. arabica* (Dias et al., 2010). O diterpeno caveol é encontrado em altas concentrações em *C. arabica*, *C. stenophylla*, *C. congensis*, *C. racemosa*, *C. salvatrix*, *C. sessiliflora* e *C. pseudozanguebaria*, sendo este conteúdo cerca de 5 a 200 vezes maior do que o encontrado em *C. canephora* e *C. liberica* (Roos et al., 1997).

Considerando a importância do genótipo no conteúdo de compostos bioativos e consequentemente na capacidade antioxidante, neste trabalho avaliamos a influência do genótipo de café no perfil qualitativo e quantitativo de compostos bioativos e na capacidade de desativar *in vitro* as principais espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) de importância biológica, nomeadamente o radical peroxila (ROO^\bullet), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (HO^\bullet), o ácido hipocloroso (HOCl), o radical óxido nítrico (NO^\bullet) e o ânion peroxinitrito (ONOO^-).

2 Material e métodos

2.1 Reagentes

Os padrões de cafeína (99% de pureza), ácido 5-cafeoilquínico (95% de pureza), ácido cafeico (98% de pureza), ácido *p*-cumárico (98% de pureza), ácido ferúlico (99% de pureza), trigonelina (98% de pureza), teobromina (99% de pureza), teofilina (99% de pureza), trolox (97% de pureza), ácido ascórbico (99% de pureza), quercetina (98% de pureza), cisteína (97% de pureza) e rutina (94% de pureza) foram adquiridos da Sigma-

Aldrich (St. Louis, MO, USA) e o ácido gálico da Extrasynthèse (Genay, France). O metanol e o ácido acético glacial, ambos de grau HPLC, o éter metil *terc*-butílico (MTBE) e o etanol foram adquiridos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) e o ácido fórmico de grau PA da Merck (Darmstadt, Alemanha). Fluoresceína, 2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-hidroclorato (AAPH), lucigenina, solução de peróxido de hidrogênio 30% (*m/v*), luminol, di-hidrorodamina 123 (DHR), N,N-dimetilformamida (DMF), solução de hipoclorito de sódio com 10-15% de cloro disponível, 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), dimetilsulfóxido (DMSO), 3-(aminopropil)-1-hidróxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno (NOC-5) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno-3-undecanoico (C₁₁-BODIPY^{581/591}, MM= 504,43 g/mol) foi adquirido da Invitrogen (Eugene, Oregon, USA) e a azobisisobutironitrila (AIBN) foi doado pela Mig Química (São Paulo, SP, Brasil). Folin-Ciocalteu foi adquirido da Dinâmica (São Paulo, SP, Brasil). Carbonato de sódio, fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio, nitrito de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio e bicarbonato de sódio foram adquiridos da Synth (São Paulo, SP, Brasil). Fosfato de sódio tribásico dodecahidratado e 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, cloreto ferroso tetrahidratado da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), ácido cítrico e etilenodiaminotetracético (EDTA) da Quemis (Joinville, SC, Brasil). A água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação e filtração Millipore (Billerica, MA, USA).

2.2 Amostras de café

Doze amostras de café pertencentes a quatro espécies foram avaliadas: uma amostra da espécie *C. kapakata*; uma da espécie *C. racemosa*; três cultivares de *C. arabica* (cv. Catuaí Vermelho IAC 144, cv. IAC Ouro Verde, cv. Tupi IAC 1669-33) e sete variedades de *C. canephora* (var. Robusta IAC 3597, var. Robusta IAC 1655, var. Robusta IAC 1650, var. Kouilou 70 Planta 14A, var. Kouilou 70 Planta 14B, var. Laurentii, var. Bukobensis). Ao longo do texto, o termo genótipo será utilizado para denominar as diferentes espécies, cultivares e variedades de café avaliadas.

As características vegetativas e produtivas de cada genótipo de café são:

C. kapakata: é resistente ao nematoide *Meloidogyne* spp e ao bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*), porém é menos explorada do que *C. racemosa* no melhoramento do cafeeiro. *C. kapakata* não é usada comercialmente no Brasil.

C. racemosa: é resistente ao nematoide *Meloidogyne* spp e ao bicho mineiro. A espécie *C. racemosa*, mediante hibridação interespecífica e posterior seleção durante várias gerações no procedimento de melhoramento, deu origem a materiais altamente resistentes ao bicho mineiro, cujo melhoramento está em fase de finalização no IAC. Esta espécie apresenta tolerância à seca e a altas temperaturas. Os frutos de *C. racemosa* amadurecem em curto período (90 dias) comparado ao *C. arabica* (210-250 dias) e ao *C. canephora* (300-350 dias). Os frutos são relativamente pequenos (8-11 mm de comprimento e 4-6 mm de largura), de cor preta quando maduros e muito aromáticos. Esta espécie não é usada comercialmente no Brasil.

***C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC 144**: resultante do cruzamento entre Caturra Amarelo IAC 476-11 x Mundo Novo IAC 374-19. Este cruzamento teve por objetivo transferir para o cv. Mundo Novo o fator dominante Caturra (*CtCt*), o qual confere porte baixo através da redução do comprimento dos internódios dos ramos. As plantas do cv. Catuaí Vermelho são suscetíveis à ferrugem (causada pelo fungo *Hemileia vastratix*) e aos nematoides, porém, apresentam alta produtividade com ampla capacidade de adaptação na maioria das regiões cafeeiras. O cultivar foi lançado pelo IAC para fins comerciais em 1972.

***C. arabica* cv. IAC Ouro Verde**: resultante do cruzamento entre Catuaí Amarelo IAC H2077-2-12-70 x Mundo Novo IAC 515-20. A hibridação foi realizada com o objetivo de conferir ao cultivar Catuaí, de porte baixo, ainda mais vigor vegetativo. As plantas do cv. Ouro Verde são suscetíveis à ferrugem, porém são mais produtivas e mais vigorosas do que as plantas do cv. Catuaí Vermelho. Este cultivar foi lançado oficialmente pelo IAC em 2000.

***C. arabica* cv. Tupi IAC 1669-33**: resultante do cruzamento entre Vila Sarchi x Híbrido de Timor CIFC 832/2. O Híbrido de Timor, provavelmente derivado de um cruzamento natural de *C. arabica* (cv. Típica) x *C. canephora*, é resistente às raças conhecidas do agente causador da ferrugem do cafeeiro e vem sendo intensivamente empregado no

melhoramento de *C. arabica*. O cultivar Vila Sarchi possui o mesmo alelo que confere porte baixo às plantas de Caturra Vermelho. Portanto, as plantas do cv. Tupi são de porte baixo, resistentes à ferrugem e apresentam boa produtividade. Este cultivar foi lançado oficialmente pelo IAC em 2000.

***C. canephora* var. Robusta/Kouilou/Laurentii/Bukobensis:** são provenientes de cruzamentos não controlados. Estas variedades são resistentes ao agente da ferrugem e aos nematoides. Em geral, as plantas são de porte alto, apresentam alto vigor vegetativo e produtividade, porém são sensíveis à seca. Dentre estas variedades, somente Robusta e Kouilou são cultivadas comercialmente no Brasil.

Os frutos de cada planta (**Figura Suplementar S1**) foram colhidos no estágio de maturação cereja na safra de 2010/2011. Os frutos de café dos doze genótipos foram colhidos em diferentes épocas e quantidades devido às diferenças no ciclo de produção e na produtividade entre os genótipos de café (**Tabela 1**). Todas as plantas são mantidas no Banco de Germoplasma de Café e são cultivadas no centro experimental do Instituto Agrônomo (IAC) em Campinas, São Paulo, localizado a 22°54'S de latitude, 47°05'W de longitude e 854 m de altitude.

Tabela 1: Época da colheita e quantidade de frutos de café colhidos de doze cafeeiros do IAC pertencentes a quatro espécies.

Amostras de café	Colheita	Quantidade (g)
<i>C. kapakata</i>	Junho 2011	325
<i>C. racemosa</i>	Dezembro 2011	620
<i>C. arabica</i> cv. Catuaí Vermelho IAC 144	Mai 2011	2000
<i>C. arabica</i> cv. IAC Ouro Verde	Junho 2011	1780
<i>C. arabica</i> cv. Tupi IAC 1669-33	Julho 2011	1240
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 3597	Julho 2011	655
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1655	Julho 2011	300
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1650	Julho 2011	620
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14A	Julho 2011	475
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14B	Julho 2011	560
<i>C. canephora</i> var. Laurentii	Julho 2011	292
<i>C. canephora</i> var. Bukobensis	Julho 2011	480

2.3 Preparo das amostras

Após a colheita, seleção, descascamento e remoção manual da mucilagem, as sementes de café com pergaminho foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, foi realizada a remoção do pergaminho e da película prateada (**Figura Suplementar S2**) e as sementes foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 120 h ($T=-65^{\circ}\text{C}$, $p<40\ \mu\text{Hg}$) (Liobras, São Paulo, SP, Brasil). As sementes liofilizadas foram moídas, peneiradas em peneira de abertura 0,5 mm (ABNT 35, Tyler 32), embaladas à vácuo (Jumbo Plus, Selovac, São Paulo, SP, Brasil) em sacos de polietileno e armazenadas protegidas da luz a -80°C até o momento da extração.

2.4 Preparo dos extratos hidrofílico e lipofílico

Os extratos foram preparados através da extração sequencial da fração lipofílica e hidrofílica de acordo com Prior et al. (2003), com algumas modificações. O café liofilizado (2,0 g) foi pesado em tubo de teflon de 50 mL e extraído com 20 mL de hexano, seguido por centrifugação (Beckman Coulter Allegra 64R, Palo Alto, CA, USA) a 9000 g por 15 min a 20°C e coleta do sobrenadante. Este processo de extração foi repetido três vezes e os três sobrenadantes obtidos foram combinados em um balão de fundo redondo. O hexano foi removido em evaporador rotativo ($T<30^{\circ}\text{C}$). O extrato lipofílico obtido foi transferido para um frasco âmbar, seco sob fluxo de N_2 e o resíduo armazenado sob atmosfera de N_2 a -80°C .

O resíduo sólido proveniente da produção do extrato lipofílico foi extraído três vezes com 20 mL de uma solução de acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v). A extração consistiu na agitação em vortex por 30 s e sonicação por 4 min. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 9000 g por 15 min a 20°C e o sobrenadante coletado. Os três sobrenadantes coletados foram combinados em um balão de fundo redondo e o solvente orgânico foi retirado em evaporador rotativo ($T<30^{\circ}\text{C}$). O extrato concentrado (fase aquosa) foi congelado em freezer a -80°C e liofilizado por 120 h ($T=-92^{\circ}\text{C}$, $p<60\ \mu\text{Hg}$). Após a liofilização, o extrato hidrofílico foi transferido para frasco âmbar e armazenado em freezer a -80°C .

Foram preparados três extratos lipofílicos e hidrofílicos de cada amostra de café (**Figuras Suplementares S3 e S4**). Os três extratos foram homogeneizados formando um único extrato hidrofílico e um único extrato lipofílico.

O rendimento dos extratos lipofílicos (7,5 a 13,7%, *m/m*) e hidrofílicos (22,4 a 29,0%, *m/m*) foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Rendimento (\%, m/m)} = \left(\frac{\text{massa de extrato hidrofílico ou lipofílico (g)}}{\text{massa de café liofilizado (g)}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

O extrato hidrofílico foi suspenso em água:metanol (80:20, *v/v*) (5 mg de extrato hidrofílico/1250 µL de água:metanol), agitado em vortex por 30 s e centrifugado a 25000 *g* por 10 min a 10°C. O sobrenadante foi filtrado com membranas de 0,45 µm (Millipore, SP, Brasil) e injetado no HPLC-DAD ou HPLC-DAD-MSⁿ. Nos ensaios de capacidade redutora e de capacidade de desativar ERO e ERN, o extrato hidrofílico foi suspenso em solução tampão (5 mg de extrato hidrofílico/1250 µL de tampão), agitado em vortex por 30 s, centrifugado a 25000 *g* por 10 min a 10°C e o sobrenadante usado nas análises. O extrato lipofílico foi solubilizado em DMSO ou etanol (10 mg de extrato lipofílico/1700 µL de DMSO ou etanol) seguido de agitação em vortex por 30s, sonicação por 2 min e agitação em vortex por 30s. O extrato lipofílico solubilizado foi usado nas análises de capacidade redutora e de desativar ERO e ERN.

2.5 Determinação da composição dos extratos por HPLC-DAD-MSⁿ

A identificação dos compostos presentes no extrato hidrofílico foi realizada em um HPLC (Shimadzu HPLC, Kyoto, Japão) equipado com bombas quaternárias (LC-20AD), degaseificador on-line (DGU-20A5), válvula Rheodyne com alça de amostragem de 20 µL, detector DAD (Shimadzu, SPD-M20A) conectado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador *ion trap* (Bruker Daltonics, modelo Esquire 4000, Bremen, Alemanha). Para a identificação dos compostos por MS foram utilizadas as mesmas condições de separação utilizadas para a quantificação, porém na composição do solvente A, o ácido cítrico foi substituído pelo ácido fórmico 0,3% (pH 2,5), pois o ácido cítrico gera fragmentos de *m/z* 191 que interferem na identificação dos compostos. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de *m/z* 70 a *m/z* 600. Os parâmetros usados no MS foram: ESI modo negativo, voltagem no capilar de 2500 V, temperatura do gás de secagem (N₂) a 310°C e fluxo de 8 L/min, nebulizador: 30 psi e energia de fragmentação do MS² e MS³: 1,6 V.

A identificação da trigonelina, teobromina, teofilina, cafeína, ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e ácido cafeico foi realizada com base nos resultados combinados dos seguintes parâmetros: ordem de eluição em coluna de fase reversa, co-cromatografia com padrões, características dos espectros UV-visível e de massas comparados aos padrões analisados nas mesmas condições. Os demais ácidos clorogênicos e seus derivados, para os quais não há padrões comerciais disponíveis, foram identificados através da ordem de eluição em fase reversa, características dos espectros UV-visível e de massas comparados aos da literatura (Clifford et al., 2003; Clifford & Knight, 2004; Farah et al., 2005; Poerner-Rodrigues & Bragagnolo, 2012).

As análises quantitativas da composição do extrato hidrofílico foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu HPLC) equipado com sistema binário de bombas (LC-10AD), degaseificador com gás hélio (DGU-2A), sistema de injeção automático (SIL-10A) e detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M10A). A separação da trigonelina, teobromina, teofilina, cafeína, ácidos clorogênicos e derivados foi realizada em uma coluna ODS-C₁₈ Shim-pack (5 µm, 250 x 4,6 mm, Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplada a uma pré-coluna ODS-C₁₈ (5 µm, 4 x 3 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), utilizando como fase móvel uma mistura de 80% (v/v) de ácido cítrico 10 mM (pH 2,5) e 20% (v/v) de metanol (solvente A) e metanol (solvente B) (Farah et al., 2005). O gradiente foi programado como segue: 100:0 (solvente A:solvente B) por 19 min, de 100:0 para 80:20 em 6 min, mantendo 80:20 por 10 min, passando para 60:40 em 15 min, mantendo 60:40 por 10 min, passando para 100:0 em 1 min e mantendo esta proporção por 9 min. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e temperatura da coluna de 30°C. A trigonelina foi monitorada e quantificada a 262 nm. A teobromina, a teofilina e a cafeína a 272 nm. Os ácidos clorogênicos e o ácido cafeico a 325 nm.

A quantificação foi realizada através de curvas analíticas contendo 6 pontos preparados em triplicata para os padrões de trigonelina (40-290 µg/mL, R²= 0,998), teobromina (0,2-1,9 µg/mL, R²= 0,994), teofilina (0,1-1,5 µg/mL, R²= 0,996), cafeína (20-480 µg/mL, R²= 0,999), 5-CQA (0,5-1000 µg/mL, R²= 0,998) e ácido cafeico (0,3-3,2 µg/mL, R²= 0,996). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados baseados nos parâmetros da curva analítica, sendo eles: trigonelina (LD= 6 µg/mL, LQ= 18 µg/mL), teobromina (LD= 0,07 µg/mL, LQ= 0,22 µg/mL), teofilina (LD= 0,04 µg/mL,

LQ= 0,13 µg/mL), cafeína (LD= 8 µg/mL, LQ= 23 µg/mL), 5-CQA (LD= 10 µg/mL, LQ= 31 µg/mL) e ácido cafeico (LD= 0,09 µg/mL, LQ= 0,27 µg/mL). A quantificação dos ácidos clorogênicos e de seus derivados foi realizada utilizando a área do padrão do 5-CQA combinada com os coeficientes de extinção molar como descrito por Farah et al. (2005). Devido à indisponibilidade do coeficiente de extinção molar do ácido *p*-cumaroilquínico, este foi quantificado utilizando a área do padrão de 5-CQA. Os conjugados de cinamoil-aminoácido foram quantificados utilizando o coeficiente de extinção molar do 5-CQA como fator de correção (Clifford & Knight, 2004) e para a quantificação dos ácidos cafeoilferuloilquínico, *p*-cumaroilcafeoilquínico, dimetoxicafeoilquínico e dimetoxiferuloilquínico foi utilizada a média do coeficiente de extinção molar dos 3 isômeros de ácido dicafeoilquínico (Perrone et al., 2008).

2.6 Capacidade redutora e capacidade de desativar as ERO e ERN

Os ensaios foram realizados em um leitor de microplacas (Synergy Mx, Bio-Tek, Winooski, VT, USA) equipado com termostato e dois dispensadores para reagentes. Dois ensaios controle foram conduzidos em todas as microplacas, sendo um deles para verificar a interação entre a sonda e o extrato, sem adição do gerador radicalar ou da espécie reativa, e no outro, um controle de qualidade analítico (controle positivo), adicionando um composto com capacidade antioxidante conhecida para desativar a espécie reativa específica. Não foi observada nenhuma interação entre a sonda e o extrato, e durante os ensaios a variação nas respostas dos controles positivos foi menor que 15%. Cada ensaio correspondeu a três experimentos realizados em triplicata. Com exceção da capacidade redutora e da capacidade de desativar o ROO[•], os resultados foram expressos como valores de IC₅₀ calculados através de análise de regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 5.03.

2.6.1 Capacidade redutora dos extratos hidrofílicos

A capacidade redutora do extrato hidrofílico foi determinada através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), o qual foi adaptado para análise em leitor de microplacas (Synergy Mx, Bio-Tek). A mistura reacional continha os seguintes reagentes (volume final de 300 µL): extratos hidrofílicos (nas concentrações de 33 e 73

$\mu\text{g/mL}$) dissolvidos em água, reagente de Folin-Ciocalteu (8,3%, *v/v*) e solução de carbonato de sódio (2,3%, *m/v*). O sinal de absorbância foi monitorado a 765 nm por 120 min (25°C). A quantificação foi realizada através de curva analítica do ácido gálico na faixa de 2-12,5 $\mu\text{g/mL}$ e os resultados estão expressos em miligrama de equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

2.6.2 Capacidade de extratos hidrofílicos de desativarem o radical peroxila

A capacidade de desativar o ROO^\bullet foi medida pelo monitoramento do efeito dos extratos hidrofílicos no decaimento da fluorescência, devido à oxidação da fluoresceína induzida pelo ROO^\bullet (Ou et al., 2001). O ROO^\bullet foi gerado por decomposição térmica do AAPH a 37°C. A mistura reacional continha os seguintes reagentes dissolvidos em tampão fosfato 75 mM (pH 7,4) nas concentrações finais indicadas (volume final de 200 μL): fluoresceína (61 nM), extratos hidrofílicos (5 concentrações, 0,5-5,2 $\mu\text{g/mL}$) e AAPH (19 mM). A mistura foi pré-incubada no leitor de microplacas durante 10 min antes da adição do AAPH. O sinal de fluorescência (excitação a 485 ± 20 nm e emissão a 528 ± 20 nm) foi monitorado a cada minuto até atingir 0,5% da fluorescência inicial. A quantificação foi realizada através de uma curva analítica de trolox na faixa de 1-12 μM e os resultados foram expressos em μmol de equivalente ao trolox por grama de extrato ($\mu\text{M ET/g}$).

2.6.3 Capacidade de extratos lipofílicos de desativarem o radical peroxila

A capacidade de desativar o ROO^\bullet foi medida pelo monitoramento do efeito dos extratos lipofílicos no decaimento da fluorescência, devido à oxidação do $\text{C}_{11}\text{-BODIPY}^{581/591}$ induzida pelo ROO^\bullet (Rodrigues et al., 2012a). O ROO^\bullet foi gerado por decomposição térmica do AIBN a 41°C. A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 225 μL): $\text{C}_{11}\text{-BODIPY}^{581/591}$ (0,18 μM) em DMSO, AIBN (195 mM) e extratos lipofílicos (nas concentrações de 309 e 717 $\mu\text{g/mL}$) dissolvidos em DMSO/MTBE (10:1, *v/v*). O sinal de fluorescência (excitação a 540 ± 20 nm e emissão a 600 ± 20 nm) foi monitorado até atingir 0,5% da fluorescência inicial. A quantificação foi realizada através de curva analítica do trolox na faixa de 14-143 μM e os resultados foram expressos em μmol de equivalente ao trolox por grama de extrato ($\mu\text{M ET/g}$).

2.6.4 Capacidade de extratos hidrofílico e lipofílico de desativarem o peróxido de hidrogênio

A capacidade de desativar o H_2O_2 foi medida pelo monitoramento do efeito dos extratos hidrofílico e lipofílico no aumento da luminescência resultante da oxidação da lucigenina induzida pelo H_2O_2 (Rodrigues et al., 2012b). A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 300 μL): tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), solução de lucigenina (0,8 mM) em tampão Tris-HCl, extratos hidrofílicos (5 concentrações, 350-2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dissolvidos em tampão Tris-HCl ou extratos lipofílicos (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dissolvidos em DMSO e H_2O_2 1% (v/v). O sinal de quimiluminescência foi medido após 5 min de incubação a 37°C.

2.6.5 Capacidade de extratos hidrofílicos de desativarem o radical hidroxila

A capacidade de desativar o HO^\bullet foi medida pelo monitoramento do efeito dos extratos hidrofílicos no aumento da luminescência resultante da oxidação do luminol induzida pelo HO^\bullet (Rodrigues et al., 2012b). O HO^\bullet foi gerado pela reação de Fenton (FeCl_2 -EDTA- H_2O_2). A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 250 μL): tampão carbonato 0,5 M (pH 10), extratos hidrofílicos dissolvidos em água ultrapura (5 concentrações, 0,4-8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), solução de luminol (20 μM) em tampão carbonato, FeCl_2 -EDTA (25 μM , 100 μM) em água ultrapura e H_2O_2 (3,5 mM). O sinal de quimiluminescência foi medido após 5 min de incubação a 37°C.

2.6.6 Capacidade de extratos hidrofílico e lipofílico de desativarem o ácido hipocloroso

A capacidade de desativar o HOCl foi medida pelo monitoramento do efeito dos extratos hidrofílico e lipofílico no aumento da fluorescência resultante da oxidação da DHR para a rodamina 123 induzida pelo HOCl (Rodrigues et al., 2012b). O HOCl foi preparado através do ajuste do pH de uma solução de NaOCl 1% (m/v) até 6,2 com H_2SO_4 10% (v/v). A concentração do HOCl foi determinada espectrofotometricamente a 235 nm usando o coeficiente de absorvidade molar de 100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e as demais diluições foram feitas em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4). A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 300 μL): tampão fosfato 100 mM (pH 7,4),

extratos hidrofílicos (5 concentrações, 0,7-71 µg/mL) dissolvidos em tampão fosfato ou extratos lipofílicos (20 µg/mL) dissolvidos em etanol, DHR (5 µM) e HOCl (5 µM) dissolvidos em tampão fosfato. O sinal de fluorescência (excitação a 485 ± 20 nm e emissão a 528 ± 20 nm) foi medido imediatamente após a adição do HOCl a 37°C.

2.6.7 Capacidade de extratos hidrofílico e lipofílico de desativarem o óxido nítrico

A capacidade de desativar o NO^\bullet foi medida pelo monitoramento do efeito dos extratos hidrofílico e lipofílico no aumento da fluorescência resultante da oxidação da 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) para a triazolofluoresceína induzida pelo NO^\bullet (Gomes et al., 2007). O NO^\bullet foi gerado pela termodecomposição do NOC-5. A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 300 µL): DAF-2 (5 µM) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4), extratos hidrofílicos (5 concentrações, 0,7-85 µg/mL) dissolvidos em tampão fosfato ou extratos lipofílicos (20 µg/mL) dissolvidos em DMSO e NOC-5 (60 µM) dissolvido em tampão fosfato. O sinal de fluorescência (excitação a 485 ± 20 nm e emissão a 528 ± 20 nm) foi medido após 30 min de incubação a 37°C.

2.6.8 Capacidade de extratos hidrofílico e lipofílico de desativarem o ânion peroxinitrito

A capacidade de desativar o ONOO^- foi medida pelo monitoramento do efeito dos extratos hidrofílico e lipofílico no aumento da fluorescência resultante da oxidação da DHR para a rodamina 123 induzida pelo ONOO^- (Rodrigues et al., 2012b). O ONOO^- foi sintetizado como previamente descrito por Gomes et al. (2007). A mistura reacional continha os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 300 µL): DHR (5 µM) em tampão fosfato (90 mM NaCl, 50 mM Na_3PO_4 , 5 mM KCl, pH 7,4), extratos hidrofílicos (5 concentrações, 0,3-35 µg/mL) dissolvidos em tampão fosfato ou extratos lipofílicos (22 µg/mL) dissolvidos em DMSO e ONOO^- (600 nM). O sinal de fluorescência (excitação a 485 ± 20 nm e emissão a 528 ± 20 nm) foi medido após 5 min de incubação a 37°C. Paralelamente foi realizado um ensaio na presença de NaHCO_3 25 mM com a finalidade de simular a concentração de CO_2 fisiológica.

2.7 Cálculo da contribuição de cada composto bioativo na capacidade antioxidante

A contribuição de cada composto bioativo na capacidade antioxidante do extrato hidrofílico foi calculada considerando a capacidade antioxidante do extrato, a capacidade antioxidante de cada padrão analítico, avaliada anteriormente por Poerner-Rodrigues et al. (2013), e a concentração de cada composto bioativo presente no extrato. Nos ensaios de capacidade redutora e de desativação do ROO[•], a porcentagem de contribuição (a) foi calculada através da Equação 2. Nos ensaios de desativação do H₂O₂, do HO[•], do HOCl, do NO[•] e do ONOO⁻ foram usados os seguintes passos para o cálculo de contribuição (b): (1^o) cálculo da concentração de composto bioativo presente na fração do extrato hidrofílico responsável por inibir 50% da oxidação da sonda (Equação 3) e cálculo do logaritmo decimal desta concentração; (2^o) cálculo da % de inibição do composto bioativo presente no extrato utilizando a equação da curva de dose-resposta obtida para cada padrão analítico (Equação 4).

$$\% \text{ Contribuição (a)} = \left(\frac{([\text{concentração}] \times \text{capacidade redutora do padrão}) \times 100}{\text{capacidade redutora do extrato}} \right) \quad \text{Equação 2}$$

onde:

[concentração] = concentração do composto bioativo no extrato (g/g)

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) = \left(\frac{\text{IC}_{50} \text{ do extrato} \times \% \text{ do composto no extrato}}{100} \right) \quad \text{Equação 3}$$

$$\% \text{ Contribuição (b)} = \left(100 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - X) \times \text{inclinação da curva}} \right) \quad \text{Equação 4}$$

onde:

$\log \text{IC}_{50}$ = logaritmo do IC₅₀ do padrão analítico

X = logaritmo da concentração do composto bioativo presente no extrato

2.8 Análise estatística

Os resultados dos teores de compostos bioativos, da capacidade redutora e da capacidade de desativar as ERO e ERN dos extratos hidrofílico e lipofílico foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando o software Origin[®] 8. A similaridade dos extratos hidrofílicos quanto à capacidade redutora e capacidade de desativar as ERO e ERN foi determinada utilizando a análise de agrupamento hierárquico empregando média não ponderada e a distância Euclidiana como índice de similaridade. A análise de componentes principais foi aplicada para caracterizar os extratos hidrofílicos de acordo com a capacidade redutora e a capacidade de desativar as ERO e ERN e o conteúdo de compostos bioativos utilizando o software Statistica 6.0. A capacidade redutora e capacidade de desativar as ERO e ERN foram utilizadas como variáveis ativas. Os teores de ácidos clorogênicos (soma dos ácidos cafeoilquínico, feruloilquínico, *p*-cumaroilquínico, dicafeoilquínico, ácido cafeoilferuloilquínico, *p*-cumaroilcafeoilquínico, dimetoxicafeoilquínico e dimetoxiferuloilquínico), conjugados de cinamoil-aminoácido (soma de cafeoil tirosina, cafeoil triptofano e *p*-cumaroil triptofano), ácido cafeico, trigonelina, teobromina, teofilina e cafeína foram utilizados como variáveis suplementares na derivatização das componentes principais, sendo projetadas no mesmo espaço.

3 Resultados

3.1 Compostos bioativos nos extratos hidrofílicos

A **Figura 1** mostra um cromatograma típico da separação da trigonelina, teobromina, cafeína, ácidos clorogênicos e seus derivados em extrato hidrofílico de café. Nos extratos hidrofílicos foram identificados e quantificados 23 derivados hidroxicinâmicos (**Tabela 2**), sendo 19 ácidos clorogênicos, 3 conjugados de cinamoil-aminoácido e 1 ácido cinâmico livre. A identificação destes compostos utilizando o HPLC-DAD-MSⁿ foi apresentada previamente (Poerner-Rodrigues & Bragagnolo, 2012), assim não será discutida neste trabalho.

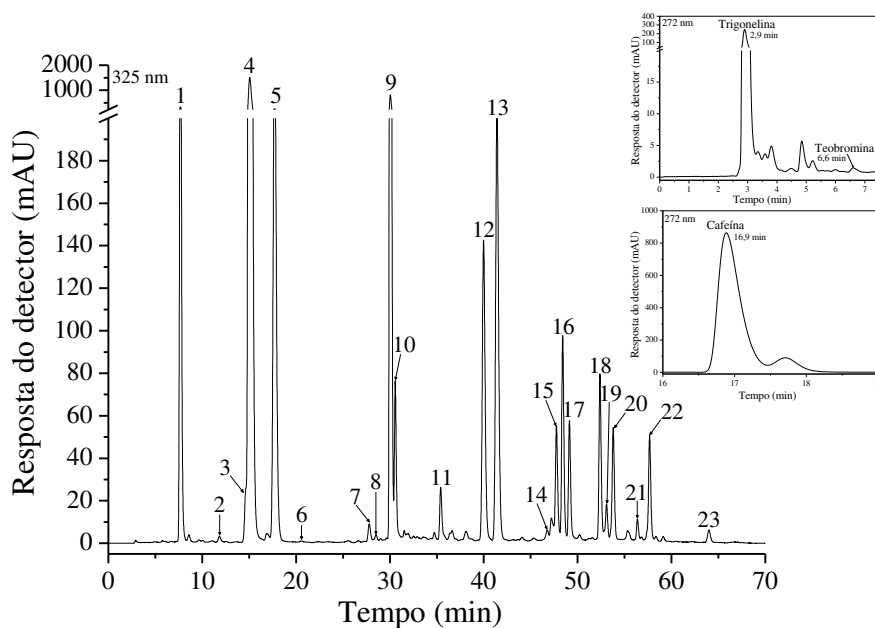


Figura 1. Cromatograma da trigonelina, teobromina, cafeína, ácidos clorogênicos e derivados em extrato hidrofílico de *C. canephora* var. Kouilou 70 Planta 14B obtida por HPLC-DAD, a 325 e 272 nm (a identificação dos compostos está detalhada na **Tabela 2**).

Tabela 2. Características cromatográficas, de espectros UV e de massas obtidas por HPLC-DAD-MSⁿ dos ácidos clorogênicos e derivados identificados nos extratos hidrofílicos de café.

Pico ^a	t _R (min) ^b	Composto (abreviatura)	Espectro UV ^c	[M - H] ⁻ (m/z)	Fragmentos (m/z) ^d
1	7,7	ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA)	A	353	MS ² [353]: 191 , 179 (46), 135 (9), 173 (2) MS ³ [353→191]: 127 , 173 (83), 85 (55), 93(47)
2	11,9	ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico (3- <i>p</i> CoQA)	B	337	MS ² [337]: 163 MS ³ [337→163]: 119
3	14,4	ácido 3-feruloilquínico (3-FQA)	A	367	MS ² [367]: 193 , 133 (8), 173 (4) MS ³ [367→193]: 133 , 149 (22)
4	15,1	ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA)	A	353	MS ² [353]: 191 , 179 (3) MS ³ [353→191]: 127 , 173 (81), 85 (39), 111 (30)
5	17,7	ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA)	A	353	MS ² [353]: 173 , 179 (60), 191 (13), 135 (11) MS ³ [353→173]: 93 , 111 (51), 155 (39), 71 (14)
6	20,6	ácido cafeico (CA)	A	179	MS ² [179]: 135
7	27,8	ácido 5- <i>p</i> -cumaroilquínico (5- <i>p</i> CoQA)	B	337	MS ² [337]: 191 , 163 (5) MS ³ [337→191]: 127 , 172 (49), 85 (43)
8	28,5	ácido 4- <i>p</i> -cumaroilquínico (4- <i>p</i> CoQA)	B	337	MS ² [337]: 173 , 191 (11), 163 (8) MS ³ [337→173]: 93 , 111 (76), 155 (35)
9	30,0	ácido 5-feruloilquínico (5-FQA)	A	367	MS ² [367]: 191 , 173 (7) MS ³ [367→191]: 127 , 173 (81), 85 (44), 93 (36)
10	30,6	ácido 4-feruloilquínico (4-FQA)	A	367	MS ² [367]: 173 , 191 (40) MS ³ [367→173]: 93 , 111 (61), 155 (30)
11	35,4	cafeoil tirosina (CTir)	A	342	MS ² [342]: 207 , 163 (7), 135 (4), 119 (2) MS ³ [342→207]: 163 , 119 (14)
12	40,0	ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA)	A	515	MS ² [515]: 353 , 173 (13), 179 (13), 191 (8), 335 (7) MS ³ [515→353]: 173 , 179 (65), 191 (45), 135 (6)
13	41,4	ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA)	A	515	MS ² [515]: 353 , 191 (6) MS ³ [515→353]: 191 , 179 (47), 135 (7), 173 (3)
14	46,8	ácido 3- <i>p</i> -cumaroil,4-cafeoilquínico (3 <i>p</i> Co,4CQA)	A	499	MS ² [499]: 353 , 335 (27), 337 (21), 173 (17), 179 (14) MS ³ [499→353]: 173 , 179 (54), 135 (20), 191 (14)
15	47,7	ácido 3-cafeoil,4-feruloilquínico (3C,4FQA)	A	529	MS ² [529]: 367 , 173 (39), 335 (7), 193 (6) MS ³ [529→367]: 173 , 193 (23)
16	48,4	ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA)	A	515	MS ² [515]: 353 , 173 (11), 203 (11) MS ³ [515→353]: 173 , 179 (66), 191 (30), 135 (7)
17	49,1	ácido 3-cafeoil,5-feruloilquínico (3C,5FQA)	A	529	MS ² [529]: 353 , 367 (35), 191 (17) MS ³ [529→353]: 191 , 179 (42), 135 (7)
18	52,4	cafeoil triptofano (CTrp)	C	366	MS ² [366]: 229 , 135 (2), 185 (2) MS ³ [366→229]: 185 , 100 (24), 142 (12)
19	53,1	ácido 4-feruloil,5-cafeoilquínico (4F,5CQA)	A	529	MS ² [529]: 367 , 173 (7) MS ³ [529→367]: 173 , 193 (63), 134 (6)
20	53,8	ácido 4-cafeoil,5-feruloilquínico (4C,5FQA)	A	529	MS ² [529]: 353 , 367 (26), 173 (10), 191 (9) MS ³ [529→353]: 173 , 179 (71), 191 (13), 135 (10)
21	56,4	<i>p</i> -cumaroil triptofano (<i>p</i> -CoTrp)	D	350	MS ² [350]: 229 , 185 (10) MS ³ [350→229]: 185 , 100 (24), 142 (11)
22	57,7	ácido 4-dimetóxi,5-cafeoilquínico (4D,5CQA)	A	543	MS ² [543]: 381 , 367 (22), 173 (15), 207 (8), 349 (4), 335 (3) MS ³ [543→381]: 173 , 207 (55)
23	64,0	ácido 4-dimetóxi,5-feruloilquínico (4D,5FQA)	A	557	MS ² [557]: 381 , 349 (31), 207 (8), 173 (6) MS ³ [557→381]: 173 , 207 (49)

^a Numerados de acordo com o cromatograma da **Figura 1**. ^b Tempo de retenção na coluna C₁₈. ^c Gradiente linear de ácido cítrico/metanol. Os espectros UV estão apresentados no **Appendix A**. ^d Os picos base estão grifados em negrito e a porcentagem de cada fragmento está apresentada entre parênteses.

Em geral, o perfil qualitativo de compostos bioativos foi similar entre os genótipos de café (**Tabelas 3 e 4**). As diferenças entre os genótipos ocorreram em relação à concentração destes compostos nos extratos. Os extratos hidrofílicos de *C. canephora* (34,7 g/100 g) e de *C. kapakata* (33,4 g/100 g) apresentaram teores de ácidos clorogênicos totais em média 30% maiores do que os extratos hidrofílicos de *C. arabica* (24 g/100 g) e de *C. racemosa* (24,7 g/100 g) (**Tabela 3**).

Além da variação no teor de ácidos clorogênicos totais, também foi encontrada uma variação na contribuição dos subgrupos de compostos que compõem os ácidos clorogênicos. Por exemplo, os subgrupos de CQA, FQA, *p*-CoQA, di-CQA e CFQA representam em média 79%, 6,7%, 1,3%, 12% e 0,4% do conteúdo total de ácidos clorogênicos nos extratos de *C. arabica* enquanto que nos extratos de *C. canephora* representam em média 64%, 17%, 0,4%, 14% e 3,6%. Dentre estes subgrupos de ácidos clorogênicos, podemos destacar o elevado conteúdo de FQA e CFQA encontrado nos extratos de *C. canephora*, sendo em média 4 e 12 vezes superior ao de *C. arabica*, respectivamente. Em geral, os extratos hidrofílicos apresentaram como isômeros majoritários de cada subgrupo o 5-CQA, 5-FQA, 5-*p*CoQA, 3,5-diCQA e 3C,5FQA (**Tabelas Suplementares S1 e S2**).

Conjugados de cinamoil-aminoácido foram encontrados somente em *C. canephora* e em *C. arabica*, sendo os teores no *C. canephora* (832 g/100 g) em média 16 vezes superiores aos do *C. arabica* (51 g/100 g) (**Tabela 3**). Em relação ao conteúdo de cafeína, *C. canephora* apresentou uma concentração 2 vezes superior ao conteúdo das outras espécies de café. Enquanto isso, as espécies de *C. kapakata* e de *C. racemosa* destacaram-se pelos elevados teores de trigonelina (**Tabela 4**).

Tabela 3. Rendimento dos extratos hidrofílicos e conteúdo dos principais subgrupos de ácidos clorogênicos (CQA, FQA, *p*-CoQA, di-CQA e CFQA), de ácidos clorogênicos totais (CGA), de conjugados de cinamoil-aminoácido (TCTrp) e de ácido cafeico em extratos hidrofílicos de café.

Extratos hidrofílicos ^A	Rendimento (%, <i>m/m</i>)	CQA total ^B	FQA total ^C	<i>p</i> -CoQA total ^D	di-CQA total ^E	CFQA total ^F	CGA ^G	TCTrp total ^H	Ácido cafeico
<i>C. kapakata</i>	24,1	25709 ± 194 ^a	1829 ± 12 ^{lg}	231 ± 3 ^c	4951 ± 21 ^c	647 ± 3 ^e	33391 ± 225 ^{de}	nd ^I	nd
<i>C. racemosa</i>	23,9	19863 ± 457 ^d	803 ± 14 ⁱ	185 ± 9 ^d	3708 ± 112 ^c	126 ± 4 ^f	24693 ± 595 ^g	nd	9,9 ± 0,2 ^a
<i>C. arabica</i> cv. Catuaí Vermelho IAC 144	22,4	17929 ± 409 ^e	1696 ± 39 ^{gh}	284 ± 6 ^b	2792 ± 78 ^f	117 ± 3 ^f	22921 ± 536 ^g	26,5 ± 0,8 ^f	6,3 ± 0,3 ^c
<i>C. arabica</i> cv. IAC Ouro Verde	22,6	19066 ± 369 ^{de}	1382 ± 26 ^h	273 ± 6 ^b	2994 ± 58 ^f	94,5 ± 2,4 ^f	23896 ± 465 ^g	27,0 ± 1,0 ^f	5,7 ± 0,2 ^{cd}
<i>C. arabica</i> cv. Tupi IAC 1669-33	25,1	20030 ± 54 ^d	1748 ± 16 ^{gh}	366 ± 11 ^a	2869 ± 107 ^f	109 ± 4 ^f	25232 ± 195 ^g	101 ± 5 ^e	5,9 ± 0,1 ^{cd}
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 3597	26,3	18866 ± 687 ^{de}	4985 ± 170 ^{de}	113 ± 4 ^e	4929 ± 177 ^c	1441 ± 59 ^a	30867 ± 1150 ^f	672 ± 28 ^d	4,3 ± 0,2 ^{ef}
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1655	23,6	19054 ± 544 ^{de}	8189 ± 217 ^a	120 ± 3 ^e	4574 ± 159 ^d	1273 ± 41 ^b	33529 ± 1000 ^{cde}	741 ± 20 ^{cd}	4,2 ± 0,3 ^f
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1650	24,1	22117 ± 196 ^{bc}	5859 ± 50 ^c	70,6 ± 0,6 ^f	5850 ± 79 ^b	1218 ± 6 ^{bc}	35421 ± 324 ^{bcd}	758 ± 16 ^c	7,5 ± 0,4 ^b
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14A	28,4	21663 ± 766 ^c	5686 ± 204 ^c	185 ± 6 ^d	3859 ± 163 ^e	951 ± 35 ^d	32622 ± 1185 ^{ef}	745 ± 28 ^c	4,5 ± 0,2 ^{ef}
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14B	28,9	24844 ± 483 ^a	6744 ± 159 ^b	170 ± 4 ^d	4245 ± 104 ^d	1449 ± 39 ^a	37937 ± 799 ^a	1026 ± 33 ^b	5,1 ± 0,2 ^{de}
<i>C. canephora</i> var. Laurentii	25,1	23124 ± 290 ^b	4698 ± 61 ^e	234 ± 4 ^c	6326 ± 137 ^a	1150 ± 31 ^{bc}	35593 ± 523 ^{bc}	1116 ± 26 ^a	6,2 ± 0,5 ^c
<i>C. canephora</i> var. Bukobensis	29,0	25413 ± 288 ^a	5230 ± 30 ^d	183 ± 5 ^d	4565 ± 81 ^d	1162 ± 49 ^{ab}	36924 ± 389 ^{ab}	768 ± 17 ^c	4,2 ± 0,3 ^f

^A Os resultados correspondem a média das triplicatas ± desvio padrão, expressos em mg/100 g de extrato hidrofílico. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$); ^B CQA total: ácido cafeoilquínico (soma de 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA); ^C FQA total: ácido feruloilquínico (soma de 3-FQA, 4-FQA e 5-FQA); ^D *p*-CoQA total: ácido *p*-cumaroilquínico (soma de 3-*p*CoQA, 4-*p*CoQA e 5-*p*CoQA); ^E di-CQA total: ácido dicafeoilquínico (soma de 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA); ^F CFQA total: ácido cafeoilferuloilquínico (soma de 3C,4FQA, 3C,5FQA, 4F,5CQA e 4C,5FQA); ^G CGA: ácidos clorogênicos totais (soma de CQA, FQA, *p*-CoQA, di-CQA, CFQA, ácido *p*-cumaroilcafeoilquínico e ácido dimetoxicinamoilquínico); ^H TCTrp: conjugados de cinamoil-aminoácido (soma de cafeoiltirosina, cafeoiltriptofano e *p*-cumaroiltriptofano); ^I nd: não detectado (Limite de detecção: ácido cafeico= 0,09 µg/mL).

Tabela 4. Conteúdo de trigonelina, teobromina, teofilina e cafeína em extratos hidrofílicos de café.

Extratos hidrofílicos ^A	Trigonelina	Teobromina	Teofilina	Cafeína
<i>C. kapakata</i>	6712 ± 70 ^a	nd ^B	7,8 ± 0,3 ^c	3923 ± 46 ^g
<i>C. racemosa</i>	5438 ± 105 ^b	43,2 ± 1,3 ^a	3,3 ± 0,03 ^d	4780 ± 54 ^e
<i>C. arabica</i> cv. Catuaí Vermelho IAC 144	4719 ± 101 ^{cd}	nd	nd	4616 ± 112 ^{ef}
<i>C. arabica</i> cv. IAC Ouro Verde	4578 ± 69 ^{de}	nd	nd	4163 ± 84 ^{fg}
<i>C. arabica</i> cv. Tupi IAC 1669-33	4436 ± 62 ^e	3,9 ± 0,1 ^b	nd	4482 ± 24 ^{efg}
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 3597	3838 ± 151 ^f	nd	nd	6600 ± 265 ^d
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1655	4934 ± 120 ^c	nd	11,5 ± 0,5 ^a	8937 ± 207 ^c
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1650	4686 ± 28 ^{cd}	nd	9,3 ± 0,2 ^b	9321 ± 71 ^c
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14A	4019 ± 133 ^f	4,6 ± 0,4 ^b	nd	9963 ± 299 ^b
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14B	3952 ± 67 ^f	4,9 ± 0,2 ^b	nd	11776 ± 402 ^a
<i>C. canephora</i> var. Laurentii	3922 ± 54 ^f	nd	12,2 ± 0,5 ^a	9467 ± 125 ^{bc}
<i>C. canephora</i> var. Bukobensis	3091 ± 25 ^g	nd	nd	9210 ± 153 ^c

^A Os resultados correspondem a média das triplicatas ± desvio padrão, expressos em mg/100 g de extrato hidrofílico. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). ^B nd: não detectado (Limite de detecção: Teobromina= 0,07 µg/mL; Teofilina= 0,04 µg/mL).

3.2 Capacidade redutora e capacidade dos extratos hidrofílicos de desativarem as ERO e ERN

Os doze extratos hidrofílicos de café apresentaram capacidade redutora e foram capazes de desativar todas as ERO (ROO[•], H₂O₂, HO[•] e HOCl) (**Tabela 5**) e as ERN (NO[•] e ONOO⁻) (**Tabela 6**) avaliadas, sempre com uma relação dose-dependente e com IC₅₀ na ordem de µg/mL. A capacidade redutora e a capacidade de desativar o ROO[•], o H₂O₂, o HO[•], o NO[•] e o ONOO⁻ dos extratos hidrofílicos foi em média 3, 8, 6, 12, 17 e 8 vezes inferior à do controle positivo de cada ensaio, respectivamente. Por outro lado, os extratos hidrofílicos apresentaram capacidade de desativar o HOCl em média 6 vezes maior do que a da cisteína usada como controle positivo.

A capacidade dos extratos hidrofílicos de desativarem o ONOO⁻ também foi avaliada na presença de NaHCO₃ com o objetivo de simular as concentrações fisiológicas de CO₂. Nesta condição o CO₂ pode modular a reatividade do ONOO⁻ devido à rápida reação entre estes dois compostos gerando o dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) e o radical ânion carbonato (CO₃^{•-}), que são os principais radicais responsáveis pelas reações de oxidação e nitrificação observadas *in vivo* (Squadrito & Pryor, 1998). Em geral, os extratos hidrofílicos

mantiveram o seu valor de IC₅₀ no ensaio realizado na presença de NaHCO₃ (**Tabela 6**), indicando que os extratos hidrofílicos também são efetivos em desativar o NO₂[•] e o CO₃^{•-}.

Tabela 5. Capacidade redutora e capacidade de extratos hidrofílicos de café e de controles positivos de desativarem o radical peroxila (ROO[•]), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical hidroxila (HO[•]) e o ácido hipocloroso (HOCl).

Amostras	Capacidade redutora ^A	ROO [•] ^B	IC ₅₀ ^C (µg/mL)		
			H ₂ O ₂	HO [•]	HOCl
Extratos hidrofílicos					
<i>C. kapakata</i>	205 ± 14 ^{bcd}	3738 ± 246 ^{cd}	877 ± 31 ^b	1,49 ± 0,04 ^{cd}	4,26 ± 0,28 ^a
<i>C. racemosa</i>	152 ± 10 ^e	2643 ± 190 ^g	1083 ± 27 ^{ef}	2,15 ± 0,10 ^f	5,08 ± 0,33 ^a
<i>C. arabica</i> cv. Catuaí Vermelho IAC 144	145 ± 11 ^e	2453 ± 161 ^g	1526 ± 19 ^g	2,96 ± 0,07 ^h	16,07 ± 0,19 ^e
<i>C. arabica</i> cv. IAC Ouro Verde	149 ± 8 ^e	3008 ± 261 ^{ef}	1133 ± 20 ^f	2,76 ± 0,06 ^g	11,96 ± 0,51 ^d
<i>C. arabica</i> cv. Tupi IAC 1669-33	147 ± 9 ^e	2700 ± 231 ^{fg}	863 ± 33 ^b	2,82 ± 0,07 ^{gh}	13,22 ± 0,77 ^d
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 3597	192 ± 10 ^d	3204 ± 220 ^e	941 ± 4 ^c	1,77 ± 0,06 ^e	7,47 ± 0,35 ^b
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1655	202 ± 11 ^{cd}	4111 ± 404 ^{bc}	1022 ± 24 ^{de}	1,61 ± 0,01 ^d	10,60 ± 0,40 ^c
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1650	215 ± 10 ^{abc}	3689 ± 276 ^d	984 ± 8 ^{cd}	1,56 ± 0,03 ^d	9,72 ± 0,56 ^c
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14A	206 ± 14 ^{bcd}	4230 ± 350 ^b	831 ± 17 ^{ab}	1,39 ± 0,03 ^{bc}	9,88 ± 0,34 ^c
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14B	225 ± 12 ^a	4735 ± 370 ^a	779 ± 25 ^a	1,33 ± 0,05 ^{ab}	15,26 ± 0,87 ^c
<i>C. canephora</i> var. Laurentii	219 ± 12 ^{ab}	4020 ± 322 ^{bcd}	868 ± 16 ^b	1,33 ± 0,01 ^{ab}	9,57 ± 0,40 ^c
<i>C. canephora</i> var. Bukobensis	226 ± 14 ^a	3681 ± 246 ^d	824 ± 9 ^{ab}	1,25 ± 0,01 ^a	14,62 ± 0,26 ^e
Controles positivos					
Ácido ascórbico	721 ± 45	-	155 ± 18	-	-
Quercetina	-	28032 ± 2025	-	-	-
Ácido gálico	-	-	-	0,16 ± 0,01	-
Cisteína	-	-	-	-	66,46 ± 6,37

^A mg de equivalente ao ácido gálico/g de extrato hidrofílico ou g de padrão (média das triplicatas ± desvio-padrão).

^B µmol de equivalente ao trolox/g de extrato hidrofílico ou g de cada padrão (média das triplicatas ± desvio-padrão).

^C IC₅₀ = concentração inibitória, *in vitro*, para reduzir em 50% o efeito oxidativo das espécies reativas no meio reacional testado (média das triplicatas ± desvio-padrão). Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes (*p*<0,05).

Tabela 6. Capacidade de extratos hidrofílicos de café e de controles positivos de desativarem o óxido nítrico (NO•) e o ânion peroxinitrito (ONOO⁻).

Amostras	IC ₅₀ ^A (µg/mL)		
	NO•	ONOO ⁻	
		Ausência de NaHCO ₃	Presença de NaHCO ₃
Extratos hidrofílicos			
<i>C. kapakata</i>	9,96 ± 0,81 ^c	1,20 ± 0,09 ^{ab}	1,43 ± 0,06 ^a
<i>C. racemosa</i>	13,90 ± 0,94 ^d	1,94 ± 0,08 ^{ef}	2,13 ± 0,07 ^b
<i>C. arabica</i> cv. Catuaí Vermelho IAC 144	17,62 ± 0,51 ^{ef}	2,36 ± 0,09 ^g	3,06 ± 0,24 ^c
<i>C. arabica</i> cv. IAC Ouro Verde	15,57 ± 0,84 ^{de}	1,86 ± 0,12 ^{ef}	2,20 ± 0,14 ^b
<i>C. arabica</i> cv. Tupi IAC 1669-33	18,26 ± 1,25 ^f	2,00 ± 0,16 ^f	2,21 ± 0,14 ^b
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 3597	6,86 ± 0,55 ^a	1,68 ± 0,04 ^{de}	1,99 ± 0,10 ^b
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1655	6,11 ± 0,38 ^a	1,40 ± 0,10 ^{bc}	1,39 ± 0,08 ^a
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1650	7,35 ± 0,34 ^{ab}	1,57 ± 0,05 ^{cd}	2,09 ± 0,15 ^b
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14A	9,41 ± 0,57 ^{bc}	1,28 ± 0,06 ^{abc}	1,52 ± 0,15 ^a
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14B	9,18 ± 0,74 ^{bc}	1,08 ± 0,05 ^a	1,21 ± 0,08 ^a
<i>C. canephora</i> var. Laurentii	6,40 ± 0,56 ^a	1,09 ± 0,03 ^a	1,28 ± 0,08 ^a
<i>C. canephora</i> var. Bukobensis	6,77 ± 0,60 ^a	1,10 ± 0,03 ^a	1,24 ± 0,07 ^a
Controles positivos			
Rutina	0,78 ± 0,05	-	-
Trolox	-	0,20 ± 0,005	0,20 ± 0,01

^A IC₅₀ = concentração inibitória, *in vitro*, para reduzir em 50% o efeito oxidativo das espécies reativas no meio reacional testado (média das triplicatas ± desvio-padrão). Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A capacidade antioxidante dos extratos hidrofílicos de café foi influenciada pelo genótipo de café e pela espécie reativa avaliada. Quando a análise por agrupamento hierárquico foi aplicada utilizando como variáveis a capacidade redutora e a capacidade de desativar as ERO e ERN dos extratos hidrofílicos, foram formados dois grandes grupos (**Figura 2**). O primeiro grupo foi formado pelos três extratos de *C. arabica* e pelo extrato de *C. racemosa*. O segundo grupo foi formado pelos sete extratos de *C. canephora* e pelo extrato de *C. kapakata*.

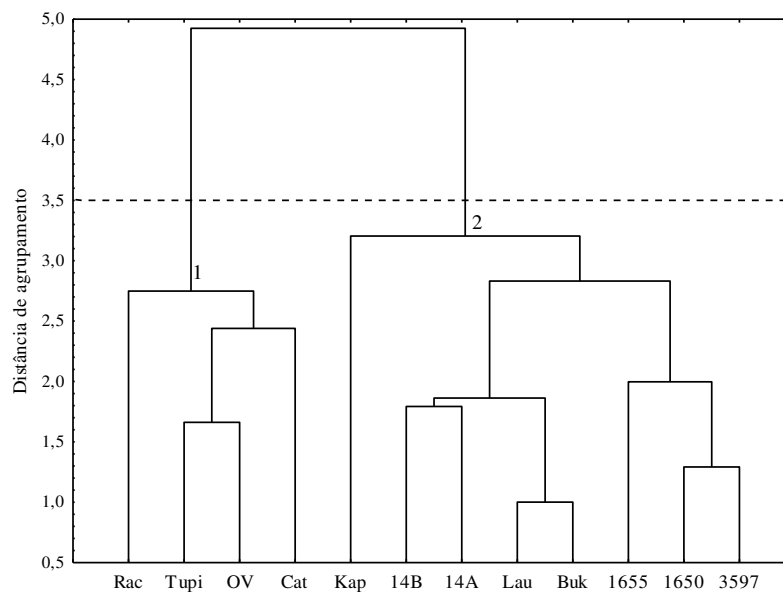


Figura 2. Dendrograma obtido na análise de agrupamento hierárquico usando a capacidade redutora e a capacidade dos extratos hidrofílicos de café de desativarem as ERO e ERN. Legenda: Rac: *C. racemosa*; Tupi: *C. arabica* cv. Tupi IAC 1669-33; OV: *C. arabica* cv. IAC Ouro Verde; Cat: *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC 144; Kap: *C. kapakata*; 14B: *C. canephora* var. Kouilou 70 Planta 14B; 14A: *C. canephora* var. Kouilou 70 Planta 14A; Lau: *C. canephora* var. Laurentii; Buk: *C. canephora* var. Bukobensis; 1655: *C. canephora* var. Robusta IAC 1655; 1650: *C. canephora* var. Robusta IAC 1650; 3597: *C. canephora* cv. Robusta IAC 3597.

Na análise de componentes principais também foi observada a formação de dois grandes grupos, os quais foram separados pela componente principal 1. O primeiro grupo está localizado à direita e o segundo grupo à esquerda (**Figura 3c**). Os extratos hidrofílicos pertencentes ao segundo grupo apresentaram maior capacidade redutora e maior capacidade de desativar o ROO^\bullet , o H_2O_2 , o HO^\bullet , o NO^\bullet e o ONOO^- do que os extratos hidrofílicos do primeiro grupo (**Figuras 3a e 3c**). Esta maior capacidade de desativar estas 5 espécies reativas está correlacionada positivamente com os teores de ácidos clorogênicos, de conjugados de cinamoil-aminoácido e de cafeína (**Figura 3b**).

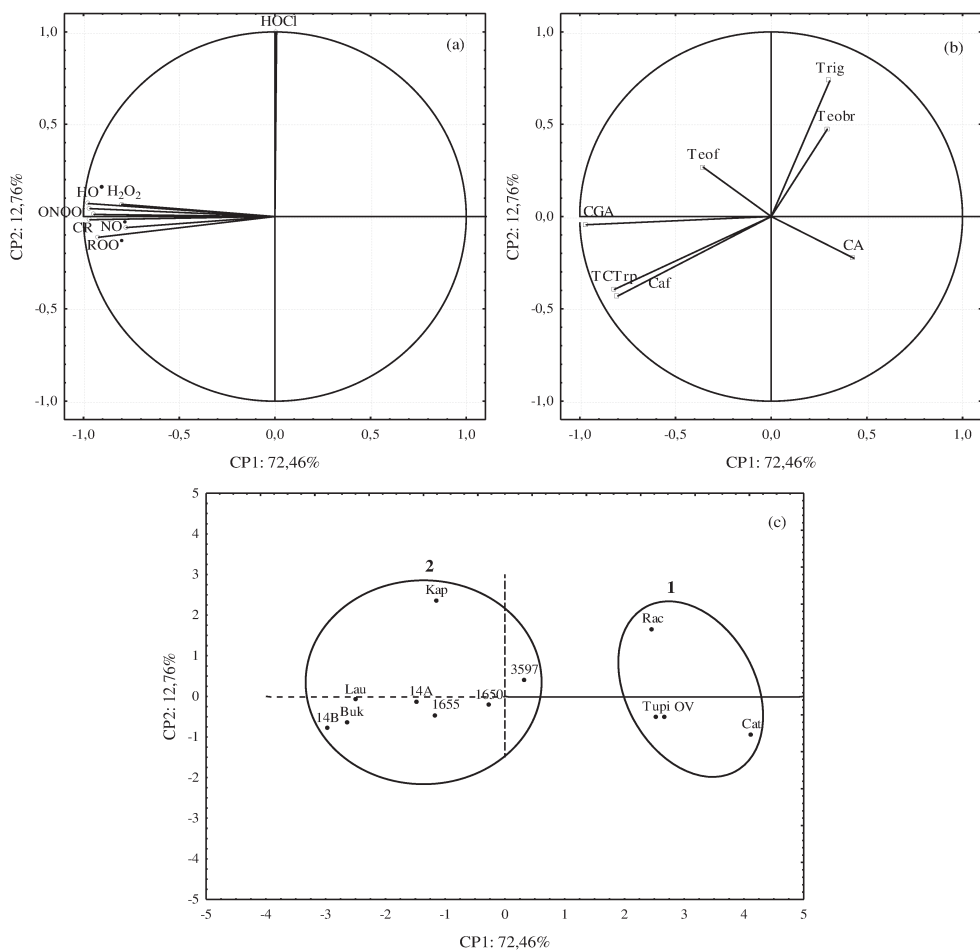


Figura 3. Análise de componentes principais da capacidade redutora e da capacidade dos extratos hidrofílicos de café de desativarem as ERO e ERN: projeção das variáveis ativas (a), projeção das variáveis suplementares (b) e gráfico dos extratos hidrofílicos de café (c). Legenda: CR: capacidade redutora; ROO•: radical peroxila; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HO•: radical hidroxila; HOCl: ácido hipocloroso; NO•: óxido nítrico; ONOO•: ânion peroxinitrito; CGA: ácidos clorogênicos; TCTrp: total de conjugados de cinamoil-aminoácido (cafeoiltriptofano, cafeoiltriptofano e *p*-cumaroiltriptofano); CA: ácido cafeico; Trig: trigonelina; Caf: cafeína; Teobr: teobromina; Teof: teofilina; Rac: *C. racemosa*; Tupi: *C. arabica* cv. Tupi IAC 1669-33; OV: *C. arabica* cv. IAC Ouro Verde; Cat: *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC 144; Kap: *C. kapakata*; 14B: *C. canephora* var. Kouilou 70 Planta 14B; 14A: *C. canephora* var. Kouilou 70 Planta 14A; Lau: *C. canephora* var. Laurentii; Buk: *C. canephora* var. Bukobensis; 1655: *C. canephora* var. Robusta IAC 1655; 1650: *C. canephora* var. Robusta IAC 1650; 3597: *C. canephora* cv. Robusta IAC 3597.

3.3 Estimativa da contribuição de cada composto bioativo na capacidade antioxidante

Dos cinco padrões analíticos de compostos bioativos presentes nos extratos hidrofílicos avaliados, o ácido 5-cafeoilquínico foi o principal responsável pela capacidade redutora e pela capacidade de desativar todas as ERO e ERN, com exceção do HOCl (**Tabela 7**). De fato, o ácido cafeico, a trigonelina, a cafeína e a teofilina não contribuíram

para a capacidade dos extratos desativarem as ERO e ERN, com exceção da contribuição da trigonelina na desativação do H₂O₂ (2,4 a 14,6%) e da contribuição do ácido cafeico na desativação do HOCl (1,5 a 2,0%).

Tabela 7. Estimativa (%) da contribuição de alguns padrões na capacidade redutora e na capacidade dos extratos hidrofílicos de café de desativarem as ERO e ERN.

Ensaio de desativação	5-CQA	Ácido cafeico	Trigonelina	Cafeína	Teofilina
CR	53-74%	0,03-0,07%	NC	0,1-0,4%	NC
ROO [•]	47-74%	0,03-0,08%	NC	0,01-0,02%	NC
*H ₂ O ₂	15-26%	NC	2,4-14,6%	NC	NC
*HO [•]	18-41%	NC	NC	NC	NC
*HOCl	0,7-2,9%	1,5-2,0%	NC	NC	NC
*NO [•]	9-25%	0,08-0,39%	NC	NC	NC
*ONOO ⁻ _a	36-48%	0,06-0,22%	NC	NC	NC
*ONOO ⁻ _p	33-49%	0,004-0,02%	NC	NC	NC

Cálculo da estimativa da contribuição está apresentado no item 2.7 do material e métodos. *relativo à capacidade do extrato hidrofílico inibir 50% da oxidação (IC₅₀). NC= não contribuiu. CR: capacidade redutora; ROO[•]: radical peroxila; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HO[•]: radical hidroxila; HOCl: ácido hipocloroso; NO[•]: óxido nítrico; ONOO⁻_a: ânion peroxinitrito na ausência de NaHCO₃; ONOO⁻_p: ânion peroxinitrito na presença de NaHCO₃; 5-CQA: ácido 5-cafeoilquinico.

3.4 Capacidade dos extratos lipofílicos de desativarem as ERO e ERN

A capacidade desativadora frente ao ROO[•] dos extratos lipofílicos variou entre 5,63 e 12,94 μM ET/g (**Tabela 8**). Os extratos lipofílicos de *C. racemosa* e dos 3 cultivares de *C. arabica* foram os mais eficientes em desativar o ROO[•], apesar de apresentarem capacidade desativadora cerca de 200 vezes menor do que a do α-tocoferol (2596 ± 235 μM ET/g), usado como controle positivo.

Nos ensaios de desativação do H₂O₂, do NO[•] e do ONOO⁻ os extratos lipofílicos foram completamente solubilizados em DMSO e para o ensaio de desativação do HOCl em etanol, seguido de diluições no mesmo solvente. Ao adicionar o extrato lipofílico diluído em solvente na microplaca, contendo o gerador de radical e a sonda solubilizados em tampão, o meio reacional formou uma suspensão (**Figura Suplementar S5**) com características de absorção entre 480 e 530 nm (**Tabela Suplementar S3**). A completa solubilização do extrato lipofílico no meio reacional dos ensaios de desativação do H₂O₂,

do HOCl, do NO[•] e do ONOO⁻ ocorreu somente em concentrações inferiores a 20 µg/mL. Nesta concentração, todos os extratos lipofílicos desativaram o HOCl e o ONOO⁻ (ausência e presença de NaHCO₃ 25 mM) com inibição da oxidação entre 5 e 36% (**Tabela 8**). Estes resultados indicam que os extratos lipofílicos de sementes de café apresentam potencial em desativar o HOCl e o ONOO⁻ e reforçam a necessidade do desenvolvimento de novos ensaios de desativação que apresentem o gerador de radical e a sonda com características lipofílicas. Não podemos descartar a possibilidade de os extratos lipofílicos serem capazes de desativar o H₂O₂ e o NO[•], tendo em vista que foram avaliados em concentrações baixas devido ao limitante de solubilidade.

Tabela 8. Capacidade de extratos lipofílicos de café de desativarem o radical peroxila (ROO[•]), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ácido hipocloroso (HOCl), o óxido nítrico (NO[•]) e o ânion peroxinitrito (ONOO⁻).

Extratos lipofílicos	ROO [•] ^A	H ₂ O ₂	HOCl	NO [•]	ONOO ⁻	
					Ausência de NaHCO ₃	Presença de NaHCO ₃
<i>C. kapakata</i>	6,37 ± 0,51 ^{ef}	NA ^B	19 ^{(10%)*}	NA	20 ^{(11%)*}	20 ^{(26%)*}
<i>C. racemosa</i>	12,94 ± 0,96 ^a	NA	19 ^{(29%)*}	NA	20 ^{(27%)*}	19 ^{(36%)*}
<i>C. arabica</i> cv. Catuaí Vermelho IAC 144	11,39 ± 0,99 ^b	NA	18 ^{(19%)*}	NA	21 ^{(14%)*}	21 ^{(18%)*}
<i>C. arabica</i> cv. IAC Ouro Verde	10,27 ± 1,10 ^{bc}	NA	20 ^{(21%)*}	NA	20 ^{(7%)*}	20 ^{(17%)*}
<i>C. arabica</i> cv. Tupi IAC 1669-33	9,46 ± 1,24 ^c	NA	19 ^{(19%)*}	NA	22 ^{(10%)*}	20 ^{(22%)*}
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 3597	8,34 ± 0,29 ^{cd}	NA	19 ^{(13%)*}	NA	20 ^{(6%)*}	20 ^{(12%)*}
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1655	6,90 ± 0,78 ^{def}	NA	18 ^{(10%)*}	NA	22 ^{(9%)*}	21 ^{(19%)*}
<i>C. canephora</i> var. Robusta IAC 1650	6,86 ± 0,64 ^{def}	NA	20 ^{(11%)*}	NA	19 ^{(12%)*}	20 ^{(19%)*}
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14A	5,63 ± 0,48 ^f	NA	18 ^{(13%)*}	NA	21 ^{(5%)*}	62 ^{(20%)*}
<i>C. canephora</i> var. Kouilou 70 Planta 14B	7,45 ± 0,35 ^{de}	NA	20 ^{(13%)*}	NA	21 ^{(14%)*}	20 ^{(17%)*}
<i>C. canephora</i> var. Laurentii	7,57 ± 0,73 ^{de}	NA	19 ^{(12%)*}	NA	20 ^{(14%)*}	20 ^{(22%)*}
<i>C. canephora</i> var. Bukobensis	6,94 ± 0,38 ^{def}	NA	20 ^{(11%)*}	NA	21 ^{(12%)*}	20 ^{(19%)*}

^A µmol de equivalente ao trolox/g de extrato lipofílico (média ± desvio-padrão). ^B NA= nenhuma atividade foi encontrada na máxima concentração avaliada (20 µg/mL). * Capacidade desativadora (sobrescrito) na máxima concentração avaliada (µg/mL).

4 Discussão

Este estudo mostrou que extratos hidrofílicos de café de diferentes genótipos são capazes de desativar as principais ERO (ROO^\bullet , H_2O_2 , HO^\bullet , HOCl) e ERN (NO^\bullet , ONOO^-) de importância biológica. Além disso, possivelmente são capazes de desativar o NO_2^\bullet e o $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Os extratos hidrofílicos de sete variedades de *C. canephora* e de *C. kapakata* destacaram-se pela elevada eficiência em desativar o ROO^\bullet , o H_2O_2 , o HO^\bullet , o NO^\bullet e o ONOO^- . O conteúdo de ácido 5-cafeoilquínico foi o principal responsável pela capacidade antioxidante frente a estas ERO e ERN (**Tabela 7**).

O ácido 5-cafeoilquínico é o principal composto fenólico encontrado no café, correspondendo a 52% e 68% dos ácidos clorogênicos totais presentes nos extratos hidrofílicos de *C. canephora* e *C. kapakata*, respectivamente. O ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), bem como os isômeros 3-CQA e 4-CQA, são formados pela esterificação de uma molécula de ácido cafeico com o ácido quínico, e apresentam na sua estrutura um grupo catecol. Nos extratos hidrofílicos de café também estão presentes outros compostos que contêm grupos catecóis na sua estrutura, tais como: os ácidos dicafeoilquínicos, os ácidos cafeoilferuloilquínicos, a cafeoil tirosina e o cafeoil triptofano. Destes, podemos destacar os ácidos dicafeoilquínicos que apresentam dois grupos catecóis na sua estrutura, os quais conferem uma alta capacidade antioxidante frente ao radical DPPH e ao radical ânion superóxido (Iwai et al., 2004). Esta característica estrutural dos ácidos dicafeoilquínicos aliado à elevada concentração nos extratos hidrofílicos de *C. canephora* e *C. kapakata* provavelmente contribuiu para a eficiente capacidade desativadora destes extratos frente ao ROO^\bullet , H_2O_2 , HO^\bullet , NO^\bullet e ONOO^- .

Os compostos fenólicos podem desativar o ROO^\bullet e o HO^\bullet através da transferência de átomos de hidrogênio, da transferência de elétrons e da adição à ligação dupla (Horstman et al., 2002; Anouar et al., 2009). Os três mecanismos podem ocorrer, porém a desativação do ROO^\bullet pelos compostos fenólicos ocorre principalmente pela transferência de um átomo de hidrogênio (Ou et al., 2001). A literatura também relata a capacidade de compostos fenólicos desativarem o ONOO^- , o qual pode ser desativado através de dois mecanismos, dependendo das características estruturais do composto fenólico. Os monofenóis, como os ácidos feruloilquínico, *p*-cumaroilquínico atuam preferencialmente através da nitração e os catecóis, como os ácidos cafeico, cafeoilquínico, dicafeoilquínico e

os conjugados de cinamoil-aminoácido atuam através da doação de elétrons (Pannala et al., 1998).

Os extratos hidrofílicos foram potentes desativadores do HOCl apresentando uma capacidade desativadora em média seis vezes maior do que a da cisteína. Dentre os compostos bioativos avaliados somente os ácidos 5-cafeoilquínico e cafeico contribuíram na desativação desta ERO, apesar de contribuírem com menos do que 3% do valor de IC₅₀ (**Tabela 7**). Já foi reportado que os compostos fenólicos são capazes de desativar o HOCl através da doação de dois elétrons do anel fenólico, formando uma orto-quinona (Kono et al., 1995). O HOCl, um oxidante de dois elétrons, é particularmente reativo com tióis e resíduos de metionina, podendo também converter grupos amina a cloraminas (Winterbourn, 2008). Sendo assim, a desativação do HOCl pelos extratos hidrofílicos provavelmente está relacionada à presença de outros compostos capazes de transferir dois elétrons, como proteínas e aminoácidos.

Os resultados deste estudo mostram que o genótipo é uma característica determinante nos teores dos compostos bioativos do café. Além disso, indica que as espécies *C. canephora* e *C. kapakata* são as mais promissoras para serem utilizadas como fonte de compostos antioxidantes hidrofílicos para a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Material Suplementar

Figura Suplementar S1. Frutos de café colhidos de doze cafeeiros do IAC pertencentes a quatro espécies.

Figura Suplementar S2. Sementes de café cru de doze genótipos pertencentes a quatro espécies.

Figura Suplementar S3. Extratos hidrofílicos de café pertencentes a quatro espécies.

Figura Suplementar S4. Extratos lipofílicos de café pertencentes a quatro espécies.

Figura Suplementar S5. Meio reacional do ensaio de desativação do ONOO⁻ (volume cinco vezes maior do que usado na microplaca) contendo o extrato lipofílico de *C. arabica*

cv. IAC Ouro Verde solubilizado em DMSO em seis concentrações (20, 100, 200, 500, 1000 e 2000 µg/mL) e sem o extrato lipofílico (DMSO).

Tabela Suplementar S1. Conteúdo de isômeros de ácido cafeoilquínico (CQA), de ácido feruloilquínico (FQA), de ácido *p*-cumaroilquínico (*p*-CoQA) e de ácido dicafeoilquínico (di-CQA) em extratos hidrofílicos de café.

Tabela Suplementar S2. Conteúdo de isômeros de ácido cafeoilferuloilquínico (CFQA) e de conjugados de ácido cinâmico com aminoácido (CTrp e *p*-CoTrp) em extratos hidrofílicos de grãos de café.

Tabela Suplementar S3. Absorbância do meio reacional do ensaio de desativação do ONOO⁻ contendo o extrato lipofílico de *C. arabica* cv. IAC Ouro Verde solubilizado em DMSO.

Referências

- Aguiar, A.T.E., Fazuoli, L.C., Salva, T.J.G., Favarin, J.L., 2005. Chemical diversity in coffee species of genebank of Instituto Agronômico do estado de São Paulo. *Crop Breed. Appl. Biot.* 5, 460-466.
- Almeida, A.A., Farah, A., Silva, D.A.M., Nunam, E.A., Glória, M.B.A., 2006. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J. Agric. Food. Chem.* 54, 8738-8743.
- Alves, R.C., Casal, S., Alves, M.R., Oliveira, M.B, 2009. Discrimination between Arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. *Food Chem.* 114, 295-299.
- Anouar, E., Kosinová, P., Kozłowski, D., Mokrini, R., Duroux, J.L., Trouillas, P., 2009. New aspects of the antioxidant properties of phenolic acids: a combined theoretical and experimental approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 7659-7668.
- Bertrand, B., Guyot, B., Anthony, P., Lachermes, P., 2003. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theor. Appl. Genet.* 107, 387-394.
- Butt, M.S., Sultan, M.T., 2011. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit. Rev. Food Sci.* 51, 363-373.

- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N., 2003. Hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 2900-2911.
- Clifford, M.N., Knight, S., 2004. The cinnamoyl-amino acid conjugates of green robusta coffee beans. *Food Chem.* 87, 457-463.
- Dias, R.C.E., Campanha, F.G., Vieira, L.G.E., Ferreira, L.P., Pot, D., Marraccini, P., Benassi, M.T., 2010. Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by a new high-performance liquid chromatography methodology. *J. Agric. Food. Chem.* 58, 88-93.
- Davis, A.P., Govaerts, R., Bridson, D.M., Stoffelen, P., 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 152, 465-512.
- Esquivel, P., Jiménez, V.M., 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res. Int.* 46, 488-495.
- Farah, A., 2009. Coffee as a speciality and functional beverage. In: Paquin, P. *Functional and Speciality Beverage Technology*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, cap. 15, p. 370-395.
- Farah, A., De Paulis, T., Trugo, L.C., Martin, P.R., 2005. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 1505-1513.
- Gomes, A., Fernandes, E., Silva, A.M.S., Santos, C.M.M., Pinto, D.C.G.A., Cavaleiro, J.A.S., Lima, J.L.F.C., 2007. 2-Styrylchromones: novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6027-6036.
- Heck, C.I., Mejia, E.G., 2007. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci.* 72, 138-151.
- Horstman, J.A., Wrona, M.Z., Dryhurst, G., 2002. Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. *Bioorg. Chem.* 30, 371-382.
- ICO - International Coffee Organization., 2012. Coffee market report - august 2012. Disponível em: <<http://dev.ico.org/documents/wsiteenglish/edletter-11-e.htm>>. Acesso em 20 jan. 2013.
- Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., Fujita, T., 2004. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 4893-4898.

- Ju, J., Picinich, S.C., Yang, Z., Zhao, Y., Suh, N., Kong, A., Yang, C.S., 2010. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis* 31, 533-542.
- Kono, Y., Shibata, H., Kodama, Y., Ueda, A., Sawa, Y., 1995. Chlorogenic acid as a natural scavenger for hypochlorous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 972-978.
- Kozuma, K., Tsuchiya, S., Kohori, J., Hase, T., Tokimitsu, I., 2005. Antihypertensive effect of green coffee bean extract on mildly hypertensive subjects. *Hypertens. Res.* 28, 711-718.
- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hébert, R., Helliwell, B., Hill, G.B., McDowell, I., 2002. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian study of health and aging. *Am. J. Epidemiol.* 156, 445-53.
- Nkondjock, A., 2009. Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. *Cancer Lett.* 277, 121-125.
- Ochiai, R., Jokura, H., Suzuki, A., Tokimitsu, I., Ohishi, M., Komai, N., Rakugi, H., Ohigara, T. 2004. Green coffee bean extract improves human vasoreactivity. *Hypertens. Res.* 27, 731-737.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619-4626.
- Pannala, A.S., Razaq, R., Halliwell, B., Singh, S., Rice-Evans, C.A., 1998. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radical Bio. Med.* 24, 594-606.
- Perrone, D., Farah, A., Donangelo, C.M., De Paulis, T., Martin, P.R., 2008. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chem.* 106, 859-867.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R., 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 3273-3279.
- Poerner-Rodrigues, N. & Bragagnolo, N., 2012. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MSⁿ, of bioactive compounds in coffee brews. Submitted to the *Journal of Food Composition and Analysis*.

- Poerner-Rodrigues, N., Benassi, M.T., Bragagnolo, N., 2013. Correlação, através de análise multivariada, entre a composição de compostos bioativos e a capacidade de desativar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio de bebidas de café. Será submetido à revista *Food Research International*.
- Ranheim, T., Halvorsen, B., 2005. Coffee consumption and human health - beneficial or detrimental? - Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 274-84.
- Rodrigues, E., Mariutti, L.R.B., Chisté, R.C., Mercadante, A.Z., 2012a. Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: application to carotenoids and structure-activity relationship. *Food Chem.* 135, 2103-2111.
- Rodrigues, E., Mariutti, L.R.B., Faria, A.F., Mercadante, A.Z., 2012b. Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chem.* 134, 704-711.
- Roos, B., Weg, G., Urgert, R., Bovenkamp, P., Charrier, A., Katan, M.B., 1997. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 3065-3069.
- Santos, M.D., Almeida, M.C., Lopes, N.P., Souza, G.E.P., 2006. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antypiretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 2236-2240.
- Shahidi, F., Chandrasekara, A., 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem. Rev.* 9, 147-170.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16, 144-158.
- Speer, K., Kölling-Speer, I. The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J. Plant Phys.* 18, 201-216, 2006.
- Squadrito, G.L., Pryor, W.A., 1998. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxy nitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Bio. Med.* 25, 392-403.
- Tanaka, K., Nishizono, S., Tamaru, S., Kondo, M., Shimoda, H., Tanaka, J., Okada, T. 2009. Anti-obesity and hypotriglyceridemic properties of coffee bean extract in SD rats. *Food Sci. Technol. Res.* 15, 147-152.

- Vinson, J.A., Burnham, B.R., Nagendran, M.V. 2012. Randomized, double-blind, placebo-controlled, linear dose, crossover study to evaluate the efficacy and safety of a green coffee bean extract in overweight subjects. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 5, 21-27.
- Winterbourn, C.C., 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4, 278-286.



Figura Suplementar S1. Frutos de café colhidos de doze cafeeiros do IAC pertencentes a quatro espécies: *C. kapakata*, *C. racemosa*, *C. arabica* (cv. Catuaí Vermelho IAC 144, cv. IAC Ouro Verde, cv. Tupi IAC 1669-33) e *C. canephora* (var. Robusta IAC 3597, var. Robusta IAC 1655, var. Robusta IAC 1650, var. Kouilou 70 Planta 14A, var. Kouilou 70 Planta 14B, var. Laurentii, var. Bukobensis).



Figura Suplementar S2. Sementes de café cru de doze genótipos pertencentes a quatro espécies: *C. kapakata*, *C. racemosa*, *C. arabica* (cv. Catuaí Vermelho IAC 144, cv. IAC Ouro Verde, cv. Tupi IAC 1669-33) e *C. canephora* (var. Robusta IAC 3597, var. Robusta IAC 1655, var. Robusta IAC 1650, var. Kouilou 70 Planta 14A, var. Kouilou 70 Planta 14B, var. Laurentii, var. Bukobensis).

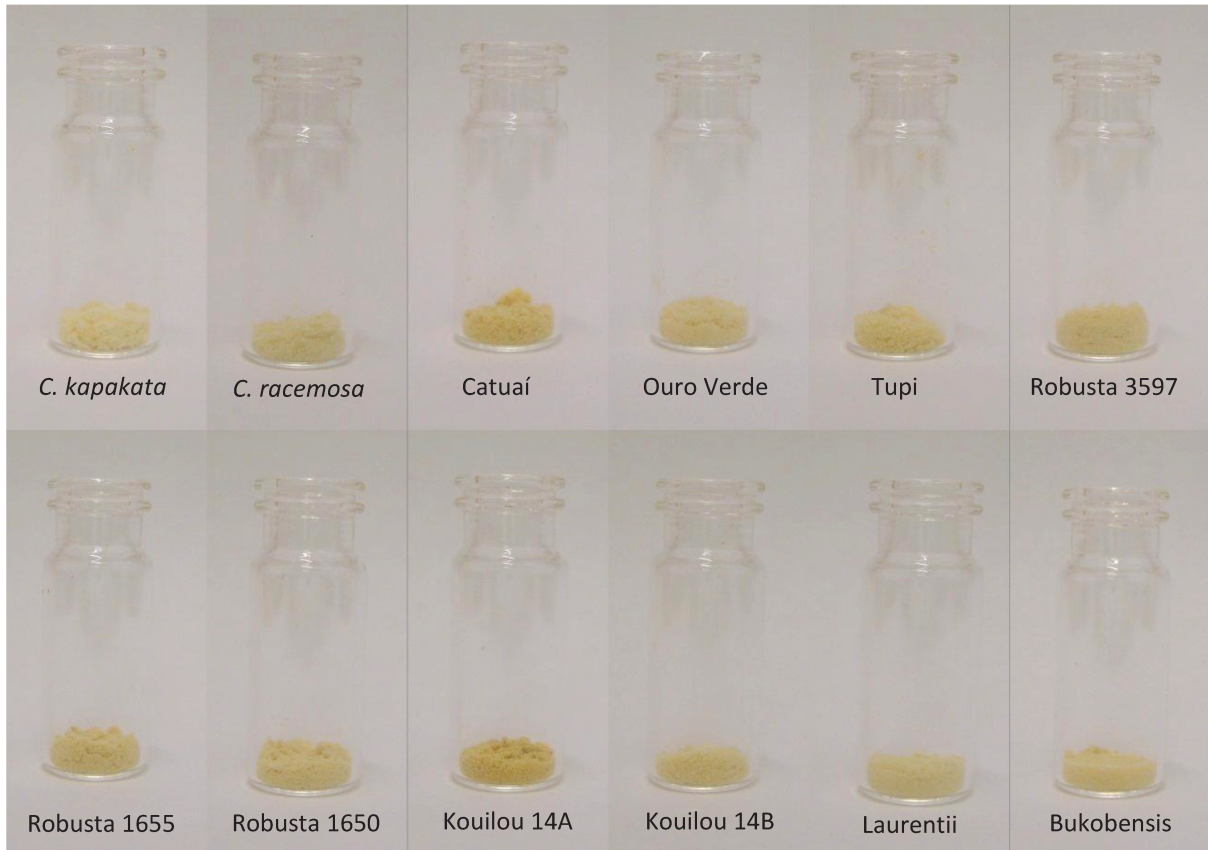


Figura Suplementar S3. Extratos hidrofílicos de café pertencentes a quatro espécies: *C. kapakata*, *C. racemosa*, *C. arabica* (cv. Catuai Vermelho IAC 144, cv. IAC Ouro Verde, cv. Tupi IAC 1669-33) e *C. canephora* (var. Robusta IAC 3597, var. Robusta IAC 1655, var. Robusta IAC 1650, var. Kouilou 70 Planta 14A, var. Kouilou 70 Planta 14B, var. Laurentii, var. Bukobensis).



Figura Suplementar S4. Extratos lipofílicos de café pertencentes a quatro espécies: *C. kapakata*, *C. racemosa*, *C. arabica* (cv. Catuaí Vermelho IAC 144, cv. IAC Ouro Verde, cv. Tupi IAC 1669-33) e *C. canephora* (var. Robusta IAC 3597, var. Robusta IAC 1655, var. Robusta IAC 1650, var. Kouilou 70 Planta 14A, var. Kouilou 70 Planta 14B, var. Laurentii, var. Bukobensis).

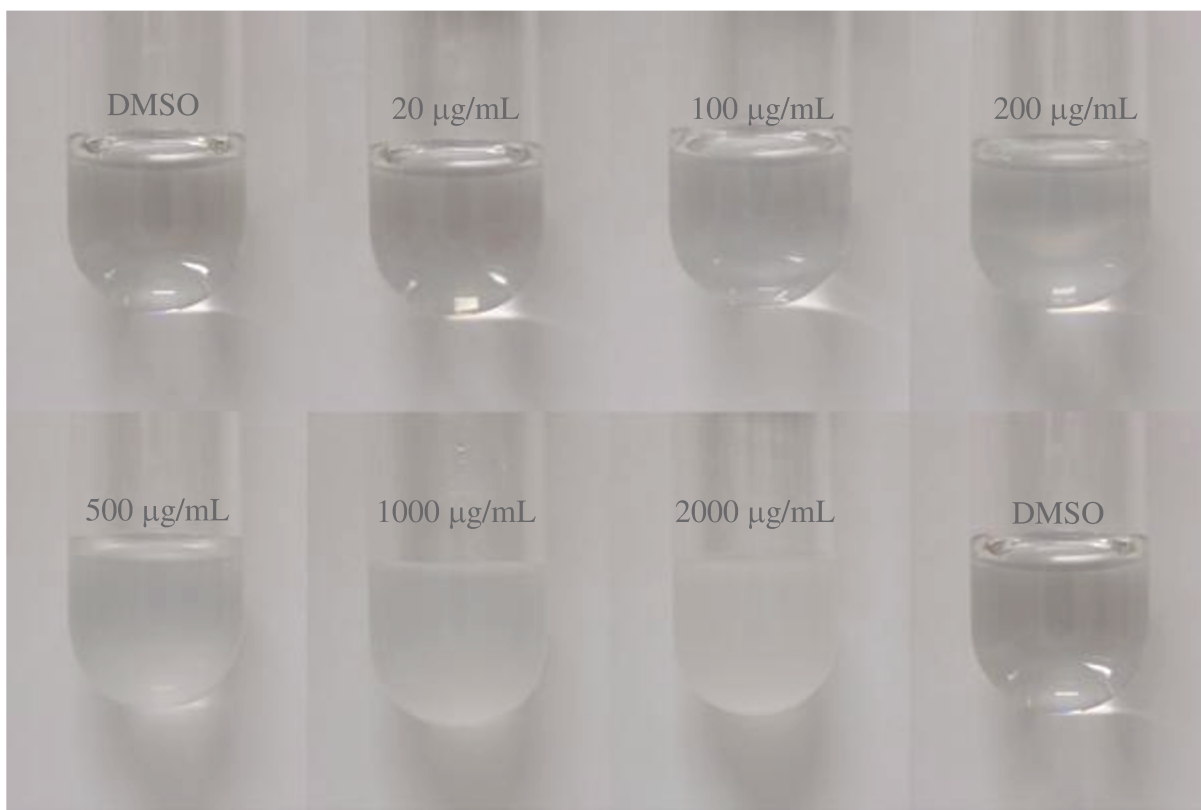


Figura Suplementar S5. Meio reacional do ensaio de desativação do ONOO^- (volume cinco vezes maior do que usado na microplaca) contendo o extrato lipofílico de *C. arabica* cv. IAC Ouro Verde solubilizado em DMSO em seis concentrações (20, 100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$) e sem o extrato lipofílico (DMSO).

Tabela Suplementar S1. Conteúdo de isômeros de ácido cafeoilquínico (CQA), de ácido feruloilquínico (FQA), de ácido *p*-cumaroilquínico (*p*-CoQA) e de ácido dicafeoilquínico (di-CQA) em extratos hidrofílicos de café.

Extratos hidrofílicos ^A	3-CQA	4-CQA	5-CQA	3-FQA	4-FQA	5-FQA	3- <i>p</i> CoQA	4- <i>p</i> CoQA	5- <i>p</i> CoQA	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA
<i>C. kapakata</i>	1055 ± 6 ^{fg}	1874 ± 12 ^g	22780 ± 176 ^a	49,0 ± 2,2 ^h	160 ± 1 ^f	1620 ± 10 ^g	10,5 ± 1,2 ^g	21,4 ± 0,6 ^e	199 ± 1 ^b	864 ± 4 ^d	1777 ± 10 ^g	2310 ± 9 ^a
<i>C. racemosa</i>	1436 ± 34 ^{de}	3357 ± 66 ^{ab}	15070 ± 356 ^{fg}	15,3 ± 0,9 ^c	88,7 ± 2,4 ^g	699 ± 16 ^e	24,6 ± 0,8 ^e	50,1 ± 2,8 ^b	111 ± 5 ^d	547 ± 16 ^f	2603 ± 77 ^b	558 ± 19 ^f
cv. Catuaí	1434 ± 35 ^{de}	2079 ± 46 ^{ef}	14416 ± 328 ^g	87,9 ± 5,7 ^{ef}	218 ± 4 ^e	1391 ± 34 ^{gh}	33,6 ± 0,6 ^{bc}	41,9 ± 0,5 ^c	208 ± 5 ^b	702 ± 19 ^e	1764 ± 50 ^g	326 ± 9 ^h
cv. Ouro Verde	1462 ± 32 ^{de}	2122 ± 47 ^{de}	15482 ± 290 ^{ef}	61,2 ± 2,7 ^{gh}	179 ± 2 ^f	1141 ± 21 ^h	31,1 ± 1 ^{cd}	40,3 ± 0,3 ^c	202 ± 5 ^b	672 ± 12 ^e	1975 ± 39 ^{ef}	346 ± 8 ^{gh}
cv. Tupi	1605 ± 86 ^d	2283 ± 26 ^d	16192 ± 12 ^{def}	66,4 ± 5,6 ^{gh}	233 ± 1 ^e	1448 ± 9 ^{gh}	41,6 ± 1,5 ^a	54,9 ± 2,4 ^a	269 ± 7 ^a	628 ± 25 ^{ef}	1834 ± 69 ^{fg}	406 ± 14 ^g
var. Robusta 3597	1361 ± 51 ^e	1984 ± 69 ^{efg}	15521 ± 567 ^{ef}	141 ± 9 ^c	473 ± 17 ^c	4370 ± 147 ^{ef}	15,2 ± 1,2 ^f	18,1 ± 0,2 ^e	79,5 ± 3 ^f	1520 ± 47 ^b	2029 ± 74 ^{ef}	1381 ± 57 ^b
var. Robusta 1655	958 ± 29 ^g	1646 ± 47 ^h	16450 ± 468 ^{de}	156 ± 0 ^{bc}	648 ± 10 ^a	7385 ± 208 ^a	9,0 ± 0,1 ^{gh}	13,3 ± 0,8 ^f	97,5 ± 4,3 ^e	1428 ± 48 ^{bc}	2437 ± 86 ^{bc}	709 ± 25 ^e
var. Robusta 1650	1101 ± 11 ^f	1916 ± 25 ^{fg}	19100 ± 160 ^{bc}	98,7 ± 3,7 ^e	453 ± 5 ^c	5308 ± 45 ^c	7,2 ± 0,5 ^h	2,7 ± 0,2 ^g	60,7 ± 0,3 ^g	1513 ± 20 ^b	3530 ± 49 ^a	808 ± 11 ^d
var. Kouilou 14A	2087 ± 70 ^c	2742 ± 123 ^c	16834 ± 574 ^d	190 ± 9 ^a	591 ± 26 ^b	4905 ± 179 ^d	34,6 ± 1,1 ^b	41,2 ± 1,1 ^c	110 ± 4 ^d	1509 ± 63 ^b	1652 ± 71 ^g	698 ± 29 ^e
var. Kouilou 14B	2553 ± 50 ^b	3293 ± 68 ^b	18999 ± 365 ^c	165 ± 5 ^b	575 ± 25 ^b	6004 ± 132 ^b	33,1 ± 0,6 ^{bc}	33,4 ± 1,7 ^d	103 ± 3 ^{de}	1403 ± 34 ^c	2139 ± 53 ^{de}	703 ± 17 ^e
var. Laurentii	1138 ± 16 ^f	1897 ± 46 ^g	20089 ± 238 ^b	76,7 ± 2,7 ^{fg}	336 ± 5 ^d	4286 ± 59 ^f	29,9 ± 0,8 ^d	34,2 ± 1,1 ^d	170 ± 3 ^c	1742 ± 35 ^a	3698 ± 81 ^a	885 ± 22 ^c
var. Bukobensis	2756 ± 33 ^a	3525 ± 39 ^a	19132 ± 224 ^{bc}	119 ± 10 ^d	478 ± 5 ^c	4633 ± 39 ^{de}	41,8 ± 0,3 ^a	39,6 ± 1,1 ^c	102 ± 4 ^{de}	1505 ± 27 ^b	2279 ± 52 ^{cd}	781 ± 21 ^d

^A Os resultados correspondem a média das triplicatas ± desvio padrão, expressos em mg/100 g de extrato hidrofílico. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela Suplementar S2. Conteúdo de isômeros de ácido cafeoilferuloilquínico (CFQA), *p*-cumaroilcafeoilquínico (*p*CoCQA), dimetoxicinamoilquínico (DCQA e DFQA) e de conjugados de cinamoil-aminoácido (CTir, CTrp e *p*-CoTrp) em extratos hidrofílicos de café.

Extratos hidrofílicos ^A	3C,4FQA	3C,5FQA	4F,5CQA	4C,5FQA	3 <i>p</i> Co,4CQA	4D,5CQA	4D,5FQA	CTir	CTrp	<i>p</i> -CoTrp
<i>C. kapakata</i>	122 ± 1 ^d	155 ± 0,4 ^g	130 ± 0,4 ^b	239 ± 2 ^{ef}	24,4 ± 0,5 ^{efg}	11,9 ± 0,8 ^e	nd	nd	nd	nd
<i>C. racemosa</i>	12,9 ± 0,1 ^e	60,5 ± 1,9 ^h	15,0 ± 0,9 ^e	37,3 ± 2,8 ^g	7,7 ± 0,7 ^h	nd	nd	nd	nd	nd
cv. Catuaí	40,6 ± 1,5 ^e	40,3 ± 0,5 ^h	10,4 ± 0,7 ^e	25,5 ± 0,4 ^g	39,2 ± 1,4 ^b	12,2 ± 0,6 ^e	nd	nd	26,5 ± 0,8 ^g	nd
cv. Ouro Verde	31,2 ± 0,5 ^e	34,3 ± 0,5 ^h	9,0 ± 0,8 ^e	20,0 ± 0,6 ^g	33,5 ± 1,5 ^c	11,3 ± 0,3 ^e	nd	nd	27,0 ± 1,0 ^g	nd
cv. Tupi	31,0 ± 1,7 ^e	36,5 ± 1,8 ^h	11,1 ± 1,3 ^e	30,3 ± 0,6 ^g	40,0 ± 1,9 ^b	21,1 ± 0,9 ^e	nd	nd	83,3 ± 3,8 ^f	17,6 ± 0,8 ^f
var. Robusta 3597	398 ± 16 ^b	403 ± 18 ^d	149 ± 7 ^a	491 ± 19 ^a	31,3 ± 0,7 ^{cd}	42,0 ± 2,1 ^{cd}	nd	122 ± 7,8 ^c	466 ± 17 ^e	83,6 ± 2,9 ^d
var. Robusta 1655	408 ± 9 ^{ab}	473 ± 17 ^b	103 ± 5 ^c	289 ± 10 ^d	23,5 ± 2,0 ^{fg}	50,9 ± 2,7 ^c	nd	11,4 ± 0,7 ^d	446 ± 17 ^e	272 ± 7 ^a
var. Robusta 1650	372 ± 3 ^{bc}	531 ± 5 ^a	65,8 ± 1,2 ^d	249 ± 1 ^{ef}	28,3 ± 0,6 ^{de}	28,7 ± 1,6 ^{de}	nd	23,6 ± 0,3 ^d	567 ± 9 ^c	167 ± 7 ^b
var. Kouilou 14A	376 ± 12 ^{bc}	268 ± 11 ^f	74,7 ± 3,4 ^d	232 ± 9 ^f	22,4 ± 1,7 ^g	53,8 ± 1,6 ^c	nd	176 ± 7 ^b	519 ± 20 ^d	50,0 ± 1,9 ^e
var. Kouilou 14B	443 ± 10 ^a	439 ± 12 ^c	139 ± 4 ^{ab}	428 ± 12 ^b	28,4 ± 1,8 ^{de}	422 ± 13 ^a	62,9 ± 2,3 ^a	214 ± 5 ^a	692 ± 20 ^b	120 ± 8 ^c
var. Laurentii	348 ± 9 ^c	449 ± 17 ^{bc}	93,5 ± 1,6 ^c	259 ± 5 ^e	61,1 ± 2,3 ^a	nd	nd	17,5 ± 0,9 ^d	815 ± 18 ^a	283 ± 8 ^a
var. Bukobensis	372 ± 45 ^{bc}	336 ± 14 ^e	138 ± 7 ^b	316 ± 9 ^c	27,6 ± 0,4 ^{def}	218 ± 13 ^b	24,7 ± 1,2 ^b	113 ± 5 ^c	551 ± 13 ^{cd}	104 ± 3 ^c

^A Os resultados correspondem a média das triplicatas ± desvio padrão, expressos em mg/100 g de extrato hidrofílico. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). ^B nd: não detectado.

Tabela Suplementar S3. Absorbância do meio reacional do ensaio de desativação do ONOO⁻ contendo o extrato lipofílico de *C. arabica* cv. IAC Ouro Verde solubilizado em DMSO.

Extrato lipofílico (µg/mL)	Absorbância			
	480 nm	490 nm	520 nm	530 nm
0	0,045	0,044	0,043	0,043
20	0,045	0,044	0,043	0,042
100	0,082	0,080	0,076	0,075
200	0,150	0,147	0,138	0,136
500	0,314	0,309	0,296	0,292
1000	0,565	0,550	0,510	0,498
2000	0,880	0,872	0,850	0,842

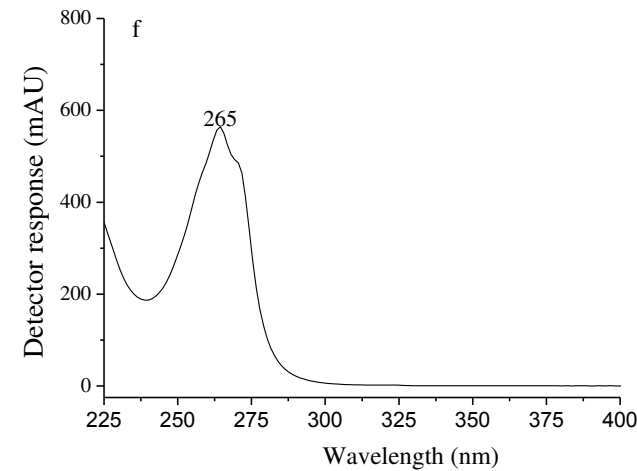
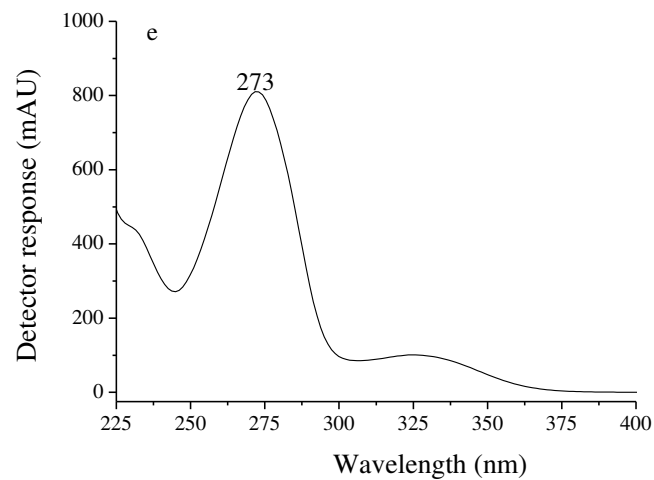
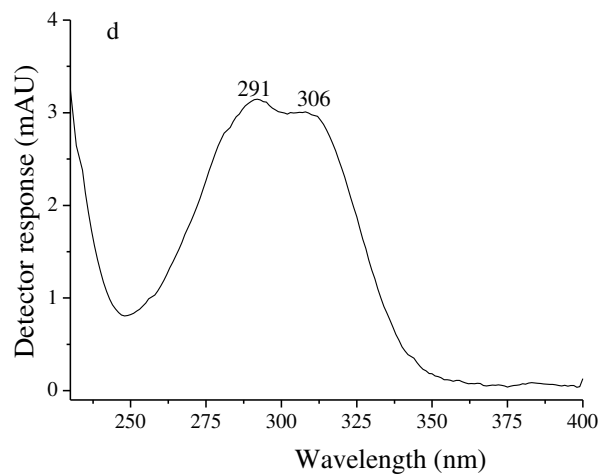
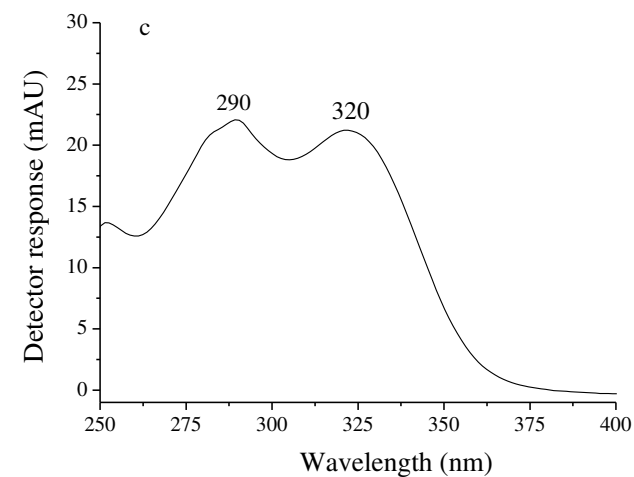
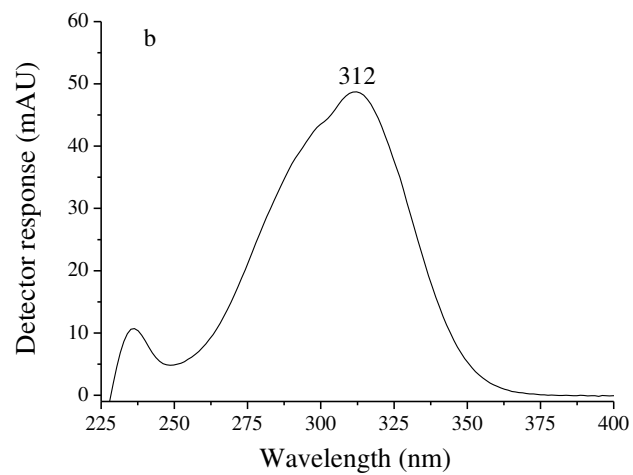
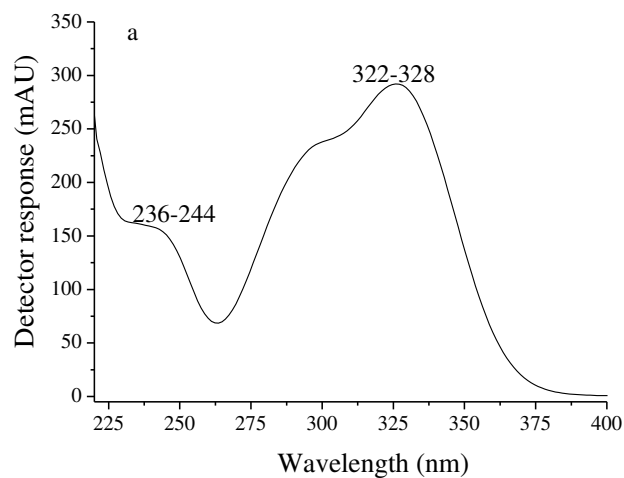
CONCLUSÃO GERAL

Os resultados do presente estudo mostram que as bebidas de café são potentes desativadoras *in vitro* das principais espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio de relevância biológica, como o ROO•, o HO•, o H₂O₂, o HOCl, o NO• e o ONOO⁻, sendo a eficiência de desativação determinada pelo conteúdo de ácidos clorogênicos e de compostos escuros formados durante a reação de Maillard. A elevada capacidade das bebidas de café desativarem as ERO e ERN sugere que a desativação destas espécies reativas pode ser um dos mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos relacionado ao consumo de bebidas de café, tal como a redução do risco de desenvolvimento de algumas doenças crônico-degenerativas.

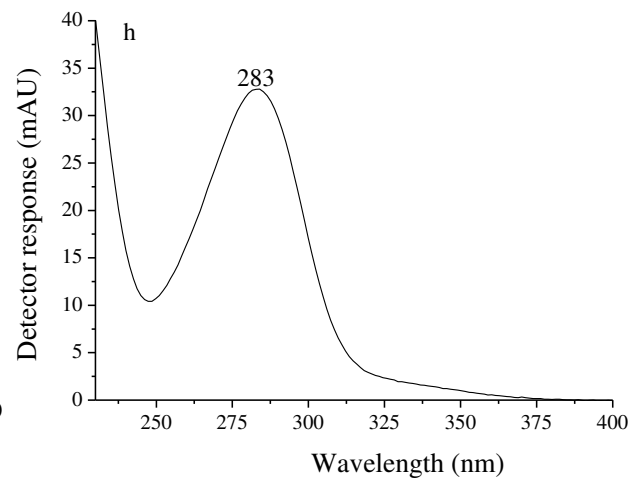
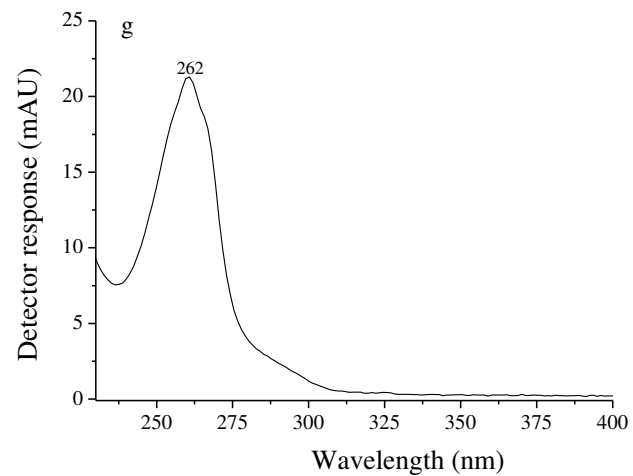
Além disso, este trabalho indica que o genótipo é uma característica determinante nos teores dos compostos bioativos presentes nas sementes de café cru e que a eficiência dos diferentes genótipos de café desativarem as ERO e ERN é influenciada principalmente pelo conteúdo de ácidos clorogênicos. As espécies *C. canephora* e *C. kapakata* são as mais promissoras para serem utilizadas como fonte de compostos antioxidantes hidrofílicos para a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

APPENDIX

Appendix A. UV spectra of the compounds identified in coffee brews. Legend: (a): caffeic acid, caffeoylquinic acids, feruloylquinic acids, dicaffeoylquinic acids, caffeoylferuloylquinic acids, chlorogenic acid lactones. (b): *p*-coumaric acid, *p*-coumaroylquinic acids. (c): caffeoyltryptophan. (d): *p*-coumaroyltryptophan. (e): caffeine, theobromine, theophylline. (f): trigonelline. (g): nicotinic acid. (h): 5-hydroxymethylfurfural



Appendix A. UV spectra of the compounds identified in coffee brews. Legend: (a): caffeic acid, caffeoylquinic acids, feruloylquinic acids, dicaffeoylquinic acids, caffeoylferuloylquinic acids, chlorogenic acid lactones. (b): *p*-coumaric acid, *p*-coumaroylquinic acids. (c): caffeoyltryptophan. (d): *p*-coumaroyltryptophan. (e): caffeine, theobromine, theophylline. (f): trigonelline. (g): nicotinic acid. (h): 5-hydroxymethylfurfural



Appendix B: MS, MS² and MS³ spectra for chlorogenic acids and derivatives obtained by ESI ionization in negative mode, of all peaks separated by HPLC on a C₁₈ column, from the coffee brews.

