



FERNANDA PAOLA DE PÁDUA GANDRA

**BIOATIVIDADE DE GRÃOS DE CAFÉS
ORIUNDOS DE FRUTOS IMATUROS E EFEITO
SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE
CAMUNDONGOS**

LAVRAS – MG

2017

FERNANDA PAOLA DE PÁDUA GANDRA

**BIOATIVIDADE DE GRÃOS DE CAFÉS ORIUNDOS DE FRUTOS
IMATUROS E EFEITO SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE
CAMUNDONGOS**

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

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Gandra, Fernanda Paola de Pádua.

Bioatividade de grãos de cafés oriundos de frutos imaturos e efeito sobre o metabolismo energético de camundongos / Fernanda Paola de Pádua Gandra. – Lavras : UFLA, 2016.

115 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientadora: Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira.

Bibliografia.

1. Defeitos. 2. Termogênico. 3. Alto peso molecular. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

FERNANDA PAOLA DE PÁDUA GANDRA

**BIOATIVIDADE DE GRÃOS DE CAFÉS ORIUNDOS DE FRUTOS
IMATUROS E EFEITO SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE
CAMUNDONGOS**

***BIOACTIVITY OF COFFEE GRAINS ORIGINATED FROM IMMATURE
FRUITS AND EFFECT OVER THE ENERGETIC METABOLISMO OF
MICE***

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

APROVADA em 15 de setembro de 2016.

Profa. Dra. Sheila Andrade Abrahão

Instituto Federal Fluminense -
IFF

Profa. Dra. Adriene Ribeiro Lima

Centro Universitário UNA

Dra. Caroline Lima Angélico

EPAMIG

Profa. Dra. Ivana Aparecida da Silveira

UNILAVRAS

Prof. Dr. Raimundo Vicente Sousa
Presidente da banca

LAVRAS – MG

2017

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao departamento de Ciência dos Alimentos por permitirem a realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro para realização do estágio em Portugal.

À professora Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira, pela orientação, confiança, amizade e oportunidade de me desenvolver profissionalmente.

À professora Dra. Jacqueline Alvarez pela oportunidade de realizar o trabalho, pela orientação, amizade, ensinamentos.

Ao professor Manuel Coimbra pela oportunidade, pela acolhida, pelos ensinamentos.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realizar as análises de HPLC.

A todos os professores que me ajudaram e ensinaram em toda esta trajetória.

A Maria Helena pela grande ajuda e carinho.

A Tina, Heloísa, Renato e Mônica por me ajudarem nas análises.

Ao Edson pela ajuda de sempre.

Às amigas Penélope e Paola, por tudo que fizeram por mim. A todos os amigos do Labin.

A todos os colegas do DCA pela força e pelos bons momentos.

Aos amigos do Polo do Café pela força, apoio e amizade.

Aos amigos que fiz na Universidade de Aveiro e fora dela.

A minha família e ao meu noivo por me apoiarem e por terem sido fundamentais nessa caminhada.

Muito obrigada!

Aos meus pais, Antônio e Márcia.

Aos meus irmãos Tom, Renata, Ricardo e Aurélio.

Ao Rodrigo.

DEDICO

RESUMO GERAL

A fim de eliminar grãos defeituosos do mercado interno, há uma necessidade de propostas alternativas mais atraentes para os produtores de café. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e bioatividade de grãos oriundos de frutos imaturos (defeito verde) e o efeito dos grãos crus sobre o metabolismo energético de camundongos obesos e eutróficos. Foram utilizados grãos de frutos colhidos no estágio cereja (maduros) e estágio verde (imaturos). Para avaliação da bioatividade do material de alto peso molecular, os grãos foram torrados e foi feito o fracionamento em etanol. Foram avaliados: a composição centesimal, os teores de cafeína, os compostos fenólicos totais, 5-ACQ e a atividade antioxidante (DPPH-IC50). Para o ensaio *in vivo*, os animais foram divididos em quatro grupos - Eutrófico: alimentados em uma dieta padrão AIN-93; Eutrófico café: alimentados em uma dieta padrão AIN-93 + 1,0% de defeitos verdes; Obeso: alimentados com uma dieta rica em gordura para induzir obesidade; Obeso café: alimentados em uma dieta rica em gordura para induzir a obesidade + 1,6% de defeitos do café verde. Sangue, tecidos adiposos branco (epidídimo e subcutâneo) e marrom, fígado e músculo gastrocnêmio foram coletados e pesados. Os parâmetros bioquímicos foram dosados no soro e os teores de lipídios totais, triacilglicerol e colesterol total foram dosados também no fígado. Após oito semanas de tratamento, os animais foram submetidos à medição do consumo de oxigênio. Para avaliação da atividade antioxidante *in vivo*, foram dosados os níveis de hidroperóxidos, MDA, SOD e catalase no tecido adiposo e fígado dos animais. O conteúdo de carboidratos, lipídios e macrominerais não diferiram entre as duas amostras analisadas. Os grãos defeituosos apresentaram quantidades consideráveis de compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro*. Os grãos defeitos verdes foram capazes de aumentar o gasto energético e reduzir a massa gorda e o aumento de peso ponderal dos animais obesos. A atividade antioxidante *in vivo* dos grãos foi comprovada pelo aumento da atividade da enzima catalase no tecido adiposo dos animais eutróficos. Para avaliar a bioatividade do material de alto peso molecular (HMWM) dos grãos torrados, foram feitas caracterizações quanto aos teores de: açúcares e ligações glicolíticas, proteínas, melanoidinas, 5-ACQ e cafeína (frações de HMWM) e avaliada a atividade antioxidante (DPPH-IC 50). O material de alto peso molecular (HMWM) do defeito verde possui composição química semelhante ao HMWM do café e expressiva capacidade antioxidante.

Palavras-chave: Defeitos. Termogênico. Alto peso molecular. Melanoidinas. Antioxidante.

GENERAL ABSTRACT

In order to eliminate defective grains from the internal market, there is a need alternative proposals more attractive to coffee producers. The objective of this study was to evaluate the chemical composition and biodiversity of grains originated from immature fruits (green defect), as well as the effect of raw grains over the energetic metabolism of obese and eutrophic mice. Grains harvested in the cherry (mature) and green (immature) stages were used. For the evaluation of biodiversity of the high molecular weight material, the grains were roasted and fractioned in ethanol. We evaluated the centesimal composition, content of caffeine, total phenolic compounds, 5-ACQ, and antioxidant activities (DPPH-IC50). For the *in vivo* trial, the animals were divided into four groups: Eutrophic – fed a standard diet AIN-93; Eutrophic coffee – fed a standard diet AIN-93 + 1.0% of green defects; Obese – fed a diet rich in fat to induce obesity; Obese coffee – fed a diet rich in fat to induce obesity + 1.6% of green defect. Blood, white (epididymis and subcutaneous) and brown fat tissue, liver and gastrocnemius muscle were collected and weighed. The biochemical parameters were dosed in serum, and the contents of total lipids, triacylglycerol and cholesterol were dosed in the liver. After 8 weeks of treatment, the animals were submitted to the measuring of oxygen consumption. For evaluating the antioxidant activity *in vivo*, the levels of hydroperoxides, MDA, SOD and catalase in the fat tissue and liver were dosed. The contents of carbohydrates, lipids and macrominerals did not differ between the two analyzed samples. The defective grains presented considerable amounts of bioactive compounds and antioxidant activity *in vitro*. The green defect grains were capable of increasing the energy expense and reducing the fat mass, as well as the increase in ponderal weight of the obese animals. The *in vivo* antioxidant activity of the grains was proven by the increase of the activity of enzyme catalase in the fat tissue of the eutrophic animals. To evaluate the bioactivity of the high molecular weight material (HMWM) of the roasted grains, a characterization regarding the contents of sugars and glycolytic bonds, proteins, melanoidins, 5-ACQ and caffeine (HMWM fractions) was performed, and the antioxidant activity (DPPH-IC 50) was evaluated. The high molecular weight material (HMWM) of the green defect presented chemical composition similar to the HMWM of the coffee and expressive antioxidant capacity.

Keywords: Defects. Thermogenic. High molecular weight. Melanoidins. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - (A) Consumo dietético (g/dia), (B) calórico (Kcal/dia) e (C) ingestão de grãos classificados como defeito verde por animais obesos e eutróficos. 66
- Figura 2 - Peso ponderal dos animais eutróficos e obesos controles e alimentados com grãos classificados defeito verde ao longo das nove semanas de tratamento. * 67
- Figura 3 - Peso final dos animais dos grupos eutróficos e obesos controles e alimentados com grãos classificados defeito verde. 68
- Figura 4 - Peso dos tecidos adiposos epididimal, subcutâneo, marrom (g) e adiposidade (%) dos grupos eutróficos e obesos controles e alimentados com grãos classificados defeito verde. 68
- Figura 5 - Consumo de O₂ e gasto energético de animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde. 70
- Figura 6 - Peso do músculo gastrocnêmico dos animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde. 72
- Figura 7 - Teores de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL, e triacilgliceróis de animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde. 74
- Figura 8 - Peso do fígado e teores de lipídios totais, triacilgliceróis e colesterol total hepáticos dos animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde. 76

Figura 9 - Teores de hidroperóxidos e de dialdeído malônico (MDA) no tecido adiposo e fígado dos animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde.	78
Figura 10 - Atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no tecido adiposo e fígado dos animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde.	79

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Atividade sequestrante de radicais livres (% de inibição) do material de alto peso molecular (HMWM) dos grãos de café e dos grãos classificados como defeito verde em diferentes diluições.	108
---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Equivalência de grãos imperfeitos e impurezas.....	18
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Composição centesimal de grãos de café e de grãos classificados como defeito verde, crus.	61
Tabela 2 - Teores de cafeína, ácido clorogênico e trigonelina dos grãos de café e de grãos classificados como defeito verde (g/100 g).	63
Tabela 3 - Atividade sequestrante de radicais livres DPPH-IC50 de grãos de café e de grãos classificados como defeito verde	64

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Parâmetros de cor dos grãos de café e de grãos classificados como defeito verde, torrados e moídos.	99
Tabela 2 - Rendimentos da fração solúvel e material de alto peso molecular (HMWM) dos grãos de café e dos grãos classificados como defeito verde.....	100
Tabela 3 - Composição em açúcares, expressa em % molar, das amostras HMWM dos grãos de café e frações e do HMWM dos grãos defeito verde e frações e respectivas % de açúcares.	101
Tabela 4 - Composição das ligações glicosídicas presentes nas amostras estudadas	103
Tabela 5 - Teores de ácido clorogênico e cafeína das frações do material de alto peso molecular (HMWM) dos grãos de café dos grãos classificados como defeito.	104

Tabela 6 - Teores de melanoidinas K(mix 405 nm) do HMWM do café e defeito e respectivas frações etanólicas.....	106
Tabela 7 - Teores de proteínas do HMWM dos grãos de café e dos grãos classificados defeito e respectivas frações etanólicas.	107
Tabela 8 - Atividade sequestrante de radicais DPPH (EC50) do HMWM do café e do defeito verde.	109

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Consumo de café	17
2.2	Classificação do café	17
2.3	Defeitos do café	19
2.4	Defeito Verde	20
2.5	Composição química dos grãos de café crus	21
2.6	Torração dos grãos	23
2.7	Melanoidinas do café	24
2.8	Capacidade antioxidante dos grãos de café	25
2.8.1	Compostos bioativos do café e efeitos no organismo	27
2.8.2	Efeito termogênico do café	29
2.8.3	Obesidade	30
2.8.4	Tecido adiposo	31
2.8.5	Obesidade, dislipidemia e resistência à insulina	33
	REFERÊNCIAS	37
	CAPÍTULO 2 GRÃOS DE CAFÉS CRUS ORIUNDOS DE FRUTOS IMATUROS DO CAFEIEIRO: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E EFEITO SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE CAMUNDONGOS	47
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1	Instalações e matéria-prima	51
2.2	Composição centesimal	51
2.3	Determinação dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico	52
2.4	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> (DPPH- IC50)	52
2.5	Ensaio <i>in vivo</i>	53
2.5.1	Animais	53
2.5.2	Calorimetria (consumo de O₂ e gasto energético)	54
2.5.3	Parâmetros bioquímicos	55
2.5.4	Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	55
2.5.4.1	Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - MDA)	55
2.5.4.2	Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos no fígado e tecido adiposo	56
2.5.4.3	Atividade da superóxido dismutase no fígado e tecido adiposo ...	57

2.5.4.4	Atividade da catalase no fígado e tecido adiposo.....	58
2.6	Análises Estatísticas	58
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1	Composição centesimal	61
3.2	Compostos bioativos.....	62
3.3	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> (DPPH-IC50).....	64
3.4	Ensaio <i>in vivo</i>	65
3.4.1	Consumo dietético e calórico	65
3.4.2	Peso ponderal dos animais, adiposidade e pesos dos tecidos adiposos: epididimal e subcutâneo e marrom	67
3.4.3	Consumo de O ₂ e gasto energético	70
3.4.4	Peso do músculo gastrocnêmico	71
3.4.5	Parâmetros bioquímicos séricos.....	73
3.4.6	Peso e teores de lipídios totais, triacilgliceróis e colesterol total do fígado	76
3.5	Capacidade antioxidante <i>in vivo</i>	77
4	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	83
	CAPÍTULO 3 GRÃOS TORRADOS ORIUNDOS DE FRUTOS IMATUROS DO CAFEIEIRO: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES BIOATIVAS DO MATERIAL DE ALTO PESO MOLECULAR...	89
1	INTRODUÇÃO	91
2	MATERIAL E MÉTODOS	93
2.1	Instalações e Amostras.....	93
2.2	Torração.....	93
2.3	Coloração	93
2.4	Preparação do extrato e isolamento do Material de Alto Peso Molecular (HMWM).....	94
2.5	Fracionamento do HMWM por precipitação em etanol.....	94
2.6	Determinação dos teores de cafeína e ácidos clorogênicos	94
2.7	Caracterização dos grãos do HMWM e frações	95
2.7.1	Análise de açúcares neutros.....	95
2.7.2	Análise das ligações glicosídicas	96
2.7.3	Proteínas.....	97
2.7.4	Melanoidinas.....	97
2.8	Atividade antioxidante (DPPH-IC50).....	98
2.9	Estatística	98
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.1	Coloração	99
3.2	Rendimento	99
3.3	Açúcares neutros e ligações glicolíticas	100

3.4	Ácido 5-cafeoilquínico e cafeína	104
3.5	Melanoidinas	106
3.6	Proteínas	107
3.7	Atividade antioxidante	108
4	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	113

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo devido às suas características sensoriais peculiares. Os efeitos estimulantes e os possíveis benefícios à saúde atribuídos ao produto têm colaborado para o aumento do consumo entre os brasileiros.

A bebida aumenta a capacidade de trabalho físico e mental, do estado de alerta, vigília e memória. Pesquisas apontam também um efeito benéfico do café no desenvolvimento de determinadas doenças como diabetes tipo 2, dislipidemias, asma, doença de Parkinson e Alzheimer (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; DÓREA; COSTA, 2005; SANTOS; LIMA, 2016).

Além disso, estudos têm comprovado o efeito termogênico do café, exercido pelos compostos bioativos presentes nos grãos, capazes de estimular a lipólise, mobilizando gordura dos tecidos (ONAKPOYA; TERRY; ERNST, 2011). Todos estes benefícios podem estar associados à potente capacidade antioxidante do café, que se deve à presença de um conjunto de substâncias tais como a cafeína, compostos fenólicos e produtos formados com a torração como as melanoidinas.

Em função destes resultados, uma variedade de produtos à base de grãos crus e torrados têm sido desenvolvidos e utilizados principalmente como suplemento alimentar. O conhecimento sobre a composição química e efeitos na saúde humana de grãos de café com menor valor de mercado, como o defeito verde, pode significar uma alternativa para a utilização destes grãos pelas indústrias alimentar e farmacêutica.

Os grãos classificados como “defeito verde” são oriundos de frutos imaturos do cafeeiro e apresentam a película prateada aderida aos grãos. As principais causas de aparecimento desses grãos estão associadas com a

realização da colheita em uma única etapa (GONÇALVES, 2006). Estes grãos juntos com os pretos e ardidos respondem por cerca de 20% da produção brasileira e são os defeitos que mais afetam a qualidade da bebida.

Devido à elevada produção, a maioria das indústrias mistura os grãos defeituosos aos de boa qualidade (FRANÇA et al., 2005). Dessa maneira, fazem-se necessárias propostas mais atraentes para os produtores de café para minimizar essa prática.

Neste sentido, com este estudo objetivou-se avaliar a composição química e bioatividade de grãos oriundos de frutos imaturos (defeito verde) e de grãos de café sadios, crus e torrados. Além disso, foi avaliado o efeito dos grãos crus sobre o metabolismo energético de camundongos tratados com dieta hiperlipídica (obesos) e em camundongos tratados com dieta padrão (não obesos).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Consumo de café

O Brasil é o segundo maior consumidor de café, atrás apenas dos EUA. No consumo por habitante, os maiores consumidores mundiais são Finlândia, Noruega e Dinamarca (HECKMAN; PINTO; SAVELYEV, 2013). Os brasileiros estão consumindo mais xícaras de café por dia e diversificando as formas da bebida durante o dia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2016).

O comportamento dos consumidores tem sido o de valorizar os produtos com melhor qualidade, certificados e sustentáveis. O consumo de café no Brasil mostrou um leve acréscimo em 2015. A recuperação de +1,24% em 2014, atingindo 20,333 milhões de sacas, foi seguida de um novo aumento de 0,86% nos doze meses compreendidos entre novembro/2014 e outubro/2015, completando 20,508 milhões de sacas (ABIC, 2016).

O consumo *per capita* também aumentou ligeiramente, passando a 4,90 kg/habitante.ano de café torrado e moído (6,12 kg de café cru em grão), o equivalente a 81 litros/habitante.ano. Enquanto o consumo total registrou aumento médio de 0,86%, o volume exclusivo das empresas associadas da ABIC, acusou o crescimento de 1,33% (ABIC, 2016).

2.2 Classificação do café

A valorização da qualidade do café é uma antiga preocupação que levou os setores ligados à atividade cafeeira, no Brasil, à elaboração de normas de classificação em 1917 (REIS; CUNHA; CARVALHO, 2011). A classificação é essencial na comercialização do café, pois a partir da análise dos grãos é que são definidos os valores financeiros do produto (GONÇALVES, 2006).

A qualidade do café é determinada, principalmente, com base em duas formas de classificação. A primeira é através de uma classificação física, em que

os grãos são classificados de acordo com a forma e tamanho (classificação por peneira) e pela presença de defeitos (classificação por tipo). A segunda classificação é pela bebida, através da conhecida prova de xícara, realizada por provadores treinados que conseguem distinguir diferentes padrões de bebida (REIS; CUNHA; CARVALHO, 2011).

Na classificação física por peneira, consideram-se o tamanho e o formato dos grãos que são avaliados na passagem de uma amostra de café em um jogo de peneiras de crivos redondos e ou alongados. Esta descrição é fundamental nas etapas de beneficiamento, rebeneficiamento e na classificação comercial do café. Já a classificação quanto ao tipo, leva em consideração seu aspecto e quantidade de defeitos. Nesta classificação, são analisados grãos defeituosos e impurezas em uma amostra de 300 g de café beneficiado proveniente de saca de 60 kg (Tabela 1), sendo que estes possuem valores variáveis, pelos quais recebem a classificação nos tipos 2 a 8 (REIS; CUNHA; CARVALHO, 2011).

Tabela 1 - Equivalência de grãos imperfeitos e impurezas.

Tabela oficial para classificação de cafés em tipos negociáveis no Brasil (classificação por defeitos em latas de 300 gramas)	
Grãos imperfeitos e impurezas	Defeitos
1 grão preto	1
1 pedra, pau ou torrão grande	5
1 pedra, pau ou torrão regular	2
1 pedra, pau ou torrão pequeno	1
1 coco	1
1 casca grande	1
2 ardidos	1
2 marinheiros	1
2 a 3 cascas pequenas	1
2 a 5 brocados	1
3 conchas	1
5 verdes	1
5 quebrados	1
5 chochos ou mal granados	1

2.3 Defeitos do café

Os defeitos podem ser classificados de acordo com a natureza: intrínseca ou extrínseca. Os defeitos de natureza extrínseca são os elementos estranhos ou materiais diferentes dos grãos de café incorporados durante a colheita, como cascas, paus, pedras e torrões, também conhecidos como impurezas. Os defeitos de natureza intrínseca aparecem devido à colheita, condução inadequada de processos durante a lavoura e pós-colheita.

O café natural produzido no Brasil apresenta um padrão de qualidade extremamente variável. Nos cafeeiros, ocorrem mais de uma floração, e ao longo de toda colheita, apresentam frutos em diferentes estádios de maturação. No início da colheita, predominam um maior percentual de frutos verdes e cereja, e no final, frutos passas e secos. O sistema tradicionalmente utilizado para a colheita do café resulta, então, em um produto desuniforme em razão da heterogeneidade da maturação dos frutos. O café, em geral, é colhido quando a porcentagem dos frutos verdes está em torno de 15-20% e o teor de água em torno de 55 a 60%.

Dessa forma, ocorrerão frutos em diferentes estádios de maturação e, portanto, frutos com diferentes teores de água. Se por um lado, nas colheitas tardias, os frutos secos podem ter sofrido alguma fermentação indesejável, nas colheitas antecipadas, os frutos verdes irão resultar em defeitos verdes e preto-verdes depreciando o aspecto, o tipo e a bebida de café.

Os principais defeitos do café são:

- a) Grãos verdes: grão imaturo, com película prateada aderida, com sulco ventral fechado e de coloração verde em tons diversos;
- b) Grãos pretos: grão ou pedaço de grão de coloração preta opaca;

- c) Grãos ardidos: grão ou pedaço de grão que apresenta a coloração marrom, em diversos tons, devido à ação de processos fermentativos;
- d) Grãos preto-verdes: grão preto que se apresenta brilhante devido à aderência da película prateada;
- e) Grãos mal granados: grão com formação incompleta apresentando-se com pouca massa e, às vezes, com a superfície enrugada;
- f) Grãos conchas: grão em forma de concha, resultante da separação de grãos imbricados oriundos da fecundação de dois óvulos em uma única loja de ovário;
- g) Grãos quebrados: pedaço de grão, de forma ou tamanho variável;
- h) Grãos brocados: grão danificado pela broca do café, apresentando um ou mais orifícios limpos ou sujos (REIS; CUNHA; CARVALHO, 2011).

Os grãos pretos, verdes e ardidos representam 20% da produção brasileira e são considerados como os piores defeitos. Estes tipos de grãos, normalmente, não são vendidos no mercado internacional, sendo separados. Dessa forma, na tentativa de diminuir as perdas, a maioria das indústrias no Brasil mistura os grãos defeituosos aos de boa qualidade. Porém, esta mistura afeta negativamente a qualidade da bebida consumida (FRANÇA et al., 2005).

2.4 Defeito Verde

Os grãos classificados como “defeito verde” são oriundos de frutos imaturos do cafeeiro e apresentam a película prateada aderida aos grãos. Neste tipo de grão, as paredes da célula e a estrutura interna não estão totalmente desenvolvidas, pois são provenientes de colheitas antes do amadurecimento (grãos imaturos) e causam o aumento da adstringência da bebida

(GONÇALVES, 2006). Chagas (1994) afirma que os grãos colhidos no estágio cereja apresentaram “bebida padrão mole”, já os frutos quando colhidos verdes ou secos apresentaram “bebida dura”. Estes resultados podem estar relacionados com o elevado teor de compostos fenólicos destes grãos. Mazzafera (1999) observou maiores teores de compostos fenólicos em grãos imaturos.

Estes grãos, dependendo das condições de secagem, produzem os grãos preto-verdes. Os grãos imaturos, comparado com os grãos pretos e ardidos, apresentam menor índice de contaminação fúngica podendo ser utilizados pela indústria farmacêutica e alimentícia.

2.5 Composição química dos grãos de café crus

A composição química do café cru depende da espécie, da variedade, de práticas agrícolas, grau de maturação do fruto do café, processamento primário e condições de estocagem (TOLEDO; BARBOSA, 1997). A Tabela 2 representa a composição química de grãos arábica (CLARKE et al., 2003).

Os ácidos clorogênicos e seus isômeros são os principais componentes da fração fenólica dos grãos *in natura*, alcançando teores de até 14% (em peso seco) (FARAH et al., 2008). Os principais grupos de isômeros dos ácidos clorogênicos encontrados nos grãos são os ácidos cafeoilquínicos, os dicafeoilquínicos e os feruloilquínicos. Com a torração, os ácidos clorogênicos são convertidos em compostos de aroma durante a torração e podem ser incorporados a melanoidinas (BEKEDAM et al., 2008a; MOREIRA et al., 2012). O conteúdo de ácidos clorogênicos nos grãos de café são cerca de 3 a 5 vezes mais que os teores de cafeína (ABIC, 2016).

A cafeína é um alcaloide nitrogenado que possui estabilidade ao processo de torração. O composto é conhecido por suas propriedades fisiológicas e farmacológicas, principalmente em relação ao seu efeito na redução do sono e às propriedades estimulantes. O teor de cafeína nas sementes

do cafeeiro depende da espécie: no *C. arabica*, o conteúdo médio é de 12 g/kg; já no *C. canephora*, em torno de 22 g/kg (SCREENATH, 1997).

Outro composto nitrogenado presente nos grãos de café é a trigonelina. Representa cerca de 1% do grão, e sua principal importância está nos produtos formados após a degradação térmica. Ao ser degradada, gera a niacina, uma vitamina pertencente ao grupo de vitaminas do complexo B (VIANI; HORMAN, 1974).

Os lipídeos estão localizados no citossol e se apresentam na forma de gotículas em todas as regiões da semente. Qualquer mudança na estrutura das membranas, causada por injúrias, ativa as lipases, ocasionando o aumento da quantidade de ácido graxo livre (AMORIM, 1972). Monteiro e Trugo (2005) encontraram percentagem de lipídeos de 16% para o café arábica e de 10% para o café robusta.

As proteínas, no café, estão livres no citoplasma ou ligadas a polissacarídeos de parede celular. Os teores de proteínas presentes nos grãos de café variam de 8,7% a 16%, e a maioria é solúvel em água, representada principalmente pela fração albumina. Outras possuem atividade enzimática, como as lipases, as proteases, a catalase e as peroxidases. Durante a torração, as proteínas são desnaturadas e degradadas em moléculas menores. Algumas proteínas também reagem com carboidratos (reação de Maillard) ou com compostos fenólicos (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Os polissacarídeos majoritários nos grãos de café são as galactomananas e as arabinogalactanas tipo II. As arabinogalactanas tipo II estão covalentemente ligadas às proteínas e são compostas na cadeia principal por resíduos de galactose unidos por ligações β -(1 \rightarrow 3), alguns substituídos no O-6 por resíduos únicos de galactose unidos por ligações β -(1 \rightarrow 6). Estes resíduos de galactose ligados à cadeia principal podem ser substituídos no O-3 por resíduos de arabinose unidos por ligações β -(1 \rightarrow 5). Podem ainda conter ácidos urônicos

ligados à cadeia principal de galactose (NUNES; DOMINGUES; COIMBRA, 2005).

As galactomananas são compostas na cadeia principal por resíduos manoses unidos por ligações β -(1→4), substituídos no O-6 por resíduos únicos de galactose, existindo vários graus de ramificação. As galactomananas são polissacarídeos acetilados, em que os grupos acetilo têm sido observados no O-2 e O-3 de resíduos de manose, e que contêm também resíduos únicos de arabinose como ramificações e resíduos de β -(1-4)-glucose dispersos na cadeia principal (NUNES; DOMINGUES; COIMBRA, 2005).

Os açúcares predominantes no café são os não redutores, particularmente a sacarose; os redutores se apresentam em quantidades pequenas. Durante a torração, a sacarose é rapidamente degradada, ocorrendo caramelização. Não somente a sacarose como também outros glicídios e polissacarídeos são de importância para o aroma do café. A principal família de compostos voláteis gerada por esses açúcares são os furanos, que contribuem para as características do café torrado (MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999).

O grão de café cru possui ainda uma grande variedade de minerais como potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), sódio (Na), ferro (Fe), manganês (Mn), rubídio (Rb), zinco (Zn), cobre (Cu), estrôncio (Sr), cromo (Cr), vanádio (V), bário (Ba), níquel (Ni), cobalto (Co), chumbo (Pb), molibdênio (Mo), titânio (Ti) e cádmio (Cd); aminoácidos como alanina, arginina, asparagina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina (ABIC, 2016).

2.6 Torração dos grãos

Os grãos de café são torrados por diferentes tempos e temperaturas dependendo das características desejadas para o produto final (ALESSANDRINI et al., 2008). Os grãos quando submetidos aos tratamentos térmicos sofrem

mudanças químicas e fornecem bebidas com características sensoriais diferenciadas devido a variações na composição química (CLARKE et al., 2003, TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Muitas reações ocorrem durante este processo, entre elas a caramelização de açúcares, degradação de Strecker, reação de Maillard, e a degradação de ácidos clorogênicos (CLARKE; MACRAE, 1985; RODARTE, 2008; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Na caramelização a sacarose é rapidamente degradada e a reação é acompanhada pela produção de gás carbônico. A natureza e o conteúdo dos açúcares presentes nos grãos são essenciais para o flavor do café, para a formação do pigmento e outras moléculas.

Na degradação de Strecker, ocorre uma reação entre aminoácidos e compostos dicarbonílicos. O aminoácido perde um carbono e ocorre formação de aldeído e CO₂. Os aminoácidos livres podem ser degradados durante a torração, ou combinados com outros componentes, gerando uma mistura de complexos voláteis e não voláteis (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

A reação de Maillard é uma reação de escurecimento não enzimático e caracteriza-se pela combinação do grupamento carbonila de carboidratos redutores com o grupo amínico de aminoácidos, proteínas e peptídios. Produtos da reação de Maillard, como as melanoidinas, têm sido apontados como os constituintes com maior potencial antioxidante da bebida de café (BEKEDAM et al., 2008a). Em contrapartida, outros estudos mostram a formação de radicais livres durante a torração do café (GOODMAN; PASCUAL; YERETZIAN, 2011).

2.7 Melanoidinas do café

As melanoidinas são produtos finais da reação de Maillard, possuem alto peso molecular, cor marrom e caráter aniônico. As propriedades químicas e

funcionais das melanoidinas do café não são totalmente compreendidas, devido à composição química extremamente complexa dessas moléculas (BEKEDAM et al., 2008a; MOREIRA et al., 2012; NUNES; COIMBRA, 2001).

Tem sido sugerido que os polissacarídeos possam estar covalentemente ligados às melanoidinas uma vez que não é possível separá-los fisicamente (NUNES; COIMBRA, 2001, 2002). Os polissacarídeos são os componentes mais abundantes do material de alto peso molecular (HMW), sendo os principais: as galactomananas (GM) e as arabinogalactanas tipo II (ligadas a proteínas). Além dos carboidratos, os ácidos clorogênicos (como os ácidos químico e cafeico) e seus produtos de degradação são incorporados às melanoidinas pela formação de oito ligações ésteres ou formas condensadas durante a torração dos grãos (BEKEDAM et al., 2008a; MOREIRA et al., 2012).

As melanoidinas têm sido foco de várias pesquisas relacionadas a sua atividade antioxidante, anti-hipertensiva, poder de ligação a metais e efeito antimicrobiano (BEKEDAM et al., 2008a, 2008b; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). O mecanismo de ação antioxidante associado às melanoidinas envolve a transferência de átomos de hidrogênio e transferência de elétrons (BEKEDAM et al., 2008a; LIU; KITTS, 2011).

2.8 Capacidade antioxidante dos grãos de café

Os antioxidantes são substâncias presentes em concentrações baixas, comparadas às concentrações do substrato oxidante, que previne ou atrasa a oxidação de substratos susceptíveis (HALLIWELL, 2000).

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

sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos polinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os componentes presentes nos grãos de café com potencial antioxidante são os compostos fenólicos, cafeína, e produtos da reação de Maillard, como melanoidinas. Assim, a capacidade antioxidante do café se deve pela presença de constituintes naturais e compostos formados com a torração (VIGNOLLI, 2011).

Os polifenóis importantes no café são os flavonoides e ácidos fenólicos, o ácido cafeico e os derivados do ácido clorogênico (WANG; HO, 2009). Diversos estudos já demonstraram os efeitos protetores dos componentes fenólicos do café contra o estresse oxidativo (CHU et al., 2009; NATELLA et al., 2002; ZHAO et al., 2008). A capacidade antioxidante dos polifenóis é influenciada pelo número e posição dos grupos OH, assim como pelas posições de glicosilação (HALLIWELL, 2004). São capazes de captar radicais alcóxila (RO^{\bullet}), alquilperóxila (ROO^{\bullet}), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}), além do oxidante peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}/ONOOH$) (WANG; HO, 2009).

A cafeína consegue inibir a lipoperoxidação induzida por radicais hidroxilas (OH^{\bullet}), peróxidos (ROO^{\bullet}) e oxigênio singlete, convertendo em um potente antioxidante com capacidade similar à glutatona e superior ao ácido ascórbico (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1991). Lopez-Galilea, Peña e Cid (2008) concluíram que a cafeína possui atividade antioxidante em sistemas-modelo. Em um estudo realizado por Noschang et al. (2009), os autores observaram um aumento na atividade da superóxido dismutase e da catalase no córtex cerebral de ratos tratados com doses de cafeína.

Efeitos protetores contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e consequente dano no DNA têm sido atribuídos a compostos

dirpenos como o caveol e cafestol presentes no café. Em estudos de citotoxicidade e peroxidação lipídica, protegeram efetivamente culturas celulares da injúria causada pelo peróxido de hidrogênio, aumentando a viabilidade celular e diminuindo a formação de TBARS (ácido tiobarbitúrico). Além disso, células enriquecidas com caveol e cafestol também mostraram ser resistentes ao hidroperóxido tert-butil, devido ao sequestro dos radicais peroxil e a prevenção da peroxidação lipídica por esses compostos (LEE; CHOI; JEONG, 2007).

A atividade antioxidante da bebida é expressiva apesar dos compostos fenólicos diminuírem com a torração. Isso se deve à formação de melanoidinas principalmente na torração escura (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; BEKEDAM et al., 2008a, 2008b; LIU; KITTS, 2011). Liu e Kitss (2011) confirmaram que produtos da reação de Maillard são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante da bebida de café.

2.8.1 Compostos bioativos do café e efeitos no organismo

Os efeitos do consumo de café dependem da qualidade e quantidade dos compostos químicos ingeridos, estando o consumo moderado normalmente descrito como a ingestão de três a cinco doses diárias (aproximadamente 150-300 mg de cafeína/dia) (CAVIN et al., 2010).

Este psicoestimulante tem perfil farmacocinético e farmacodinâmico bem compreendidos (HECKMAN et al., 2013). Mais de 99% de uma dose oral de cafeína são absorvidos, com concentrações plasmáticas máximas atingidas em 15 a 45 minutos. Uma dose de 250 mg determina concentrações plasmáticas entre 5 e 25 mcg/mL. Após entrar na corrente sanguínea, a cafeína é distribuída a todas as células do organismo, onde penetra livremente. A principal rota de eliminação da cafeína e das demais metilxantinas é o fígado que leva um certo tempo para metabolizá-las. Os metabólitos formados, juntamente com uma pequena parcela de cafeína intacta, são excretados pela urina. A meia vida da cafeína apresenta uma grande variação individual, oscilando entre 3 e 7,5 horas

em indivíduos normais. O metabolismo pode ser alterado por vários fatores como tabagismo, uso de anticoncepcionais orais e algumas doenças (ENCARNAÇÃO; LIMA, 2003; FERNANDES et al., 1998; SCHILTER et al., 2001).

O fato do consumo de café descafeinado estar igualmente associado a um menor risco de desenvolvimento de doenças como diabetes II (ISOGAWA et al., 2003; TUOMILEHTO et al., 2004; ZHANG et al., 2009) sugere que outros constituintes do café, além da cafeína, são responsáveis por esses efeitos benéficos (GREENBERG et al., 2006).

No estudo de Natella et al. (2002), os autores associaram a rápida incorporação de ácidos fenólicos do café nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) resultando na melhora da resistência à modificação oxidativa das LDL-c. Os polifenóis extraídos dos grãos crus também são capazes de inibir a lipoxigenase (DURAK; GAWLIK-DZIKI; KOWALSKA, 2015; DURAK; GAWLIK-DZIKI; PECIO, 2014; DURAK; GAWLIK-DZIKI; SUGIER, 2014), resultando na redução do estresse oxidativo.

Os polifenóis possuem elevados pesos moleculares e isto diminui a sua absorção intestinal (PARK et al., 2014). No entanto, os principais derivados do ácido clorogênico do café possuem alta biodisponibilidade e são absorvidos no corpo humano ao longo de todo o trato gastrointestinal (FARAH et al., 2008). São inicialmente absorvidas no estômago e intestino delgado (primeira fase) e depois fermentado pela microbiota intestinal e absorvido no cólon durante a segunda fase (COWAN et al., 2014; REDEUIL et al., 2011). Tem sido relatado que cerca de 90% dos ácidos clorogênicos de café seriam disponíveis para chegar ao trato gastrointestinal (GI) e sofrerem hidrólise por esterases, conjugação ou absorção sob a forma livre (FUMEAUX et al., 2010).

Os compostos fenólicos presentes nos grãos parecem contrariar muitos dos efeitos negativos da cafeína (BONITA et al., 2007), já que o alcaloide está

associado com o aumento da pressão sistólica e diastólica da artéria braquial em humanos. Bidel et al. (2006) observaram uma inversa relação entre o consumo de café e o risco de doenças cardiovasculares entre pacientes com diabetes tipo 2. Celik et al. (2010) associaram o consumo moderado de café a um menor risco de doença coronariana nas mulheres.

Além dos benefícios já citados, componentes presentes no café aumentam a capacidade antioxidante no fígado (GOTTELAND; DE-PABLO, 2007; LIMA et al., 2010), e auxiliam na perda de peso.

2.8.2 Efeito termogênico do café

Estudos em humanos e animais sugerem que o consumo de café induz à perda de peso por aumento da termogênese (DULLOO et al., 1989) e existem evidências de que este aumento é dependente da quantidade de cafeína ingerida (GRAHAM, 2001).

A cafeína exerce um efeito sobre a descarga das células nervosas e liberação de alguns outros neurotransmissores e hormônios, tais como a adrenalina, agindo também no aumento da secreção da enzima lípase hormônio sensível, uma lipoproteína que mobiliza os depósitos de gordura para utilizar como fonte de energia em vez do glicogênio muscular, ou seja, poupa o glicogênio (PETERSON, 1977). Além disso, o composto exerce uma ação diurética, favorece o esforço muscular, reduz a apatia, a sonolência e o sedentarismo dos obesos, o que os torna mais ativos e mais motivados.

Os efeitos termogênicos do café se devem não somente à presença de cafeína, mas também de ácidos clorogênicos (GREENBERG et al., 2006). No estudo de Shimoda, Seki e Aitani (2006), os autores concluíram que o extrato de café cru suprimiu o ganho de peso e acúmulo de gordura visceral em camundongos. Eles observaram que a cafeína foi responsável pela redução da absorção de gordura, mas que o ácido clorogênico e seus derivados aumentaram o metabolismo da gordura no fígado.

Em outro estudo, realizado por Cho et al. (2010), os autores observaram que os compostos fenólicos do café reduziram o peso corporal e os níveis de hormônios relacionados à obesidade em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

Os compostos fenólicos destacam-se por suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, e mais recentemente por seus efeitos sobre a microbiota intestinal, sinalização celular e expressão gênica, mecanismos importantes na prevenção do desenvolvimento da obesidade e diabetes tipo 2 (ANHÊ et al., 2013). Os polifenóis ajudam na redução da gordura visceral, atuando na hidrólise dos triacilgliceróis que estão armazenadas nos adipócitos (CHANG et al., 2013; GANGEHEI et al., 2010; MOTTA, 2009).

Em função dos resultados aqui descritos, uma variedade de produtos à base de grãos crus de café, conhecido como café verde, tem sido comercializada em muitos países inclusive no Brasil. Cho et al. (2010) e Shimoda, Seki e Aitani (2006) descrevem um método de extração do grão cru de café para a comercialização de um suplemento de emagrecimento. Vinson, Burnham e Nagendran (2012) sugerem que pode haver um nutracêutico barato, a base de ácido clorogênico, eficaz na redução de peso em adultos.

2.8.3 Obesidade

A obesidade é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal. Existem vários métodos utilizados para a avaliação desse excesso, sendo mais usado o Índice de Massa Corpórea (IMC). A obesidade é definida como IMC igual ou maior a 30 kg/m² e caracteriza-se pelo excesso de gordura corporal em relação à massa magra.

As determinantes que levam a obesidade estão relacionadas basicamente às mudanças ambientais a que indivíduos geneticamente suscetíveis ao ganho de peso se expõem, com aumento da ingestão calórica e redução da atividade física (LERARIO; LOTTENBERG, 2006).

Se por um lado, o estilo de vida moderna tem favorecido o ganho de peso da população, por outro, a adoção de práticas saudáveis tem sido crescente. Ensaios clínicos e epidemiológicos têm estabelecido uma correlação inversa entre a ingestão de frutas, legumes e verduras e a ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis (RUESTEN et al., 2013). Estes alimentos fornecem compostos bioativos como fibras, vitaminas, minerais, carotenoides e compostos fenólicos que promovem benefícios à saúde e reduzem o risco de desenvolvimento dessas doenças (SLAVIN; LLOYD, 2012; TORRES FLUENTES et al., 2015).

Além da preocupação com a alimentação e prática de atividade física, muitas pessoas que necessitam perder peso, procuram terapias alternativas como plantas medicinais, chás, entre outros (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO - ABIFISA, 2004). Estão incluídos indivíduos que usam estas ervas *in natura* e aqueles que utilizam as plantas processadas em formulações medicamentosas (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Em 2004, a OMS estimou que cerca de 80% da população utilizava plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde (ABIFISA, 2004) e atualmente, este número pode ser ainda maior, principalmente no que se refere ao tratamento da obesidade.

2.8.4 Tecido adiposo

Os humanos possuem dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM). O TAB apresenta funções abrangentes. Por constituir depósitos localizados em diversas regiões do organismo, o TAB oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, permite um adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares, sem comprometer a integridade e funcionalidade dos mesmos. Além disso, pela distribuição mais abrangente, incluindo derme e tecido subcutâneo, e por ser um excelente isolante térmico,

tem papel importante na manutenção da temperatura corporal (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo branco é o principal reservatório energético do organismo. Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma (LARGE et al., 2004). O adipócito branco maduro armazena os TAG em uma única e grande gota lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma. Durante seu desenvolvimento, a célula jovem contém múltiplas gotículas de lipídios, que coalescem para formar uma inclusão lipídica unitária com o amadurecimento celular. Os adipócitos brancos maduros são células grandes, muitas vezes maiores que hemácias, fibroblastos e células do sistema imune e podem alterar acentuadamente seu tamanho (volume e diâmetro) conforme a quantidade de TAG acumulada (POND, 2001).

Os adipócitos possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar TAG em períodos em que a oferta de energia é abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit calórico. A regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos sistemas neurais e hormonais, e depende das necessidades energéticas do indivíduo (AHIMA; FLIER, 2000).

Já o tecido adiposo marrom (TAM) é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal. Os depósitos de TAM estão praticamente ausentes em humanos adultos, mas são encontrados em fetos e recém-nascidos. O adipócito marrom pode atingir 60 μm de diâmetro, sendo, geralmente, muito menor que o adipócito branco que tem um tamanho médio de 90–100 μm . É uma célula caracterizada pela presença de várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, citoplasma relativamente abundante e núcleo esférico e ligeiramente excêntrico (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Este tecido apresenta um grande número de mitocôndrias que, por não possuírem o complexo enzimático necessário para a síntese de ATP, utilizam a energia liberada pela oxidação de metabólitos, principalmente ácidos graxos, para gerar calor (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Esse processo ocorre porque a proteína desacopladora-1 (UCP-1, termogenina), uma proteína da membrana mitocondrial interna do adipócito marrom, atua como um canal de próton que descarrega a energia gerada pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso das mitocôndrias durante as reações oxidativas do ciclo de Krebs, desviando esses prótons do complexo F1 F0 (ATP sintase) e impedindo a síntese de ATP, permitindo que se dissipe em calor a energia estocada na mitocôndria (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

2.8.5 Obesidade, dislipidemia e resistência à insulina

A identificação e caracterização da leptina estabeleceram definitivamente o tecido adiposo como órgão endócrino (ZHANG, 1994). A leptina, produto do gene *ob*, é uma proteína secretada pelo tecido adiposo que sinaliza para o sistema nervoso central, o tamanho das reservas de gordura do corpo (VIDAL-PUIG et al., 1996).

Além da leptina, outras adipocinas foram identificadas e podem ser classificadas com base nos processos que regulam como homeostasia lipídica, função imune, sensibilidade à insulina, controle da pressão arterial, apetite e balanço energético (KARASTERGIOU; MOHAMED-ALI, 2010).

Alguns estímulos foram propostos para explicar a produção excessiva de adipocinas nos indivíduos obesos como:

1-Hipoxia: à medida que o tecido adiposo aumenta torna-se insuficiente para oxigenar adequadamente os adipócitos. A hipóxia causada induz uma resposta inflamatória que promove a angiogênese. A resposta adipocitária à hipoxia é provavelmente mediada pelo fator indutor de hipóxia-1 (HIF-1).

2-Estresse do retículo endoplasmático: O retículo endoplasmático aumenta sua ação frente à obesidade. O estresse do retículo endoplasmático conduz à ativação das cinases que estimulam a produção de citocinas inflamatórias, TNF alfa e IL-6.

3-Estresse oxidativo – resulta do aumento do aporte de glicose aos adipócitos que estimula a produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria. O estresse oxidativo ativa cinases promovendo a resposta inflamatória (BROWLEE, 2001; SHOELSON; LEE; YUAN, 2003; WENGER, 2002; ZICK, 2003).

O adipócito, de acordo com a sua localização, apresenta características metabólicas diferentes. A adiposidade intra-abdominal pode acarretar consequências mais drásticas para o indivíduo devido à capacidade de expansão limitada dos adipócitos viscerais (GIORGINO; LAVIOLA; ERIKSSON, 2005) o que os tornam disfuncionais. Estes adipócitos disfuncionais produzem quantidades ainda maiores de adipocinas.

Algumas das substâncias secretadas pelo tecido adiposo como a leptina, adiponectina, TNF alfa, entre outras, estão relacionadas com a sensibilidade tecidual à insulina. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é produzido em excesso pelo adipócito do obeso, resultando numa redução da atividade de quinase do receptor de insulina, contribuindo para o início da resistência à insulina e a evolução eventual para diabetes mellitus do tipo 2 (HOTAMISLIGIL et al., 1994).

Uma enzima mais ativa no tecido adiposo visceral é a beta hidroxisteroide desidrogenase tipo 1, responsável pela conversão de cortisona em cortisol em nível tecidual, é mais ativa no tecido adiposo visceral. Sendo este tecido mais sensível ao cortisol, provocaria alterações tais como hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes mellitus tipo II (BUJALSKA; KUMAR; STEWART, 1997).

Além disso, os adipócitos representam uma fonte de ácidos graxos livres derivados da hidrólise dos triglicerídeos. Estes ácidos graxos livres, também reduzem a sensibilidade à insulina em nível muscular, devido à sua capacidade para interferir com a sinalização intracelular dos hormônios pancreáticos. Uma grande quantidade de ácidos graxos livres induz uma síntese aumentada de glicose e triacilgliceróis e promove a secreção de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) (DANDONA et al., 2005).

A estrutura das lipoproteínas de alta densidade (HDL) também sofre alterações na presença do aumento sérico de triacilgliceróis. A enzima proteína de transferência colesterol esterificado (CETP) determina uma troca dos triglicerídeos das VLDL para as HDL e do colesterol esterificado das HDL para as VLDL. Devido a estas alterações, o clearance de HDL é aumentado, com a consequente redução dos seus níveis séricos. Isso leva a efeitos aterogênicos e redução da atividade antioxidante e endotelial, gerando menor remoção do colesterol dos tecidos periféricos. A CETP também promove a troca de triglicerídeos e colesterol entre as VLDL e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a hidrólise dos triacilgliceróis produz LDL pequenas e densas (DANDONA et al., 2005).

REFERÊNCIAS

- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Leptin. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 62, p. 413-437, 2011.
- ALESSANDRINI, L. et al. Near infrared spectroscopy: an analytical tool to predict coffee roasting degree. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 625, n. 1, p. 95-102, Jan. 2008.
- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, ago. 2009.
- AMORIM, H. V. **Relação entre alguns compostos orgânicos do grão de café verde com a qualidade da bebida**. 1972. 136 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1972.
- ANHÊ, F. F. et al. Polyphenols and type 2 diabetes: a prospective review. **Pharma Nutrition**, New York, v. 1, n. 4, p. 105-114, Oct. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Café e saúde: café e composição química**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=161&sid=81>>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO. **Suplemento alimentar e de promoção da saúde: informações sobre os fitoterápicos brasileiros**. 2004. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 10 jun. 2016.
- BEKEDAM, E. K. et al. Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 6, p. 2055-2063, Mar. 2008a.
- BEKEDAM, E. K. et al. Low molecular weight melanoidins in coffee brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 11, p. 4060-4067, June 2008b.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

- BIDEL, S. et al. Coffee consumption and risk of total and cardiovascular mortality among patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, New York, v. 49, n. 11, p. 2618-2626, Nov. 2006.
- BONITA, J. S. et al. Coffee and cardiovascular disease: *in vitro*, cellular, animal, and human studies. **Pharmacological Research**, London, v. 55, n. 3, p. 187-198, Mar. 2007.
- BROWLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, London, v. 414, p. 813-820, Dec. 2001.
- BUJALSKA, I. J.; KUMAR, S.; STEWART, P. M. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? **The Lancet**, London, v. 349, n. 9060, p. 1210-1213, Apr. 1997.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 84, p. 277-359, 2004.
- CAVIN, C. et al. Coffee and tea intake and risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 19, n. 7, p. 1723-1736, 2010.
- CELIK, T. et al. The effects of coffee intake on coronary heart disease: ongoing controversy. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 118-118, Sept. 2010.
- CHAGAS, S. J. de R. O. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais**. 1994. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.
- CHANG, Y. Y. et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects of polyphenol-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): flower-waterextract on livers of high-fat-diet fed hamsters. **Journal of Functional Foods**, New York, v. 5, n. 1, p. 44-52, 2013.
- CHO, A. S. et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 937-943, Mar. 2010.

CHU, Y. F. et al. Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 20, p. 9801-9808, Oct. 2009.

CLARKE, R. J. et al. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. London: Academic, 2003. v. 3, 1486 p.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee: chemistry**. New York: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1, 306 p.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, London, v. 40, n. 1, p. 35-42, Jan. 1991.

COWAN, T. E. et al. Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 25, n. 4, p. 489-495, 2014.

DANDONA, P. et al. Metabolic syndrome a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. **Circulation**, Baltimore, v. 111, p. 1448-1454, 2005.

DÓREA, J. G.; COSTA, T. H. M. da. Is coffee a functional food? **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 93, n. 6, p. 773-782, Dec. 2005.

DULLOO, A. et al. Normal caffeine consumption: influence on thermogenesis and daily energy expenditure in lean and postobese human volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 49, n. 1, p. 44-50, 1989.

DURAK, A.; GAWLIK-DZIKI, U.; KOWALSKA, I. Coffee with ginger: interactions of biologically active phytochemicals in the model system. **Food Chemistry**, London, v. 166, p. 261-269, Jan. 2015.

DURAK, A.; GAWLIK-DZIKI, U.; PECIO, Ł. Coffee with cinnamon: impact of phytochemicals interactions on antioxidant and anti-inflammatory in vitro activity. **Food Chemistry**, London, v. 162, p. 81-88, Nov. 2014.

DURAK, A.; GAWLIK-DZIKI, U.; SUGIER, D. Coffee enriched with willow (*Salix purpurea* and *Salix myrsinifolia*) bark preparation: interactions of antioxidative phytochemicals in a model system. **Journal of Functional Foods**, New York, v. 18, part B, p. 1106-1116, Oct. 2014.

ENCARNAÇÃO, R. O.; LIMA, D. R. **Café & saúde humana**. Brasília, DF: EMBRAPA Café, 2003. 64 p. (Documento, 1).

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 138, n. 12, p. 2309-2315, Dec. 2008.

FERNANDES, O. et al. **Reproductive toxicology**. New York: Elsevier, 1998. 435 p.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 216-229, abr. 2006.

FRANÇA, A. S. et al. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, London, v. 90, n. 1/2, p. 89-94, Mar./Apr. 2005.

FUMEAUX, R. et al. First synthesis, characterization, and evidence for the presence of hydroxycinnamic acid sulfate and glucuronide conjugates in human biological fluids as a result of coffee consumption. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 8, n. 22, p. 5199-5211, 2010.

GANGEHEI, L. et al. Oligonol a low molecular weight polyphenol of lychee fruit extract inhibits proliferation of influenza virus by blocking reactive oxygen species-dependent ERK phosphorylation. **Phytomedicine**, Jena, v. 17, n. 13, p. 1047-1056, 2010.

GIORGINO, F.; LAVIOLA, L.; ERIKSSON, J. W. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 183, n. 1, p. 13-30, Jan. 2005.

GONÇALVES, A. M. O. **Influência dos defeitos dos grãos de café na percepção das características sensoriais da bebida pelo consumidor**. 2006. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

- GOODMAN, B. A.; PASCUAL, E. C.; YERETZIAN, C. Real time monitoring of free radical processes during the roasting of coffee beans using electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Food Chemistry**, London, v. 125, p. 248-254, 2011.
- GOTTELAND, M.; DE-PABLO, V. S. Algunas verdades sobre el café. **Revista Chilena de Nutrição**, Santiago, v. 34, n. 2, p. 105-115, 2007.
- GRAHAM, T. E. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. **Sports Medicine**, Auckland, v. 31, n. 11, p. 785-807, 2001.
- GREENBERG, J. A. et al. Coffee, diabetes, and weight control. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 84, n. 4, p. 682-693, Oct. 2006.
- HALLIWELL, B. Antioxidant paradox. **The Lancet**, London, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, Apr. 2000.
- HECKMAN, J.; PINTO, R.; SAVELYEV, P. Understanding the mechanisms through which an influential early childhood program boosted adult outcomes. **The American Economic Review**, Nashville, v. 103, n. 6, p. 2052-2086, 2013.
- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **PNAS**, Washington, v. 91, n. 11, p. 4854-4858, 1994.
- ISOGAWA, A. et al. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, London, v. 361, n. 9344, p. 1477-1478, Nov. 2003.
- KARASTERGIOU, K.; MOHAMED-ALI, V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. **Molecular and Cellular Endocrinology**, New York, v. 318, n. 1/2, p. 69-78, Apr. 2010.
- LARGE, V. et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. **Diabetes Metabolism**, Paris, v. 30, n. 4, p. 294-309, Sept. 2004.
- LEE, K. J.; CHOI, J. H.; JEONG, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2118-2125, Nov. 2007.
- LERARIO, A. C.; LOTTENBERG, S. A. Mecanismos ambientais implicados no ganho de peso e as oportunidades para prevenção da obesidade. **Einstein**, São Paulo, v. 4, p. S7-S13, 2006. Suplemento 1.

LIMA, A. R. et al. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 20-24, jan. 2010.

LIU, Y.; KITTS, D. D. Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 8, p. 2418-2424, Oct. 2011.

LOPEZ-GALILEA, I.; PEÑA, M. P.; CID, C. Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, n. 1, p. 141-149, Jan. 2008.

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

MAZZAFERA, P. Mineral nutrition and caffeine content in coffee leaves. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 387-391, 1999.

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

MOREIRA, A. S. et al. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. **Food & Function**, London, v. 3, n. 9, p. 903-915, Sept. 2012.

MOTTA, E. L. **Avaliação da composição nutricional e atividade antioxidante de Litchi chinensis Sonn. ("Lichia") cultivada no Brasil**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

NATELLA, F. et al. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 6211-6216, 2002.

NOSCHANG, C. G. et al. Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. **Neurochemical Research**, New York, v. 34, p. 1568-1574, 2009.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted arabica coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, 1773-1782, 2001.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted robusta coffee as affected by the degree of roast. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 7046-7052, 2002.

NUNES, F. M.; DOMINGUES, M. R.; COIMBRA, M. A. Arabinosyl and glucosyl residues as structural features of acetylated galactomannans from green and roasted coffee infusions. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, p. 1689-1698, 2005.

ONAKPOYA, I.; TERRY, R.; ERNST, E. The use of green coffee extract as a weight loss supplement: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. **Gastroenterology Research and Practice**, Cairo, v. 2011, p. 382852, Aug. 2011.

PARK, J. Y. et al. Inhibition of adipogenesis by oligonol through Akt-mTOR inhibition in 3T3-L1 adipocytes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Cairo, v. 2014, p. 1-11, 2014.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 83, n. 2, p. 346-356, Dec. 1977.

POND, C. M. Long-term changes in adipose tissue in human disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 60, n. 3, p. 365-374, Aug. 2001.

REDEUIL, K. et al. Identification of novel circulating coffee metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, n. 29, p. 4678-4688, 2011.

REIS, P. R.; CUNHA, R. L.; CARVALHO, G. R. **Café arábica: da pós colheita ao consumo**. Lavras: Unidade Regional EPAMIG Sul de Minas, 2011. 734 p.

RODARTE, M. P. **Análise sensorial, química e perfil de constituintes voláteis de cafés especiais**. 2008. 147 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

RUESTEN, A. von et al. Diet and risk of chronic diseases: results from the first 8 years of follow-up in the epic-potsdam study. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 67, n. 4, p. 412-419, Feb. 2013.

SANTOS, R. M. M.; LIMA, D. R. A. Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: a mini-review. **European Journal of Nutrition**, London, v. 55, n. 4, p. 1345-1358, June 2016.

SCHILTER, B. et al. Coffee: recent developments. In: CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. (Ed.). **Coffee: recent developments**. London: Blackwell Science, 2001. p. 165-183.

SCREENATH, H. L. Development of caffeine in free coffee varieties. **Indian Coffee**, Bangalore, v. 61, n. 10, p. 13-14, 1997.

SHIMODA, S.; SEKI, E.; AITANI, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 6, p. 9, Mar. 2006.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; YUAN, M. Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. **International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders**, London, v. 27, p. S49-S52, Dec. 2003. Supplement.

SLAVIN, J. L.; LLOYD, B. Health benefits of fruits and vegetables. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, Rochville, v. 3, n. 4, p. 506-516, 2012.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 965-971, set./out. 2006.

TOLEDO, L. B.; BARBOSA, A. T. **Classificação e degustação de café**. Rio de Janeiro: ABIC Brasil, 1997. 20 p.

TORRES-FLUENTES, C. et al. A natural solution for obesity: bioactives for the prevention and treatment of weight gain: a review. **Nutritional Neuroscience**, London, v. 18, n. 2, p. 49-65, Feb. 2015.

TUOMILEHTO, J. et al. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged Finnish men and women. **JAMA**, Chicago, v. 291, n. 10, p. 1213-1219, Mar. 2004.

VIANI, R.; HORMAN, I. Thermal behavior of trigonelline. **Journal Food of Science**, Chicago, v. 39, n. 6, p. 1216-1217, Nov./Dec. 1974.

VIDAL-PUIG, A. et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 97, n. 11, p. 2553-2561, 1996.

VIGNOLLI, J. A. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, London, v. 124, n. 3, p. 863-868, Feb. 2011.

VINSON, J. A.; BURNHAM, B. R.; NAGENDRAN, M. V. 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, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, Auckland, v. 5, p. 21-27, Jan. 2012.

WANG, Y.; HO, C. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 18, p. 8109-8114, Aug. 2009.

WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. **FASEB Journal**, New York, v. 16, p. 1151-1162, Aug. 2002.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZHANG, W. L. et al. Coffee consumption and risk of cardiovascular events and all-cause mortality among women with type 2 diabetes. **Diabetologia**, New York, v. 52, n. 5, p. 810-817, May 2009.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, London, v. 372, p. 425-431, 1994.

ZHAO, Z. H. et al. 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF-alpha-induced secretion of interleukin-8 from caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 10, p. 3863-3868, May 2008.

ZICK, Y. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. **International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders**, London, v. 27, p. S56-S60, Dec. 2003. Supplement.

**CAPÍTULO 2 GRÃOS DE CAFÉS CRUS ORIUNDOS DE FRUTOS
IMATUROS DO CAFEIEIRO: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA,
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E EFEITO SOBRE O METABOLISMO
ENERGÉTICO DE CAMUNDONGOS**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e bioatividade de grãos oriundos de frutos imaturos sobre o metabolismo energético de camundongos obesos e eutróficos. Foram avaliados: a composição centesimal, teores de cafeína, compostos fenólicos totais, 5-ACQ e atividade antioxidante (DPPH-IC50). Para o ensaio *in vivo* os animais foram divididos em quatro grupos - Eutrófico: alimentados em uma dieta padrão AIN-93; Eutrófico café: alimentados em uma dieta padrão AIN-93 + 1,0% de defeitos verdes; Obeso: alimentados com uma dieta rica em gordura para induzir obesidade; Obeso café: alimentados com uma dieta rica em gordura para induzir a obesidade + 1,6% de defeitos do café verde. Sangue, tecidos adiposos branco (epidídimo e subcutâneo) e marrom, fígado e músculo gastrocnêmio foram coletados e pesados. Os parâmetros bioquímicos foram dosados no soro e os teores de lipídios totais, triacilglicerol e colesterol total foram dosados também no fígado. Após oito semanas de tratamento, os animais foram submetidos à medição do consumo de oxigênio. Para avaliação da atividade antioxidante *in vivo*, foram dosados os níveis de hidroperóxidos, MDA, SOD e catalase no tecido adiposo e fígado dos animais. O conteúdo de carboidratos, lipídios e macrominerais não diferiram entre as duas amostras analisadas. Os grãos defeituosos apresentaram quantidades consideráveis de compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro*. Os grãos defeitos verdes foram capazes de aumentar o gasto energético e reduzir massa gorda e o ganho de peso ponderal dos animais obesos. A atividade antioxidante *in vivo* dos grãos foi comprovada pelo aumento da atividade da enzima catalase no tecido adiposo dos animais eutróficos.

Palavras-chave: café Verde. Obesidade. Termogênico. Antioxidante

Raw coffee grains originated from immature coffee fruits: chemical characterization, antioxidant properties and effect over the energetic metabolism of mice

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the chemical composition and bioactivity of grains originated from immature fruits, and the effect of these grains over the energetic metabolism of obese and eutrophic mice. We evaluated the centesimal composition, contents of caffeine, total phenolic compounds, 5-ACQ and antioxidant activity (DPPH-IC50). For the *in vivo* trial, the animals were divided into four groups: Eutrophic – fed a standard diet AIN-93; Eutrophic coffee – fed a standard diet AIN-93 + 1.0% of green defect; Obese – fed a diet rich in fat to induce obesity; Obese coffee – fed a diet rich in fat to induce obesity + 1.6% of green defect. Blood, white (epididymis and subcutaneous) and brown fat tissue, liver and gastrocnemius muscle were collected and weighed. The biochemical parameters were dosed in serum, and the contents of total lipids, triacylglycerol and cholesterol were dosed in the liver. After 8 weeks of treatment, the animals were submitted to the measuring of oxygen consumption. For evaluating the antioxidant activity *in vivo*, the levels of hydroperoxides, MDA, SOD and catalase in the fat tissue and liver were dosed. The contents of carbohydrates, lipids and macrominerals did not differ between the two analyzed samples. The defective grains presented considerable amounts of bioactive compounds and antioxidant activity *in vitro*. The green defect grains were capable of increasing the energy expense and reducing the fat mass, as well as the increase in ponderal weight of the obese animals. The *in vivo* antioxidant activity of the grains was proven by the increase of the activity of enzyme catalase in the fat tissue of the eutrophic animals.

Keywords: Antioxidant. Raw coffee. Immature grains. Thermogenic. Defect.

1 INTRODUÇÃO

O poder antioxidante do café se deve a presença e aos potenciais sinérgicos entre cafeína e outros componentes bioativos incluindo compostos fenólicos presentes naturalmente nos grãos (BAEZA et al., 2014; FERRUZZI, 2010).

Os ácidos clorogênicos e seus isômeros são os principais componentes da fração fenólica dos grãos *in natura* (FARAH et al., 2008). As propriedades benéficas dos polifenóis justificam o grande número de pesquisas recentes realizadas com os grãos crus, já que o processo de torração, principalmente aquele mais drástico, altera a composição fenólica de grãos (PERRONE; FARAH; DONANGELO, 2012).

Estudos recentes têm comprovado que grãos crus de café possuem a capacidade de estimular a lipólise, mobilizando gordura dos tecidos (JARRAR; OBEID, 2014; SONG; CHOI; PARK, 2014) o que ocasiona perda de peso. Esse efeito pode ser útil no controle da obesidade e de suas comorbidades associadas como aterosclerose, a síndrome metabólica e o diabetes mellitus (LEE et al., 2009).

Os grãos defeitos verdes são oriundos de frutos imaturos do cafeeiro, e, quando colhidos e processados juntamente aos frutos de estágio de maturação ideal (cereja), afetam a qualidade sensorial da bebida por conferir adstringência a esta (VASCONCELOS, 2005).

Estes grãos juntos aos grãos pretos e ardidos são conhecidos como defeitos intrínsecos do café (PVA) e são os que mais afetam a qualidade do produto. Os PVAs representam 20% da produção brasileira de café, ou seja, cerca de três milhões de saca por ano (FRANÇA et al., 2005).

A confirmação de um possível efeito do defeito verde no estresse oxidativo e na obesidade levaria um benefício de utilização destes grãos na

saúde humana, além de direcionar para uma nova finalidade, retirando-os dos grãos de café isentos de defeitos que possuem alto valor comercial.

Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar a composição química, a atividade antioxidante *in vitro* e o efeito de grãos defeitos verdes do café no perfil lipídico, estresse oxidativo e metabolismo energético de camundongos eutróficos e obesos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalações e matéria-prima

As análises de composição centesimal foram realizadas no Laboratório Central do Departamento de Ciência dos Alimentos e a análise da atividade antioxidante realizada no Polo de Tecnologia em Qualidade do Café - INOVACAFÉ da UFLA. As análises de compostos bioativos foram realizadas no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados o biotério Ênio Cardillo e as análises feitas no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Foram utilizados neste experimento frutos colhidos no estádio cereja e estádio verde. Após a colheita, os frutos foram levados ao lavador onde foram lavados e posteriormente secados em terreiro. Após a secagem, os grãos foram beneficiados e classificados manualmente, obtendo-se grãos de café sem defeito e grãos defeitos verdes. Os grãos foram moídos em granulometria fina em moinho IKA A11 com o auxílio de nitrogênio líquido e depois selados a vácuo e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o uso.

2.2 Composição centesimal

Foi realizada análise de composição centesimal, conforme a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005) nos grãos crus. A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, com emprego de calor, baseando-se na perda de peso do material submetido ao aquecimento a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, até peso constante. Para o extrato etéreo, foi realizado o método de “*Soxhlet*”, baseado na perda de peso do material submetido à extração com éter. A fração proteica foi determinada pelo método de “*Kjeldahl*”, por meio da determinação da porcentagem total de nitrogênio e multiplicado pelo fator de 6,25. O teor de

cinzas (resíduo mineral fixo) foi obtido pela calcinação da amostra, em forno mufla, a 550 °C, até a obtenção de cinzas claras ou ligeiramente acinzentadas. O conteúdo de fibra bruta foi obtido pelo método enzimático gravimétrico. A fração glicídica (extrato não nitrogenado) foi calculada por diferença, subtraindo a 100 a somatória da porcentagem de umidade, extrato etéreo, proteína, cinza e fibra.

2.3 Determinação dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico

Para a determinação de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico, foram utilizados procedimentos de extração com água quente, segundo Vitorino et al. (2001), e análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado cromatógrafo da marca Shimadzu^R com coluna em fase reversa C-18. O sistema foi acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu^R (modelo SPD-10A) conectado por uma interface (CBM-101) a um microcomputador para processamento de dados.

As condições de análise otimizadas foram:

- 1) Fluxo: 1 mL/min
- 2) Fase móvel: metanol, água e ácido acético (20:80:1)
- 3) Temperatura: ambiente
- 4) Comprimento de onda: 272 nm
- 5) Pressão: 130 atm

2.4 Atividade antioxidante *in vitro* (DPPH- IC50)

Para a análise da atividade sequestrante de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) do extrato, cada amostra foi diluída em etanol a 25, 50, 100, 200 µg.mL⁻¹. Em 4 mL da amostra, foi adicionado 1 mL de DPPH(0,5 mmol.L⁻¹) igualmente diluído em etanol. A mistura foi acondicionada em tubo de ensaio âmbar e agitada. Decorridos 30 min, foi realizada a leitura a 517 nm. A diminuição na absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres. Os

testes foram realizados em triplicata. Foi realizado o IC50, em que se determina a quantidade de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH.

2.5 Ensaio *in vivo*

Foram avaliados o peso, consumo alimentar, peso dos tecidos dos camundongos além de parâmetros bioquímicos do soro e atividade antioxidante do soro e tecido adiposo dos animais.

2.5.1 Animais

Os camundongos C57BL/6 machos, com oito semanas de idade foram mantidos em um ambiente de luz de 12 horas (7:00-19:00) e temperatura controlada (30-32 °C). Os animais foram divididos em quatro grupos:

- a) Eutrófico: alimentados com uma dieta padrão AIN-93,
- b) Eutrófico café: alimentados com uma dieta padrão AIN-93 acrescida de 1,0% de grãos classificados como defeito verde.
- c) Obeso: alimentados com uma dieta rica em gordura para induzir obesidade.
- d) Obeso café: alimentados com uma dieta rica em gordura para induzir a obesidade + 1,65% de grãos classificados como defeito verde.

Os animais tiveram acesso livre à água e à dieta. O cálculo da quantidade de defeito verde foi baseado no consumo médio de cada dieta (padrão e indutora de obesidade) de estudos prévios.

Os animais receberam as dietas durante nove semanas. A dieta padrão (AIN-93) foi composta por 50,30% de proteína, carboidrato 41,90% e 7,80% de gordura, com um total de 2,18 kcal/g de dieta (REEVES; NIELSEN; FAHEY JUNIOR, 1993). A dieta rica em gorduras foi composta por 25%, 61% e 15% do

total de kcal de carboidrato, gordura e proteína, respectivamente, e tinha uma densidade calórica de 5,21 kcal/g de dieta (AKAGIRI et al., 2008).

O peso corporal e ingestão das dietas foram medidos uma vez por semana. No final do período experimental, os animais foram mantidos em jejum durante a noite e sacrificados sob anestesia. Sangue, tecidos adiposos branco (epidídimo e subcutâneo) e marrom, fígado e músculo gastrocnêmio foram coletadas imediatamente após a eutanásia para análises subsequentes. A adiposidade foi avaliada pela quantidade de tecido adiposo em relação ao peso total do animal.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da UFLA, o protocolo 031/2014.

2.5.2 Calorimetria (consumo de O₂ e gasto energético)

Após oito semanas de tratamento, os animais foram submetidos à medição do consumo de oxigênio. A taxa metabólica foi estimada por gravadores contínuos de consumo de oxigênio (VO₂) e CO₂ liberados com um calorímetro indirecto-fluxo aberto (Gas Analyzer LE405, Panlab Harvard).

Ao final de oito semanas de dieta, os camundongos foram pesados e colocados no interior da câmara de medição, onde permaneceram durante 50 minutos, sem qualquer influência externa. O consumo de VO₂ foi registrado para cada minuto usando um sistema informatizado (Metabolism, Harvard.). Os 20 minutos finais de registro foram utilizados para a análise, enquanto os primeiros 30 minutos, foram ignorados para garantir a condição de descanso do animal (após o estresse do tratamento) e para evitar a influência de gases de espaço no interior da câmara (O₂ e CO₂).

Os valores da relação de troca VO₂ e respiratória (RER = VCO₂ / VO₂) foram utilizados para estimar o gasto de energia (EE), através da equação, EE = [3,815 + (1.232 x RER)] x VO₂ x 1,44.

2.5.3 Parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos: glicose sérica, triacilglicerol, colesterol total e HDL-c foram dosados no soro dos animais utilizando kits enzimáticos colorimétricos (Labtest, Brasil). O colesterol não HDL-c foi determinado subtraindo os teores de colesterol HDL dos teores de colesterol total.

O conteúdo total de lípidos no fígado foi extraída e determinada de acordo com Folch, Lees e Sloane Stanley (1957) e o triacilglicerol e concentração de colesterol total foram medidos utilizando kits enzimáticos colorimétricos (Labtest, Brasil) como previamente descrito.

2.5.4 Atividade antioxidante *in vivo*

A atividade antioxidante *in vivo* foi avaliada pela dosagem de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico- MDA) e hidroperóxidos e de enzimas antioxidantes no soro e no tecido adiposo dos animais.

2.5.4.1 Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico- MDA)

A medida dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico foi realizada em microplacas (BUEGE; AUST, 1978). Para isso, foram obtidos os sobrenadantes de fígado e tecido adiposo por centrifugação em solução tampão. Em seguida, 250 μL do sobrenadante foram adicionados a 500 μL da solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCL 0,25 N). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e então colocadas sob água corrente até esfriarem. Foram adicionados 750 μL de álcool butílico e os tubos foram vigorosamente agitados. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente, e 200 μL do sobrenadante foram plaqueados, em duplicata. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento

de onda de 535 nm, e os resultados foram normalizados pela concentração de proteína no fígado e tecido adiposo (LOWRY et al., 1951).

2.5.4.2 Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos no fígado e tecido adiposo

O ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange consiste basicamente na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) a férricos (Fe^{3+}) sob condições ácidas pelos hidroperóxidos (BANERJEE et al., 2002; NOUROOZ-ZADEH; TAJADDINI-SARMADI; WOLFF, 1994). O indicador utilizado é o xilenol orange, uma vez que se liga ao íon férrico produzindo um cromóforo azul-arroxeadado, detectado por espectrofotômetro.

A medida da concentração de hidroperóxidos foi realizada em microplaca. No momento da realização do ensaio, uma parte da solução FOX (preparado pela dissolução do xilenol orange e do sulfato ferroso amoniacal em 250 mM de H_2SO_4 para uma concentração final de 1 e 2,5 mM respectivamente) foi diluída em nove partes da solução de metanol contendo 4,4 mM de BHT (hidroxitolueno butilado), obtendo-se, assim, o reagente FOX-2. Para as dosagens, aos sobrenadantes de fígado e de tecido adiposo (20 μL) foram acrescentados 180 μL do reagente FOX-2, diretamente na microplaca, em duplicata, e o branco foi feito utilizando água deionizada no lugar do sobrenadante. Em seguida, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos, e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560 nm.

Na segunda etapa da técnica, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com trifenílfostina (TPP). A TPP é utilizada como eficiente ferramenta para distinção entre peróxido de hidrogênio e peróxidos (não- H_2O_2), já que a presença de TPP indica o teor de peróxido de hidrogênio na amostra (BANERJEE et al., 2002; NOUROOZ-ZADEH; TAJADDINI-SARMADI; WOLFF, 1994). Aos sobrenadantes do fígado e tecido adiposo (15 μL) foram

adicionados 5 μL da solução de TPP em metanol (TPP a 10 mM), diretamente na microplaca, em duplicata, e o branco foi feito utilizando água deionizada. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos, após este tempo foi acrescentado 180 μL do reagente FOX-2. As amostras foram mantidas novamente à temperatura ambiente por mais 30 minutos e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560 nm. A concentração de hidroperóxidos foi estimada pelo coeficiente de extinção de hidroperóxidos, $4,3 \times 10^4 \text{M}^{-1}$, e pelo coeficiente de extinção do cromóforo azul-arroxeadado produzido pelo xilenol orange, ao se ligar aos íons férricos, $1,5 \times 10^4 \text{M}^{-1}$. Para quantificar os hidroperóxidos da amostra, foram subtraídas as dosagens com TPP daquelas sem TPP (sem TPP - com TPP = quantidade de hidroperóxidos da amostra), e o resultado foi normalizado pela concentração de proteína no fígado e tecido adiposo (LOWRY et al., 1951).

2.5.4.3 Atividade da superóxido dismutase no fígado e tecido adiposo

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade em catalisar a dismutação de radicais superóxidos (O_2^-), diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogallol. Para esta dosagem, em placa de 96 poços, foram adicionados 30 μL do sobrenadante de fígado, 99 μL do PBS 1x, 6 μL do MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium) e 15 μL do pirogallol. Em outra placa de 96 poços, foram adicionados 30 μL do sobrenadante de tecido adiposo, 99 μL do PBS 1x, 6 μL do MTT e 15 μL do pirogallol. No branco, o pirogallol foi substituído por PBS 1x, e no padrão a amostra foi substituída por PBS 1x. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 37 °C, a reação foi parada com 150 μL de DMSO (dimetil sulfóxido) e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 570 nm.

Para o cálculo da atividade, foi considerado que uma unidade (U) de SOD é capaz de evitar a auto-oxidação de 50% de pirogallol do padrão. Após a

normalização pela concentração de proteína no fígado e tecido adiposo (LOWRY et al., 1951), o resultado foi expresso em unidades de SOD por mg de proteína de fígado e de tecido adiposo.

2.5.4.4 Atividade da catalase no fígado e tecido adiposo

A avaliação da atividade de catalase se baseia no decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – (A_{240}) pela decomposição deste pela catalase ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), de acordo com Nelson e Kiesow (1972).

Para esta dosagem, 25 μL do sobrenadante do fígado e 25 μL do tecido adiposo já diluídos (1:25) em PBS 1x foram acrescentados a 1 mL de PBS 1x em cubeta de quartzo. Foram então acrescentados 25 μL de solução de H_2O_2 0,3M e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 240 nm por dois minutos. Os cálculos foram feitos pela diferença de leitura no tempo final pelo tempo inicial, dividido pelo volume (mL) da amostra e depois dividido por dois para obtenção do resultado da atividade da enzima em 1 minuto. Após a normalização pela concentração de proteína no fígado e no tecido adiposo (LOWRY et al., 1951), o resultado foi expresso em delta E por minuto por g de proteína.

2.6 Análises Estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e quanto à presença de *outliers* pelo teste de *Grubbs* e pelo teste de *Box-plot*.

Para comparação entre os grupos eutróficos e entre os grupos obesos e para comparação entre os grãos de café e grãos defeitos verdes quanto à composição e atividade antioxidante *in vitro*, utilizou-se o teste t de *Student* não pareado (dados paramétricos) ou o teste de *Mann Whitney* (dados não paramétricos). Para alguns parâmetros do ensaio *in vivo*, utilizou-se um teste

ANOVA para comparar os quatro grupos (Eutrófico, Eutrófico Café, Obeso e Obeso Café).

Os resultados foram expressos como média e erro padrão ou em mediana e intervalo interquartil. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism 6,0®. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição centesimal

A composição centesimal dos grãos de café e dos grãos classificados como defeito verde está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição centesimal de grãos de café e de grãos classificados como defeito verde, crus.

Tratamentos	Umíd	CHO	PTN	PTN*	LIP	Fibra	Cinzas
Grãos sadios	11,71a (±0,037)	45,75a (±0,127)	11,98b (±0,012)	9,71b (±0,042)	7,67a (±0,164)	18,85b (±0,117)	2,92b (±0,0004)
Defeito verde	11,17b (±0,020)	45,62a (±0,098)	12,85a (±0,017)	10,63a (±0,010)	8,00a (±0,074)	19,50a (±0,180)	3,56a (±0,0012)

Médias seguidas de diferentes letras diferem ($p \leq 0,05$) pelo test T Student. CHO = carboidrato; PTN = proteína; PTN * = proteína corrigida; LIP = lipídios.

A composição química do café cru depende da espécie e da variedade, e também de outros fatores como práticas agrícolas, grau de maturação do fruto do café, processamento primário e condições de estocagem (TOLEDO; BARBOSA, 1997).

Os principais constituintes dos grãos de café crus são carboidratos (mais que 50% do peso seco) solúveis (galactomananas e arabinogalactanas) e insolúveis em água (celulose), compostos fenólicos, cafeína, proteínas, lipídios e minerais (STELMACH; Pohl; Szymczycha-Madeja, 2015). O conteúdo de carboidratos e lipídios não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre as duas amostras analisadas. Vasconcelos et al. (2007) observaram diferenças entre grãos de café sem defeitos e grãos defeituosos para os seguintes parâmetros: cinzas, umidade e teor de lipídios. No estudo de Oliveira et al. (2006), os autores verificaram que após a torração, a composição de grãos sadios e defeitos foram semelhantes. Na Tabela 1, é possível também observar maiores teores de umidade para os grãos imaturos e os valores foram superiores aos obtidos por

Oliveira et al. (2006). Os níveis de umidade dos grãos estudados neste trabalho estão acima dos valores encontrados por Vasconcelos et al. (2007).

Existem evidências que os teores de proteína de cafés de diferentes qualidades, ou mesmo de espécies diferentes (Arábica ou Robusta), podem ser significativamente diferentes. No estudo de Oliveira et al. (2006), os níveis de proteínas foram superiores nos grãos pretos, porém não foi verificada diferença entre grãos sadios e grãos imaturos, resultado contrário ao obtido neste estudo, em que o conteúdo protéico foi superior no defeito verde quando comparado com os grãos sadios. Os autores salientaram que o método para avaliação dos níveis de proteínas pode incluir trigonelina e cafeína se for baseado na determinação de nitrogênio bruto multiplicado pelo fator de 6,25 (OLIVEIRA et al., 2006). A metodologia descrita, foi usada neste estudo, por isso os teores de cafeína e trigonelina foram subtraídos do valor total, levando ao conteúdo proteico corrigido (Tabela 1), que foram mais elevados nos grãos imaturos.

Esses resultados revelam que o estágio de maturação dos frutos (imaturado ou cereja) interferem em alguns parâmetros da composição dos grãos.

3.2 Compostos bioativos

Os teores de compostos bioativos (cafeína, ácido clorogênico e trigonelina) dos grãos de café e dos grãos classificados defeito verde estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Teores de cafeína, ácido clorogênico e trigonelina dos grãos de café e de grãos classificados como defeito verde (g/100 g).

	Grãos sadios	Grãos defeitos verdes
Cafeína	1,13 ($\pm 0,09$)	1,11 ($\pm 0,13$)
5-ACQ	3,27 ($\pm 0,02$)	3,34 ($\pm 0,02$) *
Trigonelina	1,13 ($\pm 0,02$)	1,11 ($\pm 0,02$)

Médias (\pm desvio padrão). *Diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$) pelo Teste t Student.

O conteúdo de cafeína presente nos grãos de café e nos grãos defeitos verdes foram iguais ($p \leq 0,05$). Os teores estão de acordo com os descritos na literatura. A cafeína é um alcaloide conhecido por suas propriedades estimulantes e termogênicas. Sua atividade antioxidante está baseada na inibição da lipoperoxidação induzida por radicais hidroxilas (OH.), peróxidos (ROO.) e oxigênio singlete, convertendo em um potente antioxidante com capacidade similar à glutatona e superior ao ácido ascórbico (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1991). Lopez-Galilea, Peña e Cid (2008) concluíram que a cafeína possui atividade antioxidante em sistemas-modelo.

Os teores de ácido 5 cafeoilquínico (5-ACQ), ácido clorogênico majoritário nos grãos de café, foram superiores nos grãos imaturos crus Estes resultados corroboram com os obtidos por Mazzafera (1999), que reportou maior conteúdo de 5-ACQ em grãos imaturos. Ramalakshmi, Kubra e Rao (2008) também encontraram maiores teores de ácido clorogênico nos grãos imaturos quando comparados aos grãos sadios.

Os polifenóis importantes no café são os flavonoides e ácidos fenólicos (WANG; HO, 2009). O ácido cafeico e os derivados do ácido clorogênico são os ácidos fenólicos mais abundantes no café. Ácidos clorogênicos são ésteres de ácido cafeico e ácido quínico com capacidades antioxidante e anti-hipertensiva (RIBEIRO et al., 2014). Compostos fenólicos são responsáveis pela

adstringência, sabor, e atividade antioxidante dos alimentos (CHEONG; YOU; AVERY, 2013; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os teores de trigonelina não diferiram entre as duas amostras. As perdas do composto podem variar de 50% a 100% de acordo com o grau de torração (CLIFFORD, 1975). Durante a torração, a trigonelina é degradada gerando a niacina, uma vitamina pertencente ao grupo de vitaminas do complexo B (VIANI; HORMAN, 1974), além de gerar compostos aromáticos.

3.3 Atividade antioxidante *in vitro* (DPPH-IC50)

A atividade sequestrante de radicais livres dos grãos de café e dos grãos classificados como grãos defeito verde está demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade sequestrante de radicais livres DPPH-IC50 de grãos de café e de grãos classificados como defeito verde

Tratamentos	DPPH (IC50)	
Grãos de café	4,35b	(±0,060)
Grãos “defeito verde”	6,61a	(±0,439)

Médias seguidas de diferentes letras diferem ($p \leq 0.05$) pelo test T Student.

O método DPPH é baseado na redução da taxa de DPPH radical estável. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R\cdot$), o DPPH \cdot é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H). O EC50 baseia-se na redução do radical DPPH \cdot que ao fixar um H. (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante consumida na redução de 50% do radical DPPH (HUANG et al., 2005). Dessa maneira, quanto menor o valor obtido, maior a capacidade antioxidante.

Observa-se que ambas as amostras possuem capacidade em sequestrar radicais livres DPPH (Tabela 3), sendo que os grãos de café sem defeitos

possuem maior potencial de captura de radicais livres que com o defeito verde, apesar dos menores teores de 5-ACQ presentes nos grãos sadios (Tabela 2). No entanto, só foram quantificados os teores de 5-ACQ e outros compostos fenólicos podem estar presentes na composição destes grãos.

A capacidade antioxidante dos polifenóis é influenciada pelo número e posição dos grupos OH, assim como pelas posições de glicosilação (HALLIWELL, 2004). São capazes de captar radicais alcoxila (RO^{\bullet}), alquilperoxila (ROO^{\bullet}), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}), além do oxidante peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}/ONOOH$) (WANG; HO, 2009). Além disso, os polifenóis extraídos dos grãos crus são capazes de inibir a lipoxigenase (DURAK; GAWLIK-DZIKI; KOWALSKA, 2015; DURAK; GAWLIK-DZIKI; PECIO, 2014; DURAK; GAWLIK-DZIKI; SUGIER, 2014).

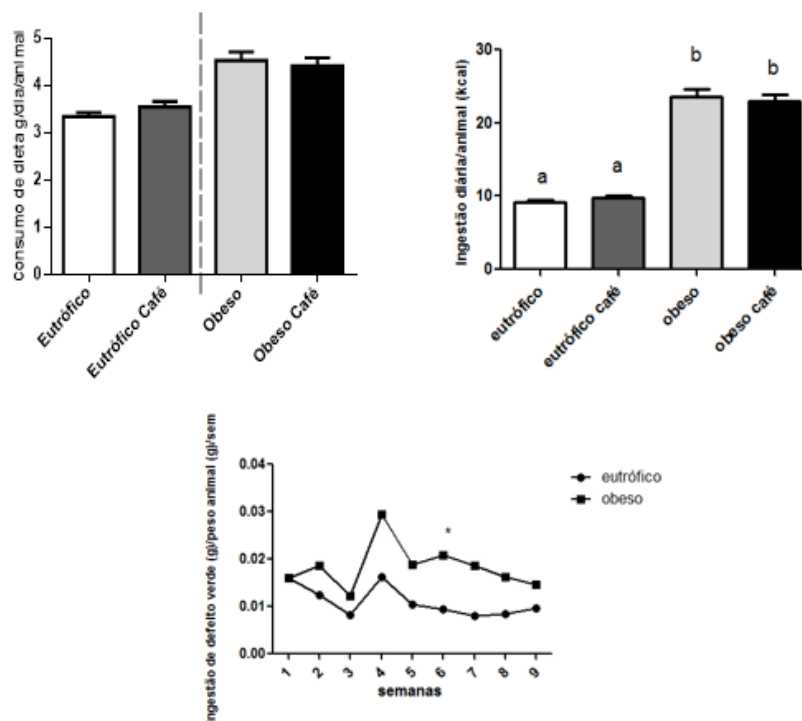
3.4 Ensaio *in vivo*

Os resultados de peso, consumo alimentar, peso dos tecidos dos camundongos além de parâmetros bioquímicos do soro e atividade antioxidante do soro e tecido adiposo dos animais estão descritos a seguir.

3.4.1 Consumo dietético e calórico

O consumo dietético (g/dia) e calórico (Kcal/dia) dos animais e o consumo dos grãos classificados defeito verde (g/peso do animal) estão demonstrados na Figura 1.

Figura 1 - (A) Consumo dietético (g/dia), (B) calórico (Kcal/dia) e (C) ingestão de grãos classificados como defeito verde por animais obesos e eutróficos.



*Diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste T Student. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os animais que receberam dieta indutora de obesidade (grupos obesos) tiveram maior consumo calórico (Figura 1b) quando comparados aos animais que receberam dieta padrão- AIN-93 (grupos eutróficos) comparados pelo teste de Tukey. A Figura 1a mostra que o consumo de dieta entre grupos eutróficos foi igual ($p \leq 0,05$ - teste T Student) assim como o consumo dos animais obesos.

Os cálculos do consumo diário e valor calórico das dietas foram feitos a partir de estudos prévios em que foram utilizadas a mesma dieta e a mesma

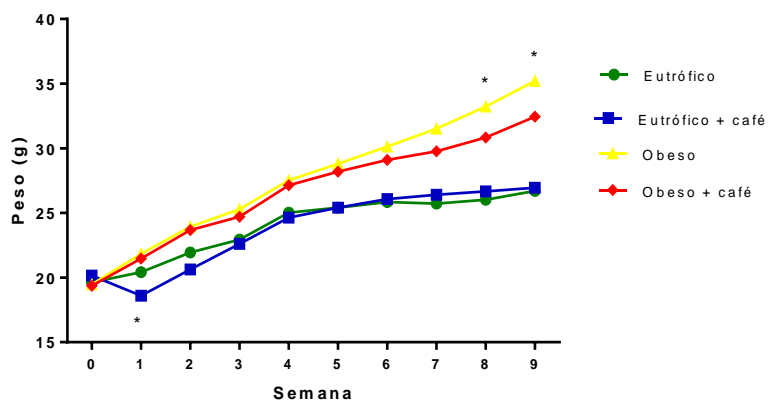
espécie de camundongos, no entanto, observou-se neste estudo um maior consumo de dieta indutora de obesidade do que era esperado.

Em relação ao consumo do defeito verde, camundongos do grupo obeso ingeriram maior quantidade quando comparados aos do grupo eutrófico (Figura 1-C) devido ao maior consumo de dieta. Por esta razão, os dados foram comparados entre os grupos eutróficos e entre os grupos obesos.

3.4.2 Peso ponderal dos animais, adiposidade e pesos dos tecidos adiposos: epididimal e subcutâneo e marrom

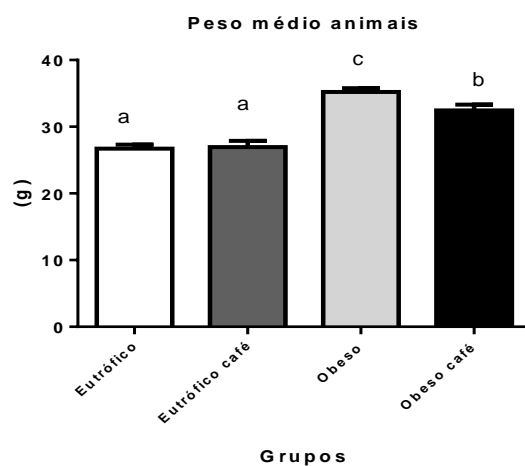
A evolução ponderal e os pesos finais dos animais bem como os pesos dos tecidos adiposos epididimal, subcutâneo, marrom e adiposidade estão demonstrados nas Figuras 2, 3 e 4 respectivamente.

Figura 2 - Peso ponderal dos animais eutróficos e obesos controles e alimentados com grãos classificados defeito verde ao longo das nove semanas de tratamento. *



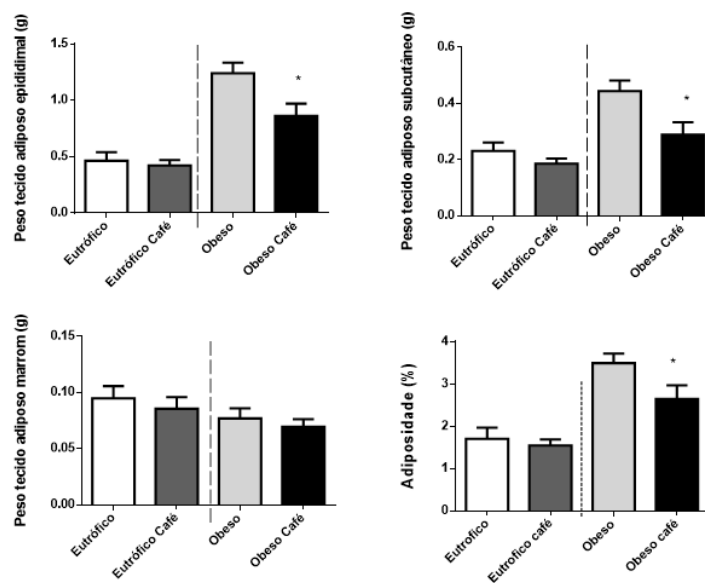
Diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste T Student.

Figura 3 - Peso final dos animais dos grupos eutróficos e obesos controles e alimentados com grãos classificados defeito verde.



Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 4 - Peso dos tecidos adiposos epididimal, subcutâneo, marrom (g) e adiposidade (%) dos grupos eutróficos e obesos controles e alimentados com grãos classificados defeito verde.



*Diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste T.

O peso médio dos animais alimentados com dieta indutora de obesidade foi significativamente maior que o dos animais alimentados com dieta padrão (Figura 3). Para este parâmetro, foi realizada uma análise comparando todos os grupos para comprovar a indução da obesidade.

O ganho de peso ponderal (Figura 2) e os pesos dos tecidos adiposos epididimal e subcutâneo (Figura 4) foram menores nos camundongos obesos que ingeriram defeito verde quando comparados aos animais obesos. Não houve diferença entre os grupos eutróficos em relação a estes parâmetros.

Estes resultados ocorreram possivelmente porque os animais eutróficos ingeriram uma quantidade significativamente menor de defeito verde (Figura 1) quando comparados aos camundongos obesos. Porém, deve-se considerar que as respostas metabólicas provocadas pelos compostos presentes no defeito verde podem ter evidências apenas quando estabelecida a obesidade.

Estudos recentes têm comprovado que o café possui a capacidade de estimular lipólise (JARRAR; OBEID, 2014; SONG; CHOI; PARK, 2014). No estudo de Su et al. (2013), os autores sugeriram que o consumo de uma xícara de café contendo 150 mg de cafeína por dia pode diminuir a diferenciação de adipócitos, ocasionando redução de peso corporal.

A cafeína exerce um efeito sobre a descarga das células nervosas e liberação de alguns outros neurotransmissores e hormônios, tais como a adrenalina, agindo também no aumento da secreção da enzima lipase, hormônio sensível, uma lipoproteína que mobiliza os depósitos de gordura para utilizar como fonte de energia em vez do glicogênio muscular, ou seja, poupa o glicogênio (PETERSON, 1977).

Além da cafeína, compostos fenólicos, abundantes nos grãos crus também foram relacionados com a redução do peso corporal. Foi relatado por Murase et al. (2011) que a suplementação com ácido clorogênico pode reduzir o acúmulo de gordura em vários tecidos, através de ações inibitórias de enzimas

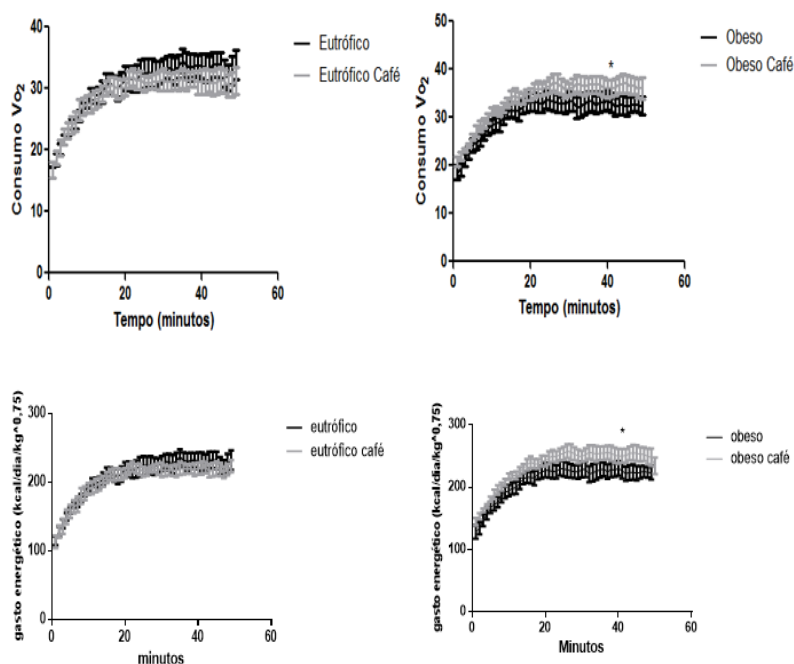
envolvidas na lipogênese. Em um estudo realizado por Cho et al. (2010), os autores observaram que o ácido cafeico e ácido clorogênico reduziram o peso corporal e os níveis de hormônios relacionados à obesidade em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

Por outro lado, o aumento de elétrons gerado pela termogênese pode gerar um aumento do estresse oxidativo, pelo aumento da produção de espécies reativas.

3.4.3 Consumo de O₂ e gasto energético

O consumo de oxigênio (O₂) e o gasto energético dos animais dos grupos estudados estão representados na Figura 5.

Figura 5 - Consumo de O₂ e gasto energético de animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde.



*Diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste T.

O consumo de oxigênio e gasto energético justifica os resultados de peso corporal e adiposidade dos animais, comprovando o aumento da termogênese.

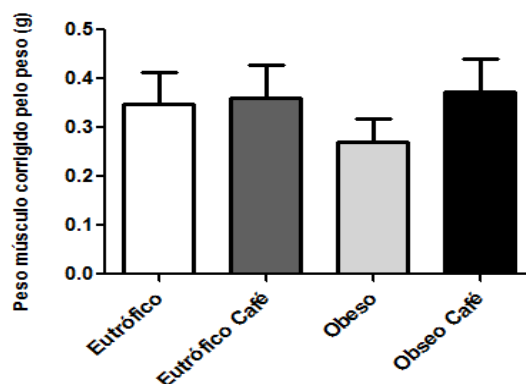
Os camundongos obesos que consumiram o café imaturo tiveram maior consumo de O₂ e maior gasto energético, comparados aos animais do grupo obeso, e, esta diferença não é observada entre os grupos eutróficos (Figura 4). O aumento do metabolismo induzido pelo café verde apenas nos animais obesos pode ser devido ao maior consumo do defeito verde ou estas respostas metabólicas podem ser evidentes apenas na obesidade.

A cafeína é capaz de elevar em aproximadamente 5% o gasto energético ao longo de 24 horas. Além do aumento do gasto energético favorecido pela liberação de neurotransmissores, exerce uma ação diurética, favorece o esforço muscular, reduz a apatia e a sonolência. Isso porque funciona como um bloqueador não seletivo dos receptores de adenosina (A1, A2A, A2B e A3A) afetando alguns dos processos fundamentais no organismo.

3.4.4 Peso do músculo gastrocnêmico

Os pesos do músculo gastrocnêmico dos animais dos grupos estudados estão demonstrados na Figura 6.

Figura 6 - Peso do músculo gastrocnêmico dos animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde.



*Diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste T.

Não foi possível inferir se o defeito verde e/ou a redução no ganho de peso dos animais obesos tratados com o café verde alterou o peso do músculo gastrocnêmico dos camundongos já que não foi observada diferença ($p \leq 0,05$ pelo teste de t Student) entre grupos eutróficos e entre grupos obesos. Uma análise comparando os quatro grupos foi feita para avaliar se a dieta indutora de obesidade influenciou o peso do músculo dos animais e também não foi observada diferença estatística ($p \leq 0,05$ pelo teste Tukey).

O efeito lipolítico do café induzido pelo aumento de AMC cíclico e o consequente aumento da Lipase Hormônio Sensível pode representar redução de gordura corporal (como comprovado neste estudo) e possível aumento de ácidos graxos livres. Assim, a utilização destes ácidos graxos para a produção de energia pouparia o glicogênio muscular, retardando a fadiga. Como o glicogênio muscular é a primeira limitação nos exercícios, a cafeína poderia exercer efeitos ergogênicos em que o glicogênio muscular é o fator limitante.

A cafeína diminui o limiar de excitabilidade e prolonga a duração do período ativo da contração muscular, por aumentar a liberação de cálcio do

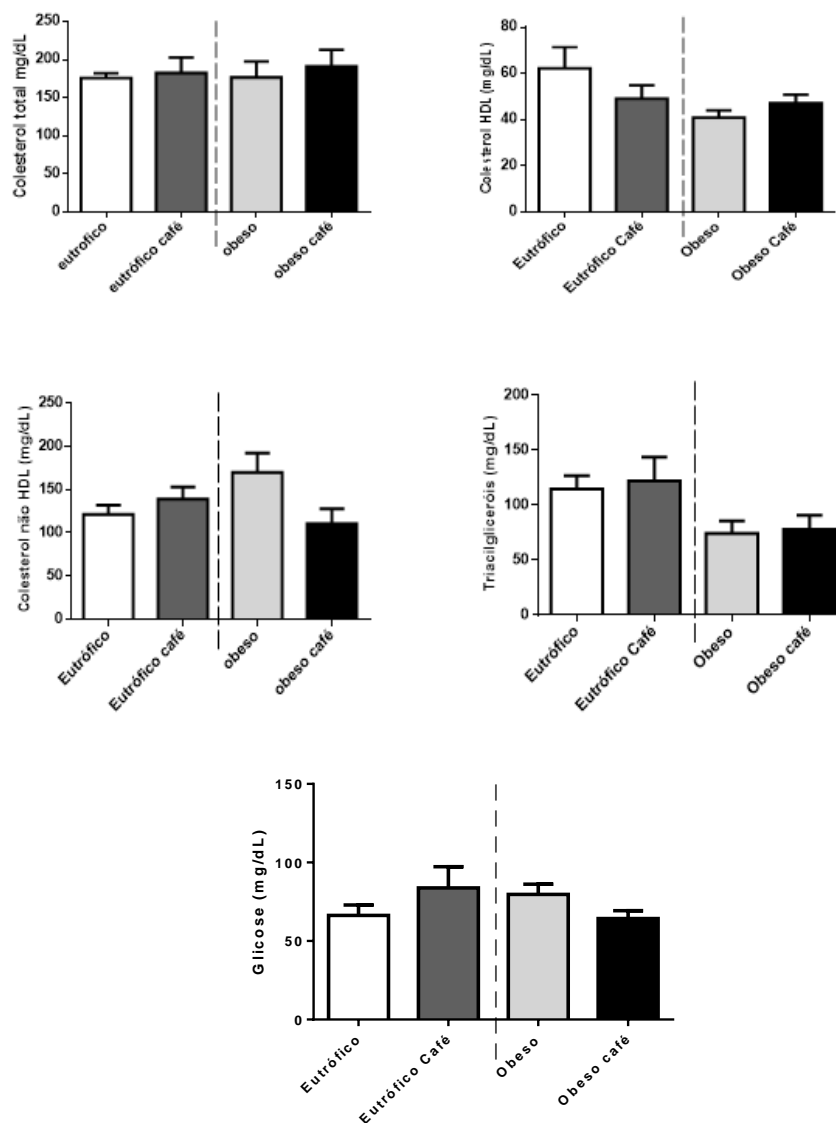
retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma e por inibir o mecanismo de recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, tornando o íon Ca^{+} mais disponível para a contração muscular. Seu efeito antagonista aos receptores de adenosina pode gerar diversas respostas no organismo, pode influenciar o gasto energético e ganho de massa muscular (BRAGA; ALVES, 2000).

No entanto, o aumento da musculatura pode ser confirmado quando os animais são submetidos a exercícios físicos, que não foi objetivo deste estudo. Além disso, estudos mostram que o efeito no aumento de massa muscular induzida pelo aumento do esforço físico e administração de cafeína depende da dosagem do alcaloide (BRAGA; ALVES, 2000).

3.4.5 Parâmetros bioquímicos séricos

Os teores de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL, e triacilgliceróis estão representados na Figura 7.

Figura 7 - Teores de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL, e triacilgliceróis de animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde.



*Diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste T.

O defeito verde não afetou os níveis de colesterol total, HDL-colesterol, HDL não colesterol e glicemia de jejum (Figura 7), já que não houve diferença entre os grupos alimentados com o café comparados com os aqueles que não o ingeriram.

A obesidade em humanos predispõe elevados níveis de colesterol, triacilgliceróis e glicemia (LI et al., 2009). Por este motivo, foi feita uma análise estatística comparando os quatro grupos a fim de verificar a influência do ganho de peso dos animais neste parâmetro. Não foram observadas diferenças entre os grupos (com exceção dos níveis de triacilgliceróis).

De fato, a predisposição para dislipidemia e diabetes em camundongos é menos evidente do que para humanos, e muitas vezes é possível apenas observar uma resistência à insulina, parâmetro não avaliado no presente estudo.

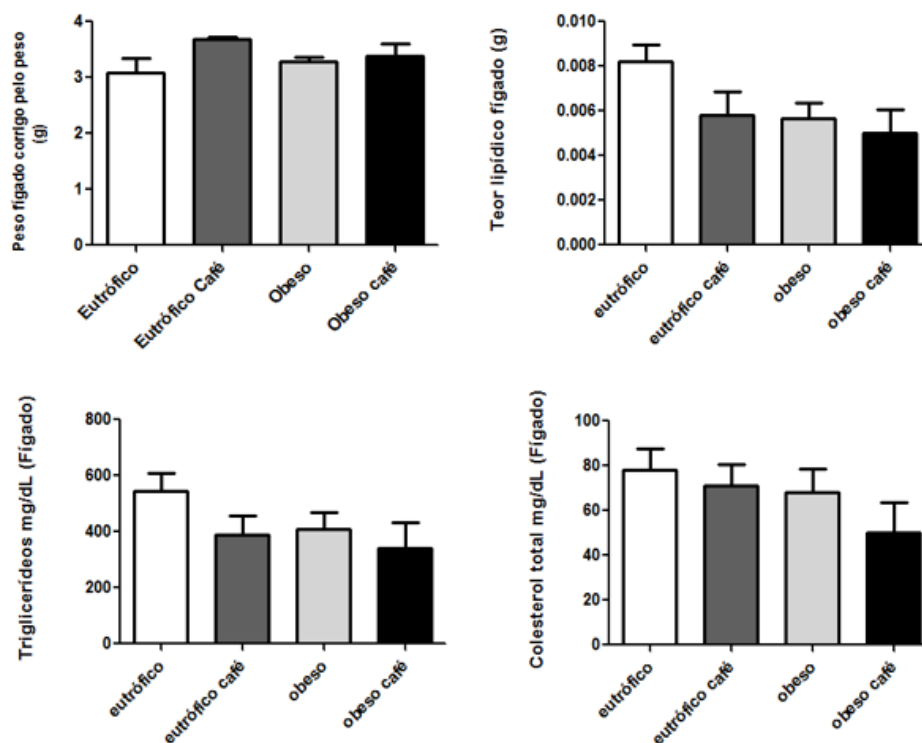
O aumento dos níveis intracelulares de AMPc induzido pela cafeína (HOWELL; COFFIN; SPEALMAN, 1997) pode provocar uma resposta no enterócito e interferir no transporte e na secreção dos lípidos através de quilomicrons. Bjornsson et al. (1994), utilizando hepatócitos de ratos, induziram um aumento de AMPc pela presença de isobutil-metilxantina, composto da mesma classe da cafeína, e observaram redução da secreção de triacilglicerol, colesterol e apoproteína B. Em um estudo realizado por Jarrar e Obeid (2014), os autores observaram que os níveis de triacilgliceróis pós-prandial de grupos administrados com cafeína foram diminuídos, provavelmente devido à redução na absorção de gordura.

No mesmo estudo, Jarrar e Obeid (2014) observaram que a glicemia pós-prandial foi mantida nos animais administrados com cafeína, independentemente do tempo de ingestão da refeição. As diferenças entre os resultados deste estudo e os de Jarrar e colegas pode ser pelo fato de nossos animais estarem em jejum, enquanto que os deles estavam no estado pós-prandial.

3.4.6 Peso e teores de lipídios totais, triacilgliceróis e colesterol total do fígado

Na Figura 8, estão representados o peso do fígado, os teores de lipídios totais, triacilgliceróis e colesterol total hepáticos dos grupos estudados.

Figura 8 - Peso do fígado e teores de lipídios totais, triacilgliceróis e colesterol total hepáticos dos animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde.



*Diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste T.

Não foi observada diferença entre grupos que ingeriram o defeito verde quanto ao peso do fígado e níveis de lipídios totais, colesterol total e triacilglicerol hepáticos (Figura 8). Os quatro grupos foram comparados como o

objetivo de avaliar a influência da dieta hiperlipídica em relação a esses parâmetros e não foram constatadas diferenças significativas estatisticamente ($p \leq 0,05$).

O fígado tem um papel central no metabolismo lipídico. As substâncias lipossolúveis que chegam neste órgão podem ser armazenadas, oxidadas ou ainda direcionadas para secreção e utilização por tecidos periféricos tais como o músculo esquelético e o tecido adiposo através das lipoproteínas. Assim, a síntese de lipoproteínas (VLDLc, LDLc e HDc) também ocorre neste tecido.

Dietas hiperlipídicas podem acarretar um aumento da gordura hepática, porém, este fato não foi comprovado neste estudo nem mesmo os efeitos lipolíticos do café verde.

Song, Choi e Park (2014) concluíram que o extrato de café cru descafeinado e o ácido 5-cafeoilquínico reduziu o acúmulo de gordura visceral em camundongos obesos.

3.5 Capacidade antioxidante *in vivo*

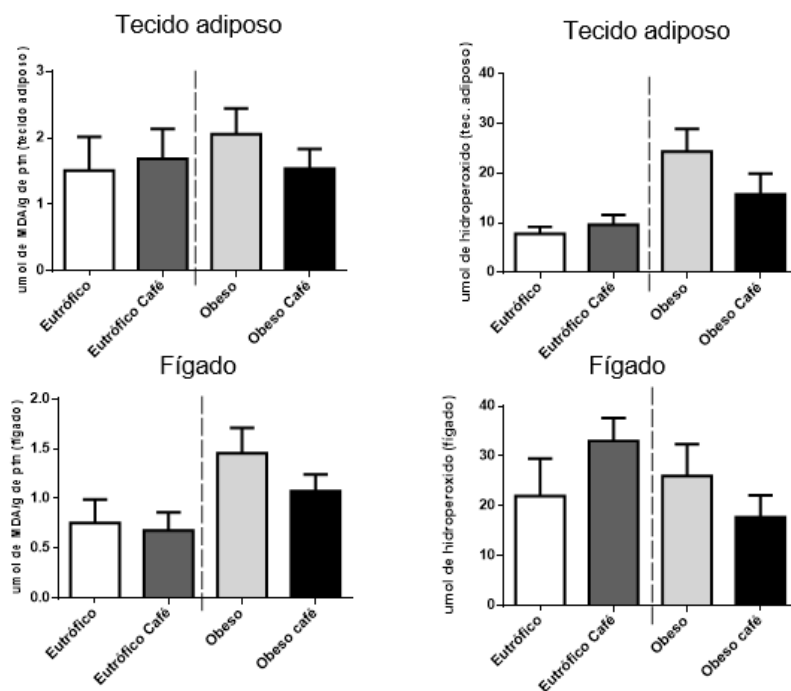
O sistema antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-), a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e a glutatona peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutatona como cofator.

O sistema antioxidante não enzimático localiza-se, principalmente, no meio extracelular, sendo por isso analisado em plasma e soro. No sangue, circulam importantes antioxidantes, a exemplo das vitaminas C, E, β -caroteno entre outros, bem como biomarcadores do dano causado por espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, como dialdeído malônico (MDA),

isoprostanos, lipoperóxidos e hidroperóxidos e outros derivados da peroxidação lipídica das membranas celulares.

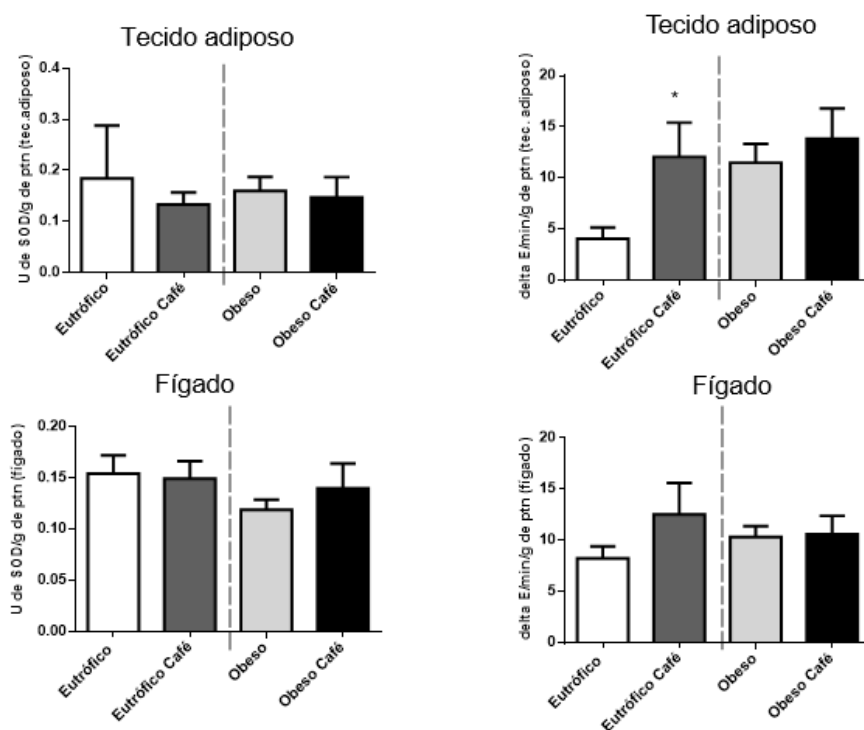
Na Figura 9, estão representados os teores de hidroperóxidos e de dialdeído malônico (MDA) e na Figura 10 a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no tecido adiposo e fígado de camundongos eutróficos e obesos alimentados com grãos defeitos verdes.

Figura 9 - Teores de hidroperóxidos e de dialdeído malônico (MDA) no tecido adiposo e fígado dos animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde.



*Diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste T.

Figura 10 - Atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no tecido adiposo e fígado dos animais eutróficos e obesos alimentados com dieta sem e com adição de grãos classificados como defeito verde.



*Diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste T.

Em relação à avaliação do potencial antioxidante, não foi observada diferença entre os grupos eutróficos e entre os grupos obesos quanto à concentração de hidroperóxidos e de MDA e atividade da superóxido dismutase (SOD), tanto no fígado quanto no tecido adiposo (Figura 9).

A atividade da catalase (delta E/min/g) no tecido adiposo dos animais obesos foi estatisticamente igual, no entanto, a atividade da enzima dos animais eutróficos administrados com o defeito foi maior quando comparado com os animais do eutrófico controle (Figura 10). Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à atividade da catalase no fígado.

Duarte et al. (2009) comprovaram a capacidade do café torrado em inibir lipoperoxidação. Em um estudo *in vitro* com células humanas, utilizando extrato da folha de *Apocynum venetum*, ficou demonstrado que o ácido clorogênico presente na folha inibiu quase que totalmente a formação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) (KIM et al., 2000).

Esperava-se redução dos produtos da peroxidação lipídica nos tecidos dos camundongos alimentados com o defeito verde, porém, as concentrações de hidroperóxidos e MDA no fígado e tecido adiposo não foram diferentes nos grupos administrados com café quando comparados com seus respectivos controles.

Também não foi observada diferença entre os grupos para a atividade da catalase no fígado e da superóxido dismutase (SOD) no fígado e tecido adiposo. Noschang et al. (2009) observaram um aumento na atividade da superóxido dismutase e da catalase no córtex cerebral de ratos tratados com doses de cafeína.

É possível inferir que os componentes presentes no defeito verde com capacidade antioxidante neutralizaram os radicais livres produzidos pelo aumento da termogênese e por esta razão não foi verificada diferença entre os grupos.

Porém, o poder antioxidante do defeito verde ficou comprovado, de fato, com o aumento da catalase no tecido adiposo dos animais eutróficos que receberam os grãos defeito verde, onde o aumento do estresse oxidativo resultante da obesidade não está presente.

4 CONCLUSÃO

- a) Grãos oriundos de frutos imaturos do cafeeiro (defeito verde) não possuem composição química semelhante à de grãos sem defeitos para os parâmetros: umidade, proteína, fibras; cinzas e ácido 5-cafeoilquínico;
- b) O conteúdo de carboidratos, lipídios, cafeína e trigonelina não diferiram entre as duas amostras analisadas;
- c) Os grãos classificados como defeito verde apresentam quantidades consideráveis de compostos bioativos (cafeína, ácido 5-cafeoilquínico e trigonelina);
- d) Os grãos defeitos verdes foram capazes de aumentar o gasto energético e reduzir o ganho de peso ponderal e o tecido adiposo branco dos animais obesos;
- e) Os grãos imaturos apresentam atividade antioxidante in vitro e a capacidade antioxidante in vivo dos grãos foi comprovada pelo aumento da atividade da enzima catalase no tecido adiposo dos animais eutróficos;

REFERÊNCIAS

AKAGIRI, S. et al. A mouse model of metabolic syndrome; increase in visceral adipose tissue precedes the development of fatty liver and insulin resistance in high-fat diet-fed male KK/Ta mice. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, Tokyo, v. 42, n. 2, p. 150-157, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. Maryland, 2005. 1094 p.

BAEZA, G. et al. Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidative stress. **Food Research International**, Barking, v. 62, p. 1038-1046, Aug. 2014.

BANERJEE, D. et al. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. **Current Science**, Columbus, v. 83, n. 10, p. 1193-1194, Nov. 2002.

BJORNSSON, O. G. et al. Regulation of VLDL secretion in primary culture of rat hepatocytes: involvement of cAMP and cAMP-dependent protein kinases. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 24, p. 137-148, 1994.

BRAGA, L. C.; ALVES, M. P. A caféina como recurso ergogênico nos exercícios de endurance. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, Taguatinga, v. 8, n. 3, p. 33-37, 2000.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.

CHEONG, M. C.; YOU, Y.; AVERY, L. **Neuropeptides can regulate feeding behavior in the absence of MC activity presented**. London: International Worm Meeting, 2013. Disponível em: <<http://www.wormbase.org/resources/paper/WBPaper00043467#0--10>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

CHO, A. S. et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 937-943, Mar. 2010.

CLIFFORD, M. N. The composition of green and roasted coffee beans. **Process Biochemistry**, London, v. 10, p. 20-29, 1975.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, London, v. 40, n. 1, p. 35-42, Jan. 1991.

DUARTE, S. M. D. et al. Peeled coffee brew effect in the antioxidant activity hematological and biochemical parameters in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 703-708, out./dez. 2009.

DURAK, A.; GAWLIK-DZIKI, U.; KOWALSKA, I. Coffee with ginger: interactions of biologically active phytochemicals in the model system. **Food Chemistry**, London, v. 166, p. 261-269, Jan. 2015.

DURAK, A.; GAWLIK-DZIKI, U.; PECIO, Ł. Coffee with cinnamon: impact of phytochemicals interactions on antioxidant and anti-inflammatory in vitro activity. **Food Chemistry**, London, v. 162, p. 81-88, Nov. 2014.

DURAK, A.; GAWLIK-DZIKI, U.; SUGIER, D. Coffee enriched with willow (*Salix purpurea* and *Salix myrsinifolia*) bark preparation: interactions of antioxidative phytochemicals in a model system. **Journal of Functional Foods**, New York, v. 18, part B, p. 1106-1116, Oct. 2014.

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 138, n. 12, p. 2309-2315, Dec. 2008.

FERRUZZI, M. G. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 100, n. 1, p. 33-41, Apr. 2010.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FRANÇA, A. S. et al. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, London, v. 90, p. 89-94, 2005.

HALLIWELL, B. Establishing biomarkers of oxidative stress: the measurement of hydrogen peroxide in human urine. **Current Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 11, n. 9, p. 1085-1092, May 2004.

HOWELL, L. L.; COFFIN, V. L.; SPEALMAN, R. D. Behavioral and physiological effects of xanthines in nonhuman primates.

Psychopharmacology, Berl, v. 129, p. 1-14, 1997.

HUANG, D. J. et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005.

JARRAR, S. F.; OBEID, O. A. Timing of caffeine ingestion alters postprandial metabolism in rats. **Nutrition**, Tarrytown, v. 30, n. 1, p. 107-111, Jan. 2014.

KIM, D. W. et al. Inhibitory effects of an aqueous extract of *Apocynum venetum* leaves and its constituents on Cu²⁺-induced oxidative modification of low density lipoprotein. **Phytotherapy Research**, London, v. 14, n. 7, p. 501-504, Nov. 2000.

LEE, H. S. et al. Chemokine and chemokine receptor gene expression in the mesenteric adipose tissue of KKAY mice. **Cytokine**, New York, v. 46, n. 2, p. 160-165, 2009.

LI, S. Y. et al. Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- α in golden hamsters fed on high fat diet. **Biomedical and Environmental Sciences**, Beijing, v. 22, n. 2, p. 122-129, 2009.

LOPEZ-GALILEA, I.; PEÑA, M. P.; CID, C. Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, n. 1, p. 141-149, Jan. 2008.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAZZAFERA, P. Mineral nutrition and caffeine content in coffee leaves. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 387-391, 1999.

MURASE, T. et al. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 300, n. 1, p. E122-E133.18, 2011.

- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 29, n. 1/2, p. 95-111, Oct. 2004.
- NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C: with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV. **Analytical Biochemistry**, Madison, v. 49, p. 474-478, 1972.
- NOSCHANG, C. G. et al. Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. **Neurochemical Research**, New York, v. 34, p. 1568-1574, 2009.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. Measurement of plasma determination concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, Madison, v. 220, p. 403-409, 1994.
- OLIVEIRA, L. S. et al. Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 39, n. 3, p. 235-239, Apr. 2006.
- PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 17, p. 4265-4275, May 2012.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 83, n. 2, p. 346-356, Dec. 1977.
- RAMALAKSHMI, K.; KUBRA, I. R.; RAO, L. J. M. Antioxidant potential of low-grade coffee beans. **Food Research International**, Barking, v. 41, n. 1, p. 96-103, 2008.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JUNIOR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- RIBEIRO, B. B. et al. Avaliação química e sensorial de blends de *Coffea canephora* Pierre e *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 2, p. 178-186, abr./jun. 2014.

SONG, S. J.; CHOI, S.; PARK, T. Decaffeinated green coffee bean extract attenuates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Cairo, v. 2014, p. 1-14, 2014.

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

SU, S. J. et al. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Hants, v. 64, n. 4, p. 429-436, June 2013.

TOLEDO, L. B.; BARBOSA, A. T. **Classificação e degustação de café**. Rio de Janeiro: ABIC Brasil, 1997. 20 p.

VASCONCELOS, A. L. S. et al. Avaliação comparativa da composição centesimal de grãos defeituosos e sadios de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina: SPCB-PR, 2005. Disponível em:
<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1863/166733_Art117f.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 mar. 2016.

VASCONCELOS, A. L. S. et al. A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 26-32, 2007.

VIANI, R.; HORMAN, I. Thermal behavior of trigonelline. **Journal Food of Science**, Chicago, v. 39, n. 6, p. 1216-1217, Nov./Dec. 1974.

VITORINO, M. D. et al. Metodologia de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 26, n. 3, p. 17-24, maio/jun. 2001.

WANG, Y.; HO, C. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 18, p. 8109-8114, Aug. 2009.

**CAPÍTULO 3 GRÃOS TORRADOS ORIUNDOS DE FRUTOS
IMATUROS DO CAFEIEIRO: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
PROPRIEDADES BIOATIVAS DO MATERIAL DE ALTO PESO
MOLECULAR**

RESUMO

O café torrado possui expressiva capacidade antioxidante principalmente devido à formação de melanoidinas. As melanoidinas são produtos finais da reação de Maillard, possuem alto peso molecular, cor marrom e caráter aniônico. As propriedades químicas e funcionais das melanoidinas do café não são totalmente compreendidas devido à composição química extremamente complexa dessas moléculas. Foram utilizados grãos colhidos no estágio cereja (maduros) e estágio verde (imaturos) e, após o beneficiamento e separação manual, foram obtidos grãos maduros e grãos imaturos (defeito verde). Para avaliação da bioatividade do material de alto peso molecular, os grãos foram torrados e foi feito o fracionamento em etanol. Os grãos torrados foram caracterizados quanto aos teores de: açúcares e ligações glicolíticas, proteínas, melanoidinas, 5-ACQ e cafeína (frações de HMWM) e avaliada a atividade antioxidante (DPPH-IC 50). O material de alto peso molecular (HMWM) do defeito verde possui composição química e capacidade antioxidante semelhante ao HMWM dos grãos maduros e podem ser usados como fonte de compostos bioativos.

Palavras-chave: Café torrado. Melanoidinas. Alto peso molecular. Compostos bioativos.

Roasted grains originated from immature coffee fruits: chemical characterization and bioactive properties of high molecular weight material

ABSTRACT

Roasted coffee presents expressive antioxidant activity, especially due to the formation of melanoidins. The melanoidins are final products of the Maillard reaction, present high molecular weight, brown color and anionic character. The chemical and functional properties of the melanoidins present in coffee are not completely understood, due to the extremely complex chemical composition of these molecules. Grains harvested in the cherry (mature) and green (immature) stages were used and, after processing and manual separation, we obtained mature and immature (green defect) grains. For evaluating the bioactivity of the high molecular weight material, the grains were roasted and fractioned in ethanol. The roasted grains were characterized regarding the contents of sugars and glycolytic bonds, proteins, melanoidins, 5-ACQ and caffeine (HMWM fractions), evaluating the antioxidant activity (DPPH-IC 50). The high molecular weight material (HMWM) of the green defect present chemical composition and antioxidant activity similar to HMWM of the mature grains and can be used as source for bioactive compounds.

Keywords: Roasted coffee. Melanoidins. High molecular weight. Bioactive compounds.

1 INTRODUÇÃO

A bebida do café possui expressiva capacidade antioxidante, apesar dos compostos fenólicos diminuírem com a torração, principalmente devido à formação de melanoidinas (compostos de alto peso molecular) (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; BEKEDAM et al., 2008a, 2008b; LIU; KITTS, 2011). Liu e Kitss (2011) confirmaram que estes compostos são os principais responsáveis pelo poder antioxidante dos grãos torrados.

Os ácidos clorogênicos ou os seus produtos de degradação são incorporados nas melanoidinas devido à formação de oito ligações ésteres ou formas condensadas durante a torra dos grãos (BEKEDAM et al., 2008a). A maneira como ocorrem estas ligações bem como o papel dos compostos fenólicos para as diferentes propriedades das melanoidinas presentes na bebida de café ainda são desconhecidos.

Durante a torração, ocorrem mudanças químicas responsáveis pelo aroma e sabor final da bebida (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006) e muitas destas características devem-se à presença de melanoidinas. Na torração, os grãos de café são submetidos a altas temperaturas por diferentes períodos de tempo dependendo das características desejadas para o produto final (ALESSANDRINI et al., 2008) e da qualidade dos grãos crus.

Além de outros fatores, a presença de defeitos pode influenciar o aspecto dos grãos torrados. Os grãos pretos, verdes e ardidos (PVA) são defeitos intrínsecos do café que mais afetam a qualidade da bebida e por isso não são vendidos no mercado internacional, sendo separados.

Os PVA representam 20% da produção brasileira de café, ou seja, cerca de três milhões de sacas por ano e, por esta razão, a maioria das indústrias mistura os grãos defeituosos aos de boa qualidade (FRANÇA et al., 2005).

O defeito preto é proveniente de colheita atrasada ou do contato prolongado com o solo. Os ardidos podem surgir em decorrência de

fermentações anormais ou do processo de secagem inadequada. Já os grãos defeitos verdes são oriundos de frutos imaturos do cafeeiro, colhidos muitas vezes juntamente aos frutos com estágio de maturação ideal (cereja) afetando qualidade sensorial da bebida por conferir adstringência a esta (VASCONCELOS et al., 2005).

Neste sentido, busca-se um aproveitamento de grãos classificados como defeitos, principalmente do defeito verde que possuem integridade física. A utilização destes grãos torrados para a saúde humana é viável devido à presença de compostos bioativos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioatividade do material de alto peso molecular (HMWM) de grãos classificados como defeito verde (oriundos de frutos imaturos do cafeeiro) torrados comparando com os grãos de cafés sem defeitos (oriundos de frutos maduros).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalações e Amostras

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas as instalações do Laboratório de Química Alimentar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Portugal.

Foram utilizados, neste trabalho, frutos colhidos no estádio cereja e no estádio verde. Após a colheita, os frutos foram levados ao lavador, posteriormente foram secos em terreiro e beneficiados. Após o beneficiamento, os grãos foram classificados, obtendo-se grãos de café e grãos defeitos verdes.

2.2 Torração

Os grãos de café e grãos defeitos foram torrados a uma temperatura média de 200 °C durante cerca de oito minutos até atingirem um grau de torração média de acordo com metodologia da SCAA (colorimétrico). Depois da torra, foi realizado um teste colorimétrico para comparar as amostras.

2.3 Coloração

A cor do café torrado e moído foi analisada usando-se um colorímetro (Chomameter-2 Reflectance, Minolta, Osaka, Japan) acoplado a um processador de dados (OP-300). O instrumento foi padronizado contra um branco antes de cada leitura. A cor foi expressa em parâmetros de escala desenvolvida pela *Commission Internationale de Eclairage* (CIE) L^* , a^* , b^* .

As coordenadas L^* , a^* e b^* representam a luminosidade da cor, em que $L^* = 0$ reproduz preto e $L^* = 100$ indica branco; a^* é a posição entre o vermelho e o verde e b^* entre o amarelo e azul.

2.4 Preparação do extrato e isolamento do Material de Alto Peso Molecular (HMWM)

Os grãos de café torrados foram moídos (250-450 μm), e as infusões foram preparadas por extração de 25 g de pó de café em 800 mL de água a 80 °C durante 20 min.

Após filtração e concentração por vácuo, foi realizada uma diálise a 4 °C (12-14 kDa). Após a diálise, foi retirado apenas o material solúvel que foi liofilizado, obtendo-se assim o material de alto peso molecular - HMWM (NUNES; COIMBRA, 2002).

2.5 Fracionamento do HMWM por precipitação em etanol

O HMWM foi fracionado em solução de etanol obtendo-se três frações; uma fração insolúvel em 50% de etanol (Et50), uma insolúvel em 75% de etanol (Et75) e uma solúvel em 75% de etanol (EtSN) (NUNES; COIMBRA, 2001).

2.6 Determinação dos teores de cafeína e ácidos clorogênicos

Para determinação de cafeína e ácidos clorogênicos foi utilizada a metodologia adaptada de Moreira et al. (2012). Os extratos foram analisados por HPLC (Dionex, Ultimate 3000) por injeção de 25 μL de amostra em coluna de fase reversa (C18). O eluente A foi uma solução aquosa de ácido fórmico e o eluente B, metanol. O programa dos eluentes ocorreu da seguinte maneira: 0–5 min, 5% eluente B; 5–45 min, 40% B; 45–65 min, 70% B; 65–75 min, 5% B. A temperatura da coluna foi 25 °C.

O eluente foi monitorado a partir de 200 a 600 nm com um detector photodiode. (PDA-100, Dionex). A identificação do ácido cafeoilquínico (ACQ) foi feita por comparação com os tempos de retenção do padrão e valores da literatura. Os ácidos clorogênicos foram quantificados a partir de um padrão interno (5-ACQ). A cafeína foi quantificada utilizando como padrão a cafeína pura.

2.7 Caracterização dos grãos do HMWM e frações

Foram quantificados os teores de açúcares neutros e as ligações glicosídicas (análise por metilação).

2.7.1 Análise de açúcares neutros

Este procedimento é uma adaptação do método de Selvendran, March e Ring (1979), descrito por Coimbra et al. (1996) e está dividido em três partes:

- Hidrólise

Foram pesadas em duplicado 1-2 mg de amostra para um tubo de cultura. Adicionou-se 200 μL de H_2SO_4 72% e incubou-se à temperatura ambiente durante 3 horas, agitando-se os tubos de cultura duas a três vezes nesse espaço de tempo. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de água destilada, de forma que a concentração final de H_2SO_4 fosse de 2M, e deixou-se hidrolisar a 120 °C num bloco de aquecimento durante 1 hora. Após este passo, arrefeceu-se os tubos num banho de gelo.

- Redução e acetilação

Adicionou-se 200 μL de padrão interno (2-desoxiglucose 1 mg/mL) a cada tubo com a amostra hidrolisada. Seguidamente transferiu-se 0,5 mL de amostra para novos tubos de cultura e neutralizou-se com 200 μL de NH_3 a 25%, confirmando-se que o pH ficou básico (pois caso não tenha ficado, ocorre destruição do NaBH_4 que se adiciona em seguida). Reduziu-se os açúcares a alditóis com 100 μL de NaBH_4 (15% (m/v) em NH_3 e colocaram-se os tubos num bloco de aquecimento a 30 °C durante 1 hora. Após esse período, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se duas vezes 50 μL de ácido acético glacial, com o objetivo de eliminar o excesso de BH_4^- . Em seguida, transferiu-se 300 μL das soluções para tubos SOVIREL, cujas tampas de teflon evitam contaminações da amostra. Colocaram-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 450 μL de 1-metilimidazol (catalisador) e 3 mL de

anidrido acético. Agitou-se bem e incubou-se num bloco de aquecimento a 30 °C durante 30 min, ocorrendo a transformação dos alditóis em acetatos de alditol.

- Análise por GC-FID

Análise por cromatografia em fase gasosa usando o Cromatógrafo Perkin Elmer-Clarus 400 acoplado a um detector de ionização de chama (FID), utilizando uma coluna capilar DB-225 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura de filme. Injetou-se 2 µL de amostra com a temperatura do injetor a 220 °C e a temperatura do detector a 230 °C, com *split* de 10 minutos. O programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: temperatura inicial de 200 °C, aumentando em seguida para 220 °C com incrementos de 40 °C/min e novamente aumento até 230 °C com incrementos de 20 °C/min, sendo a temperatura final de 230 °C durante 1 minuto.

2.7.2 Análise das ligações glicosídicas

Após a análise de açúcares neutros, foram analisadas as ligações glicosídicas presentes na amostra. Para tal, fez-se uma análise de açúcares por metilação, que se baseia em metilar os grupos hidroxilo livres e acetilar os hidroxilos que estabelecem as ligações glicosídicas. Esta análise encontra-se dividida em quatro partes (CIUCANU; KEREK, 1984):

-Metilação

- Hidrólise

Adicionou-se 500 µL de TFA 2 M a cada um dos tubos e incubou-se a 121 °C durante 1 hora, agitando-se os tubos duas a três vezes durante esse período. Em seguida, evaporou-se o ácido na *speedvac*.

- Redução e Acetilação

Adicionou-se às amostras hidrolisadas 300 µL de NH₃ 2M e 20 mg de NaBD₄ e deixou-se reagir durante 1 hora a 30 °C. Em seguida, arrefeceram-se os

tubos num banho de gelo e adicionou-se duas vezes 50 μL de ácido acético glacial para eliminar o excesso de BD_4^- . Adicionou-se 450 μL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético. Agitou-se bem e incubou-se num bloco de aquecimento a 30 °C durante 30 minutos. Em seguida, com os tubos num banho de gelo, adicionou-se 3,0 mL de água destilada, para decompor o excesso de anidrido acético, e 2,5 mL de diclorometano. Agitou-se vigorosamente os tubos, para extrair os acetatos de alditol e centrifugou-se cerca de 30 s a 3.000 rpm para se obter a separação das duas fases. Aspirou-se então a fase aquosa por sucção. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. Evaporou-se então o diclorometano na *speedvac*, adicionando-se em seguida 1,0 mL de acetona anidra, que também foi evaporada na *speedvac*. Repetiu-se este procedimento mais uma vez, adicionando-se mais 1,0 mL de acetona anidra e evaporando na *speedvac*. Os tubos foram então fechados e colocados num dessecador.

-Análise GC-qMS

Análise por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massa, utilizando um GC-qMS Agilent Technologies 6890N Network, com uma coluna capilar DB-1 cujo comprimento é 30 m, diâmetro é 0,25 mm e espessura é 0,15 μm . Foi injetado 1,0 μL de amostra com a temperatura de injetor a 220 °C, sendo o tempo total da análise de 39 minutos.

2.7.3 Proteínas

Os teores de proteínas foram quantificados de acordo com a metodologia Dumas. A partir da quantificação de nitrogênio presente nas amostras (análise elementar) foi possível quantificar os teores de proteínas multiplicando por 6,25.

2.7.4 Melanoidinas

O conteúdo de melanoidinas (K mix-405nm) dos HMWM e frações foi determinado de acordo com metodologia descrita por Bekedam et al. (2008a).

2.8 Atividade antioxidante (DPPH-IC50)

Para a análise da atividade sequestrante de radicais livres DPPH (1,1–difênil–2–picrilidrazil), cada amostra foi diluída em água em diferentes concentrações. Em 0,1 mL da amostra foi adicionado 0,3 mL de DPPH (0,5 mmol.L⁻¹) diluído em etanol. A mistura acondicionada em tubo de ensaio âmbar e agitada. Decorridos 30 min, foi realizada a leitura a 517 nm. A diminuição na absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade sequestrante de radicais livres (%ASRL) expressa em porcentagem por comparação aos controles, BHT, ácido ascórbico e trolox, nas mesmas diluições das amostras, segundo a equação 1:

$$\% \text{ASRL} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

(1) Em que Ac: absorbância controle; At: absorbância teste (amostra).

A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (Ec50), também chamada de concentração inibitória (Ec50) e é calculada a partir de uma curva de calibração. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua Ec50 e maior a sua atividade antioxidante.

2.9 Estatística

Para comparação entre as amostras, utilizou-se o teste ANOVA. Os resultados foram expressos como média. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism 5,0[®]. O nível de significância adotado foi de 5% (p≤0,05).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Coloração

Na Tabela 1, estão descritos os valores dos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) dos grãos de café e dos grãos classificados como defeito verde, torrados.

Tabela 1 - Parâmetros de cor dos grãos de café e de grãos classificados como defeito verde, torrados e moídos

Tratamentos	L^*	a^*	b^*
Grãos de café	24,75 a	13,76 a	30,29a
Grãos defeito verde	24,90 a	13,05b	29,46a

Médias (\pm desvio padrão) seguidas de diferentes letras na coluna diferem entre si ($p \leq 0.05$ – Teste t Student).

A cor é um importante parâmetro para avaliar o grau de torração do café (SUMMA et al., 2007). Os valores de L^* e b^* foram iguais para as duas amostras e ambas classificadas com grau de torração média. Campanha et al. (2010) classificam cafés com torração média aquele com valores de L^* entre 16 e 30. Estes resultados corroboram com os verificados por Mendonça, Franca e Oliveira (2009) que não encontraram diferença para parâmetros entre grãos de café sem defeitos e grãos defeito verde após a torração.

A partir destes resultados, conclui-se que o grau de torração destes grãos foi semelhante e não foi um fator de interferência nos teores de melanoidinas formadas.

3.2 Rendimento

Os rendimentos da fração solúvel e material de alto peso molecular dos grãos de café e dos grãos classificados como defeito verde estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Rendimentos da fração solúvel e material de alto peso molecular (HMWM) dos grãos de café e dos grãos classificados como defeito verde

	g/100g pó Grãos de café	Grãos defeito verde
Fração solúvel	26,88	27,50
HMWM	5,81	5,67

Os grãos imaturos (defeito verde) torrados possuem rendimento semelhante aos grãos de café tanto da fração solúvel quanto do material de alto peso molecular (Tabela 2). Este resultado permite concluir que o grau de maturação dos grãos não afeta a extrato solúvel nem a fração HMWM, podendo ser usados os constituintes presentes nestas.

No estudo de Moreira et al. (2012), os rendimentos tanto da fração solúvel quanto do material de alto peso molecular sofreram variações devido principalmente ao conteúdo de carboidratos presentes nos grãos.

3.3 Açúcares neutros e ligações glicolíticas

A composição de açúcares e as ligações glicolíticas do material de alto peso molecular e frações dos grãos de café e dos grãos classificados como defeito verde estão descritos na Tabela 3 e 4 respectivamente.

Tabela 3 - Composição em açúcares, expressa em % molar, das amostras HMWM dos grãos de café e frações e do HMWM dos grãos defeito verde e frações e respectivas % de açúcares

		Composição de açúcares (%)						
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Total
Café	HMWM	3,8	15,3	0,0	52,4	30,2	2,1	57,4
	Et50	1,1	3,6	0,1	83,1	12,0	0,0	65,0
	Et75	6,6	23,2	0,7	10,8	58,7	1,0	24,5
	Sn75	31,6	34,7	1,3	7,1	25,3	0,1	19,8
Defeito	HMWM	3,3	12,6	0,0	53,9	31,5	2,0	46,4
	Et50	0,9	3,2	0,0	85,0	10,9	1,9	52,7
	Et75	4,3	21,4	0,6	11,9	61,7	2,5	29,5
	Sn75	12,3	42,4	1,3	5,7	38,4	3,2	16,2

HMWM: material de alto peso molecular; Et50: fração insolúvel em etanol 50%; Et75: fração insolúvel em etanol 75%, Sn75: fração solúvel em etanol 75%; Rha: ramnose; Ara: arabinose; Xyl: xilose; Man: manose; Gal: galactose; Glc: glicose.

A composição de açúcares permite inferir que os polissacarídeos presentes em maior quantidade nas duas amostras são as galactomananas. A presença de arabinose (15,3% na amostra HMWM café e 12,6% na amostra HMWM defeito) presume ainda a existência de arabinogalactanas. Este resultado corrobora com os dados da literatura, uma vez que os polissacarídeos mais abundantes no café são galactomananas e arabinogalactanas.

No HMWM das duas amostras analisadas, a manose está presente em maior quantidade (52,4% na amostra de HMWM café e 53,9% na amostra de HMWM defeito), seguida pela galactose (30,2% na amostra de HMWM café e 31,5% na amostra de HMWM defeito). O HMWM café possui 57,5% de açúcares totais enquanto o defeito 46,4%.

Na fração Et50, verificou-se o maior conteúdo de açúcares totais assim como observado no estudo de Nunes e Coimbra (2002), já que estes açúcares possuem alta solubilidade em etanol 50% (MOREIRA et al., 2012).

Na fração Et50, são solubilizadas as galactomananas presentes no HMWM e na fração Et75 as arabinogalactanas (NUNES; COIMBRA, 2001). Moreira et al. (2012) afirmam que já é conhecida a participação das galactomananas na formação de melanoidinas e, através de grãos de cafés enriquecidos com arabinogalactanas do tipo II, verifica-se um aumento de compostos de alto peso molecular, sugerindo também a participação também deste polissacarídeo na formação do material de alto peso molecular.

Apesar do conteúdo de açúcares totais superior no HMWM dos grãos sadios, os teores de manose e galactose das duas amostras foram semelhantes, sugerindo conteúdo semelhante de galactomananas nos grãos e material de alto peso molecular destas. Os menores teores de arabinose no HMWM do defeito verde pode indicar menor conteúdo de arabinogalactanas do tipo II. A presença destes polissacarídeos pode ser confirmada pelas ligações glicolíticas apresentadas a seguir.

Tabela 4 - Composição das ligações glicosídicas presentes nas amostras estudadas

Ligações glicosídicas	HMWM grãos de café	HMWM grãos defeito verde
T-Ara	5,2	5,4
5-Araf	7,4	6,7
4-Rhaf	4,0	3,4
T-Manp	2,9	3,5
4-Manp	48,5	51,6
4,6-Manp	3,3	2,2
T-Galp	5,5	5,4
3-Galp	3,8	3,7
6-Galp	3,8	3,3
3,6-Galp	10,7	10,2
4-Glcp	0,2	0,2
Total Manp/ T-Manp	18,8	16,3
Total Manp/4,6-Manp	16,9	26,6
4,6-Manp/Total Manp (%)	1,1	0,6

A ligação glicosídica presente em maior quantidade em ambas as amostras é a 4-Manp. Observa-se também a presença da ligação 4,6-Manp, que corresponde às ramificações no carbono 6 dos resíduos de manose e de ligações T-Manp que indicam a presença dos resíduos de manose terminais da cadeia principal das galactomananas. São também observadas ligações T-Araf e T-Galp, que correspondem às ramificações das galactomananas. A ligação 4-Glcp indica a presença de resíduos de glucose na cadeia principal da galactomanana. As ligações mencionadas anteriormente estão descritas na literatura como componentes da estrutura das galactomananas, confirmando a presença deste polissacarídeo no HMWM do café e do defeito.

Além das galactomananas, as ligações glicolíticas confirmam a presença de arabinogalactanas do tipo II no HMWM do café e defeito, pelas ligações 3-Galp, 6-Galp, 3,6 Galp além de 5-Ara e T-Araf. As galactomananas e arabinogalactanas do tipo II são os polissacarídeos mais abundantes do café e o

presente estudo confirma a presença destes polissacarídeos em grãos imaturos torrados.

O grau de polimerização (ou seja, o número de unidades monoméricas por cadeia polimérica) é obtido através da razão entre a quantidade total das ligações de manose e a sua quantidade de resíduos terminais (Total Manp/ T-Manp). Observa-se (Tabela 3) que o grau de polimerização obtido do HMWM do café é de 18,8 e do defeito 16,3.

O grau de ramificação, obtido através da razão entre a quantidade total das ligações de manose e a sua quantidade de resíduos de manose ramificados (Total Manp/ 4,6-Manp) é superior no HMWM do defeito. A percentagem de ramificação é calculada através da razão inversa do grau de polimerização e verifica-se valores superiores no HMWM do café (1,1) enquanto no HMWM do defeito é observado uma percentagem de ramificação de 0,6.

3.4 Ácido 5-cafeoilquínico e cafeína

Na Tabela 4 estão representados os resultados de ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e cafeína das frações solúveis e HMWM e frações etanólicas dos grãos de café e grãos classificados como defeito verde.

Tabela 5 - Teores de ácido clorogênico e cafeína das frações do material de alto peso molecular (HMWM) dos grãos de café dos grãos classificados como defeito

	5-ACQ g/100g		Cafeína g/100g	
	Grãos de café	Grãos defeito verde	Grãos de café	Grãos defeito verde
Fração solúvel	1,16a	0,99b	1,20a	1,21 a
Et 50	0,066a	0,041a	Nd	Nd
Et75	Nd	Nd	Nd	Nd
Sn75	0,213a	0,232a	Nd	Nd

Nd: não detectado. Médias seguidas de diferentes letras, diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

É possível verificar que a maior parte do ACQ permaneceu na fração EtSn assim como observado por Moreira et al. (2012). Verifica-se que os valores entre as duas amostras analisadas não foram diferentes entre si. Foram observadas ainda pequenas quantidades de ácido clorogênico nas frações Et50 das duas amostras.

Os ácidos clorogênicos são compostos de baixo peso molecular e por esta razão grande parte não é retida ao final do processo de diálise (FARAH et al., 2008; MOREIRA et al., 2012). A literatura descreve que, aproximadamente metade dos ácidos clorogênicos degradados no processo de torração podem ser encontrados como pigmentos, na forma de ácido quínico livre e compostos fenólicos de baixa massa molecular, sendo mais recentemente descrita a participação desses compostos na estrutura das melanoidinas do café (BEKEDAM et al., 2008a; NUNES; COIMBRA, 2001).

Como estes compostos são incorporados nas melanoidinas durante a torração, Farah et al. (2008) afirmam que um processo eficaz de diálise para separação do HMWM do café não deve conter teores acima de 0,3 g/100 g de ACQ. Devido ao baixo conteúdo de ACQ contido no HMWM, faz-se necessária a solubilização em etanol como proposto por Nunes e Coimbra (2001).

Apesar dos teores de ACQ serem reduzidos quando comparados com o conteúdo existente nos grãos torrados, a presença de compostos fenólicos associados a compostos de alto peso molecular como as melanoidinas e polissacarídeos pode ter grande importância para a saúde, pois estes compostos em conjunto podem atuar como fibras alimentares.

Em relação à cafeína, não foi constatada a presença do composto em nenhuma das amostras analisadas. A ausência da cafeína reforça a possibilidade da utilização do HMWM do defeito como fibra alimentar, já que o composto apresenta alguns efeitos negativos ao organismo, dependendo da quantidade e sensibilidade de cada indivíduo.

3.5 Melanoidinas

As melanoidinas são definidas como compostos de cor marrom e alto peso molecular (BEKEDAM et al., 2008a; NUNES; COIMBRA, 2001) e por esta razão, a determinação é feita a 405 nm como descrito por Bekedam et al. (2008a).

Os teores de melanoidinas do material de alto peso molecular dos grãos estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Teores de melanoidinas K(mix 405 nm) do HMWM do café e defeito e respectivas frações etanólicas

	K (mix 405 nm)	
	Café	Defeito
HMWM	0,55 a	0,53 a
Et50	0,48b	0,56a
Et75	0,53 ^a	0,51 ^a
EtSn	1,03 ^a	0,99 ^a

Médias seguidas da diferente letra, diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os HMWM (kmix 405nm) e as frações etanólicas das duas amostras, com exceção da Et50, não foram diferentes ($p \leq 0,05$) (Tabela 6). As frações EtSn apresentaram os maiores conteúdos de melanoidinas (1.03-café/0,99-defeito) devido à alta solubilidade em etanol destes compostos, como observado por Moreira et al. (2012).

O aumento no teor de melanoidinas se dá com a evolução do grau de torração, devido ao desenvolvimento da reação de Maillard. No estudo de Almeida e Benasse (2011), o maior valor de melanoidinas foi obtido para uma amostra comercial conhecida por “Extra Forte”, e os cafés Gourmet

apresentaram alguns dos teores mais baixos, coincidentes com um grau de torração mais leve usualmente empregado para esse tipo de produto.

De acordo com Daglia et al. (2004) e Nicoli, Anese e Parpinel (1997), as melanoidinas contribuem em aproximadamente com 25% da matéria seca, sendo assim, um dos principais componentes da bebida do café torrado.

A coloração dos cafés torrados (Tabela 1) permite concluir que o grau de torração entre as amostras foi semelhante e não influenciou nas diferenças encontradas no conteúdo de melanoidinas.

3.6 Proteínas

Os teores de proteínas dos HMWM e frações etanólicas dos grãos de café e dos classificados defeito verde e estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Teores de proteínas do HMWM dos grãos de café e dos grãos classificados defeito e respectivas frações etanólicas

	g(100g)	
	Café	Defeito
HMWM	14,60a	15,65a
Et50	3,87b	4,75a
Et75	11,04b	12,04a
EtSn	31,33a	33,58a

Médias seguidas da diferente letra, diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Não foram observadas diferenças quanto aos teores de proteínas do HMWM do café e do HMWM do defeito ($p \leq 0,05$) (Tabela 7). As frações EtSn das duas amostras possuem os maiores conteúdos de proteínas (31,33 café e 33,58 defeito) e também não são diferentes entre si. Este resultado corrobora com o de Moreira et al. (2012), revelando a alta solubilidade em etanol das

proteínas presente no HMWM. As frações insolúveis em etanol (50% e 75%) do defeito possuem maiores teores de proteínas que as mesmas frações do café.

A reação de Maillard é uma reação de escurecimento não enzimático e caracteriza-se pela combinação do grupamento carbonila de carboidratos redutores com o grupo amínico de aminoácidos, proteínas e peptídios. Por esta razão, o conteúdo de carboidratos e proteínas presentes nos grãos de café pode determinar os teores de melanoidinas nos grãos torrados (MOREIRA et al., 2012).

3.7 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do material de alto peso molecular dos grãos de café e dos grãos classificados como defeito verde está demonstrada na Figura 1 e Tabela 8.

Figura 1 - Atividade sequestrante de radicais livres (% de inibição) do material de alto peso molecular (HMWM) dos grãos de café e dos grãos classificado como defeito verde em diferentes diluições

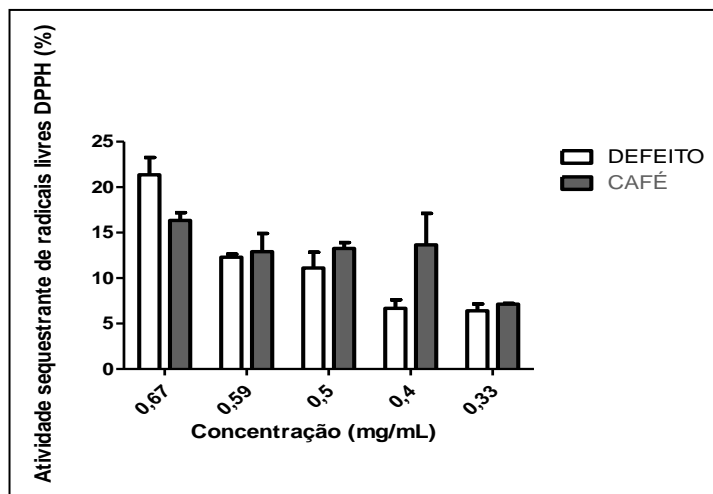


Tabela 8 - Atividade sequestrante de radicais DPPH (EC50) do HMWM do café e do defeito verde

Ativ. Antioxidante	EC50 ug/mL
HMWM Defeito	25.9 a ± 0.12
HMWM Café	24.8 b ± 0.08

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O método DPPH é baseado na redução da taxa de DPPH radical estável. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R^{\bullet}), o DPPH $^{\bullet}$ é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H). Dessa maneira, o mecanismo de redução de radicais livres DPPH envolve a doação de hidrogênio (HUANG et al., 2005).

A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH $^{\bullet}$ consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e ou a porcentagem de DPPH $^{\bullet}$ remanescente no meio reacional. O EC50 baseia-se na redução do radical DPPH $^{\bullet}$ que ao fixar um H. (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante consumida na redução de 50% do radical DPPH (HUANG et al., 2005).

As duas amostras analisadas apresentam a capacidade em sequestrar radicais DPPH (EC50), sendo que o HMWM do café possui capacidade antioxidante mais expressiva quando comparada ao HMWM do defeito. Mais de 50% da atividade antioxidante das melanoidinas se deve pelos compostos de baixo peso molecular (como compostos fenólicos) ligados não covalentemente às melanoidinas (DELGADO-ANDRADE; MORALES, 2005).

Apesar de terem sido observados maiores teores de ácidos clorogênicos no HMWM do defeito, o HMWM dos grãos de café teve maior capacidade em

sequestrar radicais livres, o que sugere que o processo de amadurecimento dos frutos influencia a capacidade antioxidante dos grãos.

Almeida e Benassi (2011) observaram que amostras que apresentaram elevados teores de fenóis totais também tiveram alta atividade antioxidante estimada pelo método ABTS. As metodologias FRAP, DPPH, ABTS, Folin e desoxirribose são aplicáveis para avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antioxidante em amostras de café torrado solúvel.

A presença da película prateada no defeito verde pode ser outro fator de influência na bioatividade do HMWM, mas estudos já comprovam a capacidade antioxidante deste componente dos grãos (COSTA et al., 2014).

A capacidade antioxidante do café, não se restringe às melanoidinas, compreende vários compostos presentes na bebida bem como suas interações sinérgicas ou antagônicas (LÓPEZ-GALILEA; PEÑA; CID, 2008), bem como no sinergismo de compostos presentes nos grãos responsáveis pela formação das melanoidinas.

4 CONCLUSÃO

- a) O material de alto peso molecular (HMWM) do defeito verde possui composição química semelhante ao HMWM do café e capacidade antioxidante *in vitro*;
- b) Além disso, o HMWM destes grãos apresenta ácido clorogênico e ausência de cafeína o que viabiliza sua utilização como fibra alimentar, dentre outras aplicações.

REFERÊNCIAS

ALESSANDRINI, L. et al. Near infrared spectroscopy: an analytical tool to predict coffee roasting degree. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 625, n. 1, p. 95-102, Jan. 2008.

ALMEIDA, M. B.; BENASSE, M. de T. Atividade antioxidante e estimativa do teor de melanoidinas em cafés torrados comerciais Antioxidant activity and estimation of melanoidin content in commercial roasted coffee. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, p. 1893-1900, 2011. Suplemento 1.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, ago. 2009.

BEKEDAM, E. K. et al. High molecular weight melanoidins from coffee brew. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 20, p. 7658-7666, Oct. 2006.

BEKEDAM, E. K. et al. Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 6, p. 2055-2063, Mar. 2008a.

BEKEDAM, E. K. et al. Low molecular weight melanoidins in coffee brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 11, p. 4060-4067, June 2008b.

CAMPANHA, G. et al. Discrimination of coffee species using kahweol and cafestol: effects of roasting and of defects. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 87-96, Jan./Apr. 2010.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 131, p. 209-217, 1984.

COSTA, A. S. G. et al. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. **Industrial Crops and Products**, London, v. 53, p. 350-357, Feb. 2014.

DAGLIA, M. et al. Isolation of high molecular weight components and contribution to the protective activity of coffee against lipid peroxidation in a rat liver microsome system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 24, p. 11653-11660, Dec. 2008.

DELGADO-ANDRADE, C.; MORALES, F. J. Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 5, p. 1403-1407, 2005.

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 138, n. 12, p. 2309-2315, Dec. 2008.

FRANÇA, A. S. et al. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, London, v. 90, p. 89-94, 2005.

HUANG, D. J. et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005.

LOPEZ-GALILEA, I.; PEÑA, M. P.; CID, C. Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, n. 1, p. 141-149, Jan. 2008.

LIU, Y.; KITTS, D. D. Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 8, p. 2418-2424, Oct. 2011.

MENDONÇA, J. C. F.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. Physical characterization of non-defective and defective Arabica and Robusta coffees before and after roasting. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 92, p. 474-479, 2009.

MOREIRA, A. S. et al. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. **Food & Function**, London, v. 3, n. 9, p. 903-915, Sept. 2012.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. T. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 10, p. 94-100, 1999.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted arabica coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 1773-1782, 2001.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted robusta coffee as affected by the degree of roast. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 7046-7052, 2002.

NUNES, F. M. et al. Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 3428-3439, 2006.

SELVENDRAN, R. R.; MARCH, J. F.; RING, S. G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. **Analytical Biochemistry**, Madison, v. 96, p. 282-292, 1979.

SUMMA, C. A. et al. Impact of the roasting degree of coffee on the in vitro radical scavenging capacity and content of acrylamide. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 40, n. 10, p. 1849-1854, Dec. 2007.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 965-971, set./out. 2006.

VASCONCELOS, A. L. S. et al. Avaliação comparativa da composição centesimal de grãos defeituosos e sadios de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina: SPCB-PR, 2005. Disponível em:
<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1863/166733_Art117f.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 mar. 2016.

VIANI, R.; HORMAN, I. Thermal behavior of trigonelline. **Journal Food of Science**, Chicago, v. 39, n. 6, p. 1216-1217, Nov./Dec. 1974.