TAMIRIS CARNEIRO GOIS

Perfis metabolômicos da ingestão de café

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para o do título de Mestre
em Ciências

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Pereira

SÃO PAULO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gois, Tamiris Carneiro
Perfis metabolômicos da ingestão de café /
Tamiris Carneiro Gois. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Café 2.Cafeína 3.Metabolômica
4.Metabolismo 5.Espectrometria de massas
6.Cromatografia gasosa

USP/FM/DBD-276/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedico esta dissertação à minha querida família (em especial ao meu sogro, Geraldo Leonel da Silva (*in memoriam*), que dedicou muitos anos de sua vida ao cultivo de café), amigos e amantes do café que me inspiraram e apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus que com muito amor me permitiu realizar este trabalho e aos meus guias espirituais que me guiaram com muita fé, persistência e esperança em todos os momentos desta jornada.

A minha amada família, meus pais (Adenilton Gois e Daiana Gois) e avôs (Neide Siqueira, Luiz Almeida, Jandira de Gois e Vitalino Gois) que me apoiaram e ajudaram em todos os momentos. Pai e mãe, muito obrigada por sempre acreditarem no meu potencial como profissional e ser humano, além de todo apoio emocional e financeiro. Devo tudo o que tenho e sou a vocês. Amo vocês! Vó Jandira agradeço por sempre acreditar no meu potencial e se orgulhar de mim a cada conquista.

Ao meu esposo (Geraldo Silva), obrigada pelo companheirismo, compreensão, amor e paciência com as horas dedicadas ao trabalho e as intermináveis apresentações. Te amo!

Ao meu grupo (Gabriela, Pamella, Kallyandra, Juliana e Luz Marina), pelos ensinamentos, conversas, risadas e amizade incondicional. Vocês são como uma segunda família para mim! Obrigada Gabriela por todo conhecimento transmitido e ajuda em todos esses anos. Pamella, obrigada pela paciência e cuidado comigo desde a iniciação científica. Obrigada Luz Marina pela paciência, conselhos e toda a ajuda com as análises estatísticas que antes eram vários bichos de sete cabeças para mim.

Agradeço aos meus amigos (Luciana, Fabiana, Bianca, Patrícia, Carolina, Rafael, Marcus, Leonardo, Natália, Daniel, Rodrigo) que tornaram mais leves os meus dias dentro e fora do laboratório.

Ao pessoal do apoio do laboratório (Ana, Silvana, Priscila, Maúde, Marcelly, Andreia, Sileide, Márcio, Brendo) pela amizade e toda ajuda quando precisei.

A Ana Paula Carneiro dos Santos que me apresentou o laboratório e me introduziu ao mundo da pesquisa.

A Dra. Maria Anita Mendes e Meriellen Dias que me ajudaram com as primeiras análises em CG-EM, tirando dúvidas e disponibilizando o equipamento quando necessário.

A Profa. Dra. Cristiane da Silva Marciano Grasselli por toda paciência, confiança e ajuda com a parte burocrática, além das discussões para o melhoramento e entendimento do trabalho.

Ao Bruno César Correa Salles, obrigada por realizar as coletas que foram essenciais na realização do estudo.

Ao Sr. Paulo e a Sra. Regina, agradeço a hospitalidade, carinho e quitutes deliciosos em todas as minhas visitas a Alfenas.

Ao Dr. Paulo Caleb Júnior de Lima Santos, obrigada pela confiança, amizade e ajuda no desenvolvimento do trabalho. E também aos alunos do seu grupo (Carolina, Leiliane, Paula, Juliana e Paulo Roberto) pela amizade.

Gostaria de agradecer ao Dr. José Eduardo Krieger que me forneceu o laboratório apropriado para as análises e ao Dr. Alexandre da Costa Pereira pela orientação, confiança e amizade no desenvolvimento deste trabalho, que foi essencial para meu desenvolvimento pessoal e científico. Muito obrigada por tudo!

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação Zerbini e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

“O homem se destaca na vida ao dominar o caráter que lhe foi dado pela natureza, ou construindo um pela educação e sabendo modificá-lo conforme os obstáculos que encontra” (Napoleão Bonaparte).

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Café	2
1.1.1	<i>Evolução do café no cenário mundial</i>	<i>2</i>
1.1.2	<i>Tipos de café e sua composição química</i>	<i>6</i>
1.1.3	<i>Café e saúde</i>	<i>18</i>
1.2	Metabolômica	20
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	<i>24</i>
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Amostragem	26
3.1.1	<i>Estudo de intervenção nutricional</i>	<i>26</i>
3.1.2	<i>Estudo comparativo de diversas marcas de café</i>	<i>28</i>
3.2	Análises metabolômicas	30
3.2.1	<i>Padrão interno</i>	<i>31</i>
3.2.2	<i>Extração de metabólitos</i>	<i>32</i>
3.2.3	<i>Derivação química</i>	<i>34</i>
3.2.4	<i>Análises em CG-EM</i>	<i>35</i>
3.2.5	<i>Processamento de dados, identificação e quantificação relativa dos metabólitos</i>	<i>35</i>
3.2.6	<i>Seleção dos metabólitos</i>	<i>36</i>
3.2.7	<i>Caracterização dos metabólitos selecionados</i>	<i>51</i>
3.3	Análise estatística	53
3.3.1	<i>Estudo de intervenção nutricional</i>	<i>53</i>
3.3.2	<i>Estudo comparativo de diversas marcas de café</i>	<i>61</i>
4	RESULTADOS	65
4.1	Estudo de intervenção nutricional	65

4.1.1	<i>Caracterização dos metabólitos</i>	65
4.1.2	<i>Metabólitos específicos do café</i>	69
4.1.3	<i>Candidatos à biomarcadores</i>	73
4.1.4	<i>Variações no perfil metabolômico originadas após o consumo de café</i>	77
4.2	<i>Estudo comparativo de diversas marcas de café</i>	92
4.2.1	<i>Café Tradicional</i>	92
4.2.2	<i>Café expresso</i>	100
4.2.3	<i>Café tradicional versus café expresso</i>	106
4.3	<i>Sumário de resultados</i>	115
4.3.1	<i>Estudo de Intervenção Nutricional</i>	115
4.3.2	<i>Estudo comparativo de diversas marcas de café</i>	115
5	DISCUSSÃO	118
5.1	<i>Estudo de intervenção nutricional</i>	118
5.2	<i>Estudo comparativo de diversas marcas de café</i>	120
6	CONCLUSÕES	124
7	ANEXOS	126
8	REFERÊNCIAS	133

LISTA DE SIGLAS

17U	Ácido 1,7-dimetilúrico
17X	Paraxantina
1U	Ácido 1-metilúrico
1X	1-Metilxantina
5-CQA	Ácido 5-O-cafeoilquínico
A ₁ R	Receptores de Adenosina A1
A _{2A} R	Receptores de Adenosina A2AR
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ADORA1	Receptores de Adenosina A1
ADORA2A	Receptores de Adenosina A2A
AFMU	5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo
AGCs	Ácidos clorogênicos
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
ApoB	Apolipoproteína B
ApoE	Apolipoproteína E
Arábica	Café da espécie Arábica
ASC	Área sobre a curva
CAS	do inglês, <i>Chemical Abstracts Service</i>
CBAs	Compostos bioativos
CF	Cafeína
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria

	de massas
ChEBI	do inglês, <i>Chemical Entities of Biological Interest</i>
CI	do inglês, <i>Chemical Ionization</i>
CL	Cromatografia líquida
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série
CYP1A2	Enzima hepática citocromo P450 isoforma 1A2
CYP2A6	Enzima hepática citocromo P450 isoforma 2A6
CYP2C8	Enzima hepática citocromo P450 isoforma 2C8
CYP2C9	Enzima hepática citocromo P450 isoforma 2C9
CYP2E1	Enzima hepática citocromo P450 isoforma 2E1
CYP3A4	Enzima hepática citocromo P450 isoforma 3A4
d.C.	Depois de Cristo
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EI	do inglês, <i>Electron Ionization</i>
EM	Espectrometria de Massa
EM /EM	Espectrometria de massa em série
FAMES	do inglês, <i>Fatty Acid Methyl Esters</i>
FoodDB	do inglês, <i>Food Database</i>
GABA	Ácido γ -Aminobutírico
HDL	do inglês, <i>High Density Lipoproteins</i>
HMDB	do inglês, <i>Human Metabolome Database</i>
HMWM	do inglês, <i>High-Molecular-Weight Material</i>
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL-6	Interleucina 6

IMC	Índice de Massa Corpórea
InCor	Instituto do Coração
InCor-HC/FMUSP	Instituto do Coração do Hospital das Clínicas afiliado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IPA	do inglês, <i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
KEGG	do inglês, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MCT	Transportador de ácido monocarboxílico
MMA	do inglês, <i>Methylmalonic acid</i>
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MSTFA	do inglês, <i>N-methyl-N-trimethylsilyl- trifluoroacetamine</i>
NA	do inglês, <i>Non-Available</i>
NAT2	N-acetiltransferase 2
ND	Não detectado
NFκB	do inglês, <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
NIST	do inglês, <i>National Institute of Standards and Technology</i>
NIST 14	do ingles, <i>National Institute of Standards and Technology 2014</i>
OIC	Organização Internacional do Café
One-way ANOVA	do inglês, <i>One-way Analysis of Variance</i>
QA	Ácido quínico
QC	Controle de qualidade

QFA	Questionário de frequência alimentar
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Robusta	Café da espécie Robusta
RT	do inglês, <i>Retention Time</i>
RTL	do inglês, <i>Retention Time Locking</i>
SCAA	Associação Especialista em Café da América
Sindicafé-SP	Sindicato da Indústria de Café do Estado de São Paulo
SNC	Sistema Nervoso Central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMCS	do inglês, <i>Trimethylchlorosilane</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
Tukey HSD	do inglês, <i>Tukey Honestly Significant Difference</i>
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais
XDH	Xantina desidrogenase

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Menos
%	Porcentagem
<	Menor
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
∩	Intersecção
↑	Aumento
↓	Diminuí
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
atm	Atmosfera
b	Individuo
$b_i Z_i$	Fator aleatório
Da	Dalton
eV	Eletro volts
g	Gramma
ID	Indivíduo
kg	Kilograma
kg/m ²	Kilograma por metro quadrado
m/Z	Razão massa carga

mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitro
n	Número de indivíduos
N°	Número
Pa	Pascal
R\$	Reais
rpm	Rotações por minuto
t0	Tempo 0
T _{1/2}	Tempo de meia vida
t12	Tempo 12
t24	Tempo 24
t6	Tempo 6
xg	Veze a aceleração da gravidade
α	Alfa
α_0	Média geral do metabólito na amostra
β	Beta
β_1	Fator fixo grupo
β_2	Fator fixo tempo
β_3	Interação entre os fatores grupo e tempo
$\beta_3 \text{ GrupoxTempo}$	Interação entre os fatores grupo e tempo
ϵ_i	Erro experimental

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos presentes no jejum ou em 6 horas após a ingestão de café.....	73
Tabela 2. Metabólitos presentes no jejum ou em 12 horas após a ingestão de café.....	74
Tabela 3. Metabólitos presentes no jejum ou em 24 horas após a ingestão de café.....	75
Tabela 4. Metabólitos com intensidades significativamente diferentes no tempo 0 em relação ao tempo 6 dentro do grupo controle café em relação ao grupo café.	78
Tabela 5. Metabólitos com intensidades significativamente diferentes no tempo 6 em relação ao tempo 12 dentro do grupo controle em relação ao grupo café.	83
Tabela 6. Metabólitos com intensidades significativamente diferentes no tempo 12 em relação ao tempo 24 dentro do grupo controle em relação ao grupo café.	87
Tabela 7. Funções a nível molecular e celular dos dois conjuntos de metabólitos do grupo tradicional separados pela análise hierárquica de agrupamentos.	100
Tabela 8. Funções a nível molecular e celular que envolvem os dois conjuntos de metabólitos determinados pela análise hierárquica de agrupamentos do grupo expresso.	106
Tabela 9. Funções a nível molecular e celular envolvidas aos metabólitos presentes em ambos os grupos tradicional e expresso.	108
Tabela 10. Funções a nível molecular e celular envolvidas aos metabólitos presentes somente no grupo tradicional ou expresso.	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução do consumo interno de café no Brasil entre os anos 2000 e 2017... 5	5
Figura 2. Diferenças na composição química no grão verde e torrado dos cafés Arábica – <i>Coffea arabica</i> e Robusta – <i>Coffea canephora</i> 7	7
Figura 3. Classificação do grau de torrefação de acordo com o sistema Agtron/SCAA (do inglês, <i>Specialty Coffee Association of America</i>) de classificação de cor da torra. ... 9	9
Figura 4. Farmacocinética da cafeína. 12	12
Figura 5. Biotransformação da cafeína. 13	13
Figura 6. Processo de seleção dos metabólitos de alta confiabilidade no soro. 45	45
Figura 7. Processo de seleção dos metabólitos de alta confiabilidade nas marcas de café. 50	50
Figura 8. Processo da análise de possíveis biomarcadores séricos da ingestão de café. 58	58
Figura 9. Equação utilizada no modelo misto e exemplificação do intercepto aleatório. 60	60
Figura 10. Gráficos representativos do comportamento dos metabólitos originados pela interação entre tempo e grupo. 61	61
Figura 11. Cromatogramas representativos das amostras de soro no grupo café e no grupo controle. 66	66
Figura 12. Fluxograma do processo de seleção dos metabólitos de alta confiabilidade identificados nas amostras de soro. 67	67

Figura 13. Diagrama de Veen da distribuição de metabólitos entre os tempos de coleta das amostras de soro.	68
Figura 14. Comportamento do ácido quínico ao longo de 24 horas em indivíduos do grupo café.	70
Figura 15. Comportamento do ácido m-hidrocoumárico ao longo de 24 horas em indivíduos do grupo café.	71
Figura 16. Comportamento da cafeína ao longo de 24 horas em indivíduos do grupo café.	72
Figura 17. Perfil de comportamento dos potenciais biomarcadores de ingestão de café no soro ao longo de 24 horas.	76
Figura 18. Gráficos de interação entre tempo e grupo das médias das áreas sob a curva dos metabólitos significativos da comparação entre os tempos 0 e 6.	82
Figura 19. Gráficos de interação entre tempo e grupo das médias das áreas sob a curva dos metabólitos significativos da comparação entre os tempos 6 e 12.	86
Figura 20. Gráficos de interação entre tempo e grupo dos metabólitos significativos da comparação entre os tempos 12 e 24.	90
Figura 21. Perfil de comportamento ao longo de 24 horas dos aminoácidos significativamente diferentes por modelos mistos.	91
Figura 22. Cromatogramas das marcas de café correspondentes ao grupo tradicional.	93
Figura 23. Caracterização dos metabólitos selecionados do grupo tradicional.	96
Figura 24. Diagrama de Veen da distribuição dos metabólitos entre as marcas do grupo tradicional.	97
Figura 25. Agrupamento hierárquico e heatmap dos metabólitos com intensidade significativamente diferente entre as marcas no grupo tradicional.	99

Figura 26. Cromatogramas representativos dos tempos entre 6,5 e 37 minutos da aquisição de dados após o atraso do solvente para as marcas de café correspondentes ao grupo expresso.	101
Figura 27. Caracterização dos metabólitos representativos do grupo expresso.	103
Figura 28. Diagrama de Veen da distribuição dos metabólitos entre as marcas do grupo expresso.	104
Figura 29. Agrupamento hierárquico e heatmap dos metabólitos com concentração relativa significativamente diferente no grupo expresso.	105
Figura 30. Diagrama de Veen da distribuição dos metabólitos entre o grupo tradicional e expresso.	107
Figura 31. Rede de conexões entre os metabólitos presentes em todos os cafés (vermelho) e outros metabólitos pelo programa Ingenuity.	109
Figura 32. Porcentagem de metabólitos disponíveis nos cafés tradicionais e expressos segundo a classe.	110
Figura 33. Agrupamento hierárquico e heatmap dos metabólitos com concentração relativa significativamente diferente na comparação entre os cafés tradicional e expresso.	113
Figura 34. Heatmap do grupo tradicional e expresso com os principais metabólitos do café.	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Marcas de cafés utilizadas para os grupos tradicional e expresso.....	29
Quadro 2. Caracterização do preparo do café expresso.	30

RESUMO

Gois TC. *Perfis metabolômicos da ingestão de café* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Diversos estudos relacionados ao consumo de café na literatura não apresentam um consenso do papel deste alimento na saúde. Esta divergência pode ser o reflexo da utilização do consumo habitual auto-relatado pelos indivíduos como o único fator de exposição avaliado, visto que não existem biomarcadores de consumo, além de diferenças na composição química e na metabolização interindividual dos compostos bioativos (CBAs) da bebida. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo identificar as alterações no perfil metabolômico de indivíduos saudáveis após o consumo controlado de café, bem como em extratos de café do tipo tradicional e expresso de diferentes marcas. Participaram deste estudo 35 homens saudáveis divididos entre os grupos café ($n = 30$) e controle ($n = 5$). As amostras de soro foram coletadas em jejum e 6, 12 e 24 horas após consumo de café (grupo café) ou água (grupo controle) seguida da extração de metabólitos, derivação com reagentes químicos e avaliação pelo método CG-EM. Posteriormente, os metabólitos foram identificados, selecionados, caracterizados e estatisticamente analisados. A análise metabolômica não direcionada permitiu a identificação de três compostos específicos do café (*Caffeine*, *Quinic acid*, *m-Hydrocoumaric acid*) a partir de 6 horas no grupo café. Além destes compostos, o metabólito *Methylmalonic acid* também demonstrou ser um candidato à biomarcador sérico da ingestão de café. Por meio das comparações entre os grupos café e controle ao decorrer dos tempos no modelo misto observamos diferentes respostas do perfil metabolômico de aminoácidos, carboidratos e lipídeos, promovidas pelos fatores tempo e grupo como também sua interação. Os aminoácidos *4-Hydroxyproline 1*, *L-Alanine 1*, *L-Cystine 3*, *L-Methionine 1* e *L-Threonine 2* apresentaram diferentes perfis de comportamento no grupo café ao longo de 24 horas, em relação ao grupo controle. Em paralelo, foram realizadas às análises metabolômicas de dois tipos de café:

tradicional (Pilão, Melitta, 3 Corações e Prima Qualitá) e expresso (Nespresso, Dolce Gusto e Café Do Ponto). Após a preparação das bebidas, os extratos foram submetidos aos mesmos procedimentos do estudo de intervenção nutricional. No grupo tradicional, nenhum metabólito exclusivo foi identificado nas 4 marcas, porém o perfil metabolômico das marcas Melitta e 3 Corações foram similares e diferentes das demais. No grupo expresso, os cafés Nespresso e Dolce Gusto mostraram perfis semelhantes e diferentes do Café do Ponto, o qual apresentou exclusivamente Cellobiose 2 e β -Gentiobiose. A comparação entre os grupos tradicional e expresso demonstrou que seus perfis metabolômicos foram distintos, bem como cada um deles apresentou metabólitos exclusivos com algumas funções celulares e moleculares diferentes. A quantidade dos principais compostos bioativos do café foi diferente entre os dois tipos e suas marcas. A caracterização do metaboloma em um grupo homogêneo de indivíduos saudáveis permitiu identificar candidatos à biomarcadores e alterações no perfil de alguns aminoácidos após a ingestão controlada de café. Assim, a identificação de candidatos à biomarcadores de efeito agudo do café mostra a importância de validar um painel com biomarcadores de alta confiabilidade e que possam colaborar com futuros estudos de intervenção nutricional, não apenas baseado do consumo de café reportado. Além disso, diferentes métodos de preparo do café, tradicional e expresso, bem como as diversas marcas analisadas, apresentaram diferença nos seus perfis metabolômicos. Desta forma, este estudo também pode ressaltar a importância de se considerar não somente a quantidade, mas também o tipo e a marca de café consumido como fatores de exposição em estudos de intervenção nutricional e de associação entre o consumo de café e seus efeitos no organismo.

Descritores: café; cafeína; metabolômica; metabolismo; espectrometria de massas; cromatografia gasosa.

ABSTRACT

Gois TC. *Metabolomic profiles of coffee intake*. [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

There are several studies associating coffee consumption and diseases, however they are not concordant about the coffee role in health. This divergence may reflect a lack of standard in data acquisition since most of the time the subjects' self-reported habitual consumption is the only exposure factor evaluated and there is no biomarker. Add, there are differences of coffee beverage bioactive compounds composition and subjects show difference in coffee metabolization resulting in many covaries to be considered in these studies. Our study aimed to identify changes in metabolomic profile of healthy individuals after controlled consumption of coffee, as well as metabolic profile of traditional and espresso coffee beverages from different brands. 35 healthy men were distributed into coffee (n = 30) and control (n = 5) groups. Serum was sampled at fasting and 6, 12 and 24 hours after coffee (coffee group) or water (control group) intake. Metabolites were extracted, derivatized with MSTFA and TMCS, and run in GC-MS. Subsequently, the metabolites were identified using Fiehn Metabolomics Library and NIST, filtered, characterized and statistically analyzed. Untargeted metabolomic analysis identified three specific compounds of coffee (Caffeine, Quinic acid, m-Hydrocoumaric acid) in serum of subjects six hours after coffee intake. In addition to these compounds, Methylmalonic acid showed as a potential biomarker candidate of coffee intake in serum. Comparing coffee and control groups over time in a mixed model, we observed difference in the metabolomic profile related to amino acids, carbohydrates and lipids. 4-Hydroxyproline 1, L-Alanine 1, L-Cystine 3, L-Methionine 1 and L-Threonine 2 showed different profiles in coffee group over 24 hours compared to control group. In parallel to serum samples, we performed metabolomic analysis of the beverage. Two types of coffee were used: traditional powder (Pilão, Melitta, 3 Corações and Prima Qualitá) and capsule espresso (Nespresso, Dolce Gusto and Café

Do Ponto). After beverages preparation, extracts were submitted to same metabolites extraction and analysis procedures of serum samples. In traditional coffee group, no exclusive metabolites were identified in four brands, but metabolomic profile of Melitta and 3 Corações were similar between them and different from the others. In espresso coffee group, Nespresso and Dolce Gusto showed similarity and they were different from of Café do Ponto, which presented exclusively Cellobiose 2 and β -Gentiobiose. The comparison between traditional coffee and espresso coffee groups showed a difference in their metabolomic profiles, as well as each of them presented exclusive metabolites with different cellular and molecular functions. The amount of major bioactive compounds in coffee was different between the two modes of preparation and their brands. The characterization of metabolome in a homogeneous group of healthy individuals allowed the identification of potential biomarkers and showed alterations in some amino acids profile after controlled coffee intake. The identification of candidates for biomarkers of acute coffee effect showed the importance of validating a panel with biomarkers of high reliability and that may collaborate with future studies of nutritional intervention, not only based on the reported coffee consumption. In addition, coffee brewing method and brand of the product resulted in differences in their metabolomic profiles. Thus, this study may also highlight the importance of considering not only quantity, but also the brewing method and brand of coffee consumed as exposure factors in studies of nutritional intervention.

Descriptors: coffee; caffeine; metabolomics; metabolism; mass spectrometry; chromatography, gas.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Café

1.1.1 Evolução do café no cenário mundial

O café tem sido por pelo menos 1200 anos o produto alimentar de maior importância no comércio e igualmente uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Esta popularidade ocorreu graças à riqueza de suas características organolépticas, tais como aroma e sabor, e principalmente, ao efeito estimulante promovido pela cafeína no sistema nervoso central (SNC) (BUTT & SULTAN, 2011; ALVES et al., 2009). Sua descoberta ocorreu em 850 d.C. na Etiópia (nordeste da África), quando o pastor de cabras Kaldi observou que os animais do seu rebanho se tornavam mais rápidos, subiam as montanhas com agilidade, apresentavam maior resistência e percorriam quilômetros de subidas íngremes ao mastigarem as folhas e frutos de determinado arbusto. A Lenda de Kaldi, como é popularmente conhecida, se disseminou na região após o pastor experimentar os tais frutos e confirmar seus efeitos estimulantes (BAE et al., 2014; MARTINS, 2012).

Das culturas iniciais na Etiópia, o cultivo das árvores de café logo passou a ser dominado no Iêmen, principalmente na cidade de Mocha, onde as plantas foram denominadas de *kaweh* e a bebida recebeu o nome de *kaweh* ou *cabue*, que em árabe significa força. Devido ao controle sobre a produção da planta em escala comercial, o país manteve por muito tempo o monopólio de sua comercialização (MARTINS, 2012; FREDHOLM, 2011; SMITH, 1985).

Inicialmente, o café foi utilizado como refeição por viajantes cujos frutos eram consumidos macerados ou misturados com gordura animal e suas folhas eram mastigadas ou usadas no preparo de chá. A bebida preparada por infusão dos frutos em água fervente se tornou conhecida por volta de 1000 d.C., a qual era servida para fins medicinais. Entretanto, a bebida somente adquiriu forma e gosto de como a conhecemos

hoje no século XIV, quando foi desenvolvido o processo de torrefação. Este processo também permitiu a disseminação do consumo de café na Índia, África do Norte, Turquia e Bálcãs durante o século XV (MEJIA & RAMIREZ-MARES, 2014; MARTINS, 2012; FREDHOLM, 2011).

No início de 1615, o café foi introduzido na Europa por mercadores em Veneza, a qual se tornou o principal ponto de comercialização de todo continente. Até o final do século XVII, o uso da bebida preparada com água e gelo foi popularizado e estabelecimentos especiais foram criados para que os cavalheiros discutissem os acontecimentos diários enquanto ingeriam a infusão (MEJIA & RAMIREZ-MARES, 2014; FREDHOLM, 2011).

Com o aumento da demanda européia e o contrabando de plantas para Amsterdam no final do século XVII, os países árabes perderam o seu monopólio de fornecimento de grãos para as colônias holandesas e inglesas na Oceania, Ásia e Índias Orientais. Em 1718, sementes e mudas foram enviadas da Holanda para o Suriname, introduzindo então o café na América. Nas zonas tropicais americanas, o café encontrou ótimos meios para crescer e frutificar devido ao montanhoso arranjo do solo associado ao clima médio e pluvioso. Graças a estas características geográficas, os países da América do Sul se tornaram produtores de café em grande escala (NEVES, 1974; FLÓREZ, 1964).

No Brasil, as primeiras sementes e mudas chegaram pelas mãos do sargento-mor Francisco de Melo Palheta no Pará, em 1727. Como o clima da região foi favorável ao cultivo do café, este foi expandido para vários locais próximos a Belém. No entanto, a extração da borracha no início do século XIX, contribuiu para o desinteresse e a decadência do cultivo cafeeiro no Pará (NEVES, 1974; TAUNAY, 1939).

Em 1760, a situação econômica do Império português era delicada devido à escassez de riquezas e concorrência no mercado, havendo então a necessidade de se investir em novos produtos e gerar novas demandas comerciais. Ciente da propagação do consumo de café no mundo, o desembargador do Maranhão, João Alberto Castelo Branco, mandou vir algumas mudas de Belém para o Rio de Janeiro. Estas mudas foram distribuídas na região entre as monjas carmelitas de Santa Tereza, aos frades capuchinhos e ao holandês João Hoppmann, permitindo a expansão da produção e a difusão entre as regiões de Resende e Vale do Rio Paraíba, no nordeste de São Paulo. Além disso, estes cafeeiros originaram as primeiras plantações dos Estados do Rio de

Janeiro, Minas Gerais, Paraná e São Paulo (MARTINS, 2012; NEVES, 1974; TAUNAY, 1939).

Esse histórico mostra fatos interessantes relativos aos primeiros cafezais plantados no Brasil, os quais eram constituídos de maneira uniforme pela enorme progênie de um só cafeeiro, *Coffea arabica*. Aos poucos, os cafezais foram expandindo-se e outras mudas de outras espécies de cafeeiros passaram a ser cultivadas. Isto permitiu a diversificação destes cafezais, como também o surgimento de algumas variedades devido às raras mutações, que normalmente ocorrem com o decorrer do tempo, ou às recombinações de fatores genéticos, a partir de hibridações naturais entre os cultivares existentes (MAZZAFERA et al., 1988; KRUG et al., 1939).

Atualmente, o café é cultivado em 50 países diferentes ao redor do mundo (FREDHOLM, 2011). Entretanto, vale destacar que atualmente o Brasil é o maior produtor e exportador de café verde, com 31,9% do total comercializado no mundo, seguido por Vietnã e Colômbia (EMBRAPA, 2018a).

Nos últimos anos, ocorreu o aumento contínuo do consumo de café devido à melhoria da qualidade da matéria-prima e práticas agrícolas, bem como a criação de lojas especializadas e a divulgação dos efeitos benéficos na saúde causados pelo consumo em longo prazo (YERETZIAN et al., 2003).

Segundo a Organização Internacional do Café (OIC), o consumo mundial que foi de 150,8 milhões de sacas de 60kg em 2016, subiu para 157,59 milhões de sacas em 2017 e, nos últimos anos, o crescimento anual manteve média de 2,5%, enquanto a produção mundial de café em 2017 aumentou em 158,78 milhões de sacas (EMBRAPA, 2018b; ICO, 2017). Os principais consumidores do café no mundo são União Européia, Estados Unidos, Brasil, Japão, Indonésia e Rússia (CECAFÉ, 2016).

No Brasil, o consumo em 2017 foi de 21,99 milhões de sacas, mostrando um leve acréscimo de 3,6% em relação a 2016, o qual atingiu 20,5 milhões de sacas. O consumo per capita também aumentou ligeiramente, passando a 5,1 kg por habitante ao ano de café torrado e moído, o equivalente a 6,4 kg de café verde em grão ou 83 litros por habitante ao ano. Em 2018, a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) estima que o consumo de café volte a crescer devido ao atual cenário político-econômico, alcançando os 22,7 milhões de sacas no ano (ABIC, 2018a). A evolução do consumo interno brasileiro ocorrido nos últimos anos, especificamente, entre os anos 2000 e 2017, pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Evolução do consumo interno de café no Brasil entre os anos 2000 e 2017 (adaptado de ABIC, 2018b).

O crescimento no consumo interno brasileiro nos últimos anos pode estar relacionado à melhoria da qualidade do café, bem como a diversificação do sabor e facilidade do preparo pela inserção do café expresso em doses únicas, seja em sachês ou em cápsulas. As vendas em valor das cápsulas em 2015 alcançaram R\$ 1,4 bilhão, com estimativa de que atinjam R\$ 2,96 bilhões em 2019. Pela enorme procura de diferentes variações do sabor e aroma, as indústrias têm inserido os cafés gourmet, existindo uma consistente evolução para atender aqueles mais atentos à diferenciação de regiões, sabores, certificações, entre outros (ABIC, 2018a). A maioria da demanda final de todos os tipos de cafés torrados consumidos consiste de uma mistura composta de espécies diferentes de café, denominadas blends. No entanto, existem produtos formados pela mesma espécie, mas que podem ser advindas de diversas regiões (NISHIJIMA et al., 2012). Essa mistura de diferentes espécies de diferentes regiões, assim como todo o método de extração e preparo fornece à bebida diferentes composições químicas.

1.1.2 Tipos de café e sua composição química

O cafeeiro (*Coffea* sp.) é um arbusto de pequeno porte que pertence à família Rubiaceae, gênero *Coffea* L. e apresenta 103 espécies, porém apenas duas fontes de grãos de café representam 99% do consumo mundial e apresentam importância comercial, a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, ou também conhecidas como Arábica e Robusta (CAGLIANI et al., 2013; BUTT & SULTAN, 2011; FREDHOLM, 2011).

Em termos de conteúdo químico do grão verde, as espécies diferem entre si. Embora a maioria dos constituintes esteja presente nas duas espécies, as suas proporções relativas podem variar consideravelmente, bem como as diferenças na composição da parede celular podem contribuir em diversas respostas químicas após a torrefação (CAGLIANI et al., 2013; FARAH & DONANGELO, 2006; FARAH et al., 2006).

A espécie Arábica é reconhecida por conter mais lipídeos e uma pequena quantidade de cafeína, entre 1,2 e 1,3%, como também pelo seu aroma agradável que fornece a bebida qualidade de superior. Já a Robusta, apresenta maiores quantidades de compostos antioxidantes, cafeína e sólidos mais solúveis. Além disso, o café Robusta também contém alguns metabólitos secundários, por exemplo, os isômeros menores dos ácidos clorogênicos e os alcoóis diterpênicos, os quais não estão presentes na Arábica. Como sugerido pelo nome, os cafeeiros de Robusta são mais robustos, ou seja, eles são mais fortes e resistentes a pestes e doenças, e menos exigentes em relação ao clima (CAGLIANI et al., 2013; NISHIJIMA et al., 2012; FARAH, 2012). Como observado na Figura 2, a composição química dos grãos verdes e torrados nas duas espécies difere. Após a torrefação, diminuí o número de polissacarídeos, proteínas e ácidos clorogênicos, não altera cafeína e lipídios, mas aumenta a concentração do ácido nicotínico, ácidos alifáticos e quínico. Além disso, ocorre a formação das melanoidinas nas amostras, que confere cor e sabor pela junção de açúcares e aminoácidos em altas temperaturas (FARAH, 2012).

Componentes	Concentração (g/100g)			
	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>

	Grão verde	Grão torrado	Grão verde	Grão torrado
CARBOIDRATOS/FIBRAS				
Sucrose	6,0 - 9,0	traços - 4,2	0,9 - 4,0	traços - 1,6
Açúcares redutores	0,1	0,3	0,4	0,3
Polissacarídeos	34,0 - 44,0	31,0 - 33,0	48,0 - 55,0	37,0
Lignina	3,0	3,0	3,0	3,0
Pectina	2,0	2,0	2,0	2,0
COMPOSTOS NITROGENADOS				
Proteínas/peptídeos	10,0 - 11,0	7,5 - 10	11,0 - 15,0	7,5 - 10,0
Aminoácidos livres	0,5	ND	0,8 - 1,0	ND
Cafeína	0,9 - 1,3	1,1 - 1,3	1,5 - 2,5	2,4 - 2,5
Trigonelina	0,6 - 2,0	0,2 - 1,2	0,6 - 0,7	0,3 - 0,7
Ácido nicotínico	ND	0,016 - 0,026	ND	0,014 - 0,025
LIPÍDEOS				
Óleo de café (triglicerídeos com esteróis/tocoferóis insaponificáveis)	15,0 - 17,0	17,0	7,0 - 10,0	11,0
Diterpenos (livres e esterificados)	0,5 - 1,2	0,9	0,2 - 0,8	0,2
MINERAIS				
	3,0 - 4,2	4,5	4,4 - 4,5	4,7
ÁCIDOS E ÉSTERES				
Ácidos clorogênicos	4,1 - 7,9	1,9 - 2,5	6,1 - 11,3	3,3 - 3,8
Ácidos alifáticos	1,0	1,6	1,0	1,6
Ácido quinico	0,4	0,8	0,4	1,0
Melanoidinas				
	ND	25,0	ND	25,0

Figura 2. Diferenças na composição química no grão verde e torrado dos cafés Arábica – *Coffea arabica* e Robusta – *Coffea canephora* (adaptado de FARAH, 2012). O conteúdo dos grãos pode variar de acordo com o cultivo, as práticas agrícolas, clima, composição do solo e métodos de análise. Os valores os quais não foram detectados estão representados por “ND”.

De maneira global, o café é considerado uma mistura complexa por apresentar mais de 1000 compostos responsáveis pelo sabor, aroma e atividades biológicas, porém, a concentração e a biodisponibilidade destes compostos dependem de diversos fatores. Estes fatores incluem o tipo de matéria prima, práticas agrícolas utilizadas, técnicas pós-colheita, graus de torrefação, tipo de processo de torrefação, validade e condições de armazenamento, tipo de café comercial e métodos de moagem e preparação (MEJIA & RAMIREZ-MARES, 2014). Entretanto, a torrefação e o método de preparação são

considerados os principais fatores no processamento do café devido à sua forte influência na composição química da infusão (FARAH, 2012; CLARKE, 2003).

Embora a torrefação pareça ser simples, em termos de condições de processamento, a química subjacente a esta etapa é altamente complexa e não esclarecida, devido a uma série de mudanças físicas e químicas causadas nos grãos. Diversos parâmetros são utilizados para atingir um grau único de torrefação e podem variar consideravelmente dependendo do tipo de torrador, estes incluem a quantidade de grãos de café, temperatura entre 130 e 240°C, tempo de torragem e a velocidade de circulação de ar quente. Na fase inicial do processo, realizada em até 130°C, ocorrem pequenas alterações físico químicas nos grãos, tais como caramelização da sacarose, mudança de cor e a evaporação da água livre. As reações químicas exotérmicas e endotérmicas responsáveis pelo aroma e sabor do café torrado são acionadas entre 160 e 190°C. Durante este processo, os grãos castanhos claro podem se tornar pretos e aumentar de volume. Estas reações são interrompidas no ponto desejado com base na cor do grão ou tempo programado. Depois de torrados, os grãos são triturados e comercializados como café torrado moído em diferentes graus de torrefação, os quais variaram desde muito leve a muito escuro, ou utilizado na produção de café instantâneo. O método mais aceito para determinar o grau de torrefação é uma grande escala formada pela paleta de cores, baseada na progressão de desenvolvimento linear da cor obtida em condições controladas de torrefação (FARAH, 2012; CLARKE, 2003). Na Figura 3 pode ser observada a classificação do grau das torras realizada de acordo com a padronização da Associação Especialista em Café da América (SCAA; do inglês, *Specialty Coffee Association of America*) e da empresa Agtron (Agtron/SCAA, Reno, NV, 1995).

Figura 3. Classificação do grau de torrefação de acordo com o sistema Agtron/SCAA (do inglês, *Specialty Coffee Association of America*) de classificação de cor da torra.

Outra variável determinante na composição química da bebida é o método de preparo. Um aspecto comum a todos os métodos praticados é a utilização de água quente. Especialistas recomendam que a temperatura da água não possa exceder de 90-95°C, porém não é incomum que a população ferva o café na água por alguns minutos antes da filtração. Por outro lado, alguns aspectos podem variar durante o preparo do café em diferentes países e de acordo com as preferências individuais, estes incluem a proporção de café, geralmente de 8-20g, para 100mL de água; o tempo de extração e o

tamanho médio da partícula ou granulometria do café. Entre os métodos de preparo mais comuns em todo o mundo está a percolação simples, café fervido, cafeteira elétrica, máquina de café expresso, cafeteira italiana e prensa francesa. No primeiro método, o café moído é espalhado uniformemente num filtro de papel, tecido ou náilon ajustado sobre um suporte e a água quente é vertida sobre o pó em movimento circular em direção ao centro do filtro. Para o café fervido ou turco, a água é derramada sobre o café finamente triturado ou pulverizado em uma panela aquecida, quando a água começa a ferver, a mistura é vertida diretamente para xícara. A cafeteira elétrica, também conhecida como preparação por gotejamento, utiliza-se o método de percolação simples durante aproximadamente 2 minutos por meio de café, após o aquecimento da água no compartimento. No preparo do café expresso, a água e o café de granulação média são colocados em seus respectivos compartimentos, seguida da percolação da água por meio do café em aproximadamente 90°C e 9atm. Em uma máquina de café italiana, também chamada prensa italiana ou pote mocha, a água é depositada na base da chaleira onde é aquecida, percolada e conduzida continuamente sob pressão para o compartimento superior. Na prensa francesa, o café grosso moído e a água quente são misturados em um infusor especial durante alguns minutos. Em seguida, o êmbolo é pressionado para aprisionar as partículas de café no fundo do copo, e a bebida é vertida para xícara (FARAH, 2012; CLARKE, 2003).

Devido à composição complexa do café, diversas ações promovidas pela maioria dos seus compostos bioativos permanecem desconhecidas. Até o momento, os seus principais efeitos fisiológicos foram reportados apenas pelos compostos: cafeína, ácidos clorogênicos, trigonelina, alcoóis diterpênicos e melanoidinas (GODOS et al., 2014; GÓMEZ-RUIZ et al., 2007; YANAGIMOTO et al., 2004; DAGLIA et al., 2000).

Cafeína

A cafeína, também conhecida como 1,3,7-trimetilxantina, é o principal componente do café, este e seus metabólitos são detectados em biofluidos por diversas metodologias após a ingestão de café instantâneo (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2014; KUWAYAMA et al., 2013) ou pelo consumo habitual relatado no questionário de

frequência alimentar (QFA) (CORNELIS, 2015; RYBAK et al., 2015; GASSNER et al., 2014; RYBAK et al., 2014).

Entre os diversos efeitos da cafeína, os principais são a diurese e a estimulação dos sistemas cardiovascular e nervoso central (SNC) (GURLEY et al., 2015; O'KEEFE et al., 2013; PORCIÚNCULA et al., 2013; RIKSEN et al., 2011; BENOWITZ, 1990).

Estas ações ocorrem por meio do mecanismo de bloqueio não seletivo dos receptores de adenosina A₁ (A₁R ou ADORA1) e A_{2A} (A_{2A}R ou ADORA2A) acoplados à proteína G, desencadeando o acúmulo de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), mobilização do cálcio intracelular e inibição da neurotransmissão do ácido γ -aminobutírico (GABA). ADORA1 e ADORA2A podem ser encontrados nos sistemas cardiovascular, nervoso, gastrointestinal, renal e respiratório, além do tecido adiposo (GURLEY et al., 2015; O'KEEFE et al., 2013; PORCIÚNCULA et al., 2013; POPAT et al., 2011; BENOWITZ, 1990).

Após a ingestão, a cafeína é absorvida totalmente no estômago entre 30 e 40 minutos. Ao ser inserida na circulação sistêmica, a cafeína pode ligar-se à proteína albumina para ser transportada até diversos tecidos alvo, principalmente, o cérebro, fígado, rins, glândulas mamárias e placenta, onde são realizados determinados efeitos fisiológicos. O tempo de meia vida ($T_{1/2}$) da cafeína é normalmente entre 3 e 7 horas, mas alguns fatores podem tornar este tempo mais longo, tais como a gravidez, uso de contraceptivos orais, doenças hepáticas, ou curto, como tabagismo e medicamentos (MEJIA & RAMIREZ-MARES, 2014). Na Figura 4 está esquematizada a farmacocinética da cafeína.

Figura 4. Farmacocinética da cafeína (adaptado de MEJIA & RAMIREZ-MARES, 2014). O tempo de meia vida ($T_{1/2}$) da cafeína é normalmente entre 3 e 7 horas, mas alguns fatores podem tornar este tempo mais longo ($\uparrow T_{1/2}$: gravidez, contraceptivos orais, doenças hepáticas) ou curto ($\downarrow T_{1/2}$: tabagismo, medicamentos).

Quando a cafeína é ingerida em excesso, promove efeitos colaterais como dor de cabeça, náusea, ansiedade, agitação, hipertensão, broncodilatação, lipólise, hiperglicemia e hipocalcemia. Sendo que a sensibilidade é individual e depende de diversos fatores como idade, peso, sexo, dose e metabolização mediada pela enzima hepática citocromo P450 isoformas 1A2 (CYP1A2), 2A6 (CYP2A6), 2C8 (CYP2C8), 2C9 (CYP2C9), 2E1 (CYP2E1), 3A4 (CYP3A4) (PORCIÚNCULA et al., 2013; THORN et al., 2012b; TASSANEEYAKUL et al., 1994; BENOWITZ, 1990).

Entre as enzimas responsáveis pela biotransformação da cafeína, representadas na Figura 5, o principal mediador é o citocromo P450 isoforma 1A2 (CYP1A2), o qual promove 95% da metabolização primária (3-N-demetilação) da mesma. A atividade da enzima é induzida principalmente por vegetais crucíferos, medicamentos e o cigarro, enquanto os contraceptivos orais são seus principais inibidores (THORN et al., 2012a; THORN et al., 2012b; RASMUSSEN et al., 2002; TASSANEEYAKUL et al., 1994). Além disso, o CYP1A2 é importante na metabolização de drogas e compostos endógenos (BROWNING et al., 2010).

Figura 5. Biotransformação da cafeína (traduzido de Thorn et al, 2012). No esquema acima é possível observar que a cafeína (CF) é quase completamente metabolizada no fígado, aproximadamente 3% ou menos é excretado de maneira inalterada na urina. Em seres humanos, a principal via de metabolização primária da cafeína é a 3-N-desmetilação (70-80%), realizada pela enzima hepática citocromo P450 isoforma 1A2 (CYP1A2) a qual é responsável por mais de 95% do metabolismo primário, e origina o metabólito paraxantina, também conhecido como 1,7-dimetilxantina ou 17X. Os demais metabólitos primários da cafeína (teobromina, teofilina e ácido 1,3,7-trimetilúrico) são formados pelas reações 1-N-desmetilação (7-8%), 7-N-desmetilação (7-8%) e C-8-hidroxilação (15%), respectivamente. Com exceção da paraxantina, os principais metabólitos da cafeína na urina são a 1-metilxantina (1X), o ácido 1-metilúrico (1U), 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo (AFMU) e o ácido 1,7-dimetilúrico (17U). Estes metabólitos são formados pelo metabolismo secundário da paraxantina por meio das enzimas CYP1A2, CYP2A6, N-acetyltransferase 2 (NAT2), e xantina desidrogenase (XDH; também conhecido como oxidase de xantina).

Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos (AGCs) são polifenóis constituídos por ésteres de padrão complexo, formados a partir de ácidos transcinâmicos, que incluem o ácido ferúlico, ácido cafeico e, principalmente, o ácido quínico, e podem ser encontrados em diversas formas isoméricas. Estes compostos ocorrem em concentrações significativamente

elevadas em sementes de café verde e determinam a qualidade do café por meio da formação de aroma e sabor. O isômero ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) é o composto que mais contribui para o teor de polifenóis do café torrado, cerca de 2% de matéria seca, enquanto que os ácidos feruloilquínicos e dicafeoilquínicos estão presentes em menor percentagem, ou seja, menor que 0,2% (WANG & HO, 2009; VARIYAR et al., 2003; CLIFFORD, 1999).

Estes compostos são absorvidos e metabolizados no intestino delgado e no cólon por diferentes processos após a sua ingestão. No intestino delgado, 30% dos ACGs são absorvidos e sofrem ação das enzimas esterases ativas para a formação de ácidos fenólicos; enquanto os 70% restantes, ou o equivalente a dois terços, são absorvidos no cólon e metabolizados pela microflora intestinal (STALMACH et al., 2010; OLTROFF et al., 2001), a qual tem sido associada como fator principal na biodisponibilidade dos ACGs (CALANI et al., 2012; DEL RIO et al., 2010). Os diferentes metabólitos formados podem ser encontrados na urina em baixa concentração, devido à metabolização extensiva dos compostos após absorção (CANO-MARQUINA et al., 2013).

Fisiologicamente, os ACGs têm sido destacados pelas suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e antitumorais (OZGEN et al., 2006; JIN et al., 2005; KRAKAUER, 2002). Alguns compostos que também apresentam atividade antioxidante, como por exemplo, o ácido cafeico, pode desempenhar um papel importante na proteção contra doenças crônicas de base inflamatória e na prevenção da aterosclerose, por meio da inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no plasma e abaixo da superfície endotelial (NARDINI et al., 1995; LARANJINHA et al., 1994). Alguns estudos que avaliaram a capacidade antioxidante do café têm relatado que a diminuição da oxidação do LDL é dependente do aumento da concentração plasmática de glutatona (YUKAWA et al., 2004; ESPOSITO et al., 2003; NATELLA et al., 2002). A atividade antiinflamatória ocorre pela inibição da produção de mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) (KRAKAUER, 2002). ACGs podem desempenhar função antitumoral, inibindo a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), a qual é uma enzima envolvida na gênese, angiogênese e metástase do tumor hepático em seres humanos (JIN et al., 2005). Além disso, estes compostos também estão associados à redução da glicose plasmática, devido ao aumento da sensibilidade à insulina e inibição da absorção

intestinal da glicose (RODRIGUEZ DE SOTILLO et al., 2006; ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD, 2001; WELSCH et al., 1989), bem como aos efeitos anti-hipertensivos ao interagirem com o sistema renina-angiotensina, inibindo a enzima conversora de angiotensina (SUZUKI et al., 2007; ACTIS-GORETTA et al., 2006).

Trigonelina

O ácido N-metilnicotínico, mais conhecido como trigonelina, é um alcalóide derivado biologicamente da metilação enzimática do ácido nicotínico, vitamina do complexo B também conhecida como niacina. Esta molécula contribui com o amargor da bebida e é um precursor na formação de diferentes classes de compostos orgânicos voláteis durante a torrefação do café, tais como as piridinas, as quais podem conferir sabor desagradável. Após a torrefação, aproximadamente 85% da trigonelina total é transformada em ácido nicotínico (ZHOU et al., 2012; FARAH, 2012; TRUGO, 2003; FLAMENT et al., 1968).

Estudos em modelos animais demonstraram que a maioria da trigonelina ingerida é moderadamente absorvida a partir do intestino delgado, sem degradação pela microflora intestinal, e eliminada na urina em alta velocidade (ZHOU et al., 2012).

Quanto ao potencial bioativo deste composto, foram reportados seus efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes, bem como sua capacidade antioxidante (BAKURADZE et al., 2010). Diversos estudos em modelos animais e seres humanos demonstraram, em testes de tolerância à glicose oral, que a administração de trigonelina reduziu significativamente a concentração de glicose e insulina no sangue (ZHOU et al., 2013; YOSHINARI & IGARASHI, 2010; VAN DIJK et al., 2009). Outros estudos têm mostrado a redução nos níveis de colesterol e triglicerídeos em ratos diabéticos do tipo 2 após o tratamento com trigonelina, indicando que este composto pode reduzir as alterações nos níveis lipídicos ocasionados pelo diabetes (YOSHINARI & IGARASHI, 2010; YOSHINARI et al., 2009). Zhou e colaboradores (2013) observaram a capacidade antioxidante da trigonelina por meio da diminuição do conteúdo de óxido nítrico e aumento da superóxido dismutase, catalase, glutatona e da atividade da síntese do óxido nítrico induzível no pâncreas, em ratos tratados com este composto. Os resultados sugeriram que a trigonelina pode ter efeitos benéficos no pâncreas diabético e

pode exercer a sua ação antioxidante por meio da regulação de atividades das enzimas antioxidantes e diminuição da peroxidação lipídica.

Alcoóis diterpênicos

Os compostos diterpênicos, principalmente, cafestol e kahweol, ocorrem naturalmente nos grãos de café de maneira livre ou raramente, em quantidades maiores, esterificados com os ácidos palmítico e linoléico (KURZROCK & SPEER, 2001; URGERT & KATAN, 1996). A quantidade total destas moléculas no café depende da variedade, bem como do método de preparação. No café fervido ou expresso, os diterpenos estão contidos em alta quantidade, enquanto no café filtrado a maioria dos compostos fica retida no filtro de papel durante o processo (BONITA et al., 2007; NAIDOO et al., 2011; GROSS et al., 1997; URGERT & KATAN, 1996).

Ao serem ingeridos, 70% destes compostos podem ser absorvidos no intestino delgado, o que corresponde a 90% do processo, ou no cólon. Os 30% restantes são transformados em conjugados de ácido glucurônico ou sulfato durante o trânsito gastrointestinal, sendo degradados no fluido gástrico onde se tornam bioindisponíveis, e excretados na urina (DE ROOS et al., 1998).

Tem sido relatado que os diterpenos são responsáveis pelo aumento nos níveis plasmáticos de colesterol. Este efeito pode ocorrer por dois mecanismos nos receptores de LDL: redução da atividade ou envolvimento no processo de endocitose da apolipoproteína B (ApoB) e da apolipoproteína E (ApoE). Entretanto, estudos sobre o consumo de café associados à concentração de colesterol total e LDL no soro têm mostrado resultados conflitantes (GODOS et al., 2014). Por exemplo, Jee e colaboradores (2001) realizaram uma meta-análise de 14 ensaios clínicos randomizados, os quais examinaram o efeito do consumo de café sobre as concentrações de colesterol sérico. Estes autores observaram que a elevação da concentração de colesterol e LDL no soro é dependente da dose consumida de café fervido, enquanto o aumento no nível de colesterol no consumo de café filtrado foi menos pronunciado. Já van Rooij e colaboradores (1995) relataram um aumento no nível de colesterol e triglicerídeos em 36 indivíduos saudáveis após o consumo de café Arábica, mas não de café Robusta,

refletindo a diferença na quantidade de diterpenos cuja concentração é maior no café Arábica após a torra dos grãos.

Melanoidinas

As melanoidinas são definidas como polímeros azotados de alto peso molecular e coloração castanha (WANG et al., 2011; NUNES & COIMBRA, 2010). Estes compostos são produtos finais formados pela reação não enzimática entre aminoácidos e açúcares redutores durante o processo de torrefação, que ocorre naturalmente nos grãos de café, conferindo um sabor desejável a bebida (MARTINS et al., 2000). Devido a este processamento, a infusão de café é considerada como uma das principais fontes de melanoidinas na dieta humana (FOGLIANO & MORALES, 2011).

Existem dois métodos quantitativos estabelecidos para avaliar o conteúdo aproximado de melanoidinas no café. No primeiro método, que envolve a subtração da porcentagem total de compostos conhecidos a partir de 100%, o teor estimado deve representar até cerca de 29% do peso seco de grãos torrados. O segundo método baseia-se na análise da diluição e saturação de cor castanha da fermentação do café pela medição espectrofotométrica, utilizando o espectro de absorção de 405nm (BELITZ et al., 2009; GNIECHWITZ et al., 2008; NUNES & COIMBRA, 2007).

Pouco se sabe sobre a biotransformação e biodisponibilidade das melanoidinas no trânsito gástrico. Os primeiros estudos realizados sobre suas atividades biológicas têm sido muitas vezes realizados com material de alta massa molecular (HMWM; do inglês, High-Molecular-Weight Material), isolado a partir da infusão de café por ultrafiltração, após o pressuposto da presença destes compostos (SOMOZA, 2005). O HMWM foi submetido às enzimas gastrointestinais para estimulação da digestão in vitro e os resultados mostraram que a fração de baixo peso molecular foi recuperada em 14% após a digestão. Referindo-se aos resultados, estes sugerem que as melanoidinas são grandemente resistentes à digestão no trato gastrointestinal humano (MORALES et al., 2012; RUFIÁN-HENARES & MORALES, 2007).

Existe uma vasta evidência do potencial antioxidante e da atividade antiinflamatória das melanoidinas, tanto in vitro como in vivo (TAGLIAZUCCHI et al., 2010; VITAGLIONE et al., 2010; DAGLIA et al., 2008; GNIECHWITZ et al., 2008;

RUFÍÁN-HENARES & MORALES, 2007; DELGADO-ANDRADE & MORALES, 2005; DELGADO-ANDRADE et al., 2005; BORRELLI et al., 2002). Apesar de o mecanismo de ação antioxidante destes compostos ainda ser incerto, assumiu-se que ele é baseado na atividade de eliminação de radicais e/ou a sua capacidade quelante. A torrefação do café pode interferir nas propriedades antioxidantes das melanoidinas (DELGADO-ANDRADE et al., 2005; BORRELLI et al., 2002). Borrelli e colaboradores (2002) mostraram que o aumento do grau de torrefação reduziu a atividade de eliminação de radicais, mas a capacidade de impedir a peroxidação do ácido linoléico foi mais elevada nas amostras de torragem escura, enquanto Delgado-Andrade e colaboradores (2005) demonstraram que a atividade antioxidante da melanoidina isoladas a partir de café instantâneo foi menor nos grãos de torragem clara. De acordo com Richelle e colaboradores (2001), a avaliação da atividade antioxidante das melanoidinas, isoladas a partir da infusão de café, diminuiu com o grau de torrefação.

Esse conhecimento das diversas atividades fisiológicas dos compostos disponíveis do café estimulam os estudos sobre o consumo habitual de café e seus efeitos benéficos e/ou prejudiciais à saúde.

1.1.3 Café e saúde

Graças ao seu consumo elevado, como também aos potenciais efeitos promovidos na saúde, o café despertou o interesse da comunidade científica (ALVES et al., 2009). Inicialmente, a base destes estudos era unicamente a cafeína e seus efeitos fisiológicos, mas os resultados sempre apresentavam algum aspecto negativo (ALVES et al., 2009; HARTLEY et al., 2004; JAMES, 2004). Mais recentemente, novas linhas de investigação têm dado destaque a outros compostos químicos disponíveis no café, sugerindo efeitos benéficos e preventivos à saúde dos consumidores habituais desta bebida (SARRIÁ et al., 2018), tais como o melhoramento da função hepática e a diminuição do risco de doenças como Parkinson, Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e alguns tipos de câncer (JESZKA-SKOWRON et al., 2016; STELMACH et al., 2015; GUERTIN et al., 2015; HUXLEY et al., 2014; CANO-MARQUINA et al., 2013;

LIU et al., 2012; ZHOU et al., 2012; ZHANG et al., 2011; MASTERTON & HAYES, 2010; VILLANUEVA, 2009; STEEVENS et al., 2007).

Por outro lado, o café apresenta efeitos maléficos na pressão arterial (JEE et al., 1999), arritmia (KLATSKY et al., 2011), doença coronariana (SOFI et al., 2007), níveis séricos de homocisteína (GRUBBEN et al., 2000) e colesterol (STRANDHAGEN & THELLE, 2003), além aumentar o risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) (MO et al., 2018). Mo e colaboradores (2018) fizeram uma meta-análise com dezessete estudos, sendo 6 de coorte e 11 casos-controle, envolvendo 233.617 participantes e observaram o aumento no risco de IAM significativamente associado ao consumo diário de mais de três xícaras de café.

É importante ressaltar que os mecanismos moleculares dos efeitos benéficos e maléficos da ingestão de café permanecem desconhecidos, apesar dos diversos estudos epidemiológicos (CORNELIS et al., 2018). Esta falta de conhecimento destes mecanismos pode ser o reflexo de quatro fatores principais: origem e processamento do alimento consumido, alta variabilidade interindividual na metabolização dos compostos, ausência de biomarcadores de consumo e metabólitos com atividade biológica desconhecida.

A origem e o processamento dos alimentos são fatores determinantes na variabilidade e concentração de compostos disponíveis, visto que a produção em cooperativas e/ou indústrias utilizam matérias-primas de diferentes regiões geográficas, o que promove diferenças na composição nutricional a cada lote do produto. Além disso, os métodos utilizados durante o processamento são críticos na origem de compostos precursores responsáveis pelo aroma, sabor e atividades biológicas (MEJIA & RAMIREZ-MARES, 2014).

A biodisponibilidade e as atividades biológicas dos nutrientes no organismo são altamente influenciadas pela interação entre os fatores de sensibilidade, tais como genéticos, ambientais e dietéticos, e o funcionamento do aparelho digestivo, o que promove uma grande variabilidade interindividual na metabolização dos compostos (CLAUS, 2014; PRIMROSE et al., 2011; SCALBERT et al., 2009; GIBNEY et al., 2005).

A principal dificuldade na elucidação completa dos mecanismos de ação dos compostos em estudos nutricionais é a presença simultânea de uma variedade de nutrientes com diversas estruturas químicas que podem ter numerosos alvos com

diferentes afinidades e especificidades, o que pode explicar o desconhecimento das atividades biológicas da maioria dos metabólitos (GARCÍA-CAÑAS et al., 2010; GRIFFITHS & WANG, 2009; RAQIB & CRAVIOTO, 2009; DETTMER et al., 2007). Idealmente, a demonstração final sobre o papel da bioatividade de um dado constituinte alimentar deve ser obtida por meio da investigação das interações associadas às respostas metabólicas em amostras biológicas geradas durante um ensaio clínico de consumo controlado (HERRERO et al., 2012). No entanto, diversos estudos nutricionais têm-se baseado apenas no consumo habitual auto-relatado dos indivíduos como o único fator de exposição avaliado (O'KEEFE et al., 2013; FREEDMAN et al., 2012; GREENBERG et al., 2008; KLEEMOLA et al., 2000; LINDSTED et al., 1992).

Assim, são necessários novos estudos metabolômicos comparativos de diversas marcas de café para elucidar as principais diferenças nos perfis metabólicos do mesmo, além de estudos de intervenção nutricional para avaliar as respostas metabólicas interindividuais e identificar biomarcadores de consumo que aumentem a confiabilidade dos dados epidemiológicos.

1.2 Metabolômica

Devido ao desempenho analítico de alta resolução utilizado na metabolômica em métodos “ômicos” com ausência de alvos (do inglês, *untargeted*), ocorreu um aumento crescente nos últimos anos do número de estudos populacionais de intervenção alimentar, os quais abordam as relações entre dieta ou consumo de alimentos e saúde por meio da monitorização das atividades fisiológicas. Além disso, a metabolômica se tornou potencialmente aplicada na ciência e tecnologia de alimentos para a análise de qualidade, autenticidade e componentes dos alimentos (IBÁÑEZ et al., 2015).

A metabolômica é um campo de pesquisa “ômica” relativamente novo, que tem como objetivo a identificação e a quantificação relativa de metabólitos, ou seja, moléculas pequenas menores que 1500 Da (GERMAN et al., 2005). O conjunto de todos os metabólitos produzidos e/ou modificados por um organismo, que atuam em reações químicas e na conexão de diversas vias metabólicas no interior de uma célula viva é definido como metaboloma (VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006).

Tal como acontece em muitas áreas "ômicas", existem diversas tecnologias utilizadas para a análise do metaboloma, tais como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massa (EM), cada qual com suas próprias vantagens e desvantagens (DUNN et al., 2005; WISHART, 2008). Dentre elas, a EM é a mais utilizada devido à sua seletividade e alta sensibilidade na análise rápida dos metabólitos, desempenhando então um papel importante no desenvolvimento de métodos para a criação de perfis de metabólitos, sendo recomendada também para caracterização de compostos desconhecidos. Esta técnica é geralmente aplicada para a determinação de metabólitos a partir de sua razão massa carga e seu perfil de fragmentação (LEI et al., 2011; SCALBERT et al., 2009).

Em estudos metabolômicos de invenção alimentar, a EM está sendo altamente utilizada em combinação com outras técnicas de separação, tais como cromatografia líquida e cromatografia gasosa, para ampliar a sua capacidade de análise química em amostras biológicas complexas (LEI et al., 2011; SCALBERT et al., 2009).

Na técnica por cromatografia líquida (CL), a amostra é introduzida na fase móvel, normalmente um solvente tamponado, é impulsionada para a fase estacionária, ou coluna de separação, onde os compostos são então separados em função da sua afinidade pelas partículas revestidas na coluna, e o eluente direcionado ao EM. Com a CL é possível separar, identificar e quantificar os diferentes grupos de metabólitos com alta sensibilidade e boa resolução cromatográfica, porém algumas vezes às amostras precisam ser dessalinizadas após separação cromatográfica e o potencial de identificação é limitado sem o uso de EM em série (EM/EM) (LEI et al., 2011). As bibliotecas para identificação de metabólitos são recentes e dependentes da coluna e da fase móvel.

A cromatografia gasosa (CG) é uma ferramenta frequentemente utilizada para análises de misturas metabólicas complexas em consequência da separação cromatográfica de alta eficiência com tempos de retenção reprodutíveis em compostos voláteis e termicamente estáveis. Graças à reprodutibilidade nos tempos de retenção associada ao padrão de fragmentação dos compostos, houve a formação de bibliotecas metabólicas disponíveis gratuitamente, tais como a *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e *Golm Metabolome Database*, ou ainda bibliotecas comerciais como a *Agilent Fiehn GC-MS Metabolomics RTL*, que possibilitam a perfilagem automática de vários espectros simultaneamente, trazendo uma grande vantagem para a

utilização da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (LEI et al., 2011).

Desta forma, a metabolômica por CG-EM pode colaborar com a identificação das diferenças do perfil metabolômico de diversas marcas de café, bem como ajudar a esclarecer os benefícios ou prejuízos da ingestão desta bebida para a saúde cardiovascular. Um estudo metabolômico do soro e da urina de indivíduos submetidos a uma intervenção nutricional pode fornecer ainda possíveis biomarcadores de consumo de café e informações sobre a metabolização interindividual de seus compostos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo identificar as alterações no perfil metabolômico de diferentes indivíduos saudáveis após o consumo controlado de café.

2.1.1 Objetivos específicos

- I. Identificar e quantificar os metabólitos antes e após a ingestão controlada de café em amostras de soro de diferentes indivíduos saudáveis.
- II. Identificar variações no perfil metabolômico de diversos compostos específicos do café durante 24 horas.
- III. Identificar possíveis biomarcadores da ingestão de café durante 24 horas.
- IV. Identificar variações no perfil metabolômico originadas após o consumo controlado de café durante 24 horas.
- V. Determinar as diferenças nos perfis metabolômicos de diferentes marcas de café.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas afiliado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC/FMUSP), após aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAAE: 59611116.7.0000.0065).

Neste trabalho foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos do sexo masculino, as quais foram coletadas no Laboratório de Avaliação Nutricional/Ambulatório de Atendimento Nutricional da Universidade de Alfenas – Minas Gerais, bem como as informações pertencentes a este banco de dados. O projeto responsável pela coleta das amostras intitula-se “Pesquisa da variabilidade interindividual do consumo de café, de chocolate e de castanha-do-brasil” e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais (UNIFAL-MG) (protocolo N° 005/2012).

3.1 Amostragem

3.1.1 Estudo de intervenção nutricional

Recrutamento

Após a divulgação do projeto via e-mail e panfletos, os homens que se voluntariaram ao estudo foram submetidos ao questionário de triagem no ambulatório de atendimento dietoterápico da Faculdade de Nutrição da UNIFAL-MG, apenas os voluntários que atenderam os critérios de inclusão (idade entre 20 e 25 anos, índice de massa corpórea (IMC) entre 18,5 e 25 kg/m²) e exclusão (tabagismo, consumo de álcool e substâncias psicotrópicas, alergia ao alimento teste, portador de alguma enfermidade, uso de medicamentos e/ou suplemento de vitaminas) foram selecionados.

Antes do início do projeto, os voluntários receberam uma explicação detalhada sobre o protocolo do estudo, e os que estavam de acordo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participarem da pesquisa.

Após a triagem e o aceite do TCLE, foram selecionados 53 indivíduos, os quais foram submetidos à avaliação nutricional, antropométrica (peso, altura, bioimpedância, circunferência de cintura e quadril) e dietética (questionário de frequência alimentar - QFA, recordatório de 24 horas). Neste estudo, foram selecionados 35 indivíduos, a partir dos 53 sujeitos previamente selecionados, com idade média de 20 ± 2 anos e IMC médio de $21,97 \pm 2,21$ para a formação dos grupos café (30 participantes) e controle (5 participantes).

Execução experimental

Devido aos alimentos apresentarem compostos comuns aos que estão sendo analisados no café, tais como a cafeína e os ácidos clorogênicos, os voluntários foram orientados a evitar o consumo de alimentos ricos em polifenóis nas 36 horas anteriores do início do estudo até o seu término. Frutas, verduras, leguminosas, ovos, chocolate, castanhas e bebidas ricas em polifenóis (refrigerantes, café, suco natural de frutas, chás, chocolate) foram excluídas da dieta. Além disso, os participantes também foram orientados a fazer jejum das 20 horas do dia anterior até as 7:30 horas do dia seguinte, horário da primeira coleta. Não houve restrição do consumo de água neste período.

No dia do estudo, os 30 participantes do grupo café consumiram 150 mL de café tipo exportação (100% Arábica) dentro de 5 minutos após o preparo. Considerando que a quantidade de açúcar (99,8% sacarose) ou adoçante consumida por meio do alimento não exerce influência sob a metabolização dos compostos do café, as bebidas foram adoçadas a gosto. O café foi preparado para cada participante pelo método de infusão seguida de filtração, adicionando 150 mL de água fervida e filtrada em um sachê de 6,8g do Café Gourmet Prima Qualitá®. No grupo controle, os 5 voluntários consumiram 150 mL de água filtrada em um intervalo de 5 minutos.

Para averiguar o perfil de metabolização intraindividual do café, foram estabelecidos quatro tempos representativos do ciclo circadiano para as coletas das amostras de sangue dos voluntários: 0 (jejum) e 6, 12 e 24 horas após consumo do café.

As amostras de sangue (8mL) foram coletadas por uma enfermeira a partir do braço dos voluntários por via intravenosa. As coletas foram realizadas com tubo seco da marca VACUETTE®, seguida de centrifugação (10 minutos, 3000xg a 4°C) para separação do soro.

Após a centrifugação, as amostras de soro foram aliquotadas e armazenadas à -80°C para posterior análise. As amostras foram devidamente transportadas de Alfenas a São Paulo em gelo seco, armazenadas a -80°C no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor) até o momento das análises.

3.1.2 Estudo comparativo de diversas marcas de café

Seleção de amostras

Objetivando determinar as diferenças no perfil metabólico anterior à ingestão do café, foram selecionadas diferentes marcas de dois tipos cafés (tradicional e expresso), representados no Quadro 1.

Para o grupo tradicional foram selecionadas amostras de cafés torrados e moídos das três principais marcas de café tradicional comercializadas no Estado de São Paulo, de acordo com informações fornecidas pelo Sindicato da Indústria de Café do Estado de São Paulo (Sindicafé-SP). Em adição, também foi selecionada a principal marca de café tipo exportação comercializada em grãos torrados e moídos, devido à sua qualidade ser considerada melhor em relação ao café tradicional comum. Já o grupo expresso, é formado pelas três principais marcas de café expresso de mesma torra e intensidade (baseada no aroma) e comercializadas em cápsulas. Todas as amostras dos cafés foram adquiridas no mercado local.

Quadro 1. Marcas de cafés utilizadas para os grupos tradicional e expresso.

Grupo Tradicional Torragem média	Grupo Expresso Torragem escura – Intensidade 9
Café Pilão Composição: <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i> Lote: L12:16 1J	Café Intenso Arpeggio NESPRESSO Composição: <i>Coffea arabica</i> Lote: 5119378602 02:10 3
Café Melitta Composição: <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i> Lote: A156TR3 15:48	Café Espresso Barista NESCAFÉ - DOLCE GUSTO Composição: <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i> Lote: 508002896 09:30 – Spain
Café 3 Corações Composição: <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i> Lote: L57MG7 03:47	Café L'OR Espresso Forza CAFÉ DO PONTO Composição: <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i> Lote: L1 15J09:47
Café Prima Qualitá Mister Tipo exportação Composição: 100% <i>Coffea arabica</i> Lote: 290	

Preparação das bebidas

Os cafés foram mantidos em temperatura ambiente, acondicionados em suas embalagens originais a vácuo até o momento da preparação.

O preparo dos cafés tradicionais foi feito por percolação simples, seguindo a mesma proporção da receita padrão fornecida pelos fabricantes (quatro colheres de sopa ou 80g de pó de café para um litro de água). Uma amostra de 20g de café em pó foi pesada em balança analítica e transferida para o filtro de papel (Melitta Original - Aroma Max N°103, Lote 103/3 M3 15:06; Melitta) em coador de plástico (Melitta N°103; Melitta). Ao pó, foi adicionado lentamente 250mL de água filtrada (Purificador

Europa Summer Line Plus HF Inox; Europa) a 85°C, sendo o extrato recolhido em garrafa de vidro.

Já o preparo dos cafés expressos foi conduzido segundo as recomendações de cada fabricante utilizando uma cápsula de café, água filtrada (Purificador Europa Summer Line Plus HF Inox; Europa) e máquina de café adequada, representada no Quadro 2.

Quadro 2. Caracterização do preparo do café expresso.

Máquina de café	Pressão (Pa)	Temperatura (°C)	Cápsula compatível	Peso da amostra por cápsula (g)	Volume da bebida (mL)
Cafeteira Expresso Arno Dolce Gusto Modelo: Melody 3 - Vermelha	1470000	45	Café Espresso Barista	7,5	35
Cafeteira Expresso Nespresso Modelo: Essenza Manual C92 - Ardósia	1862000	45	Café Intenso Arpeggio Café L'OR Espresso Forza	5,0 5,2	40 40

3.2 Análises metabolômicas

Devido às vantagens apresentadas pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), anteriormente citadas, esta técnica foi escolhida para análise das amostras neste estudo.

A CG-EM é uma das principais técnicas utilizadas atualmente em estudos metabolômicos, a qual permite a identificação de metabólitos polares e polares médios voláteis. Como a maioria dos metabólitos não são altamente voláteis, é necessária uma

preparação prévia, como a derivação, para a redução do ponto de ebulição desses compostos. No processo de derivação, os grupos funcionais hidrofílicos perdem ligações de hidrogênio, as quais são substituídas por um agrupamento de tetrametilsilano, e com isso tornam-se mais voláteis, além de resultarem em uma separação cromatográfica mais eficiente, pois há uma redução da interação dos compostos com a coluna (LEI et al. 2011; FIEHN et al., 2000).

Os métodos de ionização mais empregados em CG-EM são a ionização química (CI- do inglês, *Chemical Ionization*) e a ionização por impacto de elétrons (EI- do inglês, *Electron Ionization*). Em análises metabolômicas o processo de ionização por EI é o mais utilizado, sendo também o método utilizado neste estudo.

Na EI os compostos da amostra, em fase gasosa, sofrem ação de um feixe de elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). A colisão entre elétrons e moléculas leva a ionização dos compostos através da remoção de um elétron ($M^{+\bullet}$). Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera fragmentação dos analitos. O excesso de energia transmitida para amostra leva a uma fragmentação significativa de íons moleculares, e o padrão de fragmentação de cada composto é reproduzível (PAVIA et al., 2010), o que facilita a identificação dos metabólitos por bibliotecas de compostos existentes.

As análises metabolômicas deste trabalho ocorreram em duas etapas, sendo a primeira para a análise das marcas de café. Já na segunda etapa, foram analisadas as amostras de soro dos indivíduos do grupo café e do grupo controle.

3.2.1 Padrão interno

Para a melhor identificação dos metabólitos obtidos pela técnica de CG-EM, foi utilizado o padrão interno ácido D27-mirístico (Produto #366889; Sigma-Aldrich) em associação com os marcadores FAMES (do inglês, *Fatty Acid Methyl Esters*) (FAME Mix, C4-C24 - Produto #18919-AMP; Sigma- Aldrich).

O padrão interno foi preparado todos os dias em solução de concentração 3mg/mL, diluído em uma mistura de água deionizada (Milli Q), metanol (Produto #14262; Fluka-Analytical) e isopropanol (Produto #34965; Fluka-Analytical) (2:5:2 v/v/v). No método de análise das amostras foi fixado o tempo de retenção (RT- do

inglês, *Retention Time*) do ácido D27-mirístico que corresponde a 16,752 minutos. Este procedimento é chamado RTL (do inglês, *Retention Time Locking*) cuja utilização ajusta a variação do tempo de retenção dos componentes da amostra, possibilitando maior especificidade na identificação de metabólitos derivados em amostras biológicas e empregado também para identificação pela biblioteca de metabólitos *Agilent Fiehn 2013*.

Antes do processo de derivação das amostras, foram adicionados 5µL dos marcadores FAMEs, diluído em clorofórmio na concentração de 5mg/mL. Estes marcadores são utilizados para garantir que o índice de retenção dos compostos esteja correto. O tempo de retenção e o índice de retenção são partes muito importantes na análise. Estas medidas são usadas em combinação com os espectros EI para identificar um metabólito (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

3.2.2 Extração de metabólitos

Estudo de intervenção nutricional

Antes do preparo para análise metabolômica, as amostras de soro foram descongeladas a 4°C durante 40-60 minutos e homogeneizadas. A cada 70µL da alíquota de soro separados em tubos de baixa retenção (LOW BINDING TUBES - Produto 72.706.600; Sarstedt), foram adicionados 5µL do padrão interno D27-ácido mirístico. Para a desproteinização das amostras, foram adicionados 300µL de uma solução de acetonitrila (Produto #34967; Fluka-Analytical), isopropanol (Produto #34965; Fluka-Analytical) e água deionizada (Milli Q) (3:3:2 v/v/v) seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação (15 minutos, 15800xg e 4°C). Em seguida, 320µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de baixa retenção e liofilizados por 18 horas no Speedvac (Savant Instruments Inc., SDC-100-H, Farmingdale, NY).

Estudo comparativo de diversas marcas de café

Após o resfriamento das bebidas durante 15 minutos em temperatura ambiente, estas foram homogeneizadas e cinco amostras de 100µL, de cada marca, foram

separadas em tubos de baixa retenção (LOW BINDING TUBES - Produto 72.706.600; Sarstedt), totalizando vinte amostras para o grupo tradicional e quinze amostras para o grupo expresso. A cada alíquota do extrato foram adicionados 900µL de uma solução de acetonitrila (Produto #34967; Fluka-Analytical), isopropanol (Produto #34965; Fluka-Analytical) e água deionizada (Milli Q) (3:3:2 v/v/v) seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação (15 minutos, 15800xg e 4°C) para desproteinização. O processo de desproteinização é necessário devido os compostos com peso molecular elevado (proteínas) prejudicarem a identificação e quantificação de moléculas menores (metabólitos). Os 950µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de baixa retenção e liofilizados por 18 horas no speedvac (Savant Instruments Inc., SDC-100-H, Farmingdale, NY) para a secagem completa do conteúdo, pois a presença de água interfere na reação de derivação que é posteriormente realizada.

Amostras branco e controle de qualidade

Amostras branco foram utilizadas para verificar a existência de impurezas em reagentes e a contaminação do equipamento. Estas amostras foram preparadas da mesma maneira que as que as amostras de soro do estudo, com a substituição da alíquota de soro, por água deionizada.

Com o objetivo de checar a sensibilidade, tendência do sistema de injeção, estabilidade, reprodutibilidade e calibração do equipamento em todas as aquisições de dados, foram utilizadas amostras de controle de qualidade (QC). Para isto, uma amostra QC (preparada para cada uma das matrizes biológicas, a qual consiste da mistura de todas as amostras de cada matriz) foi analisada diariamente antes de todas as amostras do estudo. Estas amostras foram preparadas conjuntamente, e exatamente da mesma maneira que as demais amostras do estudo.

Após liofilização, todas as amostras foram mantidas à 4°C em dissecador até as análises, as quais poderiam ser utilizadas em até 12 semanas.

3.2.3 Derivação química

Nas análises metabolômicas por CG-EM, é necessário que os compostos sejam voláteis e estáveis a altas temperaturas. Amostras utilizadas em análises metabolômicas, geralmente são formadas por mistura de vários compostos químicos e, portanto, nem todas apresentam tais características. Para que estas condições sejam alcançadas, as amostras precisam passar por um processo de derivação química. Este processo consiste de duas reações: metoxiaminação e trimetilsililação.

A metoxiaminação é uma medida de precaução para a quantificação dos compostos, em que ocorre a proteção de cetonas e aldeídos, evitando assim a perda de grupos carboxila e favorecendo a identificação de compostos por estes tornarem-se mais estáveis. Neste processo, o resíduo seco foi ressuspenso em 50µL da solução de metoxiamina (40mg/mL) (Produto #226904; Sigma-Aldrich) diluída em piridina (Produto #270407; Sigma-Aldrich), seguida pela agitação de 2 minutos e incubação por 16 horas a 650rpm e 25°C.

Na reação de trimetilsililação, ocorre a troca de prótons ácidos que promovem a redução drástica do ponto de ebulição dos metabólitos, melhorando sua estabilidade térmica e separação cromatográfica. Esta reação ocorreu durante 1 hora em agitação (650rpm) a 25°C, com a adição de 100µL de MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamine - Produto #69479; Sigma- Aldrich) contendo 1% de TMCS (Trimethylchlorosilane - Produto #89595-KC; Sigma- Aldrich).

Após a finalização das reações, as amostras foram submetidas novamente a centrifugação (30 minutos, 15800xg e 22°C) e 120µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo insert com mola em frascos pequenos (vials) adequados ao equipamento CG-EM. Lembrando que estas amostras derivadas são sempre utilizadas no prazo máximo de 24 horas nas análises posteriores ao término do processo de derivação.

Neste processo, todas as amostras foram derivadas de maneira aleatória.

3.2.4 Análises em CG-EM

Para a obtenção de maior confiabilidade na quantificação relativa, todas as amostras do estudo foram analisadas em três replicatas técnicas randomizadas, o qual utilizou o programa RANDOM.ORG (www.random.org) na realização deste processo.

O equipamento CG-EM Agilent (7890B GC; 5977A MS) foi utilizado na realização das análises. O método de análise consistiu da injeção de 1 µL do derivado no sistema GC Agilent 7890B operando no modo *splitless*, ou seja, sem divisão de amostra. A coluna DB5-MS + 10m Duragard capillary (Agilent 122-5532G), por onde o gás hélio fluí em uma pressão de 0,81 mL min⁻¹, foi utilizada para a separação dos metabólitos. A temperatura do injetor foi fixada em 250 °C e a temperatura da coluna em 60 °C durante 1 min e então elevada a 320 °C em uma velocidade de 10 °C /min. O eluente da coluna é automaticamente transferido para o EM (Agilent 5977A) com o detector operando no modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV). O espectro de massa foi registrado após o atraso de 6,5 min do solvente. A temperatura do EM quadrupolo foi fixada em 180 °C e a fonte de íons em 280 °C.

3.2.5 Processamento de dados, identificação e quantificação relativa dos metabólitos

O software *Unknowns – Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis* (version B.07.00) identificou e determinou os compostos por meio da comparação entre a fragmentação do espectro de massas e o tempo de retenção utilizando as bibliotecas *Agilent Fiehn 2013* e *National Institute of Standards and Technology 2014* (NIST 14).

Os valores de cada metabólito foram obtidos por meio da quantificação relativa da área sobre a curva dos picos.

3.2.6 Seleção dos metabólitos

Estudo de intervenção nutricional

Para aumentar a confiabilidade dos conjuntos de dados analisados nas amostras de soro, foi realizada uma seleção de metabólitos em cada tempo de coleta por meio de três fases (Figura 6). Na primeira fase, foram selecionados os metabólitos presentes em pelo menos duas das três replicatas técnicas e, na segunda fase, os que estavam presentes em pelo menos 10% da população, ou seja, em pelo menos 3 dos indivíduos totais avaliados da junção entre o grupo café e controle. Após a exclusão dos contaminantes, foram obtidos os valores das médias das replicatas técnicas de cada metabólito selecionado em cada tempo enquanto os valores ausentes foram considerados como NA (do inglês, *Non-Available*). Estes valores das médias e NA foram utilizados nas análises posteriores.

Processo de seleção dos metabólitos de alta confiabilidade

Fase 1:

Exclusão dos metabólitos que não estão presentes em pelo menos duas das três replicatas técnicas.

TEMPO 0

INDIVÍDUOS	METABÓLITOS					
	Arachidonic acid	Creatinine	DL-Ornithine	Gluconic acid	Uric acid 1	Xylitol
01	3	3	1	1	2	1
02	2	2	1	3	3	3
03	1	2	0	3	1	2
04	2	3	1	0	2	1
05	3	2	1	1	2	1
06	2	2	1	1	2	2
07	2	3	1	1	1	1
08	2	2	1	1	1	1
09	2	2	1	1	2	1
10	2	3	1	0	1	1
11	2	2	1	1	1	0
12	2	2	1	1	2	1
13	2	3	1	1	1	1
14	2	3	1	1	1	1
15	2	3	1	1	3	1
16	2	3	1	1	2	1
17	1	2	1	1	1	1
18	1	2	1	1	1	1
19	1	2	1	1	2	1
20	2	2	1	1	1	1
21	2	3	1	1	2	1
22	1	3	1	0	1	1
23	2	3	1	1	2	1
24	2	2	1	1	2	1
25	3	3	1	1	1	1
26	1	1	1	0	2	0
27	2	3	1	1	3	0
28	1	2	0	0	3	1
29	2	1	0	0	2	1
30	1	1	0	0	1	1
PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS	22 ✓	27 ✓	0 X	2 ✓	17 ✓	3 ✓

TEMPO 6

INDIVÍDUOS	METABÓLITOS					
	Arachidonic acid	Creatinine	DL-Ornithine	Gluconic acid	Uric acid 1	Xylitol
01	3	3	1	1	2	1
02	2	2	1	1	3	0
03	1	2	0	1	1	2
04	2	3	1	0	2	1
05	3	2	1	1	2	1
06	2	2	1	1	2	2
07	2	3	1	1	1	1
08	2	2	1	1	1	1
09	2	2	1	1	2	1
10	2	3	1	0	1	1
11	2	2	1	1	1	0
12	2	2	1	1	2	1
13	2	3	1	1	1	1
14	2	3	1	1	1	1
15	2	3	1	1	3	1
16	2	3	1	1	2	1
17	1	2	1	1	1	1
18	1	2	1	1	1	1
19	1	2	1	1	2	1
20	2	2	1	1	2	1
21	2	3	1	1	2	1
22	1	3	1	0	1	1
23	2	3	1	1	2	1
24	2	2	1	1	2	1
25	3	3	1	1	1	1
26	1	1	1	0	2	0
27	2	3	1	1	3	0
28	1	2	0	0	3	1
29	2	1	0	0	2	1
30	1	1	0	0	1	1
31	2	0	2	1	2	1
32	3	2	1	1	3	1
PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS	24 ✓	28 ✓	1 ✓	0 X	20 ✓	2 ✓

TEMPO 12

INDIVÍDUOS	METABÓLITOS					
	Arachidonic acid	Creatinine	DL-Ornithine	Gluconic acid	Uric acid 1	Xylitol
01	1	1	1	2	1	2
02	1	0	0	3	1	3
03	1	3	2	1	1	2
04	1	1	0	1	3	2
05	1	2	2	2	3	2
06	0	1	0	2	1	2
07	0	0	0	2	3	2
08	1	0	0	3	2	2
09	1	0	2	3	1	2
10	1	0	3	1	2	1
11	1	0	2	1	1	3
12	1	0	2	1	1	2
13	1	0	3	1	1	3
14	1	0	3	0	1	3
15	1	0	3	1	1	3
16	1	1	3	1	1	2
17	1	1	2	1	1	2
18	1	0	2	1	1	1
19	1	1	1	2	1	2
20	1	0	2	1	1	3
21	1	0	0	1	1	2
22	1	1	3	3	0	2
23	2	1	2	1	1	2
24	1	1	2	1	1	2
25	0	1	1	3	1	2
26	1	1	0	1	1	2
27	1	1	1	2	1	3
28	1	1	2	1	1	2
29	1	1	0	1	1	3
30	1	1	2	1	1	1
31	1	0	1	1	1	2
32	1	0	1	2	1	2
33	1	0	1	1	1	3
34	1	0	1	3	2	3
PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS	1 ✓	2 ✓	18 ✓	13 ✓	6 ✓	31 ✓

TEMPO 24

INDIVÍDUOS	METABÓLITOS					
	Arachidonic acid	Creatinine	DL-Ornithine	Gluconic acid	Uric acid 1	Xylitol
01	1	0	2	1	2	0
02	0	0	3	1	3	1
03	1	1	2	1	2	1
04	0	0	1	3	2	1
05	1	1	1	1	2	1
06	2	0	1	1	2	1
07	0	1	1	1	2	1
08	1	0	1	1	2	1
09	1	1	1	3	2	1
10	1	1	1	1	3	1
11	1	2	2	1	2	0
12	1	1	1	1	2	1
13	0	1	2	1	2	1
14	0	1	1	1	2	1
15	0	1	3	1	3	1
16	0	1	3	1	2	1
17	0	1	3	1	2	1
18	0	1	1	1	3	0
19	1	0	2	1	2	1
20	0	2	1	1	2	1
21	0	0	2	1	2	1
22	0	0	1	3	2	1
23	2	0	3	1	2	1
24	0	1	1	1	2	1
25	0	0	1	1	1	1
26	1	1	1	1	2	1
27	1	1	1	1	3	1
28	1	1	1	1	2	1
29	3	1	1	1	3	1
30	3	1	1	1	1	1
PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS	4 ✓	2 ✓	11 ✓	3 ✓	28 ✓	0 X

Fase 2:

Exclusão dos metabólitos que não estão presentes em pelo menos 10% dos indivíduos totais avaliados em cada tempo.

TEMPO 0

INDIVÍDUOS	METABÓLITOS				
	Arachidonic acid	Creatinine	Gluconic acid	Uric acid 1	Xylitol
01	3	3	1	2	1
02	2	2	3	3	3
03	1	2	3	1	2
04	2	3	0	2	1
05	3	2	1	2	1
06	2	2	1	2	2
07	2	3	1	1	1
08	2	2	1	1	1
09	2	2	1	2	1
10	2	3	0	1	1
11	2	2	1	1	0
12	2	2	1	2	1
13	2	3	1	1	1
14	2	3	1	1	1
15	2	3	1	3	1
16	2	3	1	2	1
17	1	2	1	1	1
18	1	2	1	1	1
19	1	2	1	2	1
20	2	2	1	1	1
21	2	3	1	2	1
22	1	3	0	1	1
23	2	3	1	2	1
24	2	2	1	2	1
25	3	3	1	1	1
26	1	1	0	2	0
27	2	3	1	3	0
28	1	2	0	3	1
29	2	1	0	2	1
30	1	1	0	1	1
PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS	22 ✓	27 ✓	2 X	17 ✓	3 ✓

TEMPO 6

INDIVÍDUOS	METABÓLITOS				
	Arachidonic acid	Creatinine	DL-Ornithine	Uric acid 1	Xylitol
01	3	3	1	2	1
02	2	2	1	3	0
03	1	2	0	1	2
04	2	3	1	2	1
05	3	2	1	2	1
06	2	2	1	2	2
07	2	3	1	1	1
08	2	2	1	1	1
09	2	2	1	2	1
10	2	3	1	1	1
11	2	2	1	1	0
12	2	2	1	2	1
13	2	3	1	1	1
14	2	3	1	1	1
15	2	3	1	3	1
16	2	3	1	2	1
17	1	2	1	1	1
18	1	2	1	1	1
19	1	2	1	2	1
20	2	2	1	2	1
21	2	3	1	2	1
22	1	3	1	1	1
23	2	3	1	2	1
24	2	2	1	2	1
25	3	3	1	1	1
26	1	1	1	2	0
27	2	3	1	3	0
28	1	2	0	3	1
29	2	1	0	2	1
30	1	1	0	1	1
31	2	0	2	2	1
32	3	2	1	3	1
PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS	24 ✓	28 ✓	1 X	20 ✓	2 X

TEMPO 12

INDIVÍDUOS	METABÓLITOS					
	Arachidonic acid	Creatinine	DL-Ornithine	Gluconic acid	Uric acid 1	Xylitol
01	1	1	1	2	1	2
02	1	0	0	3	1	3
03	1	3	2	1	1	2
04	1	1	0	1	3	2
05	1	2	2	2	3	2
06	0	1	0	2	1	2
07	0	0	0	2	3	2
08	1	0	0	3	2	2
09	1	0	2	3	1	2
10	1	0	3	1	2	1
11	1	0	2	1	1	3
12	1	0	2	1	1	2
13	1	0	3	1	1	3
14	1	0	3	0	1	3
15	1	0	3	1	1	3
16	1	1	3	1	1	2
17	1	1	2	1	1	2
18	1	0	2	1	1	1
19	1	1	1	2	1	2
20	1	0	2	1	1	3
21	1	0	0	1	1	2
22	1	1	3	3	0	2
23	2	1	2	1	1	2
24	1	1	2	1	1	2
25	0	1	1	3	1	2
26	1	1	0	1	1	2
27	1	1	1	2	1	3
28	1	1	2	1	1	2
29	1	1	0	1	1	3
30	1	1	2	1	1	1
31	1	0	1	1	1	2
32	1	0	1	2	1	2
33	1	0	1	1	1	3
34	1	0	1	3	2	3
PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS	1 X	2 X	18 ✓	13 ✓	6 ✓	31 ✓

TEMPO 24

INDIVÍDUOS	METABÓLITOS				
	Arachidonic acid	Creatinine	DL-Ornithine	Gluconic acid	Uric acid 1
01	1	0	2	1	2
02	0	0	3	1	3
03	1	1	2	1	2
04	0	0	1	3	2
05	1	1	1	1	2
06	2	0	1	1	2
07	0	1	1	1	2
08	1	0	1	1	2
09	1	1	1	3	2
10	1	1	1	1	3
11	1	2	2	1	2
12	1	1	1	1	2
13	0	1	2	1	2
14	0	1	1	1	2
15	0	1	3	1	3
16	0	1	3	1	2
17	0	1	3	1	2
18	0	1	1	1	3
19	1	0	2	1	2
20	0	2	1	1	2
21	0	0	2	1	2
22	0	0	1	3	2
23	2	0	3	1	2
24	0	1	1	1	2
25	0	0	1	1	1
26	1	1	1	1	2
27	1	1	1	1	3
28	1	1	1	1	2
29	3	1	1	1	3
30	3	1	1	1	1
PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS	4 ✓	2 X	11 ✓	3 ✓	28 ✓

Número de indivíduos totais em cada tempo:

Grupo	Tempo			
	0	6	12	24
Café	25	27	29	25
Controle	5	5	5	5
Total	30	32	34	30

Fase 3:

Exclusão dos contaminantes e aplicação do cálculo da média para os valores das replicatas técnicas de cada metabólito selecionado em cada tempo.

Replicatas técnicas

Legenda: ✓ Selecionado ✗ Excluído ● Presente ● Ausente

Figura 6. Processo de seleção dos metabólitos de alta confiabilidade no soro. O processo foi aplicado para cada tempo de coleta (0, 6, 12, 24 horas) utilizando os indivíduos do grupo café (tempos 0 e 24 = 25 indivíduos, tempo 6 = 27 indivíduos, tempo 12 = 29 indivíduos) e grupo controle (tempos 0, 6, 12 e 24 = 5 indivíduos). Na primeira fase, foram excluídos os metabólitos que não estavam presentes em pelo menos 2 das 3 replicatas técnicas. Os metabólitos selecionados na primeira fase foram submetidos à segunda fase, na qual foram excluídos os metabólitos que não estavam presentes em pelo menos 10% do total da população avaliada, ou seja, presentes em pelo menos 3 indivíduos. Após a seleção nas fases anteriores e a exclusão de contaminantes, os valores da área sobre a curva (ASC) de cada metabólito selecionado em cada um dos quatro tempos foram submetidos ao cálculo da média. Este cálculo variou de acordo com o número da presença nas replicatas técnicas: em caso da presença nas 3 replicatas, foram usados os valores da ASC das 3 replicatas técnicas no cálculo; na presença de 2 replicatas, o cálculo utilizava apenas os valores da ASC das 2 replicatas técnicas; e na presença de 1 replicata técnica, foi utilizado o valor da ASC da mesma. Para os indivíduos que apresentaram ausência nas 3 replicatas técnicas do metabólito selecionado, foram considerados como NA.

Estes conjuntos de dados foram armazenados em forma de tabela para cada tempo (0, 6, 12 e 24 horas), com um indivíduo por linha e um metabólito selecionado

por coluna, que corresponde a cada variável. As tabelas continham os valores das médias das replicatas técnicas ou NA de cada indivíduo por metabólito.

Estudo comparativo de diversas marcas de café

A seleção de metabólitos foi realizada nos conjuntos de dados das marcas de café em três fases (Figura 7). Com o intuito de aumentar a confiabilidade, foram selecionados os metabólitos presentes em pelo menos duas das três replicatas técnicas na primeira fase. E, na segunda fase, os que estavam presentes em pelo menos 80% das amostras, ou seja, em pelo menos quatro das cinco replicatas biológicas, em uma das marcas de café do grupo tradicional ou expresso. Os valores das médias das replicatas técnicas de cada metabólito de cada marca foram usadas nas análises posteriores. Os valores ausentes foram considerados como NA.

Processo de seleção dos metabólitos de alta confiabilidade

Fase 1:

Exclusão dos metabólitos que não estão presentes em pelo menos duas das três replicatas técnicas.

CAFÉ PILÃO

METABÓLITOS	AMOSTRAS					PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS
	1	2	3	4	5	
2,3-Butanediol	0	1	1	1	3	1 ✓
2-Ketovaleric acid	1	1	1	1	1	0 ✗
3-O-Coumaroylquinic acid	2	2	3	3	2	5 ✓
4-O-Coumaroylquinic acid	3	1	0	1	3	2 ✓
5-O-Feruloylquinic acid	1	3	2	2	2	4 ✓
Arabinofuranose	1	3	2	1	3	3 ✓
Caffeic acid	2	3	2	1	3	4 ✓
Caffeine	3	1	3	3	3	4 ✓
Mannobiose	0	0	0	0	1	0 ✗
Quinic acid	2	0	3	2	2	4 ✓

CAFÉ MELITTA

METABÓLITOS	AMOSTRAS					PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS
	1	2	3	4	5	
2,3-Butanediol	2	1	1	1	2	2 ✓
2-Ketovaleric acid	1	1	1	1	2	1 ✓
3-O-Coumaroylquinic acid	3	3	3	3	3	5 ✓
4-O-Coumaroylquinic acid	1	1	1	3	3	2 ✓
5-O-Feruloylquinic acid	2	2	2	2	2	5 ✓
Arabinofuranose	1	3	2	1	3	3 ✓
Caffeic acid	2	3	2	1	3	4 ✓
Caffeine	3	2	2	3	3	5 ✓
Mannobiose	1	1	1	1	1	0 X
Quinic acid	2	0	3	2	2	4 ✓

CAFÉ 3 CORAÇÕES

METABÓLITOS	AMOSTRAS					PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS
	1	2	3	4	5	
2,3-Butanediol	1	1	1	1	1	0 X
2-Ketovaleric acid	1	2	1	1	3	2 ✓
3-O-Coumaroylquinic acid	2	2	3	0	2	4 ✓
4-O-Coumaroylquinic acid	3	1	0	1	1	1 ✓
5-O-Feruloylquinic acid	2	3	2	2	2	5 ✓
Arabinofuranose	1	3	2	1	3	3 ✓
Caffeic acid	2	3	2	3	3	5 ✓
Caffeine	3	1	3	3	3	4 ✓
Mannobiose	1	0	1	0	1	0 X
Quinic acid	2	1	3	2	2	4 ✓

CAFÉ PRIMA QUALITÁ

METABÓLITOS	AMOSTRAS					PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS
	1	2	3	4	5	
2,3-Butanediol	2	2	2	0	3	4 ✓
2-Ketovaleric acid	2	2	3	3	2	5 ✓
3-O-Coumaroylquinic acid	2	2	1	1	2	3 ✓
4-O-Coumaroylquinic acid	3	1	2	2	3	4 ✓
5-O-Feruloylquinic acid	1	1	1	1	1	0 ✗
Arabinofuranose	1	3	2	3	3	4 ✓
Caffeic acid	2	3	2	1	3	4 ✓
Caffeine	3	3	3	3	3	5 ✓
Mannobiose	2	3	2	2	1	4 ✓
Quinic acid	2	1	1	2	2	3 ✓

Fase 2:

Exclusão dos metabólitos que não estão presentes em pelo menos 80% das amostras.

CAFÉ PILÃO

METABÓLITOS	AMOSTRAS					PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS
	1	2	3	4	5	
2,3-Butanediol	0	1	1	1	3	1 ✗
3-O-Coumaroylquinic acid	2	2	3	3	2	5 ✓
4-O-Coumaroylquinic acid	3	1	0	1	3	2 ✗
5-O-Feruloylquinic acid	1	3	2	2	2	4 ✓
Arabinofuranose	1	3	2	1	3	3 ✗
Caffeic acid	2	3	2	1	3	4 ✓
Caffeine	3	1	3	3	3	4 ✓
Quinic acid	2	0	3	2	2	4 ✓

CAFÉ MELITTA

METABÓLITOS	AMOSTRAS					PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS
	1	2	3	4	5	
2,3-Butanediol	2	1	1	1	2	2 X
2-Ketovaleric acid	1	1	1	1	2	1 X
3-O-Coumaroylquinic acid	3	3	3	3	3	5 ✓
4-O-Coumaroylquinic acid	1	1	1	3	3	2 X
5-O-Feruloylquinic acid	2	2	2	2	2	5 ✓
Arabinofuranose	1	3	2	1	3	3 X
Caffeic acid	2	3	2	1	3	4 ✓
Caffeine	3	2	2	3	3	5 ✓
Quinic acid	2	0	3	2	2	4 ✓

CAFÉ 3 CORAÇÕES

METABÓLITOS	AMOSTRAS					PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS
	1	2	3	4	5	
2-Ketovaleric acid	1	2	1	1	3	2 X
3-O-Coumaroylquinic acid	2	2	3	0	2	4 ✓
4-O-Coumaroylquinic acid	3	1	0	1	1	1 X
5-O-Feruloylquinic acid	2	3	2	2	2	5 ✓
Arabinofuranose	1	3	2	1	3	3 X
Caffeic acid	2	3	2	3	3	5 ✓
Caffeine	3	1	3	3	3	4 ✓
Quinic acid	2	1	3	2	2	4 ✓

CAFÉ PRIMA QUALITÁ

METABÓLITOS	AMOSTRAS					PRESENÇA EM PELO MENOS 2 DE 3 REPLICATAS TÉCNICAS
	1	2	3	4	5	
2,3-Butanediol	2	2	2	0	3	4 ✓
2-Ketovaleric acid	2	2	3	3	2	5 ✓
3-O-Coumaroylquinic acid	2	2	1	1	2	3 ✗
4-O-Coumaroylquinic acid	3	1	2	2	3	4 ✓
Arabinofuranose	1	3	2	3	3	4 ✓
Caffeic acid	2	3	2	1	3	4 ✓
Caffeine	3	3	3	3	3	5 ✓
Mannobiose	2	3	2	2	1	4 ✓
Quinic acid	2	1	1	2	2	3 ✗

Fase 3:

Exclusão dos contaminantes e aplicação do cálculo da média para os valores das replicatas técnicas de cada metabólito selecionado em cada marca.

Replicatas técnicas

Legenda: ✓ Selecionado ✗ Excluído ● Presente ● Ausente

Figura 7. Processo de seleção dos metabólitos de alta confiabilidade nas marcas de café. O processo foi aplicado em três fases por grupo (tradicional: Prima Qualitá, Melitta, Pilão, 3 Corações; expresso: Arpeggio – Nespresso, Barista – Nescafé - Dolce Gusto, Forza – Café do Ponto) utilizando as 5 replicatas biológicas de cada marca de café. Na fase 1, foram excluídos os metabólitos que não estavam presentes em pelo menos 2 de 3 replicatas técnicas. Em seguida, a fase 2 excluiu os metabólitos que não estavam presentes em pelo menos 80% do total das replicatas biológicas, ou seja, presentes em pelo menos 4 das 5 replicatas biológicas. Após a exclusão de contaminantes, foram submetidos ao cálculo da média os valores da área sobre a curva (ASC) de cada metabólito selecionado em cada uma das marcas de café de acordo com o número de replicatas técnicas presentes em cada replicata biológica: os valores da ASC das

3 replicatas técnicas no cálculo foram utilizadas em caso da presença nas 3 replicatas; na presença de 2 replicatas, o cálculo utilizava apenas os valores da ASC das 2 replicatas técnicas; e na presença de 1 replicata técnica, foi utilizado o valor da ASC desta replicata. Para as replicatas biológicas que apresentaram ausência nas 3 replicatas técnicas do metabólito selecionado, foram considerados como NA.

Os conjuntos de dados foram armazenados em forma de tabela para cada grupo (tradicional e expresso), com uma replicata biológica de cada marca por linha e uma variável por coluna, que corresponde a cada metabólito. As tabelas continham os valores das médias das replicatas técnicas ou NA para cada metabólito. A partir destas tabelas foi originado o terceiro conjunto de dados, contendo apenas os metabólitos cuja presença estava em todas as marcas do grupo tradicional e/ou grupo expresso, a qual foi utilizada na comparação entre estes grupos.

3.2.7 Caracterização dos metabólitos selecionados

Estudo de intervenção nutricional

Objetivando auxiliar na caracterização dos metabólitos previamente selecionados e sujeitos às análises exploratórias, foram submetidos à busca de seus sinônimos, nos bancos de dados online da NIST *Chemistry WebBook* (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>), *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Compound Search* (<http://www.compoundsearch.com/index.html>) todos os metabólitos identificados pela biblioteca NIST14. Já os metabólitos identificados pela biblioteca Agilent Fiehn 2013 não necessitam deste processo de busca, pois os metabólitos são listados durante o processamento com a nomenclatura correta e sem a adição da derivação TMS, o que facilita a sua caracterização.

Em seguida, foram obtidas as classes químicas de cada metabólito nos bancos de dados HMDB (do inglês, *Human Metabolome Database*) (<http://www.hmdb.ca/>), FooDB (do inglês, *Food Database*) (<http://foodb.ca>), ChEBI (do inglês, *Chemical Entities of Biological Interest*) (<http://www.ebi.ac.uk/chebi/>) e KEGG (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (<http://www.ebi.ac.uk/chebi/>) baseada na taxonomia química. Em adição, foi observada a distribuição destes metabólitos entre os tempos de coleta analisados utilizando o diagrama de Venn.

A seleção dos principais metabólitos descritos como sendo da ingestão do café presentes nos conjuntos de dados foi baseada na descrição da literatura e nos bancos de dados de metabólitos HMDB e FooDB. O comportamento destes metabólitos foi demonstrado ao longo de 24 horas no grupo café por meio de gráfico de linha utilizando a média dos valores de área sob a curva dos indivíduos totais em cada tempo de coleta, com seu respectivo erro padrão da média. Os valores ausentes foram considerados como “zero”. No programa *GraphPad Prism (version 5.00 (Trial); March 12, 2007)* foram realizados cálculos e a montagem dos gráficos.

Estudo comparativo de diversas marcas de café

A caracterização dos metabólitos previamente selecionados ocorreu da mesma maneira da etapa de intervenção nutricional, na qual também foram pesquisados os sinônimos dos metabólitos identificados pela biblioteca NIST 14. Em seguida, foram obtidos os números CAS (do inglês, *Chemical Abstracts Service*), o qual corresponde ao registro único no banco de dados CAS Registry atribuído a cada produto químico descrito na literatura, e a classe de cada metabólito nos bancos de dados HMDB e FooDB, baseada na taxonomia química.

Em adição, foram observados o padrão de intensidade e a distribuição destes metabólitos selecionados entre as marcas analisadas utilizando um mapa de cor que mostra a intensidade do metabólito dividida pela intensidade total em igual percentil dentro dos grupos analisados.

Para verificar a presença de metabólitos descritos como os principais metabólitos do café, foram selecionados na literatura e nos bancos de dados de metabólitos HMDB e FooDB quais são os compostos bioativos responsáveis pelos efeitos fisiológicos mais conhecidos do café e estudados na ciência de alimentos e nutrição. Posteriormente, foi verificado nos conjuntos de dados pré-tratados, se alguns deles estavam presentes e o seu comportamento nas marcas em teste foi demonstrado utilizando um mapa de cor.

3.3 Análise estatística

3.3.1 Estudo de intervenção nutricional

Teste exato de Fisher

Para verificar quais metabólitos são possíveis candidatos a biomarcadores séricos da ingestão de café, os metabólitos presentes apenas no jejum ou nos tempos após a ingestão foram descritos em tabelas de contingência (Figura 8). Em seguida, foi aplicado o teste exato de Fisher no ambiente R (*version 3.2.3; 2015-12-10*) em cada tabela de contingência para avaliar se a presença do metabólito em determinado tempo foi estatisticamente diferente, considerando o p-valor menor do que 0,05.

Processo de avaliação de candidatos a biomarcadores séricos da ingestão de café

Passo 1:

Seleção dos metabólitos presentes apenas no jejum ou em algum dos tempos após a ingestão de café.

Comparação entre os tempos 0 e 6

METABÓLITOS	TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	
		CAFÉ	CONTROLE
2-Furoic acid	0	8	2
Docosane	0	10	0
L-Methionine sulfoxide 3	0	12	1
Pelargonic acid 1	0	7	0
1,2-Dichlorobenzene	0	5	1
Linoleic acid	0	20	2
L-Glutamine 3	0	8	2
L-Lysine 3	6	6	1
L-Valine 4	6	9	1
Caffeine	6	8	0
Quinic acid	6	20	0
Caffeic acid	6	18	0

Comparação entre os tempos 0 e 12

METABÓLITOS	TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	
		CAFÉ	CONTROLE
2-Furoic acid	0	8	2
Docosane	0	10	0
L-Methionine sulfoxide 3	0	12	2
Pelargonic acid 1	0	7	0
1,2-Dichlorobenzene	0	5	1
Linoleic acid	0	20	2
Palmitic acid	12	11	1
Monoamidomalonic acid	12	13	2
L-Lysine 3	12	9	1
Caffeine	12	3	0
Quinic acid	12	15	0
Caffeic acid	12	20	0

Comparação entre os tempos 0 e 24

METABÓLITOS	TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	
		CAFÉ	CONTROLE
2-Furoic acid	0	8	2
Docosane	0	10	0
L-Methionine sulfoxide 3	0	12	2
Pelargonic acid 1	0	7	0
1,2-Dichlorobenzene	0	5	1
Linoleic acid	0	20	2
Arachidonic acid	24	8	1
2,6,10-Trimethyltridecane	24	4	0
Methylmalonic acid	24	18	0
Monoamidomalonic acid	24	10	1
Caffeine	24	4	0
Quinic acid	24	7	0

Passo 2:

Criação de tabelas de contingência para cada metabólito.

GRUPO CAFÉ

Metabólito: 2-Furoic acid		
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	
	PRESENTES	AUSENTES
0	8	17
6	0	25

Metabólito: L-Glutamine 3		
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	
	PRESENTES	AUSENTES
0	0	27
6	8	19

Metabólito: L-Methionine sulfoxide 3		
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	
	PRESENTES	AUSENTES
0	12	13
12	0	25

Metabólito: Monoamidomalonic acid		
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	
	PRESENTES	AUSENTES
0	0	29
12	13	16

Metabólito: 1,2-Dichlorobenzene		
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	
	PRESENTES	AUSENTES
0	5	20
24	0	25

Metabólito: Arachidonic acid		
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	
	PRESENTES	AUSENTES
0	0	25
24	8	17

GRUPO CONTROLE

Metabólito: 2-Furoic acid			
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS		
	PRESENTES	AUSENTES	
0	2	3	
6	0	5	

Metabólito: L-Glutamine 3			
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS		
	PRESENTES	AUSENTES	
0	0	5	
6	2	3	

Metabólito: L-Methionine sulfoxide 3			
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS		
	PRESENTES	AUSENTES	
0	1	4	
12	0	5	

Metabólito: Monoamidomalonic acid			
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS		
	PRESENTES	AUSENTES	
0	0	5	
12	2	3	

Metabólito: 1,2-Dichlorobenzene			
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS		
	PRESENTES	AUSENTES	
0	1	4	
24	0	5	

Metabólito: Arachidonic acid			
TEMPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS		
	PRESENTES	AUSENTES	
0	0	5	
24	1	4	

Número de indivíduos totais em cada tempo:

Grupo	Tempo			
	0	6	12	24
Café	25	27	29	25
Controle	5	5	5	5

Figura 8. Processo da análise de possíveis biomarcadores séricos da ingestão de café. Inicialmente, os metabólitos presentes apenas no jejum ou em algum dos tempos após a ingestão do alimento teste foram selecionados e armazenados em pequenas tabelas de acordo com a comparação entre os tempos: 0 e 6, 0 e

12, 0 e 24. Em seguida, foram criadas tabelas de contingência para cada um destes metabólitos, sendo uma tabela para o grupo café e outra para o grupo controle. Quando o metabólito estava ausente em um dos tempos comparados, considerava-se como o número total de indivíduos ausentes, o número de indivíduos analisados no tempo que o metabólito estava presente (grupo café: tempos 0 e 24 = 25 indivíduos, tempo 6 = 27 indivíduos, tempo 12 = 29 indivíduos; grupo controle: tempos 0, 6, 12 e 24 = 5 indivíduos).

Em adição, foram selecionados os principais candidatos a biomarcadores séricos de consumo a partir dos metabólitos significativamente presentes nos tempos após a ingestão de café. O comportamento destes metabólitos foi demonstrado ao longo de 24 horas no grupo café e no grupo controle por meio de gráfico de linha, utilizando as médias dos valores de área sob a curva para cada grupo e tempo de coleta, com seu respectivo erro padrão. Os valores ausentes foram considerados como “zero”. No programa *GraphPad Prism (version 5.00 (Trial); March 12, 2007)* foram realizados os cálculos e a montagem dos gráficos.

Modelos mistos

Com o intuito de avaliar o comportamento dos metabólitos influenciados pela ingestão de café ao longo de 24 horas, foram comparados os quatro tempos de maneira longitudinal (0 e 6, 6 e 12, 12 e 24) utilizando metabólitos que estavam presentes no mesmo indivíduo nos dois tempos comparados simultaneamente em ambos os grupos café e controle. Devido à heterogeneidade do metabolismo interindividual, foi aplicado o modelo misto generalizado no ambiente R (*version 3.2.3; 2015-12-10*) para explicar as fontes desta heterogeneidade na amostra estudada.

O modelo misto é um modelo de regressão que apresenta tanto fatores fixos quanto aleatórios, como também o erro experimental correspondente ao erro da medida. Nesta análise, os efeitos fixos são compartilhados por todos os indivíduos e os aleatórios são específicos de cada indivíduo, devido ao fato de cada indivíduo ter sua própria trajetória média. A diferença entre estas trajetórias é quantificada pelas estimativas dos efeitos aleatórios (BROWN & PRESCOTT, 2006). Em particular, nosso modelo apresenta como fatores fixos grupo (β_1), tempo (β_2) e interação (β_3 Grupo $\times$ Tempo), os indivíduos são dados como fator aleatório ($b_i Z_i$) e o erro experimental por ε_i , como exemplificado a seguir na Figura 9.

Figura 9. Equação utilizada no modelo misto e exemplificação do intercepto aleatório. Na equação apresentada acima, os símbolos correspondem à média geral do metabólito na amostra (α_0), grupo (β_1), tempo (β_2), interação entre grupo e tempo (β_3), fator aleatório ($b_i Z_i$) e o erro experimental (ε_i). No gráfico de linhas abaixo está exemplificado o efeito aleatório, ou seja, o intercepto, o qual é diferente para cada indivíduo (b) e também é um termo que permite explicar a heterogeneidade entre os indivíduos em relação à metabolização. Estes interceptos demonstram a variação na resposta de cada metabólito ao longo do tempo, dependendo do grupo em que o indivíduo está.

Devido à variação do comportamento de cada metabólito ao longo do tempo, dependendo do grupo em que o indivíduo está, foi adicionado à análise o termo de interação entre os fatores fixos tempo e grupo. Para demonstrar os comportamentos da interação, foi utilizado o gráfico de linha, onde foram calculadas as médias dos valores de cada metabólito por grupo em cada tempo comparado seguido da montagem do gráfico, representado na Figura 10. Estas análises foram realizadas em ambiente R (version 3.2.3; 2015-12-10).

Figura 10. Gráficos representativos do comportamento dos metabólitos originados pela interação entre tempo e grupo. Para a montagem dos gráficos, foram calculados os valores das médias das áreas sob a curva (ASC) de cada tempo comparado (0 e 6, 6 e 12, 12 e 24) e grupo (café, controle) de todos os metabólitos significativos na interação, além dos fatores tempo e grupo. Os grupos café e controle estão representados pelas cores vermelho e preto, respectivamente.

Para as análises, foram utilizados como referência o grupo controle e os tempos 0 (comparação entre 0 e 6), 6 (comparação entre 6 e 12) e 12 (comparação entre 12 e 24). Os metabólitos que apresentaram diferença significativa nos fatores fixos tempo, grupo e interação, considerando o p-valor menor que 0,05, foram considerados como influentes na caracterização do metabolismo de café.

3.3.2 Estudo comparativo de diversas marcas de café

Todas as variáveis (metabólitos) contidas nos dados pré-tratados das marcas de café foram submetidas às análises estatísticas descritivas, a qual consistiu de três etapas: grupo tradicional, grupo expresso e grupo tradicional versus grupo expresso. Para a efetuação dos cálculos, foi utilizado o programa online *MetaboAnalyst 3.0* (www.metaboanalyst.ca). Considerando que demasiados valores ausentes ou zeros podem causar problemas na normalização e análise dos dados, os valores NA foram substituídos pela metade do mínimo valor encontrado, este valor assume então ser o limite de detecção. O pressuposto dessa abordagem é que a maioria dos valores ausentes é causada pela baixa abundância dos metabólitos, ou seja, estão abaixo do limite de detecção da técnica (XIA et al., 2015).

Para a correção de sinal dos dados sujeitos as análises exploratórias, foi realizada a padronização pela técnica de auto-escalamento. A técnica de auto-escalamento consiste em subtrair os valores de cada elemento da variável, ou seja, cada metabólito, pelo valor médio dos elementos dessa mesma variável, o que corresponde à média centrada, esta operação move a origem do sistema de coordenadas para o centro dos dados, e dividir pelo desvio padrão, transformando as variáveis originais em novas variáveis com média zero e variância igual a um (XIA et al., 2015; DIETERLE et al., 2006). Em seguida, os dados tratados foram sujeitos aos testes estatísticos descritos a seguir.

Com o intuito de verificar quais metabólitos apresentam quantidades significativamente diferentes entre as marcas de café no grupo tradicional e no grupo expresso, foi utilizada a análise de variância de uma via (One-way ANOVA – do inglês, *One-way Analysis of Variance*). One-way ANOVA é um teste descritivo univariado que consiste em comparar as médias de três ou mais grupos, o qual permite afirmar diferenças significativas entre elas. As análises univariadas são os métodos mais comuns utilizados na análise exploratória de dados em multi-grupos, pois fornecem uma visão preliminar sobre os recursos que são potencialmente significativos na discriminação de condições em estudo (XIA et al., 2015; XIA et al., 2009). Em seguida, foi aplicado o teste post-hoc de Tukey da diferença honestamente significativa (Tukey HSD – do inglês, *Tukey Honestly Significant Difference*) para identificar entre quais marcas havia esta diferença estatística dos compostos. Na comparação entre o grupo tradicional e o grupo expresso foi utilizado o teste *Wilcoxon* não-paramétrico. Assim, foram considerados estatisticamente significativos todos os metabólitos cujo p-valor é menor que 0,05.

Para avaliar a correlação entre os metabólitos que apresentaram concentrações relativas significativamente diferentes no teste ANOVA ou no teste *Wilcoxon* não-paramétrico, ou seja, p-valor menor do que 0,05, associada à similaridade dos perfis metabolômicos entre as marcas de café do grupo tradicional e grupo expresso, como também o grupo tradicional versus expresso, foi aplicada a análise hierárquica de agrupamentos (do inglês, *Hierarchical Clustering Analysis*). Esta ferramenta estatística permite a separação dos metabólitos em agrupamentos diferentes, baseados na similaridade entre eles e as demais amostras. Para isto, foram utilizados dois parâmetros importantes durante a análise, a correlação de Pearson como medida de similaridade e o

algoritmo de agrupamento baseado no método de Ward, o qual utiliza o agrupamento para minimizar a soma dos quadrados de quaisquer clusters. Gráficamente, ela é representada em uma estrutura conhecida como dendograma, associada ou não a uma ferramenta visual como o mapa de calor (do inglês, *Heatmap*) cuja função é fornecer a visualização intuitiva do conjunto de dados (XIA et al., 2015; XIA et al., 2009).

Após a análise estatística, os metabólitos responsáveis pela caracterização dos grupos: exclusivos no café tradicional ou no café expresso, presentes em ambos os grupos e significativamente diferentes entre as marcas de café, foram submetidos à análise de biologia de sistemas. A análise de vias metabólicas foi realizada no programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Ingenuity systems Inc., build version: 389077M, content version: 27821452 - release date: 2016-06-14; Redwood City, CA, EUA) (<http://www.ingenuity.com>), onde foi aplicado o algoritmo *shortest-path* durante o processamento. As vias metabólicas foram consideradas como significativas quando o teste de associação de Fisher calculado contra o banco de dados do próprio programa apresentou p-valores menores do que 0,05.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Estudo de intervenção nutricional

4.1.1 Caracterização dos metabólitos

As análises em CG-EM resultaram na identificação total de 5879 metabólitos. Na Figura 11 estão representados os cromatogramas dos metabólitos observados nos indivíduos do grupo café e do grupo controle.

Figura 11. Cromatogramas representativos das amostras de soro no grupo café e no grupo controle. Na figura apresentada estão representados, de cima para baixo, os cromatogramas de uma das amostras de cada grupo (preto – grupo café; vermelho – grupo controle). Na ordenada estão representados os valores da intensidade do sinal de cada pico e na abscissa encontram-se os tempos de aquisição de dados entre 6,5 e 37 minutos.

Os metabólitos de maior confiabilidade foram selecionados em cada tempo de coleta (0, 6, 12 e 24 horas) após a aplicação dos filtros demonstrados detalhadamente no fluxograma da Figura 12.

Figura 12. Fluxograma do processo de seleção dos metabólitos de alta confiabilidade identificados nas amostras de soro. Os conjuntos de dados finais foram utilizados nas análises observacionais e estatísticas.

No diagrama de Venn da Figura 13, pode-se observar a distribuição dos conjuntos de metabólitos selecionados entre os tempos de coleta. A maioria dos metabólitos está presente em todos os tempos, enquanto alguns deles estão presentes em dois ou três tempos apenas. Os metabólitos presentes de maneira exclusiva entre os tempos também foram observados.

Figura 13. Diagrama de Venn da distribuição de metabólitos entre os tempos de coleta das amostras de soro. Na figura apresentada, cada tempo de coleta está representado por um conjunto de cor diferente (vermelho – tempo 0; verde – tempo 6; roxo – tempo 12; azul – tempo 24). Entre os metabólitos selecionados, alguns deles demonstraram exclusividade em um dos quatro tempos (tempo 0: 26 metabólitos; tempo 6: 43 metabólitos; tempo 12: 39 metabólitos; tempo 24: 31 metabólitos) e outros estavam ausentes entre eles (tempo 0 $\cap$ tempo 6 = 11 metabólitos; tempo 6 $\cap$ tempo 12 = 27 metabólitos; tempo 12 $\cap$ tempo 24 = 13; tempo 24 $\cap$ tempo 0 = 14; tempo 0 $\cap$ tempo 6 $\cap$ tempo 12 = 27 metabólitos; tempo 6 $\cap$ tempo 12 $\cap$ tempo 24 = 20 metabólitos; tempo 0 $\cap$ tempo 12 $\cap$ tempo 24 = 20 metabólitos; tempo 0 $\cap$ tempo 6 $\cap$ tempo 24 = 17 metabólitos). Quatrocentos metabólitos estavam presentes em todos os tempos.

4.1.2 Metabólitos específicos do café

Os metabólitos ácido quínico (do inglês, *Quinic acid*), ácido m-hidrocoumárico (do inglês, *m-Hydrocoumaric acid*) e cafeína (do inglês, *Caffeine*), descritos na literatura como metabólitos específicos da ingestão de café, foram identificados apenas no grupo café a partir do tempo 6 e apresentaram diferentes perfis de comportamento ao longo de 24 horas. Entretanto, nenhum dos indivíduos apresentou estes três metabólitos simultaneamente num mesmo tempo de coleta.

Na Figura 14, pode-se observar que o ácido quínico obteve o pico máximo em até 6 horas após a ingestão de café e diminuiu ao longo dos demais tempos. Este metabólito foi o único dos três metabólitos específicos que estava presente nos três tempos após a ingestão de café, sendo em grande porcentagem dos indivíduos nos tempos 6 e 12 e em baixa porcentagem no tempo 24.

Figura 14. Comportamento do ácido quínico ao longo de 24 horas em indivíduos do grupo café. O gráfico demonstrado acima representa os valores médios da área sob a curva (ASC) do metabólito ácido quínico com seus respectivos erros padrões das médias encontrados nas amostras de soro ao longo das 24 horas observadas neste estudo. Os valores ausentes foram considerados como zero. O número de indivíduos (n) que apresentaram estes metabólitos em cada um dos tempos e a porcentagem (%) destes indivíduos no grupo está detalhado na tabela abaixo do gráfico.

O ácido m-hidrocoumárico também obteve o pico máximo no tempo 6 com redução da metade do valor no tempo 12 até não ser detectado no tempo 24 (Figura 15). Poucos indivíduos apresentaram este metabólito em 6 e 12 horas após a ingestão de café.

Figura 15. Comportamento do ácido m-hidrocoumárico ao longo de 24 horas em indivíduos do grupo café. Os valores da média da área sob a curva (ASC) com seus respectivos erros padrões das médias foram obtidos em cada um dos quatro tempos (0, 6, 12, 24) do grupo café. Os valores ausentes foram considerados como zero. O número de indivíduos (n) que apresentaram estes metabólitos em cada um dos tempos e a porcentagem (%) destes indivíduos no grupo está detalhado na tabela abaixo do gráfico.

Já a cafeína, também estava presente nos tempos 6 e 12 em baixa porcentagem nos indivíduos e obteve o pico máximo em 12 horas (Figura 16).

Figura 16. Comportamento da cafeína ao longo de 24 horas em indivíduos do grupo café. **(A)** No gráfico estão apresentados os valores da média da área sob a curva (ASC) com seus respectivos erros padrões das médias obtidos em cada um dos quatro tempos (0, 6, 12, 24) do grupo café. Os valores ausentes foram considerados como zero. O número de indivíduos (n) que apresentaram estes metabólitos em cada um dos tempos e a porcentagem (%) destes indivíduos no grupo está detalhado na tabela abaixo do gráfico. **(B)** Cada uma das linhas no gráfico corresponde ao comportamento da cafeína ao longo de 24 horas em diferentes indivíduos (ID) analisados.

4.1.3 Candidatos à biomarcadores

O teste exato de Fisher aplicado em todos os metabólitos selecionados que estavam exclusivamente presentes em um dos tempos analisados, resultou em nenhum metabólito significativamente presente ou ausente ao longo de 24 horas no grupo controle.

A análise do grupo café demonstrou alguns metabólitos como possíveis biomarcadores da ingestão de café no soro ao longo dos tempos. Comparando os tempos 0 e 6, foram observados seis metabólitos ausentes e quinze metabólitos presentes de maneira significativa entre os indivíduos em 6 horas após a ingestão de café (Tabela 1), sendo a maioria deles aminoácidos.

Tabela 1. Metabólitos presentes no jejum ou em 6 horas após a ingestão de café.

Tempo	Metabólito	Classe química	p-valor
0	2-Furoic acid	Furanos	0,028
	5-Isoquinolinyboronic acid	Quinolinas	0,024
	Docosane	Hidrocarbonetos	0,021
	L-Methionine sulfoxide 3	Aminoácidos	0,002
	Pelargonic acid 1	Lipídeos	0,020
	m/Z = 459,4		0,025
6	Benzyl alcohol	Benzenóides	0,024
	Glycerol-glycoside	Carboidratos	0,017
	L-Glutamine 3	Aminoácidos	0,021
	L-Lysine 3	Aminoácidos	0,002
	L-Valine 4	Aminoácidos	0,012
	m-Hydrocoumaric acid	Fenilpropanoides	0,004
	Methylmalonic acid	Ácidos carboxílicos	0,000
	Pentadecane	Hidrocarbonetos	0,020
	Pipecolic acid	Aminoácidos	0,046
	Quinic acid	Álcoois	0,000
	Sorbitol 2	Carboidratos	0,004
	m/Z = 116, 2		0,045
	m/Z = 369,1		0,019
	m/Z = 405,2		0,009
	m/Z = 526,3		0,016
	m/Z = 535,1		0,044

Na Tabela 2 estão descritos os nove metabólitos ausentes e os dezoito metabólitos presentes de maneira significativa em 12 horas após a ingestão de café, comparado ao jejum.

Tabela 2. Metabólitos presentes no jejum ou em 12 horas após a ingestão de café.

Tempo	Metabólito	Classe química	p-valor
0	1,2-Dichlorobenzene	Benzenóides	0,005
	1-Heptadecanol	Álcoois	0,008
	2-Furoic acid	Furanos	0,022
	2-Hydroxyphenethylamine	Aminas	0,047
	L-Erythrulose 1	Carboidratos	0,026
	Linoleic acid	Lipídeos	0,021
	N-Ethoxycarbonyl-Pipecolic acid	Aminoácidos	0,041
	N-Propargyloxycarbonyl-L-Norvaline	Aminoácidos	0,047
	Pelargonic acid 2	Lipídeos	0,020
12	5-Methyltetradecane	Hidrocarbonetos	0,003
	Allocholic acid	Lipídeos	0,019
	Carbonic acid 2	Ácidos orgânicos	0,022
	Glyceryl-glycoside	Carboidratos	0,004
	Heneicosene	Hidrocarbonetos	0,009
	Isophthalic acid	Benzenóides	0,027
	L-Lysine 3	Aminoácidos	0,049
	Methylmalonic acid	Ácidos carboxílicos	0,000
	Monoamidomalonic acid	Amidas	0,050
	Palmitic acid	Lipídeos	0,049
	Quinic acid	Álcoois	0,000
	Sorbitol 1	Carboidratos	0,002
	α -Hydroxyisobutyric acid	Ácidos orgânicos	0,029
	m/Z = 205,2		0,002
	m/Z = 264,2		0,004
	m/Z = 277,1		0,011
	m/Z = 369,1		0,020
	m/Z = 547,3		0,022

A comparação entre os tempos 0 e 24, resultou em oito metabólitos ausentes e dez metabólitos presentes de maneira significativa em 24 horas após a ingestão de café (Tabela 3). A maioria dos metabólitos significativamente ausentes nesta comparação são lipídeos.

Tabela 3. Metabólitos presentes no jejum ou em 24 horas após a ingestão de café.

Tempo	Metabólito	Classe química	p-valor
0	1-Heptadecanol	Álcoois	0,007
	1,2-Dichlorobenzene	Benzenóides	0,006
	Octadecanol	Lipídeos	0,048
	Linoleic acid	Lipídeos	0,026
	Pelargonic acid 2	Lipídeos	0,019
	L-Erythrulose 1	Carboidratos	0,020
	N-ethoxycarbonyl-Pipecolic acid	Aminoácidos	0,045
	2-Furoic acid	Furanos	0,021
24	1-Methylphenazine	Quinolinas	0,050
	2,6,10-Trimethyltridecane	Hidrocarbonetos	0,019
	2-Methylbenzyl alcohol	Benzenóides	0,044
	Allocholic acid	Lipídeos	0,021
	Arachidonic acid	Lipídeos	0,022
	Methylmalonic acid	Ácidos carboxílicos	0,002
	Quinic acid	Álcoois	0,010
	m/Z = 264,2		0,010
	m/Z = 369,1		0,044
	m/Z = 382,2		0,004
	m/Z = 405,2		0,024

Como podemos observar anteriormente, os metabólitos *Quinic acid* e *Methylmalonic acid* foram os únicos que demonstraram estarem significativamente presentes em todos os tempos após a ingestão de café. Estes metabólitos estavam presentes a partir do tempo 6 em alta porcentagem de indivíduos do grupo café, mas no grupo controle não foram identificados em nenhum dos quatro tempos. O *Quinic acid* estava presente em pelo menos 90% da população entre 6 e 12 horas e 28% em 24 horas, o seu comportamento no grupo café foi o mesmo descrito anteriormente enquanto o *Methylmalonic acid* foi detectado em 52% da população entre os tempos 6 e 12 e 36% em 24 horas. Na Figura 17 está demonstrado por gráfico de linha o comportamento ao longo de 24 horas com o número e a porcentagem de indivíduos que apresentaram estes metabólitos.

Figura 17. Perfil de comportamento dos potenciais biomarcadores de ingestão de café no soro ao longo de 24 horas. Os gráficos de linha acima representam os valores médios e erro padrão da média dos metabólitos Quinic acid e Methylmalonic acid nos quatro tempos avaliados (0, 6, 12, 24 horas) em cada

grupo (café – preto; controle – cinza). Para o cálculo da média, foram utilizados os valores das áreas sob a curva (ASC) de todos os indivíduos de cada grupo em cada um dos tempos. Os valores ausentes foram considerados como “zero”. Na tabela abaixo de cada um dos gráficos está detalhado o número de indivíduos (n) que apresentaram estes metabólitos em cada um dos tempos e a respectiva porcentagem (%) destes indivíduos no grupo.

4.1.4 Variações no perfil metabolômico originadas após o consumo de café

A comparação entre os tempos 0 e 6 por modelos mistos resultou em 34 metabólitos com diferença significativa na intensidade média para os fatores tempo, grupo e interação. Considerando o tempo, observamos dezoito metabólitos com intensidade média significativamente maior no tempo 0 e, dezesseis metabólitos com maior intensidade média significativa no tempo 6. Em relação ao grupo, vinte e quatro metabólitos demonstraram intensidade média significativamente maior no grupo café enquanto dez metabólitos apresentaram comportamento inverso. A maioria destes metabólitos são aminoácidos e carboidratos. Na Tabela 4 estão descritos os nomes dos metabólitos com suas respectivas classes químicas, estimativas dos fatores tempo, grupo e interação e p-valores.

Tabela 4. Metabólitos com intensidades significativamente diferentes no tempo 0 em relação ao tempo 6 dentro do grupo controle café em relação ao grupo café.

METABÓLITO	CLASSE QUÍMICA	ESTIMATIVA			p-VALOR		
		TEMPO	GRUPO	INTERAÇÃO	TEMPO	GRUPO	INTERAÇÃO
1-Octadecanol 1	Lipídeos	-0,095	-0,127	0,262	3,85E-11	9,71E-15	0,025
2-(4-ethenylphenyl) Acetic acid	Compostos carbocíclicos	-3,890	-2,286	8,112	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
2,6-Diphenyl-3,4-dimethylpyridine	Benzenóides	-0,667	-1,606	1,453	0,001	0,008	0,002
2-Hydroxyundecanoic acid	Ácidos graxos	-0,699	-0,189	1,007	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
3 α -Mannobiose 1	Carboidratos	-0,379	-0,574	1,738	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
4,5-Dimethylnonane	Compostos carbocíclicos	-0,421	-0,315	0,772	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	0,027
4-Deoxyerythronic acid	Carboidratos	-0,193	-1,038	1,859	0,011	0,014	4,83E-11
Aspartylglycosamine	Carboidratos	-0,257	-0,426	0,992	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Didecyl-(2-fluorobenzyl)amine	Benzenóides	-0,078	-0,675	0,389	>10 ⁻¹⁶	4,45E-04	>10 ⁻¹⁶
D-Tagatose 1	Carboidratos	-0,326	-1,458	2,363	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Hydroxylamine	Compostos inorgânicos	-0,584	-0,100	1,143	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
L-Lactic acid 2	Hidroxiácidos	-2,148	-2,260	3,487	3,72E-08	0,027	3,67E-07
N,N-Diethyl-1-naphthamide	Compostos carbocíclicos	-0,639	-0,877	1,041	1,08E-84	9,21E-05	2,47E-58
Xanthine 2	Purinas	-0,095	-0,079	0,384	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
m/Z = 264,2		-0,173	-0,201	0,455	1,31E-198	9,29E-250	>10 ⁻¹⁶
m/Z = 290,2		-0,266	-0,111	0,181	>10 ⁻¹⁶	4,71E-64	1,71E-166
m/Z = 382,2		-0,873	-0,863	1,716	5,63E-20	1,78E-02	4,32E-37
Cyclopentadecane	Hidrocarbonetos	-0,053	0,164	-0,326	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
1-Piperidiny-2-propanol	Alcoóis	0,009	-0,643	0,948	>10 ⁻¹⁶	2,00E-04	3,39E-05
Aminomalonic acid	Aminoácidos	0,083	-0,145	0,074	6,87E-140	>10 ⁻¹⁶	4,95E-113
D-Galactose 1	Carboidratos	0,239	-0,408	-0,496	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Glycine 2	Aminoácidos	0,090	-0,201	0,043	5,83E-220	>10 ⁻¹⁶	9,98E-52
Sedoheptulose	Carboidratos	0,086	-1,592	1,244	9,15E-06	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Serotonin 1	Indoles	0,179	-0,396	-0,215	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
β -Glycerophosphoric acid	Lipídeos	0,327	-0,417	0,685	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
2-Isopropyl-5-methyl-1-heptanol	Hidroxiálcoóis	0,082	0,067	-0,278	9,37E-55	7,84E-38	>10 ⁻¹⁶
2-Methyltridecane	Hidrocarbonetos	1,102	0,909	-1,189	>10 ⁻¹⁶	0,029	0,044
D-Arabitol	Carboidratos	0,140	0,171	-0,613	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
L-Alanine 1	Aminoácidos	0,268	0,305	0,172	2,17E-219	1,31E-266	5,86E-86
L-Methionine 1	Aminoácidos	0,204	0,078	-0,270	>10 ⁻¹⁶	2,65E-70	>10 ⁻¹⁶
N-(6-Quinoliny) Phthalimide	Quinolinas	0,052	0,145	-0,277	2,31E-36	1,32E-273	>10 ⁻¹⁶
N-allyloxycarbonyl-N-methyl-L-Leucine	Aminoácidos	0,559	0,467	-1,020	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Octadecane	Hidrocarbonetos	0,178	0,313	-0,539	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Oleonnitrile	Compostos organonitrogenados	0,248	0,392	-0,291	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶

Em relação à interação entre os fatores tempo e grupo na resposta dos metabólitos com intensidade significativa na comparação entre jejum (t0) e 6 (t6) horas após a ingestão do café, identificamos onze diferentes perfis de resposta: (A) Metabólitos: *N,N-Diethyl-1-naphthamide*; *2-Hydroxyundecanoic acid* – os dois grupos apresentaram a mesma média da área sob a curva (ASC) no t0, mas um deles demonstrou aumento da média da ASC em t6 em relação ao t0. (B) Metabólitos: *N-(6-Quinoliny) Phthalimide*; *Oleonnitrile* – diminuição ou aumento da média da ASC em t6 em relação ao t0 para ambos os grupos, mas o grupo café apresentou a menor média da ASC nos dois tempos. (C) Metabólito: *Serotonin 1* – aumento da média da ASC em t6 em relação ao t0 para o grupo café (> média da ASC) enquanto o grupo controle apresentou pouca mudança na média da ASC. (D) Metabólitos: *2,6-Diphenyl-3,4-*

dimethylpyridine; *1-Octadecanol 1*; *Dicetyl-(2-fluorobenzyl) amine*; *4,5-Dimethylnonane*; *L-Alanine 1* – diminuição da média da ASC em t6 em relação ao t0 para o grupo café (> média da ASC) enquanto o grupo controle apresentou pouca mudança na média da ASC. (E) Metabólitos: *L-Lactic acid 2*; *3 α -Mannobiose 1*; *L-Methionine 1*; *D-Arabitol*; *N-allyloxycarbonyl-N-methyl-L-Leucine*; *Octadecane*; *Aminomalonic acid* – aumento da média da ASC em t6 (> média da ASC) em relação ao t0 (< média da ASC) para o grupo café enquanto o grupo controle apresentou o comportamento inverso. (F) Metabólitos: *4-Deoxyerythronic acid*; m/Z = 382,2; *D-Tagatose 1*; *Xanthine 2* – diminuição da média da ASC em t6 (> média da ASC) em relação ao t0 (< média da ASC) para o grupo café enquanto o grupo controle apresentou o comportamento inverso. (G) Metabólitos: *2-(4-Ethenylphenyl) Acetic acid*; *2-Methyltridecane*; *Glycine 2*; *Sedoheptulose*; β -*Glycerophosphoric acid* – aumento da média da ASC em t6 em relação ao t0 para ambos os grupos, mas um deles apresentou maior média da ASC em relação ao outro grupo nos dois tempos. (H) Metabólito: m/Z = 290,2 – diminuição da média da ASC em t6 em relação ao t0 para ambos os grupos, mas o grupo café apresentou maior média da ASC nos dois tempos, em relação ao grupo controle. (I) Metabólitos: *Cyclopentadecane*; *2-Isopropyl-5-methyl-1-heptanol* – aumento da média da ASC em t6 em relação ao t0 para o grupo café (> média da ASC) enquanto o grupo controle (< média da ASC) apresentou o comportamento inverso. (J) Metabólitos: *Aspartylglycosamine*; *D-Galactose 1* – diminuição da média da ASC em t6 em relação ao t0 para ambos os grupos, mas a média da ASC do grupo café que era maior no t0 tornou-se menor em t6, em relação ao grupo controle. (K) Metabólitos: m/Z = 264,2; *Hydroxylamine*; *1-Piperidinyl-2-propanol* – aumento da média da ASC em t6 em relação ao t0 para ambos os grupos, mas a média da ASC do grupo café que era maior no t0 tornou-se menor em t6, em relação ao grupo controle. Na Figura 18 estão representados estes perfis.

Figura 18. Gráficos de interação entre tempo e grupo das médias das áreas sob a curva dos metabólitos significativos da comparação entre os tempos 0 e 6. Os grupos café e controle estão representados pelas cores vermelho e preto, respectivamente.

Na Tabela 5 estão demonstrados os metabólitos com diferença significativa na intensidade média na comparação entre os tempos 6 e 12, além de suas respectivas classes químicas, p-valores e estimativas. Nove metabólitos apresentaram maior intensidade média significativa no tempo 6 enquanto treze metabólitos estavam em maior intensidade média no tempo 12. Ao analisarmos os grupos, observamos dez metabólitos com maior intensidade significativa no grupo café e onze metabólitos para o grupo controle. Em relação à classe química, este grupo de vinte e um metabólitos tem como maioria os carboidratos e aminoácidos.

Tabela 5. Metabólitos com intensidades significativamente diferentes no tempo 6 em relação ao tempo 12 dentro do grupo controle em relação ao grupo café.

METABÓLITO	CLASSE QUÍMICA	ESTIMATIVA			p-VALOR		
		TEMPO	GRUPO	INTERAÇÃO	TEMPO	GRUPO	INTERAÇÃO
Azelaic acid	Lipídeos	-0,023	-0,605	0,274	2,68E-15	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
D-Lyxose 1	Carboidratos	-0,187	-0,036	-0,095	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Neohesperidose	Carboidratos	-0,017	-0,331	0,116	>10 ⁻¹⁶	0,017	>10 ⁻¹⁶
m/Z = 408,3		-0,204	-0,533	-0,408	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Acetamido-2,3-epoxy-cyclohexanol		-0,429	0,352	-0,343	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
D-Galactose 1	Carboidratos	-0,194	0,254	-0,491	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
L-Serine 1	Aminoácidos	-0,015	0,345	-0,111	5,09E-13	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
N-Acetyl-D-glucosamine 3	Carboidratos	-0,062	0,006	0,209	8,77E-123	0,013	>10 ⁻¹⁶
Phosphoglycolic acid	Ácidos fosfóricos	-0,026	0,126	0,223	4,82E-17	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
1,3,5-Trichlorobenzene	Benzenóides	0,143	-0,271	-0,087	1,12E-288	>10 ⁻¹⁶	9,10E-98
1-Decanol	Lipídeos	0,054	-0,194	0,121	2,79E-59	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
4-Hydroxyproline 1	Aminoácidos	0,091	-0,206	-0,029	3,14E-269	>10 ⁻¹⁶	9,99E-16
Gluconic acid	Carboidratos	0,094	-0,184	-0,172	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
L-Ornithine 1	Aminoácidos	0,070	-0,447	0,136	1,09E-47	>10 ⁻¹⁶	6,09E-215
m/Z = 444,2		0,930	-0,133	-0,325	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
2-Hydroxyundecanoic acid	Ácidos graxos	0,150	0,384	-0,128	7,33E-159	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
4,6,8-Trimethyl-1-nonene	Hidrocarbonetos insaturados	0,289	0,115	-0,134	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
L-Cystine 3	Aminoácidos	0,332	0,316	-0,722	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
o-Chlorophenylanthraquinone	Benzenóides	0,102	0,132	-0,303	6,72E-154	8,85E-285	>10 ⁻¹⁶
D-Tagatose 2	Carboidratos	0,655	0,318	-0,561	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Tetracosane	Hidrocarbonetos saturados	0,024	0,103	0,187	2,99E-08	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶

Na Figura 19 estão demonstrados os perfis de resposta promovidos pela interação entre os fatores tempo e grupo nos metabólitos com intensidade significativa na comparação entre 6 (t6) e 12 (t12) horas após a ingestão do café. Foram identificados dez perfis diferentes entre os vinte e um metabólitos: (A) Metabólitos: *2-Hydroxyundecanoic acid*; m/Z = 444,2 – os dois grupos apresentaram a mesma média da ASC no t12, mas um deles demonstrou diminuição da média da ASC em t12 em relação ao t6. (B) Metabólito: *4,6,8-Trimethyl-1-nonene* – diminuição da média da ASC em t12 em relação ao t6 para ambos os grupos, mas o grupo café apresentou a menor média da ASC nos dois tempos. (C) Metabólitos: *L-Ornithine 1*; *1,3,5-Trichlorobenzene* – aumento da média da ASC em t12 em relação ao t6 para o grupo café (> média da ASC) enquanto o grupo controle apresentou pouca mudança na média da ASC. (D) Metabólitos: *Tetracosane*; *D-Tagatose 1* – diminuição da média da ASC em t12 em relação ao t6 para o grupo café (> média da ASC) enquanto o grupo controle apresentou pouca mudança na média da ASC. (E) Metabólitos: *L-Cystine 3*; *o-*

Chlorophenylanthraquinone; *Gluconic acid* – aumento da média da ASC em t12 (> média da ASC) em relação ao t6 (< média da ASC) para o grupo café enquanto o grupo controle apresentou o comportamento inverso. (G) Metabólitos: *Phosphoglycolic acid*; *N-acetyl-D-glucosamine 3*; *D-Lyxose 1*; *1-Decanol* – aumento da média da ASC em t12 em relação ao t6 para ambos os grupos, mas um deles apresentou maior média da ASC em relação ao outro grupo nos dois tempos. (H) Metabólitos: *Acetamido-2,3-epoxy-cyclohexanol*; *Azelaic acid* – diminuição da média da ASC em t12 em relação ao t6 para ambos os grupos, mas um deles apresentou maior média da ASC nos dois tempos, em relação ao outro grupo. (I) Metabólito: *4-Hydroxyproline 1* – diminuição da média da ASC em t12 em relação ao t6 para o grupo café (> média da ASC) enquanto o grupo controle (< média da ASC) apresentou o comportamento inverso. (J) Metabólitos: *L-Serine 1*; *D-Galactose 1*; $m/Z = 408,3$ – diminuição da média da ASC em t12 em relação ao t6 para ambos os grupos, mas a média da ASC do grupo café que era menor no t6 tornou-se maior em t12, em relação ao grupo controle. (K) Metabólito: *Neohesperidose* – aumento da média da ASC em t12 em relação ao t6 para ambos os grupos, mas a média da ASC do grupo café que era maior no t6 tornou-se menor em t12, em relação ao grupo controle.

Figura 19. Gráficos de interação entre tempo e grupo das médias das áreas sob a curva dos metabólitos significativos da comparação entre os tempos 6 e 12. Os grupos café e controle estão representados pelas cores vermelho e preto, respectivamente.

Após a comparação entre os tempos 12 e 24, foram observados vinte e oito metabólitos com diferença significativa na intensidade média. Em relação aos metabólitos com maior intensidade significativa no tempo, observamos dezoito metabólitos no tempo 12 e dez metabólitos no tempo 24. Já no grupo, dezesseis metabólitos demonstraram maior intensidade significativa no grupo café enquanto no grupo controle foram doze metabólitos. A maioria dos metabólitos deste grupo pertence à classe química dos carboidratos e lipídeos. Na Tabela 6 estão representados os metabólitos com diferença significativa na intensidade média, com suas respectivas classes químicas, estimativas dos fatores tempo, grupo e interação e p-valores.

Tabela 6. Metabólitos com intensidades significativamente diferentes no tempo 12 em relação ao tempo 24 dentro do grupo controle em relação ao grupo café.

METABÓLITO	CLASSE QUÍMICA	ESTIMATIVA			p-VALOR		
		TEMPO	GRUPO	INTERAÇÃO	TEMPO	GRUPO	INTERAÇÃO
3-Methylamino-1-phenyl-2-butenone	Benzenóides	-0,126	-0,219	0,022	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	3,43E-119
Dehydroabietic acid	Diterpenóides	-0,362	-0,066	0,624	>10 ⁻¹⁶	1,07E-80	>10 ⁻¹⁶
D-Galactose 1	Carboidratos	-0,093	-0,972	0,184	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
D-Lyxose 1	Carboidratos	-0,363	-0,125	0,304	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
D-Malic acid	Lipídeos	-0,439	-0,068	0,233	>10 ⁻¹⁶	1,44E-78	>10 ⁻¹⁶
D-Tagatose 2	Carboidratos	-0,218	-0,102	0,795	>10 ⁻¹⁶	8,59E-193	>10 ⁻¹⁶
Elaidic acid 2	Lipídeos	-0,090	-0,388	0,119	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Hydroxylamine	Compostos inorgânicos	-0,215	-0,050	0,020	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	6,05E-36
L-Threonine 2	Aminoácidos	-0,044	-0,382	0,242	1,65E-14	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
o-Chlorophenylantraquinone	Benzenóides	-0,126	-0,255	0,174	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Ribitol 1	Carboidratos	-0,143	-0,094	-0,101	3,70E-201	2,18E-79	1,30E-93
4-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-2,3-Butenone	Benzenóides	-0,049	0,084	-0,184	2,42E-216	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Capric acid	Lipídeos	-0,127	0,293	-0,231	1,55E-288	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
D-Sorbitol 2	Carboidratos	-0,300	0,066	-0,222	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Gluconolactone	Carboidratos	-0,032	0,181	-0,148	1,72E-13	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Inositol phosphate	Alcoóis	-0,243	0,167	-0,151	5,64E-200	2,85E-88	1,68E-68
L-Serine 1	Aminoácidos	-0,156	0,283	-0,415	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Methyltetradecyl sulfoxide	Sulfóxidos	-0,040	0,220	0,220	1,86E-07	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
3α-Mannobiose 1	Carboidratos	0,152	-0,229	-0,027	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	1,98E-18
7-Propyl-indole-2,3-dione	Indoles	0,190	-0,113	0,134	8,41E-258	9,01E-84	6,24E-121
Dihydrouracil 2	Pirimidinas	0,047	-0,328	0,206	1,02E-25	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Fumaric acid	Ácidos carboxílicos	0,136	-0,268	0,078	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	8,90E-195
Pyrophosphate	Compostos inorgânicos	0,071	-0,418	0,214	7,66E-50	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Elaidic acid 1	Lipídeos	0,423	0,166	-0,032	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	1,77E-06
Glucoheptonic acid 2	Carboidratos	0,028	0,021	-0,055	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Succinylacetone	Cetoácidos	0,032	0,137	-0,436	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶
Undecane	Hidrocarbonetos	0,051	0,033	0,122	1,01E-36	2,96E-08	4,99E-251
m/Z = 369,1		0,146	0,480	-0,140	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶	>10 ⁻¹⁶

Nove perfis diferentes de resposta da interação entre os fatores tempo e grupo foram identificados entre os vinte e oito metabólitos com intensidade significativa na comparação dos tempos 12 (t12) e 24 (t24) (Figura 20): A) Metabólitos: *D-Galactose 1*; *Succinylacetone* – os dois grupos apresentaram a mesma média da ASC em t12 ou t24, mas um deles demonstrou aumento ou diminuição da média da ASC em t24 em relação ao t12. (B) Metabólito: *Gluconolactone* – aumento da média da ASC em t24 em relação ao t12 para o grupo café (> média da ASC enquanto o grupo controle apresentou o comportamento inverso. (C) Metabólito: *Methyltetradecyl sulfoxide* – aumento da média da ASC em t24 em relação ao t12 para o grupo café (< média da ASC) enquanto o grupo controle apresentou pouca mudança na média da ASC. (D) Metabólitos: *D-Tagatose 2*; *Elaidic acid 2*; *Dihydrouracil 2* – diminuição da média da ASC em t24 em relação ao t12 para o grupo café (> média da ASC) enquanto o grupo controle

apresentou pouca mudança na média da ASC. (F) Metabólitos: *Dehydroabietic acid*; *o-Chlorophenylanthraquinone*; *D-Malic acid*; *D-Sorbitol 2*; *3 α -Mannobiose 1*; *Undecane*; *Pyrophosphate* – diminuição da média da ASC em t24 (> média da ASC) em relação ao t12 (< média da ASC) para o grupo café enquanto o grupo controle apresentou o comportamento inverso. (G) Metabólitos: *L-Serine 1*; *L-Threonine 2*; *Fumaric acid*; *Glucosheptonic acid 2*; *7-Propyl-indole-2,3-dione* – aumento da média da ASC em t24 em relação ao t12 para ambos os grupos, mas um deles apresentou maior média da ASC em relação ao outro grupo nos dois tempos. (H) Metabólito: *D-Lyxose 1*; *3-Methylamino-1-phenyl-2-butenone*; *Hydroxylamine*; *Inositol phosphate*; *Elaidic acid 1* – diminuição da média da ASC em t24 em relação ao t12 para ambos os grupos, mas um dos grupos apresentou maior média da ASC nos dois tempos, em relação ao outro grupo. (J) Metabólitos: *Capric acid*; *Ribitol 1* – diminuição da média da ASC em t24 em relação ao t12 para ambos os grupos, mas a média da ASC do grupo café que era menor no t12 tornou-se maior em t24, em relação ao grupo controle. (K) Metabólitos: *4-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-2,3-Butenone*; $m/Z = 369,1$ – aumento da média da ASC em t24 em relação ao t12 para ambos os grupos, mas a média da ASC do grupo café que era maior no t12 tornou-se menor em t24, em relação ao grupo controle.

Figura 20. Gráficos de interação entre tempo e grupo dos metabólitos significativos da comparação entre os tempos 12 e 24. Os grupos café e controle estão representados pelas cores vermelho e preto, respectivamente.

No intuito de observar classes químicas ou grupos de metabólitos que se elevaram em até 12 horas após a ingestão de café, foram analisados os comportamentos

dos metabólitos com intensidade média significativa ao longo de 24 horas. Dentro das diversas classes químicas entre os metabólitos, apenas sete aminoácidos apresentaram esta alteração. Na Figura 21 estão demonstrados os comportamentos destes aminoácidos por meio de gráficos de linha.

Figura 21. Perfil de comportamento ao longo de 24 horas dos aminoácidos significativamente diferentes por modelos mistos. Os gráficos de linha acima representam os valores médios dos metabólitos 4-Hydroxyproline 1, L-Methionine 1, L-Alanine 1, L-Cystine 3 e L-Threonine 2 nos quatro tempos avaliados (0, 6, 12, 24) em cada grupo (café, controle). Os valores foram apresentados como média e seu respectivo erro padrão da média. Os valores ausentes foram considerados como “zero” e os grupos café e controle estão representados pelas cores preto e cinza, respectivamente.

4.2 Estudo comparativo de diversas marcas de café

4.2.1 Café Tradicional

A análise por CG-EM resultou na identificação de 366 metabólitos. Os cromatogramas de alguns desses metabólitos para as diferentes marca de café do grupo tradicional podem ser observados na Figura 22.

Figura 22. Cromatogramas das marcas de café correspondentes ao grupo tradicional. Na figura apresentada estão representados, de cima para baixo, os cromatogramas de uma das amostras de cada marca de café (rosa – café Melitta; vermelho – café Pilão; azul – café 3 Corações; verde – café Prima Qualitá). Na ordenada estão representados os valores da intensidade do sinal de cada pico e na abscissa encontram-se os tempos de aquisição de dados entre 6,5 minutos e 37 minutos.

No intuito de aumentar a confiabilidade dos dados, foram selecionados noventa e cinco metabólitos os quais se adequaram aos requisitos do pré-tratamento de dados. Posteriormente, cada metabólito foi identificado pelo número CAS e caracterizado

quanto à classe na taxonomia química e ao padrão de intensidade por mapa de cor, baseado na comparação entre todas as marcas de café tradicional como demonstrado na Figura 23.

CLASSE QUÍMICA	METABÓLITO	CAS	INTENSIDADE MÉDIA			
			PILÃO	MELITTA	3 CORAÇÕES	PRIMA QUALITÀ
Ácidos carboxílicos	Citric acid	77-92-9				
	Cycloleucin	52-52-8				
	Fumaric acid	110-17-8				
	Glutaric acid	110-94-1				-
	L-Pyroglutamic acid	98-79-3				
	Maleic acid	110-16-7				
	Oxalic acid	144-62-7				
	Pyroglutamic acid	98-79-3				
	Succinic acid	110-15-6				
Ácidos hidroxicinâmicos	Caffeic acid	331-39-5				
Ácidos tiocarboxílicos	(Allylthio) Acetic acid	20600-63-9				
Alcalóides	Caffeine	58-08-2				
	Trigonelline 1	535-83-1				
	Trigonelline 2	535-83-1				
Álcoois e polióis	1,5-Pentanediol	111-29-5				
	2,3-Butanediol	513-85-9				
	3-O-Coumaroylquinic acid	1899-30-5				
	4-O-Coumaroylquinic acid	905-99-7				
	4-O-Feruloylquinic acid	2613-86-7				
	5-O-Feruloylquinic acid	1899-29-2				
	Chlorogenic acid 1	327-97-9				
	Chlorogenic acid 2	327-97-9				
	D-Pinitol	10284-63-6				
	Levainositol	551-72-4				
	Myo-inositol 1	87-89-8				
	Myo-inositol 2	87-89-8				
	Myo-Inositol phosphate	2831-74-5				
	Quinic acid	77-95-2				
	Quinic acid	86-68-0				
	Scyllitol	488-59-5				
	Shikimic acid	138-59-0	-			-
Benzenóides	2-Hydroxyphenethyl alcohol	7768-28-7				
	2-Piperidine ethyl 4-chlorobenzoate	15483-41-7				-
	3-Hydroxybenzoic acid	99-06-9				
	4-Aminophenol	123-30-8				
	Benzoic acid	65-85-0				
	Pyrocatechol	120-80-9				
	Pyrogallol	87-66-1				
Carboidratos	Arabinofuranose	13221-22-2				
	Beta-D-Arabinopyranose	6748-95-4				
	Cellobiose	528-50-7				
	D-Arabinose	10323-20-3	-			
	D-Erythrose	1758-51-6				
	D-Galactose	59-23-4				-
	D-Glucuronic acid	6556-12-3				
	D-Mannose	3458-28-4	-	-		
	D-Ribose	50-69-1				
	D-sorbitol	50-70-4				
	D-Tagatofuranose	87-87-0				
	Ethyl α-D-glucopyranoside	3198-49-0				
	Galactaric acid	526-99-8				
	Galactinol	3687-64-7				
	Galactofuranosiduronic acid	150659-42-0				-
	Galacturonic acid	14982-50-4				
	Glyceric acid	473-81-4				
	Glycerol	56-81-5				
	Lactulose	4618-18-2				
	Levoglucozan 1	498-07-7				
	Levoglucozan 2	498-07-7				
	L-Rhamnose	3615-41-6				
	L-Sorbose	87-79-6				
	Mannobiose	23745-85-9				
	Melibiose	585-99-9	-			
	Methyl galactoside	709-50-2				
	Ribitol 1	488-81-3				
	Ribitol 2	488-81-3

Figura 23. Caracterização dos metabólitos selecionados do grupo tradicional. Os metabólitos estão caracterizados segundo a classe química, nome do metabólito, número CAS e um padrão comparativo de intensidade, indicada por um mapa de cor, entre as diferentes marcas de café. Na elaboração do mapa de cor, inicialmente, os valores quantificados nas cinco amostras analisadas por marca de café foram sujeitos ao cálculo da média para a obtenção da intensidade média de cada metabólito selecionado. Os dados foram armazenados em forma de tabela, onde os 95 metabólitos estão representados em linhas, as marcas de café (Pilão, Melitta, 3 Corações, Prima Qualitá) em colunas e cada célula corresponde a um valor da média da intensidade. Em seguida, os valores de cada metabólito foram submetidos a uma escala de cor onde estão representados pelas cores vermelho, amarelo e verde as quais indicam a intensidade máxima, intermediária e mínima dos metabólitos, respectivamente. Os valores ausentes, os quais não foram identificados em nenhuma das cinco amostras das marcas de café, estão representados pelo símbolo “-”.

No diagrama de Venn da Figura 24, pode-se observar a distribuição deste conjunto de metabólitos selecionados entre as marcas do grupo. Entre os 95 metabólitos, 86 estão presentes em todas as marcas. Além disso, nenhum deles apresentou exclusividade, enquanto 9 metabólitos (*Glutaric acid*, *Galactofuranosiduronic acid*, *D-Arabinose*, *Melibiose*, *2-Furanacetaldehyde*, *D-*

Mannose, *Shikimic acid*, *D-Galactose* e *2-Piperidine ethyl 4-chlorobenzoate*) demonstraram estar ausentes entre algumas delas.

Figura 24. Diagrama de Veen da distribuição dos metabólitos entre as marcas do grupo tradicional. Na figura apresentada, cada marca de café está representada por um conjunto de cor diferente (vermelho – café Pilão; laranja– café Melitta; amarelo – café 3 Corações; verde – café Prima Qualitá). Entre os 95 metabólitos, 86 estavam presentes em todas as marcas e nove deles estavam ausentes em algumas delas ($\text{Pilão} \cap \text{Melitta} = D\text{-Galactose e } 2\text{-Piperidine ethyl 4-chlorobenzoate}$; $\text{Melitta} \cap 3 \text{ Corações} = \text{Shikimic acid}$; $3 \text{ Corações} \cap \text{Prima Qualitá} = D\text{-Mannose}$; $\text{Pilão} \cap \text{Melitta} \cap 3 \text{ Corações} = \text{Glutaric acid, Galactofuranosiduronic acid}$; $\text{Melitta} \cap 3 \text{ Corações} \cap \text{Prima Qualitá} = D\text{-Arabinose, Melibiose, 2-Furanacetaldehyde}$). Nenhum metabólito demonstrou exclusividade em uma das quatro marcas do grupo.

No intuito de saber quais são os metabólitos que promovem estas diferenças nos perfis metabolômicos, foi aplicado o teste One-way ANOVA utilizando a área sob a curva de todos os metabólitos selecionados. Esta análise resultou em 52 metabólitos com intensidades diferentemente significativas entre as marcas. Com intuito de observar o comportamento destes 52 metabólitos, foram utilizadas novamente as suas áreas sob a curva na análise hierárquica de agrupamentos, a qual pode se observar a formação de

dois conjuntos baseados na comparação da intensidade dos metabólitos no café Prima Qualitá, de maneira homogênea, em relação às demais marcas. No conjunto 1, formado por 24 metabólitos, os metabólitos apresentaram alta intensidade no café Prima Qualitá, enquanto no conjunto 2, os 28 metabólitos apresentaram uma relação inversa. Em relação à similaridade entre os perfis metabolômicos, foram formados 3 agrupamentos distintos, onde foi observado uma maior similaridade entre o perfil metabolômico das marcas Melitta e 3 Corações que foram diferentes do café Pilão e Prima Qualitá. Este último apresentou a maior diferença no perfil metabolômico comparado com as demais marcas. Na Figura 25 estão descritos os p-valores de cada um dos metabólitos significativos pela One-way ANOVA, além da representação dos dois agrupamentos obtidos durante a análise hierárquica de agrupamentos baseado na comparação de suas respectivas intensidades, mostradas no *heatmap*.

Figura 25. Agrupamento hierárquico e *heatmap* dos metabólitos com intensidade significativamente diferente entre as marcas no grupo tradicional. Os metabólitos estão apresentados nas linhas, as marcas de café nas colunas (vermelho – café 3 Corações; verde – café Melitta; azul escuro – café Pilão; azul claro – café Prima Qualitá) e cada célula corresponde a um valor de intensidade de cada amostra numerada de 1 a 5. Os agrupamentos ocorreram de acordo com a similaridade dos perfis metabólicos de cada marca e do comportamento destes metabólitos entre elas. A intensidade de cada metabólito (alta, intermediária ou baixa) está indicada pela escala de cor (-3-3), representada pelas cores vermelho, preto e verde. Os cafés Melitta e 3 Corações apresentaram maior similaridade entre seus perfis metabólicos, enquanto o café Prima Qualitá demonstrou ser diferente em relação às demais marcas. Dois conjuntos foram formados de acordo com o comportamento dos metabólitos entre as marcas: o conjunto 1 com 24 metabólitos predominantemente aumentados no café Prima Qualitá e o conjunto 2 com 28 metabólitos diminuídos nesta mesma marca.

Estes metabólitos contidos nestes dois conjuntos formados podem estar relacionados à diversas respostas e/ou alterações das vias metabólicas ao serem consumidos por meio do café. Para verificar quais são as funções representativas a nível molecular e celular em que estes metabólitos podem estar envolvidos, foi feita uma análise de biologia de sistemas para cada um dos dois conjuntos. Com exceção da função ciclo celular, os dois grupos mostraram funções moleculares e celulares distintas as quais estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Funções a nível molecular e celular dos dois conjuntos de metabólitos do grupo tradicional separados pela análise hierárquica de agrupamentos.

CONJUNTO	FUNÇÕES MOLECULARES E/OU CELULARES	p-VALOR	METABÓLITOS
1	Ciclo celular	0,040 - 0,002	Pyridinol; Citric acid
	Metabolismo de carboidratos	0,024 - 0,001	Citric acid; Glutaric acid
	Metabolismo de lipídeos		Citric acid; Malic acid; Glycerol;
	Transporte molecular	0,048 - 0,001	Chlorogenic acid; Lactulose;
	Bioquímica de pequenas moléculas		Glutaric acid
2	Ciclo celular	0,040 - 0,002	Caffeine; Mevalonic acid
	Eliminação de radicais livres	0,001 - 0,036	Caffeine; Catechol; D-Galactose;
			Mevalonic acid; Pyrogallol;
			Succinic acid; Uridine
	Comprometimento celular		Uridine
	Desenvolvimento celular	0,005	
	Aglomerção e organização celular		Mevalonic acid

4.2.2 Café expresso

Para as análises deste grupo, foram utilizados os mesmos critérios aplicados durante a análise do grupo tradicional.

No grupo expresso, foram identificados 362 metabólitos. Os cromatogramas de cada uma das marcas de café estão representados na Figura 26

Figura 26. Cromatogramas representativos dos tempos entre 6,5 e 37 minutos da aquisição de dados após o atraso do solvente para as marcas de café correspondentes ao grupo expresso. As diferentes cores dos cromatogramas representam as diferentes marcas (roxo – café Arpeggio; azul – café Barista; vermelho – café Forza).

Após a seleção dos metabólitos confiáveis, noventa metabólitos foram selecionados, identificados pelo número CAS e classificados segundo a sua classe na taxonomia química. Estas informações somadas à comparação do padrão de intensidade dos metabólitos entre as marcas podem ser observadas na Figura 27.

CLASSE QUÍMICA	METABÓLITOS	CAS	INTENSIDADE MÉDIA		
			ARPEGGIO	BARISTA	FORZA
Ácidos carboxílicos	Citric acid	77-92-9			
	Fumaric acid	110-17-8			
	Gamma-aminobutyric acid (GABA)	56-12-2			
	Maleic acid	110-16-7			
	Succinic acid	110-15-6			
Ácidos hidroxicinâmicos	Caffeic acid	331-39-5			
	Dimethyl caffeic acid	2316-26-9			
Ácidos tiocarboxílicos	(allylthio) Acetic acid	20600-63-9			
Alcalóides	Caffeine	58-08-2			
	Trigonelline 1	535-83-1			
	Trigonelline 2	535-83-1			
Álcoois e polióis	1,4-Butenediol	110-64-5			
	1,5-Pentanediol	111-29-5			
	2,3-Butanediol	513-85-9			
	3-O-Coumaroylquinic acid	1899-30-5			
	4-O-Feruloylquinic acid	2613-86-7			
	5-O-Feruloylquinic acid 1	1899-29-2			
	5-O-Feruloylquinic acid 2	1899-29-2			
	Chlorogenic acid 1	327-97-9			
	Chlorogenic acid 2	327-97-9			
	D-Pinitol	10284-63-6			
	Myo-inositol 1	87-89-8			
	Myo-inositol 2	87-89-8			
	Myo-Inositol phosphate	2831-74-5			
	Quinic acid	77-95-2			
	Quinic acid	86-68-0			
Benzenóides	1,2,4-Benzenetriol	533-73-3			
	2-Hydroxyphenethyl alcohol	7768-28-7			
	3-Ethynylaniline	54060-30-9			
	3-Hydroxybenzoic acid	99-06-9			
	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7			
	4-Methylcatechol	452-86-8			
	Benzoic acid	65-85-0			
	Pyrocatechol	120-80-9			
	Pyrogallol	87-66-1			
	Tyrosol	501-94-0			
Carboidratos	Arabinofuranose	13221-22-2			
	Cellobiose 1	528-50-7			
	Cellobiose 2	528-50-7			
	D-Altrose	1990-29-0			
	D-Glucuronic acid 1	6556-12-3			
	D-Glucuronic acid 2	6556-12-3			
	D-Mannose	3458-28-4			
	D-Ribose	50-69-1			
	D-Sorbitol	50-70-4			
	D-Tagatofuranose	87-87-0			
	D-Xylose	58-86-6			
	Ethyl α-D-glucopyranoside	3198-49-0			
	Galactinol	3687-64-7			
	Galactofuranosiduronic acid	150659-42-0			
	Galacturonic acid	14982-50-4			
	Glyceric acid	473-81-4			
	Glycerol	56-81-5			
	Lactose	5965-66-2			
	Lactulose	4618-18-2			
	Levoglucosan 1	498-07-7			
	Levoglucosan 2	498-07-7			
	L-Rhamnose	3615-41-6			
	Mannobiose	23745-85-9			
	Methyl galactoside	709-50-2			
	Ribitol 1	488-81-3			
	Ribitol 2	488-81-3			
	β-Gentiobiose	554-91-6

Figura 27. Caracterização dos metabólitos representativos do grupo expresso. Os metabólitos estão caracterizados pela classe segundo a classe química, nome do metabólito, número CAS e um padrão comparativo de intensidade, indicada por um mapa de cor, entre as marcas de café. Na elaboração do mapa de cor, inicialmente, os valores quantificados nas cinco amostras analisadas por marca de café, foram sujeitos ao cálculo da média para a obtenção da intensidade média de cada metabólito selecionado. Os dados foram armazenados em forma de tabela, onde os 90 metabólitos estão representados em linhas, as marcas de café (Arpeggio, Barista, Forza) em colunas e cada célula corresponde a um valor da média da intensidade. Em seguida, os valores de cada metabólito foram submetidos à escala de cor onde estão representados pelas cores vermelho, amarelo e verde as quais indicam intensidade máxima, intermediária e mínima dos metabólitos, respectivamente. Os valores ausentes, os quais não foram identificados em nenhuma das cinco amostras das marcas de café estão representados pelo símbolo “-”.

Em relação à distribuição dos 90 metabólitos selecionados nas três marcas do grupo, pode-se observar que dois metabólitos (*Cellobiose 2*, *Beta-Gentiobiose*) apresentaram identificação exclusiva no café Forza, enquanto cinco (*4-Methylcatechol*, *D-Mannose*, *Mevalonic acid*, *Tyrosol*, *D-Altrose*) estão ausentes em algumas das marcas e 83 metabólitos estão presentes em todas elas. Esta distribuição pode ser observada no diagrama de Venn da Figura 28.

Figura 28. Diagrama de Veen da distribuição dos metabólitos entre as marcas do grupo expresso. Cada conjunto colorido apresentado na figura acima representa uma marca de café do grupo (verde – café Arpeggio; azul – café Barista; roxo – café Forza). Entre os 90 metabólitos selecionados, 83 metabólitos estão presentes em todas elas. 2 deles apresentaram exclusividade no café Forza (*Cellobiose 2*, *Beta-Gentiobiose*) e 5 estão ausentes em algumas marcas ($\text{Arpeggio} \cap \text{Barista} = 4\text{-Methylcatechol}$, *D-Mannose*, *Mevalonic acid*, *Tyrosol*; $\text{Arpeggio} \cap \text{Forza} = D\text{-Altrose}$).

Cinquenta e três metabólitos foram diferentemente significativos entre as três marcas de café. Na Figura 29 estão ilustradas as intensidades dos metabólitos por meio do *heatmap* e a divisão de dois conjuntos pela análise hierárquica de agrupamentos, a qual se pode observar que os 9 metabólitos do conjunto 1 apresentaram baixa intensidade no café Forza em relação às demais marcas, enquanto nos 44 metabólitos do conjunto 2, ocorreu o inverso. Além disso, foi observada a similaridade no perfil metabolômico dos cafés Arpeggio e Barista os quais foram diferentes do café Forza.

Figura 29. Agrupamento hierárquico e *heatmap* dos metabólitos com concentração relativamente diferente no grupo expresso. Os 53 metabólitos estão representados nas linhas, as marcas de café em colunas (vermelho – café Arpeggio; verde – café Barista; azul escuro – café Forza) e cada célula corresponde a um valor de concentração relativa de cada amostra (1–5). A intensidade da concentração relativa de cada metabólito (alta, intermediária ou baixa) está indicada na escala de cor (-3 – 3) representada pelas cores vermelho, preto e verde. Dois agrupamentos resultaram da similaridade dos perfis metabólicos de cada marca e do comportamento destes metabólitos entre elas. No conjunto 1 (9 metabólitos), foi observado que os metabólitos do café Forza encontram-se em alta concentração relativa comparados as outras marcas e no conjunto 2 (44 metabólitos) ocorreu o inverso. Além disso, o café Forza apresentou um perfil metabólico diferente dos cafés Barista e Arpeggio.

Após a verificação das possíveis funções moleculares e celulares envolvidas nos dois conjuntos de metabólitos significativamente diferentes, foi observado que embora

ambos os conjuntos estejam envolvidos no ciclo e morfologia celular, eles apresentam algumas funções diferenciais descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Funções a nível molecular e celular que envolvem os dois conjuntos de metabólitos determinados pela análise hierárquica de agrupamentos do grupo expresso.

CONJUNTO	FUNÇÕES MOLECULARES E/OU CELULARES	p-VALOR	METABÓLITOS
1	Ciclo celular	0,007 - 0,004	Mevalonic acid; GABA
	Morfologia celular		
	Aglomerção e organização celular	0,048 - 0,004	Mevalonic acid; GABA; D-Mannose
	Sinalização e interação célula-célula		
	Desenvolvimento celular	0,040 - 0,004	Mevalonic acid; GABA; 4-Methylcatechol; Chlorogenic acid
2	Metabolismo de lipídeos	0,044 - 0,000	4-Hydroxybenzoic acid; Benzoic acid; Caffeic acid; Nicotinic acid; Palmitic acid; Uridine; Ribose
	Transporte molecular		
	Bioquímica de pequenas moléculas	0,048 - 0,000	Caffeine; Chlorogenic acid; Palmitic acid; Sorbitol; Trigonelline; Nicotinic acid; Uridine
	Morfologia celular		
	Ciclo celular	0,027 - 0,006	Palmitic acid; Sorbitol
		0,044 - 0,009	3-Hydroxypyridine; Caffeine; Palmitic acid

4.2.3 Café tradicional versus café expresso

Para avaliar as semelhanças e diferenças metabólicas apresentadas pelos métodos de preparo tradicional e expresso, foram utilizados todos os metabólitos presentes em todas as marcas de ambos os grupos. Após a junção entre estes metabólitos foi obtido um novo conjunto de dados contendo 102 metabólitos.

No diagrama de Venn da Figura 30, pode-se observar que a distribuição dos metabólitos demonstrou que a maioria deles está presente em ambos os grupos. Entretanto, 34% do total dos metabólitos demonstraram ser específicos de determinado tipo de café, sendo 19 metabólitos do café tradicional e 16 metabólitos do café expresso.

Figura 30. Diagrama de Venn da distribuição dos metabólitos entre o grupo tradicional e expresso. Dos 102 metabólitos totais, 67 deles estão presentes nos dois grupos, enquanto 19 metabólitos estão presentes apenas nas marcas de café tradicional e 16 estão presentes somente no café expresso. Os metabólitos exclusivos de cada tipo de café estão descritos na tabela abaixo.

Por meio da análise de biologia de sistemas realizada nos 67 metabólitos presentes em todas as marcas, foi possível verificar quais respostas e/ou alterações nas vias metabólicas o consumo de café pode promover, independentemente da marca e tipo consumido. Na Tabela 9 estão descritos os metabólitos que demonstraram estar envolvidos entre seis funções a nível molecular e celular.

Tabela 9. Funções a nível molecular e celular envolvidas aos metabólitos presentes em ambos os grupos tradicional e expresso.

FUNÇÕES MOLECULARES E/OU CELULARES	p-VALOR	METABÓLITOS
Metabolismo de lipídeos	0,021	Citric acid; Erucic acid; Nicotinic acid; Palmitic acid; α -Ketoisocaproic acid
Transporte molecular	0,016	Caffeine; Chlorogenic acid; Lactulose; Malic acid; Succinic acid
Bioquímica de pequenas moléculas	0,033	Malic acid; Palmitic acid; Succinic acid
Metabolismo de ácidos nucleicos	0,002	Citric acid; Palmitic acid; α -Ketoisocaproic acid
Metabolismo de carboidratos	0,046	Caffeine; Citric acid; Glycerol; Lactic acid; Palmitic acid
Eliminação de radicais livres	0,041	Caffeine; Catechol; Chlorogenic acid; Lactic acid; Malic acid; Palmitic acid; Pyrogallol; Sorbitol; Succinic acid; Uridine

Na análise de redes gerada pelo programa *Ingenuity*, representada na Figura 31, os metabólitos semelhantes entre o café tradicional e expresso foram associados com proteínas, fatores de transcrição e outros metabólitos, dos quais merece destaque o fator nuclear kappa B (NF κ B; do inglês, *Nuclear Factor-Kappa B*), a lipoproteína de alta densidade (HDL; do inglês, *High Density Lipoproteins*), o peróxido de hidrogênio, a dopamina e a insulina.

O modo de preparo do café pode influenciar na composição bioquímica da bebida e consequentemente atuar em diferentes vias metabólicas. Comparando a composição química entre o café tradicional e o café expresso por meio das porcentagens dos metabólitos em cada uma das 17 classes caracterizadas, foram observadas pequenas diferenças entre as bebidas. A maioria destes metabólitos pertence, em quantidade similar entre os grupos de cafés, aos carboidratos, alcoóis e polióis e lipídeos, enquanto os benzenóides e os ácidos carboxílicos demonstraram ter porcentagens diferentemente perceptíveis. Estes resultados estão representados em um gráfico de barras na Figura 32.

O modo de preparo do café pode influenciar na composição bioquímica da bebida e consequentemente atuar em diferentes vias metabólicas. Comparando a composição química entre o café tradicional e o café expresso por meio das porcentagens dos metabólitos em cada uma das 17 classes caracterizadas, foram observadas pequenas diferenças entre as bebidas. A maioria destes metabólitos pertence, em quantidade similar entre os grupos de cafés, aos carboidratos, alcoóis e polióis e lipídeos, enquanto os benzenóides e os ácidos carboxílicos demonstraram ter porcentagens diferentemente perceptíveis. Estes resultados estão representados em um gráfico de barras na Figura 32.

Figura 32. Porcentagem de metabólitos disponíveis nos cafés tradicionais e expressos segundo a classe. No gráfico apresentado acima, a porcentagem de metabólitos contidos nas classes químicas estão representadas pelas barras azuis e vermelhas, os quais correspondem ao grupo tradicional e grupo expresso, respectivamente. A porcentagem de cada classe corresponde ao número total de metabólitos contidos na mesma, baseado no número total de metabólitos de cada grupo, 86 do grupo expresso e 83 do grupo tradicional. A maioria dos metabólitos em ambos os grupos são carboidratos, álcoois e polióis e lipídeos os quais mostraram porcentagens similares entre eles. Os metabólitos do grupo expresso apresentaram maior porcentagem em benzenóides, enquanto os ácidos carboxílicos demonstraram estar em menor porcentagem, em comparação ao grupo tradicional.

Para verificar quais metabólitos promovem as diferenças nos perfis metabolômicos do café tradicional e do café expresso, foi aplicado o teste *Wilcoxon* não-paramétrico utilizando as áreas sob a curva dos 102 metabólitos que resultou em 76 metabólitos com intensidades diferentemente significativas entre as marcas. Por meio da análise hierárquica de agrupamentos foi possível observar a formação de dois grupos distintos, tradicional e expresso, demonstrando que os perfis metabolômicos destes tipos de café são diferentes. Além disso, dois conjuntos foram formados baseados na comparação da intensidade dos metabólitos entre os grupos. O conjunto 1, formado por 29 metabólitos, apresentou alta intensidade nas amostras do café tradicional, enquanto no conjunto 2, os 47 metabólitos apresentaram uma relação inversa. Na Figura 33 estão

representados os dois agrupamentos obtidos durante a análise hierárquica de agrupamentos baseado na comparação das intensidades dos metabólitos significativos por teste *Wilcoxon* não-paramétrico com seus respectivos p-valores.

Figura 33. Agrupamento hierárquico e *heatmap* dos metabólitos com concentração relativa significativamente diferente na comparação entre os cafés tradicional e expresso. Os 76 metabólitos estão representados nas linhas, os tipos de café em colunas (vermelho – café expresso; verde – café tradicional) e cada célula corresponde a um valor de concentração relativa de cada amostra. A intensidade da concentração relativa de cada metabólito (alta, intermediária ou baixa) está indicada na escala de cor (-4 – 4) representada pelas cores vermelho, preto e verde. Dois agrupamentos resultaram da similaridade dos perfis metabólicos de cada tipo de café e do comportamento destes metabólitos entre as amostras. No conjunto 1 (29 metabólitos), foi observado que os metabólitos encontram-se em alta concentração relativa no café tradicional comparados ao café expresso e no conjunto 2 (47 metabólitos) ocorreu o inverso. Além disso, o café tradicional apresentou um perfil metabólico diferente do café expresso.

No intuito de avaliar as diferenças no perfil metabólico influenciadas pelo método de preparo tradicional e expresso, também foram avaliadas as funções a nível molecular e celular representativas dos metabólitos presentes de maneira específica em cada grupo de café. Apesar de em ambos os tipos de café, os metabólitos demonstrarem estar comumente envolvidos no ciclo, aglomeração e organização celular e na sinalização e interação célula-célula, os metabólitos que as representam são diferentes. Além disso, os metabólitos exclusivos do café tradicional mostram representatividade na função de metabolismo de carboidratos e crescimento e proliferação celular, não demonstrada pelo café expresso, bem como os metabólitos exclusivos do café expresso apresentam representatividade na morfologia celular diferentemente do café tradicional. As funções de cada grupo estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Funções a nível molecular e celular envolvidas aos metabólitos presentes somente no grupo tradicional ou expresso.

GRUPO	FUNÇÕES MOLECULARES E/OU CELULARES	p-VALOR	METABÓLITOS
Tradicional	Metabolismo de carboidratos	0,007 - 0,048	4-Aminophenol; Lactic acid
	Crescimento e proliferação celular	0,003 - 0,040	Lactic acid; Mevalonic acid; Scyllo-inositol
	Ciclo celular	0,004	Mevalonic acid
	Sinalização e interação célula-célula	0,004 - 0,048	Lactic acid; Mevalonic acid
	Aglomeração e organização celular	0,007 - 0,022	4-Aminophenol; Mevalonic acid; Scyllo-inositol
Expresso	Ciclo celular		
	Morfologia celular	0,004	GABA
	Desenvolvimento celular		
	Sinalização e interação célula-célula	0,004 - 0,037	GABA; Lactose
	Aglomeração e organização celular		

Com intuito de avaliar o comportamento dos metabólitos considerados como os principais compostos bioativos do café entre as suas marcas e os tipos avaliados neste estudo, foram selecionados os metabólitos mais descritos na literatura por suas atividades biológicas. Em seguida, foi realizada a média do valor da área sob a curva de cada um destes metabólitos por marca de café, aos quais foram submetidas ao *heatmap*. Por meio desta análise foi possível observar que estes metabólitos apresentam intensidade variada entre as marcas em ambos os tipos de café. Entretanto, o Café Forza apresentou, de maneira global, uma maior intensidade de ácidos clorogênicos como também para os metabólitos *Trigonelline*, *Caffeic acid* e *Quinic acid*. Estes perfis estão demonstrados na Figura 34.

Figura 34. *Heatmap* do grupo tradicional e expresso com os principais metabólitos do café. Nos dados apresentados acima estão representados os metabólitos em linhas, os grupos em colunas (vermelho – grupo expresso; verde – grupo tradicional) e o valor da intensidade média de cada marca de café nas células. Este valor da intensidade média foi obtido por meio do cálculo da média das cinco amostras em cada marca de café. Os valores ausentes foram substituídos pela metade do valor mínimo da tabela original. A escala de cor formada pelas cores vermelha, preto e verde tem como função indicar a cada intensidade média correspondente pode ser alta (vermelho), intermediária (rosa) e baixa (azul). Os metabólitos foram considerados como principais por serem os mais descritos na literatura com base nas suas atividades biológicas.

4.3 Sumário de resultados

4.3.1 Estudo de Intervenção Nutricional

- I. A análise metabolômica nas amostras de soro do grupo café permitiu a identificação, a partir de 6 horas, dos metabólitos descritos como específicos da ingestão de café: *Quinic acid*, *m-Hydrocoumaric acid* e *Caffeine*. Estes metabólitos apresentaram diferentes perfis de comportamento ao longo de 24 horas.
- II. O *Quinic acid* e o *Methylmalonic acid* foram significativamente presentes em todos os tempos após a ingestão de café na maioria dos indivíduos do grupo café, demonstrando serem fortes candidatos à biomarcadores séricos da ingestão de café.
- III. As comparações entre os grupos café e controle no decorrer dos tempos mostraram diferentes respostas do perfil metabolômico de aminoácidos, carboidratos e lipídeos, promovidas pelos fatores tempo e grupo como também sua interação.
- IV. Os aminoácidos *4-Hydroxyproline 1*, *L-Alanine 1*, *L-Cystine 3*, *L-Methionine 1* e *L-Threonine 2* apresentaram diferentes perfis de comportamento no grupo café ao longo de 24 horas, em relação ao grupo controle.

4.3.2 Estudo comparativo de diversas marcas de café

Café tradicional

- I. As marcas de café demonstraram serem diferentes em relação ao seu perfil metabolômico. Os cafés 3 Corações e Melitta apresentaram maior similaridade entre si.
- II. Foram identificados dois conjuntos de metabólitos pela análise hierárquica de agrupamentos a partir daqueles significativamente diferentes entre as marcas que se diferem quanto à intensidade entre o café Prima Qualitá e as demais marcas. Esta diferença também é evidenciada na análise de biologia de sistemas.

Café expresso

- I. O café Forza demonstrou ser diferente das demais marcas, apresentando a Cellobiose 2 e Beta-Gentiobiose como metabólitos exclusivos.
- II. Dois conjuntos de metabólitos também foram observados pela análise hierárquica de agrupamentos a partir daqueles significativamente diferentes entre as marcas. O conjunto 1 apresentou maior intensidade no café Forza comparada as demais marcas, e o conjunto 2 o inverso. Essa diferença foi refletida também na análise de funções moleculares e celulares.

Café tradicional versus Café expresso

- I. Foi possível identificar alguns metabólitos específicos para cada preparo de café tradicional e expresso.
- II. Os metabólitos comuns do café, independente de marca e tipo de preparo demonstraram associação com o metabolismo de carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos, transporte molecular, bioquímica de pequenas moléculas e na eliminação de radicais livres. A análise de redes associou esses metabólitos principalmente com NFκB, HDL, peróxido de hidrogênio, dopamina e insulina.
- III. Os metabólitos específicos dos diferentes tipos de cafés demonstraram algumas funções moleculares diferentes.
- IV. A maioria destes metabólitos pertence aos carboidratos, alcoóis e polióis e lipídeos e não houve diferença na porcentagem deles entre o café tradicional e expresso. No entanto, foi observada a diferença na porcentagem dos benzenóides e ácidos carboxílicos.
- V. O perfil metabolômico entre o café tradicional e o café expresso foi diferente.
- VI. A intensidade dos principais compostos bioativos do café foi diferente entre os dois tipos e suas marcas.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Estudo de intervenção nutricional

A partir da análise metabolômica por CG-EM não direcionada aplicada nas amostras de soro de indivíduos saudáveis após a ingestão controlada de café, foram identificados três compostos considerados como específicos do café e candidatos à biomarcadores da ingestão deste alimento. Além disso, com a ingestão do café, foi observada a elevação no perfil de alguns aminoácidos ao longo de 24 horas.

Na literatura estão publicados diversos estudos de metabolômica direcionada para a identificação de compostos específicos do café e seus principais metabólitos, principalmente, cafeína e ácidos clorogênicos, bem como sua farmacocinética após a ingestão deste alimento (STALMACH et al., 2014; MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2014; KUWAYAMA et al., 2013; NAGY et al., 2011; REDEUIL et al., 2011; STALMACH, A. et al., 2009). A execução experimental destes estudos utiliza o método CL-EM/EM para a análise de matrizes biológicas como soro e urina. Entretanto, com a metabolômica CG-EM não direcionada, também foi possível identificar alguns dos compostos específicos do café como a cafeína, o ácido m-hidrocoumárico e o ácido quínico, precursor dos ácidos clorogênicos, além de outros metabólitos associados a esta ingestão.

Dentre os compostos específicos do café, a cafeína é a mais conhecida e estudada devido ao seu potente efeito estimulante. Apesar do tempo de meia vida da cafeína no organismo ser normalmente entre 3 e 7 horas (MEJIA & RAMIREZ-MARES, 2014), este metabólito foi identificado em 7 indivíduos nos tempos 6 e/ou 12, sugerindo que eles podem ter uma metabolização tardia.

O ácido m-hidrocoumárico também esteve presente nos tempos 6 e 12 em 30% e 17% do total dos indivíduos, respectivamente, demonstrando ser um bom candidato à biomarcador em 6 horas após a ingestão de café. Este metabólito já foi descrito como

um dos principais metabólitos da ingestão de ácido cafeico (KONISHI & KOBAYASHI, 2004), principal representante dos ácidos hidroxycinâmicos na formação dos ácidos clorogênicos no café que apresenta atividades antioxidantes e efeitos antimutagênicos observados in vitro (SCALBERT et al., 2002; RICE-EVANS et al., 1996). A formação do ácido m-hidrocoumárico ocorre pela microflora intestinal, sendo posteriormente transportado pelo transportador de ácido monocarboxílico (MCT) e absorvido nas células intestinais Caco-2 ou em outros tecidos alvos, como por exemplo, no fígado, onde é biotransformado em ácido 3-hidroxihipúrico (KONISHI & KOBAYASHI, 2004; RECHNER et al., 2001). O ácido 3-hidroxihipúrico e o ácido hipúrico foram descritos como biomarcadores inespecíficos da absorção e metabolização de compostos hidroxycinâmicos do café pela microflora intestinal (RECHNER et al., 2001).

Entre os três compostos específicos do café identificados, podemos destacar o ácido quínico (QA) por estar significativamente presente na maioria dos indivíduos do grupo café após o jejum, sendo um ótimo candidato à biomarcador de ingestão de café. Assim como o ácido cafeico, o QA está presente no café tanto na forma livre quanto ligado aos ácidos hidroxycinâmicos, formando os ácidos clorogênicos, além de contribuir no seu sabor e aroma (MARRUBINI et al., 2015; UPADHYAY & MOHAN RAO, 2013). Após a ingestão, o QA é metabolizado pela microbiota intestinal, por meio da via do chiquimato, seguido da absorção e conversão em ácido hipúrico no soro ou excretada na urina de forma inalterada. Pero e colaboradores (2009) observaram que a ingestão de QA exerce a atividade antioxidante com a inibição NF- κ B e aumento do reparo do DNA devido ao aumento da produção de triptofano e nicotinamida pela via do chiquimato.

Além dos compostos específicos do café, o metabólito *Methylmalonic acid* (MMA) também demonstrou estar significativamente presente na maioria dos indivíduos do grupo café após o jejum. O MMA é um metabólito derivado do malonato produzido durante o catabolismo de aminoácidos na mitocôndria. A presença deste metabólito pode estar associada ao constante aumento dos níveis dos aminoácidos *4-Hydroxyproline 1*, *L-Alanine 1*, *L-Cystine 3*, *L-Methionine 1* e *L-Threonine 2*, observados em nossos resultados.

Este estudo é de extrema relevância por se tratar da análise do metaboloma em um grupo homogêneo de homens saudáveis com controle da ingestão de café, ao invés

de avaliar o consumo auto-relatado. Para validar os achados deste trabalho, serão necessários novos estudos metabolômicos de intervenção nutricional em uma população maior.

5.2 Estudo comparativo de diversas marcas de café

No estudo comparativo, fornecemos evidências de que ocorreram diferenças entre os perfis metabolômicos entre o café tradicional e expresso, bem como dentre suas diversas marcas, os quais apresentaram separação por marcas específicas, após as análises metabolômicas utilizando o método CG-EM.

Estas diferenças podem estar diretamente relacionadas a diversos fatores durante o processamento destes produtos, tais como a origem, espécie e quantidade de matéria-prima utilizada, bem como o grau de torrefação e o método de preparação da bebida (MEJIA & RAMIREZ-MARES, 2014; FARAH, 2012; CLARKE, 2003). No entanto, o foco deste estudo são as diferenças nos perfis metabolômicos de diversos cafés. Apesar da diferença entre os perfis metabólicos, somente o café expresso apresentou compostos específicos em uma de suas marcas, Cellobiose 2 e Beta-Gentiobiose, os quais são açúcares formados a partir da degradação da celulose e da caramelização da glicose, provavelmente originados durante o processo de torrefação dos grãos. Estes compostos também são classificados como prebióticos, ou seja, componentes alimentares não digeríveis pelos humanos e fermentados pelos microorganismos no intestino, estimulando a proliferação seletiva e/ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon (AL-SHERAJI et al., 2013; SARKAR, 2007). Diversos estudos experimentais e epidemiológicos sugerem que os prebióticos apresentam efeitos benéficos atribuídos à modulação de funções fisiológicas chaves, tais como a composição da microbiota intestinal, a absorção de minerais, o metabolismo lipídico, os quais exercem papel primordial na redução do risco de diversas doenças como o câncer de cólon, osteoporose e arteriosclerose (KAUR & GUPTA, 2002; ROBERFROID, 2002; PARK & KROLL, 1993).

Graças aos resultados controversos e/ou de conotação negativa em estudos baseados nos efeitos agudos da cafeína, entre eles a elevação da pressão arterial,

glicemia e dos níveis séricos de homocisteína, colesterol e epinefrina (ULVIK et al., 2008; GOTTELAND & DE PABLO V, 2007; UMEMURA et al., 2006), o café também sido considerado como um fator de risco cardiovascular pela comunidade científica (LIMA et al., 2011; ALVES et al., 2009). Os efeitos da cafeína dependem da variabilidade interindividual na tolerância, metabolização deste metabólito e quantidade ingerida. Estudos já mostraram que a variação no metabolismo da cafeína é dependente de quatro fatores principais, os quais incluem os polimorfismos genéticos na CYP1A2, indução e inibição metabólica do citocromo P450, peso e sexo do indivíduo e a presença de doenças hepáticas (MINERS & MCKINNON, 2000). Já, em relação à dose contida na ingestão do café, nosso trabalho mostra que a concentração relativa de cafeína varia entre diversas marcas e método de preparo do café, demonstrando ser de extrema importância o conhecimento destes para avaliação dos efeitos fisiológicos, especialmente os cardiovasculares.

Além dos efeitos agudos da cafeína, outros compostos disponíveis no café podem estar envolvidos em diversos processos chave no desenvolvimento das doenças cardiovasculares como o acúmulo de colesterol sérico, estresse oxidativo, inflamação, formação de lesões na parede arterial e dano tecidual (LIMA et al., 2011; ALVES et al., 2009; STOCKER & KEANEY, 2004). Os resultados obtidos por meio da análise de redes neste estudo sugerem que os metabólitos presentes no café, de maneira independente da marca e método de preparo, estão altamente conectados com o HDL, NFκB e peróxido de hidrogênio, os quais são relacionados ao processo inflamatório, síntese de espécies reativas de oxigênio e concentração sérica de colesterol no desenvolvimento da aterosclerose e estresse oxidativo (CORRÊA-CAMACHO, 2007; WINTHER et al., 2005; MOLAVI & MEHTA, 2004).

Diversos estudos consideram que os efeitos benéficos promovidos por outros compostos disponíveis do café, principalmente as atividades antioxidantes e antiinflamatórias dos ACGs, podem compensar os efeitos nocivos causados no sistema cardiovascular (O'KEEFE et al., 2013; BONITA et al., 2007; CORNELIS et al., 2006; SUDANO et al., 2005). Entretanto, os compostos responsáveis pelos efeitos benéficos do café, os quais incluem os ACGs, trigonelina, ácido cafeico e o ácido quínico, também apresentaram concentrações relativas diferentes entre as marcas e os tipos de café. Estes resultados sugerem, novamente, que a realização das atividades biológicas

destes metabólitos é dependente não só da variabilidade na metabolização interindividual, mas também do tipo de café e preparo da bebida consumida.

Assim, as diferenças nos perfis metabólitos de diversos cafés demonstraram a importância do conhecimento das marcas e preparo dos cafés para futuros estudos avaliando o seu consumo e quem sabe colaborar para uma concordância literária sobre os principais benefícios e malefícios gerados pela ingestão de café as doenças cardiovasculares. Os fatores determinantes nestas variações metabólicas podem ser elucidados a partir de novos estudos com uma maior variedade de tipos, marcas e lotes de cafés comercializados.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A caracterização do metaboloma em um grupo homogêneo de indivíduos saudáveis permitiu identificar candidatos à biomarcadores e alterações no perfil de alguns aminoácidos após a ingestão controlada de café. Assim, a identificação de candidatos à biomarcadores de efeito agudo do café mostra a importância de validar um painel com biomarcadores de alta confiabilidade e que possam colaborar com futuros estudos de intervenção nutricional, não apenas baseado do consumo de café reportado.

Além disso, diferentes métodos de preparo do café, tradicional e expresso, bem como as diversas marcas analisadas, apresentaram diferença nos seus perfis metabolômicos. Desta forma, este estudo também pode ressaltar a importância de se considerar não somente a quantidade, mas também o tipo e a marca de café consumido como fatores de exposição em estudos de intervenção nutricional e de associação entre o consumo de café e seus efeitos no organismo.

ANEXOS

7 ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, RG _____ estou ciente dos objetivos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa denominada “PESQUISA DA VARIABILIDADE METABOLÔMICA DO CONSUMO DE CAFÉ, CHOCOLATE E CASTANHA DO BRASIL POR PERFIS METABOLÔMICOS” desenvolvido sob a orientação da professora Dr^a. Cristiane da Silva Marciano Grasselli e dos pesquisadores Dr. Alexandre da Costa Pereira (INCOR-USP), Dr. Paulo Caleb Júnior de Lima Santos (INCOR-USP) desenvolvida pela aluna do Curso de Nutrição da Universidade Federal de Alfenas- MG, Unifal-MG, Mayara Almeida Ribeiro.

Estou ciente dos procedimentos e concordo em me submeter aos seguintes procedimentos:

- Anamnese.
- Avaliação nutricional antropométrica e dietética;
- Avaliação da Taxa metabólica de repouso;
- Coleta de sangue e urina para avaliação de biomarcadores por perfis metabólicos.

Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que: A) o estudo será realizado a partir dos procedimentos citados acima; B) que não haverá riscos para minha saúde, C) que posso consultar os pesquisadores responsáveis em qualquer época, para esclarecimento de qualquer dúvida; D) que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e que não preciso apresentar justificativas para isso; E) que todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e que estes somente serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas sem a minha identificação; F) que não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrente da pesquisa. Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão, assinando o presente documento que segue em duas vias, uma para o pesquisador e outra para o participante.

Contato do Pesquisador Responsável:

Profa. Dra. Cristiane da Silva Marciano Grasselli - email: cgrasselli@unifal-mg.edu.br, csmgrasselli@gmail.com. Faculdade de Nutrição da Unifal-MG - Sala H-207 – Tel: 35 3299-1106 ou 3299-1391. Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Centro – CEP: 37130-000

Alfenas, ____ de _____ de _____.

(Assinatura do voluntário)

(Assinatura do pesquisador responsável)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO

Declaro para todos os fins que o projeto intitulado "PESQUISA DA VARIABILIDADE INTERINDIVIDUAL DO CONSUMO DE CAFÉ, DE CHOCOLATE E DE CASTANHA DO BRASIL" foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL-MG, recebendo o parecer **APROVADO**, conforme registro em Ata da 93ª. Reunião, de 06 de março de 2012, protocolo N° 005/2012.

Alfenas, 13 de março de 2012.

Profa. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Coordenador do CEP

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIS METABOLÔMICOS DA INGESTÃO DE CAFÉ/ CHOCOLATE/CASTANHA-DO-BRASIL

Pesquisador: Alexandre da Costa Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 59611116.7.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.795.009

Apresentação do Projeto:

Projeto bem escrito, com clareza nas argumentações e desenho.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar os perfis metabólicos de diferentes marcas de café, chocolate ou castanha-do-brasil, bem como identificar as alterações no perfil metabólico de diferentes indivíduos após o consumo controlado destes alimentos.

Objetivos específicos

Pretende-se:

- 1) caracterizar os perfis metabólicos de quatro marcas de café, chocolate e castanha-do-brasil;
- 2) identificar variações na metabolização dos compostos dos alimentos teste;
- 3) identificar e quantificar os metabólitos advindos da ingestão dos alimentos teste em amostras de soro e urina dos indivíduos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios superam os riscos ao sujeito de pesquisa.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

ORIENTAÇÕES DIETÉTICAS PARA O PERÍODO QUE ANTECEDE E NO DIA DA COLETA

- ✚ Jejum de 10 horas (alimentar e de água) antes da coleta de sangue e de urina da manhã do período 0 e 24 horas (primeiro e segunda dias respectivamente);
- ✚ Coleta da urina deve ser a primeira do dia e deverá ser feita no laboratório da Unifal, onde será realizada a coleta de sangue;
- ✚ **ATENÇÃO** aos **ALIMENTOS** que **NÃO** deverão ser **CONSUMIDOS** no período de 36 horas que precedem a primeira coleta de sangue:
 - Suco de frutas natural e frutas (todas);
 - Verduras e leguminosas (alface, tomate, feijão, cenoura, batata, beterraba, soja e todos os outros vegetais);
 - Ovo;
 - Chocolate, café e castanhas;
 - Refrigerantes.

Exemplo de Cardápio para ser seguido no dia que antecede e no dia da Coleta

Café da manhã

1 copo de leite
1 pão Francês com margarina

Colação

1 pote de iogurte natural

Almoço

8 col. sopa de arroz
1 filé de frango grelhado
1 copo de suco artificial

Lanche

1 fatia de bolo simples
4 pães tipo bisnaguinha com requeijão

Jantar

4 pegador de servir de macarrão simples
6 col. sopa de carne moída

Ceia

1 copo de leite
8 rosquinhas de nata

Sua participação para as coletas ficou marcada para:

Data: 12/04/2014

Dia da semana: Segunda

Horários:

Tempo 0: 08:00

Tempo 6: 14:00

Tempo 12: 19:00

Tempo 24: 07:00

Desenho experimental do Estudo de intervenção nutricional

Desenho experimental do Estudo comparativo de diversas marcas de café

1. PREPARAÇÃO DAS BEBIDAS

Grupo Tradicional

Método de preparo:
Percolação simples
Receita:
20g de pó de café
250mL água filtrada e aquecida

Grupo Espresso

Método de preparo: cafeteira
Receita: de acordo com as instruções do fabricante

2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Extração dos metabólitos

- 5 alíquotas de cada marca

Liofilização

- Secagem completa do conteúdo em 18 horas

Derivação química

- Metoxiamininação
- Trimetilsilação

3. AQUISIÇÃO DE DADOS

CG-EM AGilent
(7890B GC: 5977A MS)

- 3 replicatas técnicas
- Amostras randomizadas

Processamento dos dados, identificação e quantificação relativa dos metabólitos

- Software Unknowns – Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis (version B.07.00)
- Bibliotecas Fiehn 2013 e NIST 14

4. SELEÇÃO DOS METABÓLITOS

- Exclusão de contaminantes e metabólitos de baixa confiabilidade

5. CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS

- Classe química
- Número CAS
- Padrão de intensidade
- Distribuição dos metabólitos entre as marcas
- Seleção dos principais compostos bioativos do café com base na literatura

6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Programa online MetaboAnalyst
(versão 3.0)

- One-way ANOVA
- Teste Wilcoxon não-paramétrico
- Análise hierárquica de agrupamentos
- Heatmap

INGENUITY
PATHWAY ANALYSIS

- Biologia de sistemas

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

ACTIS-GORETTA, L. et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 229–234, 2006.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library**. 2013.

AL-SHERAJI, S. H. et al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542–1553, 2013.

ALVES, R. C. et al. Benefícios do café na saúde: Mito ou realidade? **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2169–2180, 2009.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 2–3, p. 145–149, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). **Indicadores da indústria de café no Brasil – 2017**. Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2017/>>. Acesso em: 08 jun. 2018a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). **Desempenho do setor**. Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/desempenho-do-setor/>>. Acesso em: 08 jun. 2018b.

BAE, J. H. et al. Coffee and health. **Integrative Medicine Research**, v. 3, n. 4, p. 189–191, 2014.

BAKURADZE, T. et al. Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell-free systems and human colon cell lines. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 12, p. 1734–43, 2010.

BELITZ, H.-D. et al. Coffee, Tea, Cocoa. In: BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. (Ed.). **Food Chemistry**. 4th. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 938–969.

BENOWITZ, N. L. Clinical Pharmacology of Caffeine. **Annual Review of Medicine**, v. 41, n. 1, p. 277–288, 1990.

BONITA, J. S. et al. Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 187–198, 2007.

BORRELLI, R. C. et al. Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Coffee Melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6527–6533, 2002.

BROWN, H.; PRESCOTT, R. **Applied Mixed Models in Medicine**. 2nd ed. New York: Wiley, 2006

BROWNING, S. L. et al. CYP1A2 is more variable than previously thought: a genomic biography of the gene behind the human drug-metabolizing enzyme. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 20, n. 11, p. 647–664, 2010.

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. Coffee and its consumption: benefits and risks. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 51, n. 4, p. 363–373, 2011.

CAGLIANI, L. R. et al. Quantification of Coffea arabica and Coffea canephora var. robusta in roasted and ground coffee blends. **Talanta**, v. 106, p. 169–173, 2013.

CALANI, L. et al. Colonic Metabolism of Polyphenols From Coffee, Green Tea, and Hazelnut Skins. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, p. S95–S99, 2012.

CANO-MARQUINA, A. et al. The impact of coffee on health. **Maturitas**, v. 75, n. 1, p. 7–21, 2013.

CLARKE, R. J. Roast and Ground. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. (Ed.). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2 ed ed. Oxford: Academic Press, 2003. p. 1487–1493.

CLAUS, S. P. Development of personalized functional foods needs metabolic profiling. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 17, n. 6, p. 567–573, 2014.

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

CONSELHO DE EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL (CECAFÉ). **Consumo mundial de café em milhares de sacas de 60kg segundo a Organização Internacional de Café**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publicue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#5103>>. Acesso em: 12 out. 2016.

CORNELIS, M. C. et al. Coffee, CYP1A2 Genotype, and Risk of Myocardial Infarction. **JAMA**, v. 295, n. 10, p. 1135, 2006.

CORNELIS, M. C. Toward systems epidemiology of coffee and health. **Current Opinion in Lipidology**, v. 26, n. 1, p. 20–29, 2015.

CORNELIS, M. C. et al. Metabolomic response to coffee consumption: Application to a three-stage clinical trial. **Journal of Internal Medicine**, v. 38, n.

1, p. 42–49, 2018.

CORRÊA-CAMACHO, C. et al. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arquivos de Ciências e Saúde**, v. 14, n. 1, p. 41–48, 2007.

DAGLIA, M. et al. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1449–1454, 2000.

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**, v. 56, n. 24, p. 11653–60, 2008.

DE ROOS, B. et al. Absorption and urinary excretion of the coffee diterpenes cafestol and kahweol in healthy ileostomy volunteers. **Journal of Internal Medicine**, v. 244, n. 6, p. 451–460, 1998.

DEL RIO, D. et al. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. **Nutrients**, v. 2, n. 8, p. 820–833, 2010.

DELGADO-ANDRADE, C.; MORALES, F. J. Unraveling the Contribution of Melanoidins to the Antioxidant Activity of Coffee Brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1403–1407, 2005.

DELGADO-ANDRADE, C. et al. Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7832–7836, 2005.

DETTMER, K. et al. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass spectrometry reviews**, v. 26, n. 1, p. 51–78, 2007.

DIETERLE, F. et al. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 13, p. 4281–4290, 2006.

DUNN, W. B. et al. Measuring the metabolome: current analytical technologies. **The Analyst**, v. 130, n. 5, p. 606–625, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Produção e consumo de café em nível mundial batem recordes no ano safra 2017/18**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/31371738/producao-e-consumo-de-cafe-em-nivel-mundial-batem-recordes-no-ano-safra-201718>>. Acesso em: 08 jun. 2018a.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Produção mundial de café atinge 160 milhões e consumo 159 milhões de sacas no ano cafeeiro 2017-2018**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/33568203/producao-mundial-de-cafe-atinge-160-milhoes-e-consumo-159-milhoes-de-sacas-no-ano-cafeeiro-2017-2018>>. Acesso em: 08 jun. 2018b.

ESPOSITO, F. et al. Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 17, n. 4, p. 595–601, 2003.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373–380, 2006.

FARAH, A. Coffee Constituents. In: CHU, Y.-F. (Ed.). **Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention**. First Edit ed. Oxford, UK: Blackwell, 2012. p. 21–58.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FIEHN, O. et al. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 11, p. 1157–1161, 2000.

FLAMENT, I. et al. Les composants furanniques de l'arôme café: quelques aspects chimiques et spectroscopiques. In: **Proc. 3rd Coll. Int. Coffee Sci.** [s.l.] ASIC, 1968. p. 197–215.

FLÓREZ, F. S. Historia del café. **Boletín Cultural y Bibliográfico**, v. 7, n. 9, p. 1604–1607, 1964.

FOGLIANO, V.; MORALES, F. J. Estimation of dietary intake of melanoidins from coffee and bread. **Food & Function**, v. 2, n. 2, p. 117, 2011.

FREDHOLM, B. B. Notes on the History of Caffeine Use. In: FREDHOLM, B. B. (Ed.). **Methylxanthines**. [s.l.] Springer, 2011. v. 200, p. 1–9.

FREEDMAN, N. D. et al. Association of Coffee Drinking with Total and Cause-Specific Mortality. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 20, p. 1891–1904, 2012.

GARCÍA-CANAS, V. et al. Advances in Nutrigenomics research: Novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 290–304, 2010.

GASSNER, A.-L. et al. Derivation of uncertainty functions from validation studies in biological fluids: Application to the analysis of caffeine and its major metabolites in human plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 121–130, 2014.

GERMAN, J. B. et al. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. **Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 3–9, 2005.

GIBNEY, M. J. et al. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. **The American journal of clinical nutrition**, v. 82, n. 3, p. 497–503, 2005.

GNIECHWITZ, D. et al. Isolation and characterisation of a coffee melanoidin fraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 12, p. 2153–2160, 2008.

GODOS, J. et al. Coffee components and cardiovascular risk: beneficial and detrimental effects. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 65, n. 8, p. 925–936, 2014.

GÓMEZ-RUIZ, J. Á. et al. In Vitro Antioxidant Activity of Coffee Compounds and Their Metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 6962–6969, 2007.

GOTTELAND, M.; DE PABLO V, S. ALGUNAS VERDADES SOBRE EL CAFÉ. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 34, n. 2, p. 105–115, 2007.

GREENBERG, J. A et al. Caffeinated coffee consumption, cardiovascular disease, and heart valve disease in the elderly (from the Framingham Study). **The American Journal of Cardiology**, v. 102, n. 11, p. 1502–1508, 2008.

GRIFFITHS, W. J.; WANG, Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 7, p. 1882–96, 2009.

GROSS, G. et al. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 35, n. 6, p. 547–54, 1997.

GRUBBEN, M. J. et al. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 480–484, 2000.

GUERTIN, K. A et al. Serum biomarkers of habitual coffee consumption may provide insight into the mechanism underlying the association between coffee consumption and colorectal cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, n. 5, p. 1000–11, 2015.

GURLEY, B. J. et al. Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: History, safety, and efficacy. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 2, p. 275–301, 2015.

HARTLEY, T. R. et al. Cardiovascular effects of caffeine in men and women. **American Journal of Cardiology**, v. 93, n. 8, p. 1022–1026, 2004.

HERRERO, M. et al. Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 1, p. 49–69, 2012.

HUXLEY, R. et al. Coffee, Decaffeinated Coffee, and Tea Consumption in Relation to Incident Type 2 Diabetes Mellitus. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, n. 22, p. 2053–2063, 2014.

IBÁÑEZ, C. et al. The role of direct high-resolution mass spectrometry in foodomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 21, p. 6275–6287, 2015.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Relatório sobre o mercado cafeeiro - Dezembro 2017**. Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/cy2017-18/cmr-1217-p.pdf>>. Acesso em: 08 jun. 2018.

JAMES, J. E. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. **Psychosomatic medicine**, v. 66, n. 1, p. 63–71, 2004.

JEE, S. H. et al. The effect of chronic coffee drinking on blood pressure: a meta-analysis of controlled clinical trials. **Hypertension**, v. 33, p. 647-652, 1999.

JEE, S. H. et al. Coffee Consumption and Serum Lipids : A Meta-Analysis of Randomized. **American Journal of Epidemiology**, v. 153, n. 4, p. 353–362, 2001.

JESZKA-SKOWRON, M. et al. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties. **European Food Research and Technology**, v. 242, p. 1403-1409, 2016.

JIN, U. H. et al. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. **Life Sciences**, v. 77, n. 22, p. 2760–2769, 2005.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Review Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, v. 27, n. 7, p. 703–714, 2002.

KLATSKY, A. L. et al. Coffee, caffeine, and risk of hospitalization for arrhythmias. **The Permanente Journal**, v. 15, p. 19-25, 2011.

KLEEMOLA, P. et al. Coffee Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease and Death. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 22, p. 3393, 2000.

KONISHI, Y; KOBAYASHI, S. Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6418-6424, 2004.

KRAKAUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 113–119, 2002.

KRUG, C. A. et al. **Taxonomia de *Coffea arabica* L.: descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1939.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, v. 17, n. 4, p. 433–450, 2001.

KUWAYAMA, K. et al. Time-course measurements of caffeine and its metabolites extracted from fingertips after coffee intake: A preliminary study for the detection of drugs from fingerprints. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 12, p. 3945–3952, 2013.

LARANJINHA, J. A. N. et al. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: Antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 487–494, 1994.

LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMNER, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 29, p. 25435–25442, 2011.

LIMA, F. A. DE et al. Consumo de café segundo métodos de preparo da bebida e associação com perfil lipídico sérico em hipertensos e diabéticos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 109–119, 2011.

LINDSTED, K. D. et al. Coffee consumption and cause-specific mortality association with age at death and compression of mortality. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 45, n. 7, p. 733–742, 1992.

LIU, R. et al. Caffeine intake, smoking, and risk of parkinson disease in men and women. **American Journal of Epidemiology**, v. 175, n. 11, p. 1200–1207, 2012.

MARRUBINI, G. et al. Determination of free quinic acid in food matrices by hydrophilic interaction liquid chromatography with UV detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 80–85, 2015.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, S. et al. Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects. **Food Research International**, v. 64, p. 125–133, 2014.

MARTINS, A. L. **História do café**. 2ª. ed. São Paulo: Contexto, 2012.

MARTINS, S. I. F. S.; et al. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 9–10, p. 364–373, 2000.

MASTERTON, G. S.; HAYES, P. C. Coffee and the liver: a potential treatment for liver disease? **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 22, n. 11, p. 1277–83, 2010.

MAZZAFERA, P. et al. A cor verde do endosperma do café. **Instituto Agrônomo de Campinas**, v. 47, n. 2, p. 159–170, 1988.

MEJIA, E. G. DE; RAMIREZ-MARES, M. V. Impact of caffeine and coffee on our health. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 10, p. 489–492, 2014.

MINERS, J. O.; MCKINNON, R. A. CYP1A2. In: LEVY, R. H.; THUMMEL, K. E.; TRAGER, W. F.; HANSTEN, P. D.; EICHELBAUM, M. E. (Ed.). **Metabolic drug interactions**. New York: [s.n.]. p. 61–73.

MO, L. et al. Coffee consumption and risk of myocardial infarction: a dose-response meta-analyses of observational studies. **Oncotarget**, v. 9, n. 30, p. 21530-21540, 2018.

MOLAVI, B.; MEHTA, J. L. Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. **Current Opinion Cardiology**, v. 19, n. 5, p. 488–493, 2004.

MORALES, F. J. et al. Physiological relevance of dietary melanoidins. **Amino Acids**, v. 42, n. 4, p. 1097–1109, 2012.

NAGY, K. et al. First identification of dimethoxycinnamic acids in human plasma after coffee intake by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 491-497, 2011.

NAIDOO, N. et al. Cholesterol-raising diterpenes in types of coffee commonly consumed in Singapore, Indonesia and India and associations with blood lipids: a survey and cross sectional study. **Nutrition journal**, v. 10, n. 1, p. 48, 2011.

NARDINI, M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 5, p. 541–552, 1995.

NATELLA, F. et al. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6211–6216, 2002.

NEVES, C. **A estória do café**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro do Café, 1974.

NISHIJIMA, M. et al. Análise de Concorrência no Mercado Mundial de Café Verde. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 50, n. 1, p. 69–82, 2012.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Melanoidins from Coffee Infusions. Fractionation, Chemical Characterization, and Effect of the Degree of Roast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3967–3977, 2007.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 171–185, 2010.

O'KEEFE, J. H. et al. Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 12, p. 1043–1051, 2013.

OLTHOF, M. R. et al. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 1, p. 66–71, 2001.

OZGEN, M. et al. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

(ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1151–1157, 2006.

PARK, S. F.; KROLL, R. G. Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 653-661, 1993.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4^a. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PERO, R. W. et al. Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increase urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 335-346, 2009.

POPAT, R. A. et al. Coffee, ADORA2A, and CYP1A2: the caffeine connection in Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v. 18, n. 5, p. 756-765, 2011.

PORCIÚNCULA, L. O. et al. The Janus face of caffeine. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 6, p. 594–609, 2013.

PRIMROSE, S. et al. Metabolomics and human nutrition. **The British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 8, p. 1277–83, 2011.

RAQIB, R.; CRAVIOTO, A. Nutrition, immunology, and genetics: Future perspectives. **Nutrition Reviews**, v. 67, Suppl. 2, p. S227–S236, 2009.

RASMUSSEN, B. B. et al. The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. **Pharmacogenetics**, v. 12, n. 6, p. 473-478, 2002.

RECHNER, A. et al. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1213-1222, 2001.

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

RICE-EVANS, C. A. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICHELLE, M. et al. Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) Prepared per Cup Serving. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3438–3442, 2001.

RIKSEN, N. P. et al. The Cardiovascular Effects of Methylxanthines. In:

FREDHOLM, B. B. (Ed.). . **Methylxanthines**. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. v. 200, p. 413–437.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, Suppl. 2, p. S105–S110, 2002.

RODRIGUEZ DE SOTILLO, D. V. et al. Insulin receptor exon 11+/- is expressed in Zucker (fa/fa) rats, and chlorogenic acid modifies their plasma insulin and liver protein and DNA. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 63–71, 2006.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Effect of in Vitro Enzymatic Digestion on Antioxidant Activity of Coffee Melanoidins and Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10016–10021, 2007.

RYBAK, M. E. et al. Urine Excretion of Caffeine and Select Caffeine Metabolites Is Common in the US Population and Associated with Caffeine Intake. **Journal of Nutrition**, v. 145, n. 4, p. 766–774, 2015.

RYBAK, M. E. et al. Determination of urine caffeine and its metabolites by use of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: estimating dietary caffeine exposure and metabolic phenotyping in population studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 3, p. 771–784, 2014.

SARKAR, S. Potential of prebiotics as functional foods – a review. **Nutrition & Food Science**, v. 37, p. 168–177, 2007.

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

SCALBERT, A. et al. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 6, p. 276–282, 2002.

SCALBERT, A. et al. Mass-spectrometry-based metabolomics: Limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. **Metabolomics**, v. 5, n. 4, p. 435–458, 2009.

SMITH, R. F. A History of Coffee. In: CLIFFORD, M. N.; WILLSON, K. C. (Eds.). **Coffee**. Boston, MA: Springer US, 1985. v. 122, p. 1–12.

SOFI, F. et al. Coffee consumption and risk of coronary hearty disease: a meta-analysis. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 17, p. 209–223, 2007.

SOMOZA, V. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n. 7, p. 663–672, 2005.

STALMACH, A. et al. Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 8, p. 1749-1758, 2009.

STALMACH, A. et al. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 98–105, 2010.

STALMACH, A. et al. Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. **Food & Function**, v. 5, p. 1727-1737, 2014.

STEEVENS, J. et al. Tea and coffee drinking and ovarian cancer risk: results from the Netherlands Cohort Study and a meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 97, n. 9, p. 1291–4, 2007.

STELMACH, E. et al. The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews. **Food Chemistry**, v. 182, p. 302-308, 2015.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological reviews**, v. 84, n. 4, p. 1381–478, 2004.

STRANDHAGEN, E; THELLE, D. S. Filtered coffee raises serum cholesterol: results from a controlled study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 1164-1168, 2003.

SUDANO, I. et al. Cardiovascular effects of coffee: is it a risk factor? **Progress in Cardiovascular Nursing**, v. 20, n. 2, p. 65–9, 2005.

SUZUKI, A. et al. Ferulic Acid Restores Endothelium-Dependent Vasodilation in Aortas of Spontaneously Hypertensive Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 20, n. 5, p. 508–513, 2007.

TAGLIAZUCCHI, D. et al. Effect of Dietary Melanoidins on Lipid Peroxidation during Simulated Gastric Digestion: Their Possible Role in the Prevention of Oxidative Damage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2513–2519, 2010.

TASSANEEYAKUL, W. et al. Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, n. 10, p. 1767-1776, 1994.

TAUNAY, A. de E. **História do café no Brasil: no Brasil Imperial: 1822-1872**. Rio de Janeiro: Departamento Nacional do Café, 1939.

THORN, C. F. et al. PharmGKB summary: caffeine pathway. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 22, n. 5, p. 389–95, 2012a.

THORN, C. F. et al. PharmGKB summary. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 22, n. 1, p. 73–77, 2012b.

TRUGO, L. C. Coffee Analysis. In: CABALLERO, B., TRUGO, L. C., FINGLAS, P. M. (Ed.). **Encyclopedia of Food Science and Nutrition**. 2nd. ed. Oxford: Oxford Academic Press, 2003. p. 498.

ULVIK, A. et al. Coffee consumption and circulating B-vitamins in healthy middle-aged men and women. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 1489–1496, 2008.

UMEMURA, T. et al. Effects of Acute Administration of Caffeine on Vascular Function. **American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 11, p. 1538–1541, 2006.

UPADHYAY, R.; MOHAN RAO, L. J. An outlook on chlorogenic acids-occurrence, chemistry, technology, and biological activities. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 968–984, 2013.

URGERT, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 89, n. 11, p. 618–23, 1996.

VAN DIJK, A. E. et al. Acute Effects of Decaffeinated Coffee and the Major Coffee Components Chlorogenic Acid and Trigonelline on Glucose Tolerance. **Diabetes Care**, v. 32, n. 6, p. 1023–1025, 2009.

VAN ROOIJ, J. et al. A placebo-controlled parallel study of the effect of two types of coffee oil on serum lipids and transaminases: identification of chemical substances involved in the cholesterol-raising effect of coffee. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 1277–83, 1995.

VARIYAR, P. S. et al. Flavoring Components of Raw Monsooned Arabica Coffee and Their Changes during Radiation Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 7945–7950, 2003.

VILLANUEVA, C. Coffee consumption, genetic susceptibility and bladder cancer risk. **NIH Public Access**, v. 20, n. 1, p. 121–127, 2009.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do Metaboloma. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 59–69, 2006.

VITAGLIONE, P. et al. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: The underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1652–1661, 2010.

WANG, H.-Y. et al. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 573–584, 2011.

WANG, Y.; HO, C. T. Polyphenols chemistry of tea and coffee: A century of progress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8109–8114, 2009.

WELSCH, C. A. et al. Dietary phenolic compounds: inhibition of Na⁺-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. **The Journal of Nutrition**, v. 119, n. 11, p. 1698–704, 1989.

WINTHER, M. P. J. DE et al. Nuclear Factor B Signaling in Atherogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 5, p. 904–914, 2005.

WISHART, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 482–493, 2008.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. W652–W660, 2009.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. W251–W257, 2015.

YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 592–596, 2004.

YERETZIAN, C. et al. Analysing the headspace of coffee by proton-transfer-reaction mass-spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 223–224, p. 115–139, 2003.

YOSHINARI, O.; IGARASHI, K. Anti-diabetic effect of trigonelline and nicotinic acid, on KK-A(y) mice. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 20, p. 2196–202, 2010.

YOSHINARI, O. et al. Anti-Diabetic Effects of Pumpkin and Its Components, Trigonelline and Nicotinic Acid, on Goto-Kakizaki Rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 1033–1041, 2009.

YUKAWA, G. S. et al. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 1, p. 70–74, 2004.

ZHANG, Y. et al. Coffee consumption and the incidence of type 2 diabetes in men and women with normal glucose tolerance: the Strong Heart Study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease**, v. 21, n. 6, p. 418–423, 2011.

ZHOU, J. et al. Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 21, p. 3523–31, 2012.

ZHOU, J. et al. Experimental diabetes treated with trigonelline: effect on β cell and pancreatic oxidative parameters. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 279–87, 2013.

ZHOU, Y. et al. A dose-response meta-analysis of coffee consumption and bladder cancer. **Preventive Medicine**, v. 55, n. 1, p. 14–22, 2012.