Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Comparação da capacidade antioxidante de torras de
café e seus efeitos sobre fatores de risco cardiovascular
em indivíduos saudáveis**

Telma Angelina Faraldo Corrêa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth A.F.S. Torres

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Machado César

São Paulo

2012

Comparação da capacidade antioxidante de torras de café e seus efeitos sobre fatores de risco cardiovascular em indivíduos saudáveis

Telma Angelina Faraldo Corrêa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth A.F.S. Torres

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Machado César

São Paulo

2012

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, do título, instituição e ano da tese.

Deus, dai-me a serenidade para aceitar as coisas que eu não posso mudar, coragem para mudar as coisas que eu possa, e sabedoria para que eu saiba a diferença: vivendo um dia a cada vez, aproveitando um momento de cada vez; aceitando as dificuldades como um caminho para a paz; indagando, como fez Jesus, a este mundo pecador, não como eu teria feito; aceitando que Você tornaria tudo correto se eu me submetesse à sua vontade para que eu seja razoavelmente feliz nesta vida e extremamente feliz com você para sempre no futuro (Reinhold Niebuhr).

Aos meus pais, Antônio e Sônia, e à minha avó Jovina pelo amor incondicional e por acreditarem em meu potencial.

Ao meu esposo Fábio pelo amor, incentivo, paciência e companheirismo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado; abrindo-me portas, abençoando-me com sua graça, dando-me sabedoria e colocando em minha vida “anjos” que tornam meu caminho mais suave;

À minha mãe que sempre foi minha fonte inspiradora, meu modelo a ser seguido, que não poupou esforços para que eu me tornasse quem sou hoje, que sempre me incentivou e se orgulhou de minhas ações, por menor que elas fossem.

À Profa. Elizabeth Torres, pela orientação, contribuição para o meu crescimento científico, oportunidade e confiança;

Ao Dr. Lu pela co-orientação; por abrir prontamente “as portas” de seu grupo de pesquisa para que pudéssemos estabelecer a parceria tão importante e necessária entre Faculdade de Saúde Pública e Instituto do Coração (InCor); pelo auxílio, incentivo e confiança;

Ao Prof. Marcelo M. Rogero pelas valiosas contribuições para o trabalho, pelo incentivo, paciência, disposição para ajudar, indicando a direção a ser tomada nos momentos mais difíceis, e pela confiança em meu trabalho;

À Profa. Maria Terezinha Serrão Peraçoli e aos seus alunos, em especial, ao Leonardo pelo importante auxílio na análise de isoprostanos;

Ao Prof. João Pessoa de Araújo Jr. pelo empréstimo do banho-maria e do agitador orbital para realização da análise de isoprostanos;

Ao Prof. Josias Rodrigues pelo empréstimo dos micropipetadores utilizados durante as análises laboratoriais;

À Profa. Débora Markowicz Bastos pelo empréstimo do equipamento de HPLC e por permitir que sua orientanda Daniela ajudasse-me na análise de ácidos fenólicos e fenólicos totais;

À Profa. Nágila Damasceno pelo empréstimo da centrífuga para isolamento do plasma;

À Dra. Cibelem Benites pela amizade, companheirismo e auxílio. É uma grande amiga e uma pessoa com a qual posso contar sempre;

Ao Prof. Raul Maranhão e à Dra. Carmen G.C.M. Vinagre pelo auxílio na análise de LDL-oxidada;

Ao Prof. José Machado Moita Neto pela disposição em colaborar com a análise estatística preliminar dos dados;

À MS. Daniela Moura de Oliveira pelo auxílio na análise de ácidos fenólicos e fenólicos totais nas bebidas de café;

À Dra. Marcela Piedade Monteiro com quem compartilhei momentos alegres e de dificuldades, que me ajudou em pré-testes e análises de enzimas antioxidantes e que me deixou uma enorme saudade quando se mudou de São Paulo;

À Thaíse M.N. Mendes que me ajudou na coleta de dados e na realização de análises laboratoriais;

À Dra. Geni Sampaio pelas orientações técnicas, disponibilidade em ajudar, apoio e incentivo;

À Ms. Rosana Manólio Soares e à Dra. Ana Paula Santos Conceição pelas importantes contribuições para o trabalho;

À Dra. Lina Yonekura por suas importantes sugestões no exame de qualificação e contribuições para o êxito deste trabalho;

Aos companheiros e colegas de laboratório de Bromatologia pelo companheirismo, amizade e incentivo nos momentos difíceis;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo (Processo nº 2008/10933-6) e do auxílio financeiro (Processo nº 2009/05792-7) necessário à realização deste trabalho;

Aos voluntários pela participação;

À toda equipe do Estudo Café e Coração (Bruno, Daniela, Vera, Caroline e Viviane) que contribuíram no recrutamento e seleção dos voluntários e na coleta de dados;

Às enfermeiras que realizaram a coleta de sangue dos voluntários;

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Corrêa TAF. Comparação da capacidade antioxidante de torras de café e seus efeitos sobre fatores de risco cardiovascular em indivíduos saudáveis [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2012.

Resumo

Introdução: O café, rico em substâncias bioativas, está entre os maiores contribuintes para a ingestão de antioxidantes em vários países. O tipo de torra dos grãos influencia em sua atividade antioxidante. Estudos indicam que o consumo moderado de café filtrado está envolvido na redução do risco de doenças crônicas não-transmissíveis, geralmente associadas entre si e que se constituem em graves problemas de saúde pública. Entretanto, a literatura não apresenta consenso sobre a ação benéfica do café na redução do risco destas doenças. **Objetivos:** Comparar a atividade antioxidante de dois graus de torras de café (torra média-clara e média) e seus efeitos sobre biomarcadores de risco cardiovascular em indivíduos saudáveis. **Métodos:** A caracterização de antioxidantes nas bebidas foi realizada pelas análises de compostos fenólicos totais, perfil de ácidos fenólicos, cafeína, melanoidinas e capacidade antioxidante total - TAC (sequestro do radical DPPH e capacidade de absorbância do radical oxigênio - ORAC). Após 1 semana de *washout*, vinte voluntários saudáveis (20 a 65 anos) ingeriram café filtrado preparado com torra média-clara ou torra média por 4 semanas e com o outro tipo de torra por mais 4 semanas em um ensaio clínico randomizado do tipo *crossover*, o qual durou 9 semanas. Lipídeos plasmáticos, lipoproteína (a), homocisteína total, biomarcadores glicêmicos e pressão arterial de 24 horas foram medidos antes do período de intervenção e após a ingestão de cada torra. A atividade antioxidante foi avaliada no plasma e em eritrócitos respectivamente pela TAC (kit *Total Antioxidant Status* e ORAC) e da atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, glutathione peroxidase - GPx e catalase - CAT). A capacidade de inibição da peroxidação lipídica foi avaliada no plasma pelas determinações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas e 8-isoprostano. Biomarcadores inflamatórios relacionados à disfunção endotelial foram medidos no plasma por imunoenaios.

Resultados: Vinte voluntários saudáveis ($49,5 \pm 8,9$ anos) foram avaliados. A torra média-clara apresentou maior teor de ácidos clorogênicos (334 mg/150 mL; $p < 0,001$) e menor teor de cafeína (231 mg/150 mL; $p = 0,003$) que a torra média (210 mg/150 mL e 244 mg/150 mL, respectivamente). Os teores de melanoidinas foram significativamente maiores na torra média ($p < 0,001$). A TAC não diferiu entre as bebidas. A ingestão de ambas as torras causou aumento nas concentrações de colesterol total e LDL (10 e 12% para a torra média-clara; 12% e 14% para a torra média) ($p < 0,05$). A ingestão da torra média também aumentou a concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL) em 7% ($p = 0,003$). Houve aumento nos índices de Castelli após o consumo da torra média-clara (5% no índice I; $p = 0,01$ e de 6% no índice II; $p = 0,03$). O TAS dos indivíduos aumentou 21% e 26%, respectivamente, após consumo da torra média-clara e média ($p < 0,001$). Os indivíduos também tiveram aumento de 13% e 13% na atividade da CAT, 52% e 75% na SOD e 62% e 49% na GPx após a ingestão da torra média-clara e torra média ($p < 0,001$), respectivamente. Ambas as torras aumentaram as concentrações da molécula de adesão celular vascular-1 solúvel (sVCAM-1), sendo 18% para a torra média-clara e 14% para a torra média ($p < 0,05$). A concentração de fibrinogênio plasmático aumentou 8% após ingestão da torra média ($p = 0,01$) e a selectina-E solúvel (sE-selectina) aumentou 12% após a torra média-clara ($p = 0,02$). Embora o consumo de café tenha elevado os níveis de colesterol total e LDL, não se relacionou à alteração de homocisteína total, lipoproteína (a) e biomarcadores de diabetes e de peroxidação lipídica. **Conclusão:** O consumo moderado de café filtrado apresentou alguns efeitos maléficos sobre o perfil de risco cardiovascular em indivíduos saudáveis, independente de sua atividade antioxidante.

Descritores: Antioxidantes, biomarcadores inflamatórios, café torrado, disfunção endotelial, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica.

Correa TAF. Comparison of the antioxidant capacity of coffee roasts and their effects on cardiovascular risk factors in healthy subjects [Thesis] São Paulo (BR): School of Public Health of the University of São Paulo; 2012.

Abstract

Introduction: Coffee is rich in bioactive substances and it is among the major contributors to the total antioxidant ingestion in several countries. The roasting degree of coffee is important for its antioxidant activity. Studies indicate that the moderate consumption of filtered coffee is involved in the prevention of chronic diseases, which are usually associated and constitute serious problems of public health. However, literature does not present consensus about the beneficial effects of coffee in the prevention of these diseases. **Objectives:** To compare the antioxidant activity of the two coffee roasts (medium light and medium roast) and their effects on biomarkers of the cardiovascular risk in healthy subjects. **Methods:** The antioxidant characterization of the coffee beverages was performed by the total phenolic content analysis, phenolic profile, caffeine, melanoidins and total antioxidant capacity - TAC (DPPH radical scavenging capacity and Oxygen radical absorbance capacity - ORAC assays). After 1-week washout, twenty healthy volunteers (20 to 65 years old) consumed medium light roast or medium roast paper-filtered coffee for 4 weeks and then switched to the other roast for an additional 4 weeks in a randomized crossover trial that lasted 9 weeks. Plasma lipids, lipoprotein (a), total homocysteine, serum glycemic biomarkers, and twenty-four hours blood pressure were measured at baseline and after each intervention. Levels of total antioxidant status (TAS) and ORAC were evaluated in plasma, and antioxidant enzymes activities (superoxide dismutase - SOD, glutathione peroxidase - GPx and catalase - CAT) in erythrocytes. Lipid peroxidation inhibition capacity was determined in plasma by oxidized LDL and 8-isoprostane assays. Endothelial dysfunction-related inflammation biomarkers were measured in plasma by immunoassays. **Results:** Twenty healthy volunteers (49.5 ± 8.9 years) were evaluated. Medium light roast coffee showed higher chlorogenic acids

(334 mg/150 mL; $p < 0.001$) and less caffeine (231 mg/150 mL; $p = 0.003$) than medium roasting (210 mg/150 mL and 244 mg/150 mL, respectively). Melanoidins were significantly higher in medium roast than medium light roast ($p < 0.001$). There was an increase in the Castelli indexes after medium light roast consumption (5% in the index I; $p = 0.01$, and 6% in the index II; $p = 0.03$). No significant differences were observed for TAC between the medium light roast and medium roast. Both roasts increased plasma total cholesterol and LDL concentrations (10%, and 12% for medium light roast; 12%, and 14% for medium roast, respectively) ($p < 0.05$). Medium roast also increased HDL concentration by 7% ($p = 0.003$). Compared with baseline, subjects had an increase of 21% and 26% in TAS, 13% and 13% in CAT, 52% and 75% in SOD, and 62% and 49% in GPx after medium light and medium roast consumption ($p < 0.001$), respectively. Both roasts increased soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) concentrations (18% for medium light roast and 14% for medium roast) ($p < 0.05$). Plasma fibrinogen concentration increased 8% after medium roast intake ($p = 0.01$), and soluble E-selectin (sE-selectin) increased 12% after medium light roast intake ($p = 0.02$). Although coffee beverages have increased total cholesterol and LDL levels, they were not related to elevation in total homocysteine, lipoprotein (a), and biomarkers of diabetes and lipid peroxidation. **Conclusion:** Moderate paper-filtered coffee consumption may have some undesirable impact on cardiovascular risk in healthy subjects regardless of its antioxidant content.

Keywords: Antioxidants, inflammation biomarkers, roasted coffee, endothelial dysfunction, antioxidant enzymes, lipid peroxidation.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ	3
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES DO CAFÉ	7
2.3 CONSUMO DE CAFÉ E DOENÇAS CARDIOVASCULARES	14
2.3.1 Café e fatores de risco cardiovascular	15
2.3.1.1 Aterosclerose.....	16
2.3.1.2 Diabetes mellitus.....	21
2.3.1.3 Hipertensão arterial.....	22
2.3.1.4 Biomarcadores inflamatórios relacionados à disfunção endotelial	24
2.4 HIPÓTESES DO ESTUDO	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 GERAL	35
3.2 ESPECÍFICOS	35
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	36
4.1 CASUÍSTICA	36
4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO	37
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NAS BEBIDAS DE CAFÉ.....	40
4.3.1 Preparo das bebidas de café.....	40
4.3.2 Quantificação de compostos fenólicos totais	41
4.3.3 Determinação do perfil de ácidos fenólicos e cafeína.....	41
4.3.4 Determinação de melanoidinas	43
4.3.5 Determinação da capacidade antioxidante por DPPH.....	43
4.3.6 Capacidade de absorbância de radical oxigênio.....	44
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO SANGUE	46

4.4.1 Obtenção do plasma e dos eritrócitos	46
4.4.2 Capacidade antioxidante total	47
4.4.3 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes	47
4.4.3.1 Catalase	48
4.4.3.2 Superóxido dismutase	48
4.4.3.3 Glutathione peroxidase	49
4.5 CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	50
4.6 MARCADORES INFLAMATÓRIOS	51
4.7 INDICADORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	52
4.7.1 Perfil lipídico	53
4.7.2 Lipoproteína(a)	53
4.7.3 Homocisteína total plasmática e ácido fólico	53
4.7.4 Glicemia, hemoglobina glicada, frutossamina e insulina	54
4.7.5 Hemograma completo	55
4.7.6 Minerais séricos	55
4.7.7 Uréia e creatinina	55
4.8 INDICADORES ANTROPOMÉTRICOS	56
4.9 PRESSÃO ARTERIAL	56
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NAS BEBIDAS DE CAFÉ	58
5.2 ESTUDO CLÍNICO	63
5.2.1 População	63
5.2.2 Consumo de nutrientes	65
5.2.3 Indicadores antropométricos	66
5.2.4 Indicadores hematológicos e bioquímicos	68
5.2.5 Pressão arterial	71
5.2.6 Atividade antioxidante no sangue	74
5.2.7 Capacidade de inibição da peroxidação lipídica	76
5.2.8 Biomarcadores inflamatórios relacionados à disfunção endotelial	77
5.3 LIMITAÇÕES E PONTOS FORTES DO ESTUDO	79

5.4 MANUSCRITOS	80
6 CONCLUSÕES.....	81
7 REFERÊNCIAS.....	82
Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido	99
Anexo 2 - Questionário clínico e nutricional	103
Anexo 3 - Registro alimentar de três dias	114
Anexo 4 - Orientação nutricional para o período de <i>washout</i>	116
Anexo 5 - Registro do estudo	117
Anexo 6 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	118
Anexo 7 - Manuscrito 1	119
Anexo 8 - Manuscrito 2	137
Anexo 9 - Primeira página do <i>curriculum lattes</i> da aluna.....	153
Anexo 10 - Primeira página do <i>curriculum lattes</i> da orientadora	154

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resumo de estudos sobre os efeitos do café em doenças cardiovasculares ou em seus fatores de risco em indivíduos saudáveis nos últimos 10 anos.....	29
Tabela 2. Parâmetros de validação do método analítico para caracterização das bebidas de café.....	58
Tabela 3. Identificação dos compostos fenólicos nas bebidas de café.....	59
Tabela 4. Concentrações de antioxidantes na bebida de café, segundo tipo de torra utilizado no preparo da bebida.....	61
Tabela 5. Características basais da população estudada.....	64
Tabela 6. Consumo diário de macro e micronutrientes, segundo o grau de torra dos grãos de café utilizados no preparo da bebida, anterior ao início da ingestão de café filtrado e após o consumo de cada torra.....	66
Tabela 7. Índice de massa corporal (IMC), percentual de gordura corporal e circunferência abdominal antes do início do período de intervenção e após o consumo de bebida de café preparada com torra média-clara ou torra média.....	67
Tabela 8. Variáveis bioquímicas no basal e após o consumo de bebida de café preparada com torra média-clara ou torra média.....	69
Tabela 9. Pressão arterial sistólica e diastólica e frequência cardíaca média de 24 horas, diurnas e noturnas, antes e após a ingestão da bebida de café preparada com torra média-clara e torra média.....	72
Tabela 10. Capacidade antioxidante total plasmática (TAS e ORAC) e atividade das enzimas antioxidantes, anterior e posterior à ingestão de café preparado com torra média-clara ou torra média.	74
Tabela 11. Biomarcadores inflamatórios medidos no plasma antes do período de intervenção e após a ingestão de café preparado com torra média-clara ou torra média.....	78

Lista de Figuras

Figura 1. Classificação do grau de torra do café.....	3
Figura 2. Estrutura química dos ácidos clorogênicos e da cafeína, componentes antioxidantes do café.....	5
Figura 3. Via metabólica proposta para os ácidos clorogênicos em humanos	7
Figura 4. Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia.....	11
Figura 5. Representação esquemática da hipótese oxidativa e do papel da LDL-oxidada no processo aterogênico.....	17
Figura 6. Proteína C reativa e inflamação.....	27
Figura 7. Fluxograma do estudo.....	39
Figura 8. Esquema da reação do radical DPPH com os antioxidantes do café.....	43
Figura 9. Reação do radical ânion superóxido com o INT para formação do corante Formazan e reação competitiva catalisada pela SOD, com formação de H ₂ O ₂	49
Figura 10. Reação de oxidação da GSH com hidroperóxido de cumeno, na presença de GPx, e posterior redução pela GR.....	50
Figura 11. Esquema da tecnologia Luminex xMAP.....	52
Figura 12. Cromatogramas com compostos fenólicos presentes: a) na bebida de café torra média-clara; b) na bebida de café torra média.....	59
Figura 13. Cromatogramas com identificação da cafeína presente: a) na bebida de café torra média-clara; b) na bebida de café torra média.....	60
Figura 14. Capacidade antioxidante total (DPPH e ORAC) de bebidas de café, segundo tipo de torra utilizado em seus preparos.....	62
Figura 15. Distribuição do estado nutricional dos voluntários, segundo IMC, durante o estudo.....	67
Figura 16. Indicadores de peroxidação lipídica do plasma antes e após a ingestão de café preparado com torra média-clara e torra média...	76

Lista de abreviaturas e siglas

ADA: *American Diabetes Association*

ARE: *Antioxidant response elements*

ABTS: Ácido 2,2-Azino-dietil-benzotiazolina sulfônico

BHT: Butil hidroxitolueno

CAT: Catalase

ACG: Ácidos clorogênicos

ACQ: Ácido cafeoilquínico

DAD: Detector de arranjo de diodos

DCV: Doenças cardiovasculares

DM: Diabetes mellitus

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

eONS: Óxido nítrico sintase endotelial

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GLUT-4: transportador de glicose

GPx: Glutathione peroxidase

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HOMA-IR: Índice *homeostasis model assessment for insulin resistance*

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular 1

IL-6: Interleucina 6

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IMC: Índice de massa corporal

InCor: Instituto de Coração

LD: Limite de detecção

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LDL-ox: Lipoproteína de baixa densidade oxidada

Lp(a): Lipoproteína(a)

LQ: Limite de quantificação

MAPA: Monitorização ambulatorial da pressão arterial

MCP-1: Proteína quimiotática para monócitos 1

m-RNA: Ácido ribonucléico mensageiro

NFκB: Fator nuclear *kappa* B

Nrf2: Fator 2 relacionado ao fator nuclear E2

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAD: Pressão arterial diastólica

PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio 1

PAS: Pressão arterial sistólica

PCR-as: Proteína C reativa de alta sensibilidade

PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}

PRM: Produtos da reação de *Maillard*

SIM: *Single ion monitoring*

SOD: Superóxido dismutase

TAC: Capacidade antioxidante total

TAS: *Total antioxidant status*

TG: Triacilgliceróis

TNF-α: Fator de necrose tumoral α

VCAM-1: Molécula de adesão celular vascular 1

1 INTRODUÇÃO

O café contém compostos com atividade antioxidante que estão naturalmente presentes nos grãos, como ácidos clorogênicos (ACG) e cafeína, e outros que são formados durante o processo de torrefação, os produtos da reação de *Maillard* (PRM) (1). A atividade antioxidante do café é mais dependente das condições de torrefação que do método de preparo da bebida e da qualidade dos grãos (2).

O efeito da torrefação na atividade antioxidante da bebida de café tem sido investigado, entretanto os resultados são inconclusivos. Alguns estudos relataram um aumento na atividade antioxidante da bebida com a torrefação (3-5), enquanto outros observaram redução desta (2, 6, 7).

Os ACG estão presentes em quantidade variável dependendo do grau de torra dos grãos de café. Segundo Verzelloni et al. (8), esses compostos destacam-se entre antioxidantes do café devido a efeitos biológicos importantes como anti-glicação, anticarcinogênese, antibiótico, anti-hipercolesterolêmico, anti-hipertensivo e antiinflamatória. Além destes, o café possui outros compostos como cafeína, ácido nicotínico, trigonelina e N-metilpiridina, que apresentam baixa atividade antioxidante *in vitro*. Durante a torrefação, parte dos ACG é isomerizada e parte transformada em quinolactonas, as quais possuem atividade antioxidante, entretanto 87 a 93% delas são excretadas nas fezes. Recentemente, tem sido mostrado que o ácido quínico e caféico, componentes dos ACG, são incorporados às melanoidinas, PRM presentes em maior quantidade (1).

A bebida de café está entre as mais consumidas mundialmente. Seu consumo tem sido estudado intensamente devido à relação entre seus antioxidantes e a redução do risco de doenças crônicas não-transmissíveis. Estudos referentes aos efeitos metabólicos e cardiovasculares do café são conflitantes (9). Alguns indicam efeitos adversos do consumo agudo de café ou em pequena (<3 xícaras/dia) ou grande (>6 xícaras/dia) quantidade em fatores de risco de DCV, incluindo colesterol sérico, pressão arterial, resistência à insulina e homocisteína plasmática (10-15). Em

contraste, a ingestão diária e moderada da bebida não tem sido associada ou tem sido associada inversamente ao risco cardiovascular (16-21).

Evidências sugerem que a presença exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO) relaciona-se à disfunção endotelial, migração de monócitos, oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e crescimento de células musculares lisas vasculares. ERO e LDL oxidadas (LDL-ox) desempenham função de extrema importância na aterogênese e consequentemente nas DCV. A peroxidação lipídica inicia uma série de eventos *in vitro* que eventualmente levam ao aumento da captação de LDL-ox por macrófagos, à formação de células espumosas e à disfunção endotelial, um dos primeiros eventos ateroscleróticos na íntima arterial. Além das ERO, a disfunção endotelial pode ser desencadeada por hiperglicemia, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, hipóxia, inflamação e hipertensão (22).

Estudos *in vitro* mostraram que ACG e PRM presentes no café podem diminuir a suscetibilidade da LDL à oxidação e neutralizar espécies reativas (3, 23).

A inflamação, intimamente relacionada ao estresse oxidativo, pode contribuir para a patogênese da aterosclerose, do diabetes e das DCV (24).

Diante do exposto, comparar os efeitos de dois graus de torra de café, contendo diferentes quantidades de antioxidantes, pode ser de grande relevância para a redução de risco de DCV. Além disso, até o momento, encontrou-se apenas um estudo que compara os efeitos de duas torras de café na atividade antioxidante e peroxidação lipídica em humanos (4) e não se encontraram dados sobre a ação de diferentes torras sobre marcadores inflamatórios.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ

A composição química do grão de café é influenciada pela espécie, sistema de cultivo, época de colheita, processo de manipulação, conservação e armazenamento e torrefação (25).

A torrefação utiliza temperaturas entre 200 e 250°C por 5 a 15 minutos, dependendo do grau de torrefação desejado. É um processo importante para formação do aroma e sabor finais da bebida, porém origina profundas alterações químicas na composição e atividade biológica do grão de café. O processo pirolítico faz com que a água existente no interior do grão seja evaporada, haja reações de caramelização e se forme uma vasta gama de compostos voláteis. A temperatura e o tempo são fatores decisivos para a qualidade do produto final (26). A classificação das torras é realizada segundo padronização da *Specialty Coffee Association of America* (SCAA) e da empresa Agtron (Agtron/ SCAA, Reno, NV, 1995) - Figura 1.

Figura 1. Classificação do grau de torra do café, segundo o sistema Agtron/SCAA *roast classification color disk* (27) (modificada).

O pó de café torrado possui, em média, 107 mg de cálcio, 165 mg de magnésio, 169 mg de fósforo, 8,1 mg de ferro, 1 mg de sódio, 1609 mg de potássio, 1,3 mg de cobre e 0,5 mg de zinco em 100 g de pó. Além dos nutrientes, o café possui compostos com atividade antioxidante e os diterpenos, cafestol e kawool, que são constituintes naturais dos grãos, estão presentes em níveis significativos e apresentam efeito hipercolesterolêmico; entretanto, parte considerável deles fica retida no filtro de papel no momento da filtração da bebida (28, 29).

A bebida de café é altamente popular e rica em substâncias biologicamente ativas, como ACG, cafeína e PRM, ocupando posição de destaque entre os maiores contribuintes para a ingestão de antioxidantes em vários países (30). Os compostos presentes nos grãos de café são incorporados à bebida em concentrações variáveis, dependendo do grau de torra dos grãos e do método de preparo da bebida (temperatura da água e tempo de contato do pó de café com a água) (30). A cafeína destaca-se como composto com atividade antioxidante pouco afetado pela torrefação. Uma xícara de café (150 mL) contém de 30 a 175 mg de cafeína (28).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, geralmente envolvidas na defesa contra radiação ultravioleta (UV) ou agressão por patógenos. Estes compostos podem ser classificados em diferentes grupos (ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas) em função do número de anéis fenólicos que contêm e de elementos estruturais que interligam estes anéis. Estruturalmente, consistem de um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (31).

Os ácidos fenólicos dividem-se em dois grupos: ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Os primeiros possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e incluem os ácidos: gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico. O conteúdo destes em plantas comestíveis é geralmente muito baixo. Os hidroxicinâmicos são constituídos por nove átomos de carbono (C_6-C_3) e consistem dos ácidos: caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico, os quais são encontrados em plantas geralmente na forma esterificada. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e de seus ésteres é decorrente da habilidade destes em doar átomos de hidrogênio. Ela depende do número e posição dos grupos hidroxilas em relação ao grupo carboxílico, aumentando com a elevação do nível de hidroxilação. Os ácidos hidroxicinâmicos possuem maior atividade antioxidante que os hidroxibenzóicos (32).

Os ACG, formados pela esterificação de um dos ácidos hidroxicinâmicos com o ácido quínico (figura 2), são os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café torrados, alcançando teores de 2 a 5g/100g de grãos. Esses ácidos são potentes antioxidantes *in vitro* (10).

Figura 2. Estrutura química dos ácidos clorogênicos e da cafeína, componentes antioxidantes do café (33) (modificada).

O componente majoritário dos ACG é o ácido cafeoilquínico (ACQ), o qual representa aproximadamente 86% da composição destes, sendo 36,5% de 5-ACQ, 34,2% de 4-ACQ e 29,3% de 3-ACQ. O principal efeito fisiológico do 5-ACQ é a sua atividade antioxidante, particularmente do seu produto de hidrólise: o ácido cafêico (30, 34).

Devido a termo-instabilidade, no processo de torrefação dos grãos de café, parte dos ACG é isomerizada, parte é transformada em quinolactonas e parte é hidrolisada e degradada em compostos de baixo peso molecular. A torrefação intensa pode causar perdas de mais de 95% dos ACG. Os ACG também participam da formação de melanoidinas na reação de *Maillard*, a qual ocorre entre o grupo amino de aminoácidos livres ou ligados a proteínas e açúcares redutores durante a torrefação. As melanoidinas representam os mais abundantes PRM (até 25% de

matéria seca) e também possuem capacidade antioxidante atribuída ao sequestro de radicais, como hidroxila e ERO e à ligação a metais (30).

O teor de ACG em uma xícara de café (150 mL) varia entre 53 e 263 mg, portanto o consumo dessa bebida ao longo do dia pode fornecer até dois terços da ingestão diária de antioxidantes (35). Pessoas que ingerem várias xícaras da bebida de café por dia consomem de 0,5 a 1,0 g de ACG, principalmente na forma de ácido cafêico (92% dos ácidos fenólicos do café), enquanto aquelas que não o ingerem e possuem um baixo consumo de frutas e hortaliças não consomem mais de 25 mg/dia (31).

Apesar de os ACG serem potentes antioxidantes *in vitro*, sua contribuição para a defesa antioxidante no organismo depende da quantidade absorvida em nível intestinal e da biodisponibilidade desses compostos (31).

ACG estão presentes nos alimentos principalmente nas formas esterificadas, entretanto estudos, tanto em ratos quanto em humanos, têm mostrado que a absorção dos ácidos fenólicos livres, como ácido cafêico, ocorre com maior facilidade em relação aos seus derivados esterificados (35-38). Isto se deve ao fato de que os ACG são absorvidos após hidrólise por esterases existentes na mucosa do intestino delgado ou secretada pela microbiota colônica (36, 38). Gonthier et al. (37) e Gomez-Ruiz et al. (39) verificaram que, com a ingestão de ACG, um terço destes é absorvido no intestino delgado; o restante atinge o cólon, no qual a microbiota os hidrolisa aos ácidos cafêico e quínico. Esses compostos são extensivamente metabolizados a vários ácidos, tais como: m-cumárico (formado por desidroxilação do ácido cafêico), ferúlico e isoferúlico (metabólitos teciduais formados pela metilação do ácido cafêico), 3,4-diidroxifenilpropiónico e 3-hidroxifenilpropiónico (formados por hidrogenação e desidroxilação do ácido cafêico) e hipúrico (metabólito derivado da aromatização do ácido quínico a ácido benzóico pela microbiota e subsequente conjugação com glicina no fígado e nos rins). A via metabólica proposta para o ACG em humanos pode ser visualizada na figura 3 (36).

As ERO são compostas por radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$), radicais peroxila e alcoxila, oxigênio *singlet* e ozônio. São formadas por meio da redução parcial do oxigênio até água. A transferência de um elétron para o oxigênio produz o primeiro intermediário reativo, o qual sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio. Este sofre uma reação de quebra das ligações entre os átomos de oxigênio, formando o radical hidroxila. Essa reação pode ser catalisada por um metal de transição (reação de Fenton) ou pela combinação do oxigênio com o peróxido de hidrogênio (Reação de Haber-Weiss). Além das ERO, há as espécies reativas de nitrogênio (óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, cloreto de nitrila e peroxinitrito); de cloro (ácido hipocloroso e cloraminas); de enxofre (radical tiíla); e de metais (ferro, cobre, manganês, etc.) (44).

As espécies reativas podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. Endogenamente, originam-se de processos biológicos, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Esta geração de espécies reativas envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas. As fontes exógenas incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (45).

Na maioria das células, as mitocôndrias são as maiores fontes de ERO e, portanto, de enzimas antioxidantes. Embora os eritrócitos sejam desprovidos de mitocôndrias, essas espécies são produzidas continuamente nestas células devido à alta tensão de oxigênio no sangue arterial e à abundância de ferro heme. Vários fatores levam à geração de ERO em eritrócitos, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. A fonte de ERO é a hemoglobina, a qual pode sofrer autooxidação e produz ânion superóxido. Uma vez que a concentração de hemoglobina oxigenada intra-eritrocítica é de 5 mM, mesmo uma pequena taxa de autooxidação pode gerar níveis importantes de ERO. A redução ocasional de oxigênio para ânion superóxido é acompanhada por oxidação da hemoglobina para metamioglobina, a qual não se liga nem transporta o oxigênio. Embora o estresse oxidativo possa danificar os eritrócitos, uma grande concentração de ERO pode exercer um efeito sistêmico (46).

As espécies reativas têm importante função biológica como controle da pressão sanguínea, sinalização celular, apoptose e fagocitose de agentes patogênicos. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante com predomínio dos oxidantes, podendo causar danos. Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos principais focos de atuação de ERO e de outras espécies reativas (43).

No endotélio, o dano celular pode desencadear alterações na estrutura, fluidez e na permeabilidade, predispondo ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas. Fatores de risco cardiovascular, como hipertensão, dislipidemia e diabetes, hiperhomocisteinemia e inflamação estão associados ao aumento na produção de ERO vascular (47). As ERO ainda estão envolvidas na sinalização pró-inflamatória endotelial, particularmente na regulação da expressão de molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). O aumento nos níveis de triacilgliceróis (TG) e da LDL, associado à diminuição dos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL), favorece o ataque de ERO. As LDL-ox depositam-se no espaço subendotelial, induzindo à disfunção do endotélio e o processo aterosclerótico. Além das ERO, a disfunção endotelial pode ser desencadeada por hiperglicemia, hipercolesterolemia ou fatores locais como hipóxia, inflamação e alterações no fluxo sanguíneo (47).

As ERO ainda atuam como mensageiros das vias de sinalização intracelular das células inflamatórias. Um exemplo é a ativação do fator nuclear *kappa* B (NFκB), induzida pelo peróxido de hidrogênio e bloqueada por vários antioxidantes. O NFκB é um fator central de transcrição, envolvido na regulação de numerosos genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas, como fator de necrose tumoral α (TNF-α), interleucinas 1, 2, 6 e 8, fatores de crescimento hematopoiéticos, moléculas de adesão celular e óxido nítrico sintetase. Esse fator nuclear é considerado um importante mediador no sinal de transdução para endotoxinas e atividade inflamatória induzida por citocinas (48).

Nos sistemas biológicos, a peroxidação pode ocorrer principalmente por duas vias: 1) enzimática envolvendo as lipoxigenases e cicloxigenases na oxidação dos ácidos graxos polinsaturados, as quais geram, respectivamente, leucotrienos e lipoxinas e prostaglandinas e tromboxanos; 2) envolve a participação das ERO, metais de transição, etc. (43).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A reação inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado da membrana celular pelo radical hidroxila ou pelo alcóxila, com consequente formação do radical lipídico. Na primeira equação da propagação, o radical lipídico reage rapidamente com o oxigênio, resultando no radical peróxila, que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o radical lipídico na segunda equação da propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais lipídicos produzidos nas etapas anteriores propagam-se até formarem complexos mais estáveis (figura 4) (44).

Figura 4. Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia (44) (adaptada).

A dosagem dos isoprostanos é um dos mais recentes e promissores métodos na mensuração da peroxidação lipídica. Os isoprostanos são produzidos *in vivo* a partir do ácido araquidônico por um processo não-enzimático de peroxidação lipídica, catalisado por ERO, na membrana celular e em partículas de LDL (49, 50). Aqueles estruturalmente semelhantes à prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) são denominados F_2 -isoprostanos, sendo o 15- F_{2t} -IsoP, também conhecido como 8-epi- $PGF_{2\alpha}$, iPF $_{2\alpha}$ -III, 8-isoprostano e 8-iso- $PGF_{2\alpha}$, o composto desta classe que tem sido mais amplamente analisado em estudos clínicos (51). Diversas características fazem dos isoprostanos marcadores atrativos para o dano oxidativo: são produtos específicos de

oxidação, são estáveis, aumentam devido ao estresse oxidativo *in vivo* e sua formação é modulada por antioxidantes (50).

Para prevenir ou reduzir os efeitos de estresse oxidativo, o organismo dispõe de dois sistemas antioxidantes: o enzimático e o não enzimático. Ambos auxiliam o mecanismo de defesa no controle dos danos causados pelas ERO e são capazes de estabilizá-las ou as desativar antes que ataquem os alvos biológicos nas células (43). Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos por meio de dois mecanismos: 1) inibição da formação das ERO na etapa de iniciação; 2) eliminação das ERO importantes na etapa de propagação, como alcóxila e peróxila, por meio da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (47).

O sistema enzimático é representado principalmente pelas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), a qual catalisa a dismutação do ânion radical superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio (Equação 1); catalase (CAT) que atua na decomposição do peróxido de hidrogênio a oxigênio e água (Equação 2) e glutathione peroxidase (GPx), a qual atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator (Equação 3). A GPx converte a glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG). Na presença de glutathione redutase e NADPH, a GSSG é imediatamente convertida à forma reduzida com concomitante oxidação do NADPH a NADP^+ . Estas enzimas constituem a primeira linha de defesa contra as ERO, impedindo sua formação ou as sequestrando de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueando a etapa de iniciação (44).

O sistema antioxidante não enzimático é composto pela GSH, ubiquinona ou coenzima Q e ácido úrico, os quais são produzidos *in vivo*; pelos tocoferóis, ácido ascórbico, carotenóides, selênio e polifenóis, obtidos por meio da ingestão de substâncias com propriedades antioxidantes, provenientes da dieta ou de outras

fontes; pelas proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina). Os metais de transição são potenciais formadores de espécies reativas por meio da reação com outros compostos, uma vez que sofrem reações redox, logo há necessidade de serem transportados associados a proteínas, impedindo que essas reações ocorram. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a lipoperoxidação e a lipoxigenase *in vitro* (43). O café ocupa posição de destaque entre os maiores contribuintes para a ingestão de antioxidantes em vários países (30, 52).

Os ácidos fenólicos, presentes no café, funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação da lipoperoxidação. Os produtos intermediários, formados pela ação destes, são relativamente estáveis (45).

A modificação oxidativa da LDL está fortemente associada à aterogênese. Vários estudos *in vitro* mostraram que o café e/ou ácidos fenólicos presentes em sua composição podem reduzir a suscetibilidade da LDL à oxidação (3, 7, 10, 23, 45, 53-55). Embora ácidos fenólicos possuam baixa solubilidade em meio lipídico, em dois destes estudos (23, 53) observou-se que, possivelmente, pequena concentração de ACG se ligou à LDL, aumentando sua resistência à oxidação. Araújo e Mancini-Filho (55) observaram elevado poder antioxidante do café e consequente capacidade de reduzir a aterogênese, com resultados semelhantes aos apresentados para tocoferol e ácido ascórbico. Em três estudos, comparou-se a capacidade de proteção da LDL de diferentes graus de torra. Em um deles (7) observou-se que a proteção aumentou até o grau de torra médio; em outro (53) as bebidas de café foram capazes de exercer atividade antioxidante, independente do grau de torra dos grãos e no terceiro (3) verificou-se que bebidas de café preparadas com torra escura e torra média apresentaram maior atividade antioxidante que aquela preparada com torra clara quando o radical AAPH foi utilizado como agente oxidante. Os autores concluíram que os PRM, presentes em grande quantidade na torra escura, apresentaram maior habilidade em sequestrar radicais peroxila que os compostos fenólicos.

2.3 CONSUMO DE CAFÉ E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As DCV são a primeira causa de mortes no Brasil e no mundo. No Brasil, as DCV foram responsáveis por 31% dos óbitos em 2009 (56). Mundialmente, mais de 17,3 milhões de pessoas morreram de DCV em 2008, representando 30% de todas as mortes (57).

Embora idade, sexo, etnia e genética sejam importantes fatores de risco para DCV não modificáveis, outros fatores, como dislipidemias, diabetes tipo 2, hipertensão arterial, obesidade, sedentarismo e dietas desbalanceadas, são modificáveis e podem predizer a ocorrência, severidade e o prognóstico de eventos cardiovasculares (58).

O amplo consumo de café e a alta prevalência de DCV levanta a questão se a ingestão de café exerce efeito sobre o sistema cardiovascular e quais são seus compostos relacionados a esse efeito. O efeito do café sobre o risco cardiovascular ainda é controverso. Estudos caso-controle, citados em duas revisões (29, 59), reportaram associação positiva entre o consumo de café e o risco de DCV. Estudos prospectivos de coorte mostraram resultados conflitantes: em um deles sugeriu-se associação positiva entre o consumo de café e o risco de DCV (60), enquanto outros não observaram associação (61, 62) ou, ainda, observaram associação inversa (24, 63-65).

Os compostos bioativos do café mais conhecidos são: cafeína, ACG e os diterpenos, cafestol e kawool. Os diterpenos e a cafeína são compostos relacionados à disfunção endotelial, hipertensão arterial, doença arterial coronariana, arritmias cardíacas, acidente vascular cerebral e dislipidemias. Os diterpenos apresentam efeito hipercolesterolêmico (25), enquanto a cafeína, embora amplamente estudada, apresenta resultados inconclusivos sobre seus efeitos benéficos ou adversos (33). Há estudos que indicam que a cafeína apresenta efeito no sistema cardiovascular, caracterizado por elevação da pressão arterial e redução discreta da frequência cardíaca. Entretanto esse efeito é verificado somente após a ingestão aguda de café, desenvolvendo-se tolerância com o consumo contínuo (28, 59, 66). Alguns estudos *in vitro* têm mostrado atividade antioxidante da cafeína (25, 29). Além da cafeína, o

café contém outros compostos relacionados à ação antioxidante (ácidos fenólicos, melanoidinas), os quais podem ter efeitos benéficos no sistema cardiovascular (9, 28).

O estudo dos ácidos fenólicos tem recebido grande atenção uma vez que estes compostos apresentam várias ações fisiológicas benéficas como a diminuição da suscetibilidade da LDL à oxidação, remoção de radicais livres e a complexação de cátions metálicos, evitando suas ações pró-oxidantes. Pesquisas indicam que estas substâncias também podem interferir na atividade enzimática, atuar na transdução de sinais celulares, ativar fatores de transcrição e agir na expressão de genes. Um dos mecanismos propostos para a indução das enzimas antioxidantes (SOD, GPx e CAT) envolve a ativação de quinases, resultando na fosforilação do fator de transcrição citoplasmático, Nrf2 (fator 2 relacionado ao fator nuclear E2), e liberação deste do complexo inibidor Keap1-Nrf2, em função de alteração em sua conformação. Essa alteração permite a translocação do Nrf2 para o núcleo celular, no qual atua como fator de transcrição para o m-RNA das enzimas antioxidantes (42, 67, 68).

2.3.1 Café e fatores de risco cardiovascular

Anormalidades em lipoproteínas ou no metabolismo glicêmico, bem como regulação dos níveis da pressão arterial, peso, estresse oxidativo ou inflamação crônica são fatores de risco cardiovascular relacionados, pelo menos parcialmente, aos hábitos alimentares (9). Portanto, intervenções alimentares podem ser benéficas na redução do risco de DCV. Estudos sobre associação do café com DCV (tabela 1, página 29) têm apresentado resultados conflitantes. Em alguns estudos observacionais, o consumo de café tem sido associado ao aumento do colesterol sérico total e da LDL (29). Evidências mostram que o consumo de café não filtrado aumenta a concentração de colesterol sérico e, conseqüentemente, o risco de DCV, enquanto o filtrado apresenta pequeno ou nenhum efeito sobre essa concentração (28, 69).

2.3.1.1 Aterosclerose

A aterosclerose, uma doença inflamatória crônica da parede das artérias, é a principal causa de mortes e desabilitação no mundo ocidental, pois predispõe ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doenças vasculares periféricas. Várias condições como hipertensão arterial sistêmica, hiperhomocisteinemia, diabetes, inflamação e hiperlipidemias induzem injúria ao endotélio vascular, desencadeando a aterogênese (22, 70). Evidências sugerem que esses fatores pró-aterogênicos estimulam a produção de ERO no endotélio e o estresse oxidativo resultante age como mediador das manifestações patológicas da disfunção endotelial. O aumento de ERO pode afetar quatro mecanismos fundamentais que contribuem para a aterosclerose: disfunção das células endoteliais, crescimento de células musculares lisas, migração de monócitos e oxidação da LDL. Existem grandes evidências do importante papel da LDL-ox na etiologia da aterosclerose (22).

Na hipótese oxidativa da aterosclerose (figura 5), a LDL circulante pode ser oxidada no plasma ou no espaço subendotelial. No plasma, sua oxidação é mínima se houver quantidade suficiente de antioxidantes. Para que haja proteção à oxidação no espaço subendotelial, acredita-se que antioxidantes devam ligar-se à LDL e serem transportados acoplados a ela (71).

Figura 5. Representação esquemática da hipótese oxidativa e do papel da LDL oxidada no processo aterogênico (72)

As LDLs atravessam as células endoteliais intactas por transporte vesicular (transcitose), o qual não requer receptores. A magnitude desse transporte é concentração-dependente, logo níveis elevados de LDL resultam em aumento da quantidade da lipoproteína que atinge a íntima (71). Ao penetrar no endotélio, a LDL sofre modificação oxidativa pela ação de produtos metabólicos, ERO e enzimas produzidas pelas células vasculares (macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas) e catalisada pela presença de metais de transição, como ferro e cobre. A LDL modificada possui características inflamatórias e citotóxicas nas células endoteliais (73).

Na primeira fase da modificação oxidativa (fase inflamatória), na íntima do vaso, os lipídeos da LDL sofrem oxidação, sem que ocorram grandes modificações na apolipoproteína B, resultando na formação da LDL minimamente oxidada. Esta induz à disfunção endotelial com expressão de moléculas de adesão intercelular 1

(ICAM-1), VCAM-1, selectinas (L, E e P) e integrinas. Essas moléculas regulam a fixação e migração transendotelial de células inflamatórias para a íntima, principalmente monócitos e linfócitos T. Os monócitos, então, aderem-se à superfície da parede vascular e outras moléculas específicas (proteína quimiotática específica, MCP-1) podem atraí-los para o espaço subendotelial, no qual se diferenciam em macrófagos. Esse processo é estimulado pelas citocinas como TNF- α e interleucina 1 β (IL-1 β), que amplificam e mantêm os sinais pró-inflamatórios da aterosclerose. A LDL minimamente oxidada pode sofrer intensa oxidação por ERO e enzimas produzidas pelos macrófagos, como mieloperoxidase e lipoxigenase, transformando-se em LDL altamente oxidada (LDL-ox), caracterizando, assim a segunda fase da modificação oxidativa. Nesta fase, surgem produtos de decomposição lipídica, os quais podem reagir com resíduos de lisina da apolipoproteína B, modificando-os. A LDL-ox passa a ser reconhecida pelos receptores *scavengers* dos macrófagos, que não são regulados pela concentração intracelular de colesterol (70, 74).

A LDL-ox apresenta: 1) conteúdo aumentado de lisolecitina, óxidos de colesterol e hidroperóxidos lipídicos e conteúdo diminuído de ácidos graxos polinsaturados, como consequência da oxidação de seus lipídeos; 2) atividade quimiotática para monócitos circulantes e inibitória para a migração de macrófagos da parede arterial para a circulação; 3) citotoxicidade aumentada; 4) menor taxa de captação pelo receptor da LDL nativa e ávida captação pelos receptores *scavenger* dos macrófagos (71).

A LDL-ox atua no endotélio, induzindo a expressão gênica do fator estimulador de colônia de macrófagos, que contribui para a diferenciação de monócitos para macrófagos, e da MCP-1, estimulando a replicação de macrófagos no espaço subendotelial e recrutando mais células inflamatórias para a lesão em formação. Quando ativados, os macrófagos liberam radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, citocinas (TNF- α , IL-1 β) e enzimas hidrolíticas. Estes produtos, além de lesar células adjacentes, estimulam a proliferação de músculo liso subendotelial e acúmulo de colesterol nos macrófagos, formando as células espumosas (macrófagos carregados de lipídeos tóxicos), que exercem ação inflamatória e induzem proliferação celular no espaço subendotelial. Desde a disfunção endotelial até a

ruptura de lesões na parede vascular, há participação ativa da LDL-ox como agente pró-aterogênico (47, 70, 75).

A lisofosfatidilcolina, em alta concentração na LDL-ox, é quimiotática para monócitos e linfócitos T, inibe a produção de óxido nítrico, responsável pelo relaxamento do endotélio, e induz as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão na superfície, as quais se ligam a várias classes de leucócitos e aumentam sua permeabilidade aos constituintes plasmáticos, permitindo que plaquetas e monócitos do sangue se fixem ao endotélio. Por sua vez, fatores liberados por estas células induzem a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima, seguida de proliferação (a síntese destas células induzem ao acúmulo de colágeno, fibras elásticas, transformação dos monócitos em macrófagos e acúmulo de lipídeos), contribuindo para que a lesão progrida. Nesta fase, o espessamento da íntima provoca o remodelamento, ou seja, uma dilatação da artéria compensatória ao estreitamento do lúmen. Mais uma vez, sob o estímulo da LDL-ox, entre outros, as células do sistema imune local liberam enzimas, citocinas e fatores de crescimento que podem induzir necrose focal. Ciclos repetidos de acúmulo e ativação de células mononucleares, migração e proliferação das células musculares lisas com produção de colágeno, levam ao aumento progressivo da lesão, até que se estruture uma capa fibrosa ao redor de um núcleo lipídico e de tecido necrótico. Quando a artéria já não consegue se dilatar adequadamente, a lesão pode então alterar o fluxo sanguíneo, manifestando-se clinicamente por síndromes coronarianas estáveis. O excesso de células espumosas no núcleo lipídico torna a placa mais frágil, sendo que uma fratura na capa fibrosa, com consequente formação de trombo, pode complicar a lesão avançada, sendo considerada a principal causa de eventos cardiovasculares agudos. Esta capa fibrosa sofre remodelamento dinâmico e contínuo, sendo que o balanço entre os processos de síntese e degradação dos seus componentes é controlado por mediadores inflamatórios, liberados em parte como resposta à LDL-ox. As citocinas podem induzir a expressão de metaloproteinases da matriz extracelular, enzimas que digerem as fibras de colágeno e elastina, fragilizando a capa da lesão. Em contraste, a HDL inibe a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (71, 75).

O conteúdo de antioxidantes da partícula de LDL é crucial para sua proteção, porém as defesas antioxidantes endógenas podem ser insuficientes. Teoricamente, os

antioxidantes poderiam exercer efeitos favoráveis tanto nas lesões iniciais quanto intermediárias e avançadas da aterosclerose (52).

Além da LDL, a Lp(a) também possui propriedades pró-aterogênicas. Essa lipoproteína é semelhante à LDL na composição de lipídeos, concentração e densidade, porém contém uma glicoproteína adicional, a apolipoproteína (a) ou apo (a), acoplada à apo B-100 por pontes de dissulfeto. Essa glicoproteína pertence à família do plasminogênio e atua como um inibidor competitivo do ativador do plasminogênio tecidual, inibindo a geração de plasmina e a fibrinólise (58). Ela ainda atua na aterosclerose por meio de estímulo da deposição de colesterol na parede das artérias, indução da ativação da atividade quimiotática de monócitos no espaço subendotelial, aumento da formação de células espumosas e estímulo à proliferação de células musculares lisas (76).

A hiperhomocisteinemia também é um potente fator de risco para DCV e está associada à aterosclerose. Estudos clínicos mostram que indivíduos com excesso de homocisteína plasmática apresentam disfunção endotelial e aumento no estresse oxidativo. Entretanto, ainda não se sabe quais são os mecanismos pelos quais a homocisteína aumenta o estresse oxidativo (58).

Poucos estudos avaliaram a associação entre a ingestão de café e o risco de aterosclerose (66). Reis et al. (77) avaliaram a relação entre consumo habitual de café durante a vida adulta jovem e o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, mas não observaram associação significativa.

O consumo de café pode diminuir a suscetibilidade da LDL à oxidação e inibir a agregação plaquetária, devido à incorporação de ácidos fenólicos em LDL e nas plaquetas (17, 78). Portanto, o consumo de café pode influenciar na formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica, em decorrência do provável envolvimento da LDL-ox na aterogênese. Além disso, os ácidos fenólicos do café têm um importante efeito antioxidante no endotélio (52). Em estudo realizado em células endoteliais (79), o ácido cafêico aumentou a atividade da enzima óxido nítrico sintase e conseqüentemente a síntese de óxido nítrico e neutralizou espécies reativas presentes no meio intracelular.

2.3.1.2 Diabetes mellitus

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou de sua incapacidade de exercer adequadamente seus efeitos. Em longo prazo, suas consequências decorrem de alterações macro e microvasculares que levam à disfunção, dano ou falência de vários órgãos. O DM2, forma presente em 90 a 95% dos casos, resulta em geral de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de sua secreção. Há evidências de que as alterações no estilo de vida, com ênfase na alimentação, obesidade e na redução da atividade física, estão associadas ao aumento acentuado de sua prevalência (80).

O DM é um fator de risco independente para DCV e um problema de importância crescente em saúde pública, devido à ocidentalização da dieta assim como ao estilo de vida inadequado (obesidade e sedentarismo). Essa doença está intimamente associada à inflamação e à aterosclerose. A LDL-ox está entre os fatores de risco relacionados ao DM e pode causar resistência à insulina e aumento da glicemia (28). A hiperglicemia relacionada ao DM causa estresse oxidativo intracelular e consequentemente disfunção endotelial, por meio dos seguintes mecanismos: produção de ERO; acúmulo de sorbitol; glicoxidação não-enzimática de macromoléculas; e ativação direta da proteína quinase C. A glicoxidação de proteínas resulta na formação de produtos finais de glicação avançada (AGE). A interação de AGE com os seus receptores de superfície de membrana (RAGE) está relacionada à geração de ERO, redução dos níveis de glutathione reduzida e ativação do NFκB. O acúmulo crônico de AGE promove a expressão de VCAM-1 e interações monócito-endotélio com formação de lesões ateroscleróticas (75).

A bebida de café contém diversos compostos que têm sido associados à redução do risco de DM2: 1) magnésio e potássio, que podem atuar na regulação da ação da insulina e melhorar a sensibilidade à insulina; 2) ácidos fenólicos, cuja atividade antioxidante pode minimizar o estresse oxidativo, responsável por provocar resistência à insulina, prejudicar a secreção deste hormônio e causar disfunção das células β pancreáticas; 3) cafeína, cuja ingestão aguda pode diminuir a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, contudo, o consumo regular da bebida de café

pode resultar em aquisição de tolerância à cafeína e consequentemente normalizar o metabolismo glicídico (28, 81, 82). A cafeína, ainda, estimula a termogênese e aumenta o gasto energético, os quais podem estimular a sensibilidade à insulina (82). Além disso, esse alcalóide tem sido associado à inibição de vários efeitos biológicos, como oxidação de lipídeos exacerbada e mobilização do glicogênio muscular ou lipólise aumentada e lipídeos corporais diminuídos (28).

Estudos populacionais sugeriram que o consumo de café pode ajudar a prevenir o DM2 e suas complicações. Em diversos estudos prospectivos de coorte (62, 82-88), houve associação inversa significativa entre o risco de DM2 e a ingestão de café, porém os mecanismos para o efeito da bebida sobre o metabolismo da glicose ainda não são conhecidos. Dentre os mecanismos sugeridos para esta associação estão a inibição da glicose-6-fosfatase e da absorção de glicose intestinal pelo ACG ou outros compostos fenólicos do café e a ingestão aumentada de magnésio proveniente do café. A glicose-6-fosfatase é fundamental na regulação do nível de glicose plasmática, portanto a função reduzida dessa enzima pode diminuir a concentração de glicose (81). A ingestão de magnésio dietético e sua concentração sérica foram inversamente associadas ao risco de DM2 em estudos prospectivos de coorte citados em duas revisões (29, 81). Entretanto, van Dieren et al. (82) não observaram associação entre a ingestão de magnésio, potássio e cafeína e a redução do risco desta doença. Mais estudos sobre a relação entre o consumo de café e o risco de DM podem ser visualizados na tabela 1 (página 29).

2.3.1.3 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial apresenta alta prevalência e baixo percentual de controle, logo é considerada um dos principais fatores de risco cardiovascular modificáveis e um dos problemas mais importantes de saúde pública. Estima-se que aproximadamente 29% da população mundial adulta (1,56 bilhões de indivíduos) terão hipertensão em 2025. Além disso, apresenta elevados custos médicos e socioeconômicos, principalmente por sua participação em complicações como:

doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades. No Brasil, estima-se que haja 30 milhões de hipertensos (89).

Essa doença está intimamente relacionada à disfunção endotelial. A angiotensina II, em adição às suas propriedades vasoconstritoras, pode estimular a inflamação na íntima arterial, visto que esta enzima provoca a produção de ânion superóxido nas células endoteliais e células musculares lisas. Além disso, pode aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), e de VCAM-1, ICAM-1 e MCP-1 pelas células endoteliais (75).

Há estudos que relacionam a hipertensão arterial ao consumo de café (tabela 1, página 29), todavia não há conclusões definitivas sobre o efeito da bebida na incidência de hipertensão (90). De 5 estudos, 3 referiram que houve associação não-linear entre consumo de café e hipertensão (82, 91, 92). Em um deles (93) houve aumento de pressão arterial somente em consumidores não habituais e em outro (94) houve redução desta, porém em indivíduos hipertensos.

A cafeína apresenta efeito pressórico agudo. Entretanto, cerca de 5 dias após o consumo diário de café, esses efeitos não são mais observados; os consumidores habituais de café desenvolvem tolerância ao efeito induzido pela cafeína. O corpo humano possui hormônios regulatórios que mantêm a pressão arterial e podem causar tolerância aos efeitos humorais e hemodinâmicos da cafeína (14). Além disso, outros compostos presentes no café também podem exercer efeitos de controle da pressão arterial, incluindo ACG, melanoidinas e magnésio. Dependendo do consumo, esses compostos podem contrabalancear o efeito pressórico da cafeína (95).

Os ACG são metabolizados a ácido ferúlico e caféico *in vivo*, os quais podem apresentar efeito anti-hipertensivo em humanos (96). Estudo randomizado e controlado (97), avaliou a pressão arterial de 263 homens e 326 mulheres com mais de 55 anos. Observou-se que, no grupo que teve alto consumo de polifenóis, houve redução significativa (36%) na prevalência de hipertensão, em relação àquele com baixo consumo. Além disso, houve associação significativa entre consumo de polifenóis e redução da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD).

O efeito hipotensivo dos ACG pode envolver a vasodilatação mediada pelo óxido nítrico. Indivíduos com hipertensão possuem níveis elevados de peróxido de

hidrogênio e ânions superóxido. Esses ânions reduzem a biodisponibilidade de óxido nítrico no tecido endotelial, pois reagem com ele para formar o peroxinitrito. A ingestão de ACG pode melhorar a função endotelial pela redução dos ânions superóxido, por meio do aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, porque o ácido ferúlico sequestra ânions superóxido e tem efeito hipotensivo em ratos hipertensos (94, 96, 98).

Além da ação sobre o metabolismo do óxido nítrico, um estudo (98) mostrou que a bebida de café, principalmente preparada com a torra clara, a qual preserva a maior quantidade de compostos fenólicos presentes no café, apresentou atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina, resultando em efeito hipotensivo.

2.3.1.4 Biomarcadores inflamatórios relacionados à disfunção endotelial

A inflamação está intimamente relacionada ao estresse oxidativo e à aterosclerose e suas complicações. A inflamação crônica pode levar ao dano tecidual, proliferação anormal de células musculares lisas e aumento do risco cardiovascular (59).

O aumento da liberação e a ação das principais citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1), bem como MCP-1, proteína C reativa (PCR) e fibrinogênio desempenham importante função na gênese das DCV, aterosclerose e resistência à insulina (99, 100). As citocinas, embora tenham um papel benéfico na resposta metabólica e inflamatória por aumentarem a disponibilidade de substratos energéticos e a velocidade dos processos biológicos, o aumento da sua produção, em resposta às doenças inflamatórias crônicas, aterosclerose e estresse psicológico, gera espécies reativas potencialmente tóxicas, que por sua vez, podem aumentar ainda mais a produção de citocinas pela ativação do fator de transcrição NF κ B. Por outro lado, as citocinas pró-inflamatórias também ajudam as defesas antioxidantes, aumentando as atividades da SOD, CAT e GPx (48).

As citocinas IL-6 e TNF- α são produzidas e secretadas por células endoteliais e musculares lisas, monócitos e macrófagos e podem contribuir para o

desenvolvimento da lesão aterosclerótica por seu efeito parácrino, autócrino e endócrino. A IL-6 é secretada principalmente por adipócitos, em especial pelo tecido adiposo visceral; desempenha uma gama de funções nos efeitos imunes celulares e humorais relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual. O TNF- α age nos adipócitos, desempenhando um papel regulador no acúmulo de gordura corporal, pela inibição da lipogênese, com diminuição da expressão da lipase lipoprotéica, do GLUT-4 e da acetil Coenzima A sintetase, e com aumento da lipólise. Esta citocina está envolvida no processo de inflamação, pois desempenha um papel principal na cascata das citocinas. IL-6 e TNF- α são mediadores centrais da resposta de fase aguda, pois determinam a produção e a elevação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) e, em especial, da PCR. Ainda, o TNF- α induz a expressão de IL-6 e promove a expressão endotelial de moléculas de adesão. Estudos científicos têm demonstrado correlações significantes entre essas citocinas e os componentes da síndrome metabólica (glicemia, circunferência da cintura, níveis séricos de TG e de HDL e pressão arterial, além do IMC e da resistência à insulina), logo podem predizer risco para DCV e infarto do miocárdio (75, 101).

A IL-1 β é principalmente produzida por monócitos e macrófagos, mas também por células endoteliais, células musculares lisas e plaquetas ativadas. Ela induz a ativação transcripcional do gene NF κ B para a expressão de moléculas de adesão e citocinas. Também, aumenta a expressão das moléculas de adesão endotelial, facilitando a agregação de outras células inflamatórias no endotélio ativado. Conjuntamente com o TNF- α , estimula a produção de IL-6 por células musculares lisas e aumenta a expressão de macrófagos, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento de fibroblastos, associados com a progressão do processo inflamatório da aterosclerose (70).

A MCP-1 é produzida por uma variedade de células, incluindo leucócitos, células endoteliais e fibroblastos, em resposta à LDL-ox e citocinas pró-inflamatórias, sendo, desse modo, também um produto da reação da inflamação que desempenha um papel causal no recrutamento de leucócitos mononucleares para a camada íntima da artéria. Controla a função dos monócitos por meio de seu receptor e está envolvida em mudanças inflamatórias na parede arterial, prejudicando a

vasodilatação endotélio-dependente. Portanto, medidas dos níveis circulantes da MCP-1 podem ser úteis em prever o risco da aterogênese. Níveis aumentados dessa proteína têm sido encontrados em pacientes hiperlipidêmicos, visto que suas concentrações foram correlacionadas com a LDL. Aumento da sua expressão tem sido encontrado em pacientes com doença arterial coronária e seus níveis encontram-se elevados em pacientes com infarto do miocárdio (70, 75).

A PCR é uma proteína de fase aguda, cuja síntese é regulada por citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-6 e TNF- α . Embora o fígado seja a principal fonte de PCR, os adipócitos e o tecido arterial também a sintetizam. Seus níveis estão aumentados em resposta às infecções ativas ou ao processo inflamatório agudo. Elevações modestas dos níveis de PCR estão também presentes em situações crônicas inflamatórias, como a aterosclerose, e seus níveis aproximadamente triplicam na presença de risco de doenças vasculares periféricas. Dessa forma, tem sido descrito pela literatura a capacidade de a PCR prever eventos cardiovasculares. A PCR não é considerada somente um biomarcador do processo aterosclerótico, mas também está envolvida na patogênese da aterosclerose por meio de vários mecanismos: a) inibe a transcrição da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eONS) nas células endoteliais e desestabiliza o m-RNA da eONS, o qual leva a um decréscimo na liberação basal de óxido nítrico; b) promove a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 pelas células endoteliais, induz a MCP-1 e promove a captação de colesterol pelos macrófagos; c) estimula os monócitos a produzir o fator tecidual e citocinas pró-inflamatórias por meio da estimulação do NF κ B; d) estimula a migração e proliferação de células musculares lisas e produção de ERO; e) estimula a expressão e a atividade do PAI-1 em células endoteliais, e este efeito é adicional em situação de hiperglicemia. Assim, a elevação dos níveis de PAI-1 no diabetes e na síndrome metabólica é em razão da estimulação dos monócitos e das células endoteliais pela PCR, que nestas situações encontra-se significativamente aumentada (figura 6) (70, 101, 102).

Figura 6. Proteína C reativa e inflamação (70) modificada (101)

Níveis séricos elevados da PCR correlacionam-se ao aumento do risco cardiovascular. Volp et al. (101) relataram que indivíduos saudáveis apresentaram aumento linear nos níveis desta proteína com o acréscimo do número de desordens metabólicas (dislipidemia, adiposidade central, resistência à insulina e hipertensão).

Em indivíduos saudáveis, os níveis séricos de fibrinogênio correlacionam-se com os componentes da síndrome metabólica e também com o IMC. Portanto, alta concentração plasmática de fibrinogênio pode predizer risco para diabetes e DCV. O fibrinogênio causa a trombose arterial e venosa por meio do aumento da formação de fibrina, agregação plaquetária e viscosidade do plasma, e a aterosclerose pela proliferação de células endoteliais e da musculatura lisa vascular (101).

Moléculas de adesão celular (selectinas, integrinas, ICAM-1 e VCAM-1) também têm sido utilizadas como biomarcadores de aterosclerose e podem predizer o risco de eventos coronarianos futuros em populações saudáveis. Concentrações plasmáticas elevadas dessas moléculas foram reportadas em pacientes com doença cardíaca isquêmica, hipertensão e diabetes (70).

Poucos estudos avaliaram os efeitos do café sobre biomarcadores inflamatórios relacionados à disfunção endotelial e seus resultados são contraditórios. O consumo de café por indivíduos saudáveis não se associou (103), associou-se inversamente (104) ou diretamente (105) a esses biomarcadores (tabela 1).

A avaliação de biomarcadores relacionados ao metabolismo lipídico, aos fatores de coagulação, ao estresse oxidativo e à inflamação são de grande relevância para a redução de risco de DCV. Esses marcadores predizem o risco de indivíduos saudáveis desenvolverem eventos coronarianos. Entre os mais utilizados na clínica estão Lp(a), LDL-ox, homocisteína, fibrinogênio e PCR. Ainda, deve-se considerar a alta concentração de HDL como fator protetor e de LDL e TG como fatores agravantes (58).

Tabela 1. Resumo de estudos sobre os efeitos do café em doenças cardiovasculares ou em seus fatores de risco em indivíduos saudáveis nos últimos 10 anos.

Referência	Risco	Descrição do Estudo	Principais resultados
Andersen et al., 2006 (24)	DCV	Estudo de coorte. 37312 mulheres pós-menopausa (55 a 69 anos), ingeriram café (1-3, 4-5 e ≥ 6 xícaras/dia) e foram acompanhadas por 15 anos.	- A taxa de morte por DCV foi de 0,76 para o consumo de 1-3 xícaras; 0,81 para 4-5 xícaras; 0,87 para ≥ 6 xícaras/dia.
Wu et al., 2009 (61)	DCV	Meta-análise de 21 estudos prospectivos de coorte. 407806 participantes estratificados segundo o consumo de café (< 1 xícara/dia nos Estados Unidos ou ≤ 2 xícaras/dia na Europa; 1-3 ou 3-4; 4-5 ou 5-6; ≥ 6 ou ≥ 7 xícaras/dia).	- O consumo de café não se associou ao aumento do risco de doença coronariana. Em mulheres, o consumo moderado de café associou-se à redução desse risco.
De Koning Gans et al., 2010(65)	DCV	Estudo prospectivo de coorte. 37514 holandeses de ambos os sexos (20 a 65 anos), ingeriram café (<1 xícara/dia; 1-2; 2-3; 3-4; 4-6; >6 xícaras/dia) e foram acompanhados por 13 anos.	- Houve associação inversa entre o consumo de café e a incidência de doença coronariana com menor risco relativo em consumidores de 2-3 xícaras/dia.
Mineharu et al., 2011 (64)	DCV	Estudo prospectivo de coorte. 76979 japoneses de ambos os sexos (40 a 79 anos) foram estratificados segundo o consumo de café (< 1 xícara/semana; 1-6 xícaras/semana; 1-2 xícaras/dia e ≥ 3 xícaras/dia) e acompanhados por 13,1 anos.	- Associação inversa entre consumo de café e risco de mortalidade por acidente vascular cerebral; - 1 a 2 xícaras/dia reduziu em 16 a 23% o risco de mortalidade por DCV, porém o maior consumo o aumentou.
Yukawa et al., 2004 (106)	Oxidação da LDL	Estudo clínico. 11 homens (20 a 31 anos) ingeriam café filtrado (24 g/dia) por 1 semana para verificar a influência da bebida sobre a LDL-ox.	- O consumo de café reduziu significativamente a suscetibilidade da LDL à oxidação <i>ex vivo</i> .
Natella et al., 2007 (52)	Oxidação da LDL	Estudo clínico. 10 voluntários (24 a 35 anos) ingeriram 1 xícara (200 mL) de café filtrado. Amostras de sangue foram coletadas em jejum e 30 e 60 minutos após a ingestão do café.	- Redução da suscetibilidade da LDL à oxidação; sem alteração na concentração das LDL-ox.
Panagiotakos et al., 2004 (15)	Homocisteína plasmática	Estudo prospectivo de coorte. 3042 gregos de ambos os sexos foram estratificados segundo o consumo de café (0, < 100 , 200-400 e > 500 mL/dia).	- Associação dose-dependente positiva entre consumo de café e homocisteína plasmática

(Continuação)

Tabela 1. Continuação

Referência	Risco	Descrição do Estudo	Principais resultados
Rosengren et al., 2004 (83)	DM2	Estudo prospectivo de coorte. 1361 mulheres suecas (39 a 65 anos) ingeriram de 0-2, 3-4, 5-6, ≥ 7 xícaras de café/dia e foram acompanhadas por 18 anos para se verificar o risco de desenvolver diabetes.	- O risco de DM2 foi de 0,55 para 3-4 xícaras; 0,39 para 5-6 xícaras e 0,48 para ≥ 7 xícaras/dia quando comparado ao consumo de ≤ 2 xícaras/dia.
Van Dam et al., 2004 (84)	DM2	Estudo prospectivo de coorte. Holandeses de ambos os sexos (50 a 74 anos) ingeriram de 0-2, 3-4, 5-6, ≥ 7 xícaras de café/dia por 6,4 anos.	- O consumo ≥ 7 xícaras/dia não se associou à redução significativa no risco de DM2. - houve associação inversa entre o consumo de café e o risco de tolerância à glicose diminuída; indivíduos que ingeriram ≥ 5 xícaras/dia apresentaram redução de 50% no risco de DM quando comparados àqueles cujo consumo ≤ 2 xícaras/dia.
Salazar-Martinez et al., 2004 (85)	DM2	Estudo prospectivo de coorte. 41934 homens (40 a 75 anos; 12 anos de seguimento) e 84276 mulheres (30 a 55 anos; 18 anos de seguimento) consumiram café filtrado, descafeinado ou outras bebidas cafeinadas: < 1 xícara/dia, 1-3 xícaras/dia, 4-5 xícaras/dia ou ≥ 6 xícaras/dia.	- Houve relação inversa entre a ingestão de café e a incidência de DM2; homens e mulheres com consumo ≥ 6 xícaras/dia apresentaram, respectivamente, 54% e 29% de redução no risco quando comparados aos não-consumidores.
Tuomilehto et al., 2004 (86)	DM2	Estudo prospectivo de coorte. Finlandeses (6974 homens e 7655 mulheres), 35 a 64 anos, ingeriram 0-2, 3-4, 5-6, 7-9, ≥ 10 xícaras de café/dia e foram acompanhados durante 12 anos.	O consumo de café reduziu o risco de DM2 em 79% nas mulheres e em 55% nos homens cujo consumo de café era ≥ 10 xícaras/dia, quando comparados àqueles cujo consumo era 0-2 xícaras/dia.
Odegaard et al., 2008 (87)	DM2	Estudo prospectivo de coorte. 36908 indivíduos (45-74 anos), participantes do Singapore Chinese Health Study, foram estratificados segundo consumo de café (0 xícara/dia, 1, 2-3 ou ≥ 4 xícaras/dia) e acompanhados por mais de 5 anos.	- Participantes que referiram um consumo ≥ 4 xícaras de café/dia apresentaram redução de 30% no risco de DM2.
Van Dieren et al., 2009 (82)	DM2	Estudo prospectivo de coorte. 38176 holandeses de ambos os sexos ingeriram <1 , 1-2, 2-3, 3-4, 4-6 ou >6 xícaras de café/dia e foram acompanhados por 6 anos.	- O consumo de café associou-se à redução do risco de DM2 - O consumo < 3 xícaras/dia associou-se a aumento da pressão arterial, porém > 4 xícaras/dia associou-se à redução desta.

(Continuação)

Tabela 1. Continuação

Referência	Risco	Descrição do Estudo	Principais resultados
Huxley et al., 2009 (107)	DM2	Meta-análise de 18 estudos de coorte. 457922 indivíduos de ambos os sexos e de diversos países foram estratificados segundo o consumo de café (quase nunca, <1, 1, 2-3, $\geq$ 4 xícaras/dia).	- Cada xícara adicional consumida por dia associou-se à redução de 7% no risco de DM2; - A ingestão de 3-4 xícaras/dia associou-se à redução de 25% no risco de DM2 quando comparada à ingestão $\leq$ 2 xícaras/dia.
Boggs et al., 2010 (88)	DM2	Estudo prospectivo de coorte. 46906 afro-americanas (30 a 69 anos) ingeriram 0-1, 1, 2-3 ou $\geq$ 4 xícaras/dia e foram acompanhadas por 12 anos.	- Houve associação inversa entre consumo de café e risco de DM2. O risco relativo foi de 0,94 para 0-1 xícaras/dia e 0,83 para $\geq$ 4 xícaras/dia; café descafeinado e chá não se associaram significativamente ao risco de DM2.
Kempf et al., 2010 (104)	DM2, disfunção endotelial	Estudo clínico. 47 consumidores habituais de café consumiram 600 mL de café filtrado/dia por 1 mês e 1200 mL de café por mais 1 mês.	- O consumo de café não se associou à glicemia, insulinemia e ao índice <i>homeostasis model assessment for insulin resistance</i> (HOMA-IR); - 1200 mL/dia reduziu a concentração de IL-18 e 8-isoprostano e aumentou a concentração de adiponectina; - Não houve alteração significativa na concentração plasmática de IL-6, fator inibidor da migração de macrófagos, antagonista do receptor de IL-1, proteína soro amiloide A, leptina, nitrosamina e PCR.
Floegel et al., 2012 (62)	DM2, DCV	Estudo prospectivo de coorte. 42659 alemães foram estratificados conforme o consumo de café (< 1, 1-2, 2-3, 3-4, $\geq$ 4 xícaras/dia) e acompanhados durante 8,9 anos.	- O consumo de $\geq$ 4 xícaras de café com ou sem cafeína/dia reduziu o risco de DM2 quando comparado àquele < 1 xícaras/dia; o consumo de café não se associou ao risco de DCV.

(Continuação)

Tabela 1. Continuação

Referência	Risco	Descrição do Estudo	Principais resultados
Klag et al., 2002 (91)	Hipertensão arterial	Estudo prospectivo de coorte. 1017 homens brancos, com idade média de 26 anos, foram estratificados conforme o consumo de café (0, 1-2, 3-4, ≥ 5 xícaras/dia) e acompanhados durante 33 anos para se verificar o efeito do café sobre a pressão arterial.	- o consumo de 1 xícara de café/dia aumentou a PAS em 0,19 mmHg e a PAD em 0,27 mmHg. - a incidência de hipertensão aumentou progressivamente em consumidores de 1-2 xícaras/dia (27,4%) e 3-4 xícaras/dia (31,5%) quando comparados aos não consumidores (18,8%), enquanto que reduziu para 25,8% nos consumidores de > 4 xícaras/dia.
Corti et al., 2002 (93)	Hipertensão arterial	Estudo clínico. Pressão arterial e pulsação de 15 indivíduos (6 consumidores habituais de café e 9 consumidores não habituais) foram obtidas antes e após a tripla ingestão de café expresso ou expresso descafeinado ou após a administração intravenosa de cafeína (250 mg) ou placebo (salina).	- Com o consumo de café, houve aumento da pressão arterial somente nos indivíduos que não eram consumidores habituais de café.
Watanabe et al., 2006 (94)	Hipertensão arterial	Estudo clínico. 28 indivíduos ingeriram 140 mg de ACG (extrato de grãos de café) ou placebo por 12 semanas.	- Comparado ao grupo placebo, o grupo ACG apresentou uma redução de 10 mmHg na PAS e 7 mmHg na PAD.
Uiterwaal et al., 2007 (92)	Hipertensão arterial	Estudo prospectivo de coorte. 2985 homens e 3383 mulheres holandeses ingeriram 0, 1-3, 3-6 e > 6 xícaras de café/dia e foram acompanhados por 11 anos.	- Consumidores de café apresentaram maior risco de hipertensão que não-consumidores; - Mulheres com ingestão > 6 xícaras/dia apresentaram um menor risco de hipertensão em relação àquelas cuja ingestão foi de 1-3 xícaras/dia; - Indivíduos acima de 39 anos apresentaram PAS 0,35 mmHg menor por xícara ingerida/dia em relação àqueles <39 anos.
Zhang et al., 2011 (95)	Hipertensão arterial	Meta-análise de 6 estudos prospectivos de coorte. 172567 consumidores habituais de café (26 a 55 anos), provenientes de 4 países, foram estratificados segundo o consumo de café (<1, 1-3, 3-5, > 5 xícaras/dia) e acompanhados entre 6,4 a 33 anos.	- Houve aumento no risco de hipertensão em consumidores de 1-3 xícaras de café/dia; o consumo de 6 xícaras/dia reduziu o risco de hipertensão em relação ao não-consumo de café

(Continuação)

Tabela 1. Continuação

Referência	Risco	Descrição do Estudo	Principais resultados
Zampelas et al., 2004 (105)	Disfunção endotelial	Estudo transversal. 1439 homens (18 a 87 anos) e 1518 mulheres (18 a 89 anos) da província grega de Attica, com consumo de café > 200mL/dia, foram avaliados para se verificar a associação entre consumo de café e biomarcadores inflamatórios.	- O consumo de café associou-se ao aumento nas concentrações de PCR, IL-6, proteína soro amilóide A, TNF- α e contagem de leucócitos em homens e mulheres, quando comparados aos não consumidores da bebida.
Lopez-Garcia et al., 2006 (103)	Disfunção endotelial	Estudo transversal. 730 mulheres saudáveis e 663 com DM2 (43 a 70 anos) da população do <i>Nurses' Health Study I</i> . O consumo de café foi estratificado segundo a presença ou não de cafeína e a quantidade consumida (< 1 xícara/mês, 1 xícara/mês a 4 xícaras/semana, 5 a 7 xícaras/semana ou 2 xícaras/dia) para verificar os efeitos do consumo de café sobre marcadores inflamatórios relacionados à função endotelial.	- Mulheres saudáveis não apresentaram diferenças nas concentrações plasmáticas de biomarcadores inflamatórios, enquanto que nas com DM2 o alto consumo de café cafeinado associou-se com a diminuição das concentrações plasmáticas de selectina-E e PCR; - O alto consumo de café descafeinado associou-se à diminuição das concentrações plasmáticas de selectina-E e PCR apenas em mulheres saudáveis; - Os cafês com e sem cafeína não exerceram efeito sobre a função endotelial.

ACG: ácidos clorogênicos; DCV: Doenças cardiovasculares; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; HOMA-IR: índice *homeostasis model assessment for insulin resistance*; IL: interleucina; LDL: lipoproteína de baixa densidade; LDL-ox: LDL oxidadas; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PCR: proteína C reativa; TNF- α : fator de necrose tumoral α .

2.4 HIPÓTESES DO ESTUDO

- O café preparado com torra média-clara contém maior teor de ACG que aquele preparado com torra média, portanto apresenta maior capacidade antioxidante;
- O café torra média-clara reduz marcadores de lipoperoxidação (LDL-ox e 8-isoprostanos);
- Não há associação entre consumo de café filtrado e lipídeos plasmáticos, independente do grau de torra;
- Não há associação entre consumo habitual de café e a pressão arterial, independente do grau de torra;
- Há associação inversa ou não há associação entre consumo de café preparado as duas torras de café e biomarcadores inflamatórios.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Comparar a atividade antioxidante de duas torras de café (média-clara e média) e seus efeitos sobre biomarcadores de risco cardiovascular em indivíduos saudáveis.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações de compostos fenólicos totais e dos principais compostos antioxidantes (ácidos fenólicos, cafeína e melanoidinas) nas duas amostras de café filtrado;
- Verificar a capacidade antioxidante total nas amostras de café;
- Comparar os efeitos da ingestão de café preparado com cada torra sobre o perfil lipídico, glicemia e pressão arterial;
- Comparar os efeitos da ingestão de café preparado com cada torra sobre a capacidade antioxidante total e atividade das enzimas antioxidantes;
- Comparar os efeitos da ingestão de café preparado com cada torra sobre biomarcadores de peroxidação lipídica;
- Comparar os efeitos da ingestão de café preparado com cada torra sobre biomarcadores inflamatórios.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Os indivíduos procuraram espontaneamente a equipe do estudo Café e Coração, vinculada à Unidade de Coronariopatias Crônicas do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após convite de ex-participantes do estudo, de funcionários do serviço, de parentes que são tratados pelo serviço ou informação sobre o estudo veiculada na mídia.

Voluntários saudáveis foram selecionados, no período de março a julho de 2010, após realizarem as seguintes dosagens bioquímicas: hemograma completo, colesterol total e frações, glicemia de jejum, uréia e creatinina. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 1).

Os critérios utilizados para inclusão no estudo foram:

- indivíduos entre 20 e 65 anos de idade, de ambos os sexos e qualquer raça;
- não tabagistas ou ex-tabagista há mais de 2 anos;
- não etilistas (ausência de consumo diário de bebidas alcoólicas);
- ausência de medicamentos de uso contínuo e
- ausência de DCV, doenças renais, doenças hepáticas, DM e hipertensão arterial.

Os critérios de exclusão (a presença de pelo menos um critério impossibilitava a inclusão no estudo) foram:

- colesterol sérico superior a 240 mg/dL;
- glicemia de jejum superior a 100 mg/dL.

Os participantes foram submetidos aos exames: físico, bioquímico e nutricional. Ainda, responderam questionário clínico, nutricional e sócio-demográfico (anexo 2).

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo aleatorizado do tipo *crossover*. O tamanho da amostra foi baseado em estudos que relacionaram a ingestão de café à atividade antioxidante em indivíduos saudáveis (38, 40, 106, 108). Não foram obtidos muitos estudos, pois muitos são epidemiológicos ou associam a atividade antioxidante a processos patológicos ou à ingestão de cápsulas.

Os indivíduos foram orientados a manter a dieta e o estilo de vida (atividade física) habituais durante todo o estudo. Informações dietéticas foram obtidas por meio do recordatório de 24 horas (anexo 2) e do registro alimentar de 3 dias (anexo 3). O recordatório foi aplicado antes do período de *washout* e de cada intervenção e o registro alimentar durante cada intervenção, sendo posteriormente avaliados pelo *software* Avanutri, versão 4.0. Os registros foram preenchidos em 2 dias úteis alternados e 1 no final de semana, com anotação de data, horário, tipos e quantidades de alimentos e bebidas consumidos pelo próprio participante.

Os voluntários foram submetidos a duas semanas de redução e uma de abstenção de alimentos cafeinados e fontes de compostos fenólicos, como café, mate, chá verde, preto ou de canela, vinho tinto e chocolate (*washout*), para que fosse possível excluir qualquer interferência destes sobre a capacidade antioxidante no organismo e fossem minimizados os efeitos da abstinência de cafeína. Os participantes receberam orientação nutricional referente aos alimentos que poderiam ser consumidos e aqueles que deveriam ser evitados, e levaram para casa uma lista com estes alimentos e possíveis substitutos para aqueles que deveriam ser evitados (anexo 4).

Ao final do período de *washout*, os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: torra média-clara (#65) e torra média (#55). O período de intervenção foi de oito semanas. Os voluntários ingeriram café filtrado cujos grãos foram submetidos à torra média-clara ou média por quatro semanas e ao outro tipo de torra por outras quatro semanas (figura 7). Uma tabela de números aleatórios, gerada em computador, foi utilizada para distribuição dos participantes. Os voluntários foram orientados a consumir somente o café do estudo. Não foi considerada a ingestão de café puro ou com leite, pois, estudos (109, 110) mostraram que o leite não interfere nas propriedades antioxidantes do café.

* MAPA: Monitorização ambulatorial da pressão arterial

Figura 7. Fluxograma do estudo

Cada voluntário recebeu um *kit* para preparo das bebidas, composto por cafeteira elétrica, filtros de papel, garrafa térmica e pacotes de pó de café (torra média-clara ou torra média), no início do período de intervenção. O pó de café foi fornecido em embalagens de 500 g no dia de início de seu consumo. A bebida de café foi preparada em cafeteira elétrica, utilizando-se filtro de papel e 100 g de pó de café para um litro de água.

Os voluntários foram orientados a consumir de 3 a 4 xícaras (150 mL cada) de café ao longo do dia, sem horários pré-determinados. Na impossibilidade de preparo da bebida imediatamente anterior à ingestão, orientou-se seu armazenamento em garrafa térmica. Cämmerer e Kroh (111) avaliaram a influência da temperatura e do tempo de armazenamento na atividade antioxidante da bebida e observaram que, em garrafa térmica, após 6 horas, não houve alteração significativa na quantidade de ACG.

Este estudo foi registrado no *Australian New Zealand Clinical Trials Registry* (ACTRN12609001064291), vinculado à Organização Mundial de Saúde (OMS) (anexo 5), e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (anexo 6), conforme as normas de resolução 196 de 10/10/1996, do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta as pesquisas envolvendo seres vivos.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NAS BEBIDAS DE CAFÉ

4.3.1 Preparo das bebidas de café

As amostras de café foram armazenadas sob refrigeração durante o período de realização das análises da atividade antioxidante. As bebidas foram preparadas conforme orientado aos participantes, imediatamente anterior às análises. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Quantificação de compostos fenólicos totais

A determinação dos fenólicos totais foi realizada pelo método descrito por Singleton e Rossi (112), adaptado para microplaca. Alíquotas de 120 μL das bebidas diluídas (1:300, v/v) foram misturadas com 50 μL de reagente Folin-Ciocalteu (Merck) diluído 5 vezes em microplaca de poliestireno transparente (Greiner Bio One) e a mistura incubada por 3 min em temperatura ambiente. Posteriormente, 30 μL de carbonato de sódio (200 g/L) foram adicionados e a mistura incubada a 37°C por 1 h. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos foi medida em leitor de placas *Molecular Devices (SPECTRAmax)* em 765 nm. A quantificação dos fenólicos totais foi realizada, empregando-se curva analítica do padrão ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), em concentrações de 0,01 a 0,08 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de 5-ACQ/mL de bebida.

4.3.3 Determinação do perfil de ácidos fenólicos e cafeína

As análises do perfil de ácidos fenólicos e cafeína foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo líquido Agilent, modelo 1200 SL, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas com fonte de íons *eletrospray* à pressão atmosférica (API-ESI), modelo Agilent 6150, utilizando coluna Agilent Zorbax SB-C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 μm).

Após diluição das bebidas (1:100, v/v), em triplicata, alíquotas de 1 mL foram filtradas com filtro para seringa 0,22 μm (Millipore) e 20 μL foram imediatamente injetados no cromatógrafo.

A fase móvel foi constituída de ácido fórmico (Merck) 0,1% (v/v) em água deionizada (A) e metanol grau HPLC (Gold, CER Brasil) (B). Os solventes foram filtrados com membrana 0,45 μm (Millipore) e degaseificados em ultrassom antes de

serem acoplados ao sistema cromatográfico. Antes do início da análise, o sistema foi equilibrado com uma mistura de 85:15 dos eluentes A e B, respectivamente. A programação do gradiente foi a seguinte: 15% de B até 1,8 minutos, 15 - 30% B até 5 minutos, 35% de B de 6 a 12 minutos, retorno a 15% de B aos 13 minutos e mantendo por mais 7 minutos nesta condição para equilibrar a coluna. O fluxo de fase móvel foi de $320 \mu\text{L min}^{-1}$ e a temperatura do forno mantida a 40°C .

As condições do espectrômetro de massas foram: voltagem na fonte de ionização ± 3000 volts, fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) a 12 L min^{-1} , temperatura 350°C e pressão do nitrogênio a 30 psi. A análise dos ácidos fenólicos foi realizada no modo de ionização negativo e a de cafeína no modo positivo, na mesma corrida cromatográfica. Inicialmente foi realizada análise *scan* em ambos os modos e os íons mais abundantes de cada pico selecionados para análise do modo *single ion monitoring* (SIM).

A identificação do 5-ACQ e da cafeína foi realizada com base no tempo de retenção, espectro de absorção UV e espectro de massas, em comparação com os padrões de referência. A identificação dos demais ácidos fenólicos, sem padrão de referência, foi realizada pelos espectros de absorção UV (similaridade com espectro do 5-ACQ superior a 90%) e de massas, com base em dados da literatura (113-115). A quantificação foi realizada pelo DAD, por meio de curva de calibração externa de 5 pontos com o padrão de referência: cafeína a 272 nm (5 a $40 \mu\text{g/mL}$, $r^2=0,999$) e 5-ACQ a 324 nm (5 a $45 \mu\text{g/mL}$, $r^2=0,999$). Os demais ácidos fenólicos foram quantificados pela curva do 5-ACQ e os resultados somados ao deste para estimativa do teor de fenólicos totais.

A metodologia foi validada no DAD, utilizado para quantificação dos compostos do café. Foram determinados o tempo de retenção do 5-ACQ e da cafeína e a precisão das áreas, por meio da análise de oito replicatas da bebida de café intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros das curvas de calibração do 5-ACQ e cafeína, conforme metodologia proposta pela *International Conference on Harmonisation* e avaliada por Ribani et al. (116): $\text{LD} = 3,3*(s/S)$ e $\text{LQ} = 10*(s/S)$, sendo s o desvio padrão residual da equação de regressão e S o coeficiente angular.

4.3.4 Determinação de melanoidinas

A concentração de melanoidinas foi estimada pela medida de absorbância a 420 nm (1, 117) em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV/VIS-1650PC. Água destilada foi utilizada para diluição das amostras (1:100) e para zerar o equipamento.

4.3.5 Determinação da capacidade antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante por meio do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]) foi avaliada utilizando-se o método de Brand-Williams et al. (118) com modificações. O grau de descoloração do DPPH[•] foi medido em 515 nm, durante 1 hora, em intervalos de 5 minutos entre cada leitura. O efeito dos antioxidantes sobre a redução do DPPH[•] é atribuído à habilidade destes compostos de doar hidrogênio, causando alteração da coloração do meio reacional de violeta para amarelo (figura 8).

Figura 8. Esquema da reação do radical DPPH com os antioxidantes do café

Para quantificação dos sólidos totais, 1 mL de cada extrato foi colocado em tubo tarado, seco a 105°C por 24 horas, resfriado à temperatura ambiente e pesado.

As amostras foram diluídas em metanol, para obtenção de 6 diferentes concentrações (1:25, 1:50, 1:75, 1:100, 1:125 e 1:150). Uma alíquota de 30 µL de cada concentração foi misturada com 1170 µL do reagente DPPH (60 µmol/L). A análise foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV/VIS-1650PC, o qual foi zerado com 30 µL da amostra, nas mesmas diluições, misturados com 1170 µL de metanol. Um controle contendo 30 µL de metanol e 1170 µL do reagente DPPH foi preparado e o valor de sua absorbância determinado, zerando-se o equipamento com metanol. A capacidade antioxidante da amostra foi calculada, utilizando-se uma curva padrão de DPPH nas seguintes concentrações: 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µmol/L. Os valores de concentração eficiente (CE₅₀), que representam a concentração de antioxidantes da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH, foram calculados plotando-se a porcentagem DPPH reagido em função das concentrações dos extratos.

$$\text{DPPH reagido (\%)} = \frac{(\text{Absorbância controle} - \text{Absorbância amostra}) \times 100}{\text{Absorbância controle}}$$

4.3.6 Capacidade de absorbância de radical oxigênio

A capacidade de absorbância de radical oxigênio (ORAC) mede a inibição de oxidação induzida pelo radical peroxila e reflete a atividade antioxidante de quebra da cadeia do radical pela transferência de hidrogênio.

Esse ensaio foi realizado segundo método descrito por Ou et al. (119) modificado. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato 75 mmol/L (pH 7,4), pois a fluorescência da Fluoresceína (3',6'-dihidroxi-espiro[isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona) é sensível ao pH; quando este é inferior a 7,0 a intensidade da fluorescência diminui consideravelmente. A solução

estoque de Fluoresceína (1,17 mmol/L) foi preparada e armazenada a 4°C, protegida da luz, por um mês. As demais soluções foram preparadas diariamente e mantidas em gelo por período inferior a 8 horas, sendo posteriormente descartadas.

A análise foi realizada em microplacas pretas com 96 poços Fluotrac 200 (Greiner Bio One). Foram pipetados 50 µL de amostra (1:4000) em tampão fosfato 75 mmol/L (pH 7,4), 150 µL de Fluoresceína (93,54 nmol/L) e 50 µL de AAPH (2,2'-azobis(2-aminopropano)) (221 mmol/L) (Sigma-Aldrich, EUA). Para minimizar a variabilidade do ensaio, visto que pequenas diferenças de temperatura nos poços podem reduzir a reprodutibilidade (120), a placa foi incubada a 37°C por 15 minutos anterior à adição do AAPH. Por período de 1 hora, o decaimento da fluorescência foi medido a 37°C (λ excitação = 493 nm; λ emissão = 515 nm), a cada minuto, em leitor de placas *Molecular Devices (SPECTRAmax)*. Os antioxidantes presentes na amostra protegem a Fluoresceína da oxidação pelo AAPH, aumentando a área sob a curva (AUC). O resultado foi comparado com a AUC de um padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma-Aldrich, EUA) 20 µmol/L. Tampão fosfato 75 mmol/L (pH 7,4) foi utilizado como branco. Para verificação da linearidade do teste, foi preparada uma curva de calibração com Trolox nas seguintes concentrações: 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µmol/L). Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de Trolox.

O cálculo da AUC da amostra, do branco e do padrão foi realizado por meio da seguinte equação:

$$AUC = (0,5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_{59}/f_0 + f_{60}/f_0)$$

sendo: f_0 = fluorescência no tempo 0 min e f_{60} = fluorescência em 60 min

$$ORAC = C_{Trolox} (AUC_{amostra} - AUC_{branco}) / (AUC_{Trolox} - AUC_{branco}) K$$

onde: C Trolox = concentração de Trolox (20 µmol/L)

AUC = área sob a curva de redução da Fluoresceína

K = fator de diluição da amostra

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO SANGUE

4.4.1 Obtenção do plasma e dos eritrócitos

As coletas de sangue foram realizadas na Unidade de Pesquisa do InCor por profissional capacitado. Oitenta mililitros de sangue venoso foram coletados da veia cubital média em tubos *Vacutainer*®, pela manhã (entre 8:00 e 9:00 h), após jejum de 12 horas, sem a realização de atividade física vigorosa por 24 horas e consumo de bebida alcoólica por 72 horas antes da coleta (58).

Dos oitenta mililitros de sangue, quarenta foram coletados em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 1,0 mg/ mL de sangue) e transportados do InCor para a Faculdade de Saúde Pública da USP em caixa de isopor com gelo, sendo, em seguida, centrifugado a 1500 g por 15 minutos.

O plasma foi separado, distribuído em microtubos e armazenado em -80°C até o momento das análises. O precipitado, obtido no isolamento do plasma, foi transferido para tubos de 50 mL e lavados com 20 mL de soro fisiológico gelado (NaCl 9 g/L) por 4 vezes, com centrifugação a 1500 g por 15 minutos a 4°C entre as adições; os sobrenadantes foram descartados. Posteriormente, os eritrócitos (precipitado) foram transferidos para microtubos, sendo um deles utilizado para a análise de hemoglobina e os demais armazenados em -80°C até o momento das análises da atividade das enzimas antioxidantes.

4.4.2 Capacidade antioxidante total

Os antioxidantes podem desativar radicais livres por 2 mecanismos: transferência de átomo de hidrogênio ou de um elétron (120). Portanto, optou-se por um ensaio de cada mecanismo.

A capacidade antioxidante total (TAC), a qual mede a soma de todos os antioxidantes do plasma, foi determinada em leitor de placas *Molecular Devices* (*SPECTRAmax*), por meio de *kit* comercial *Total Antioxidant Status* (TAS; Randox Lab, Crumlin, UK) e do ensaio de ORAC (121) com as modificações descritas anteriormente.

No *kit* TAS, o ácido 2,2-Azino-dietil-benzotiazolina sulfônico (ABTS) foi incubado com peroxidase (metamioglobina) e peróxido de hidrogênio, resultando na produção do radical cátion $ABTS^+$ (coloração azul-esverdeada), o qual é detectado a 600 nm. As substâncias antioxidantes presentes no plasma impedem a reação, gerando uma redução na intensidade da cor proporcional à concentração de antioxidantes totais. As análises foram realizadas em microplacas de poliestireno transparentes com 96 poços (Greiner Bio One), em duplicata, e os resultados expressos em mmol/L.

Para o teste de ORAC, as amostras foram previamente diluídas (1:800) com tampão fosfato 75 mmol/L (pH 7,4). As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.3 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Para expressar a atividade das enzimas por grama de hemoglobina, sua concentração foi determinada no lisado de eritrócitos por meio do método da cianometahemoglobina (método de Drabkin) (122), utilizando-se o reagente de cor e o padrão de hemoglobina (Labtest Diagnóstica S.A.). Neste método, o ferro II do grupo heme da hemoglobina, oxiemoglobina e carboxiemoglobina, é oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto, formando hemiglobina, que se combina com o

cianeto de potássio, formando um composto estável, o cianeto de hemiglobina, o qual é medido em 540 nm, calibrando-se o equipamento com água destilada.

4.4.3.1 Catalase

A análise da atividade da CAT foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV/VIS-1650PC, segundo a técnica descrita por Aebi (123). A decomposição do H_2O_2 é medida pela redução de absorbância em 240 nm. O lisado de eritrócitos foi diluído (1:500) com tampão fosfato 50 mmol/L (pH 7,0). Uma unidade de CAT é definida como a quantidade de enzima que libera metade do H_2O_2 em 300 segundos, a 37°C. Quanto maior a redução da absorbância, maior é a atividade da CAT presente na amostra, a qual foi expressa em unidades por grama de hemoglobina (U/g Hb). As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.3.2 Superóxido dismutase

A atividade da cobre/zinco-superóxido dismutase (CuZn-SOD) foi determinada, utilizando *kit* RANSOD (Randox Lab, Crumlin, Reino Unido), de acordo com McCord e Fridovich (124).

Na determinação da atividade da SOD, xantina e xantina oxidase (XOD) são utilizadas para gerar O_2^- , o qual reage com o clorito de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium (INT), formando um corante vermelho (Formazan). A SOD catalisa a reação competitiva que converte O_2^- em H_2O_2 , reduzindo a produção do Formazan (figura 9). Portanto, sua atividade é medida como porcentagem de inibição, comparada com uma curva de calibração com SOD purificada.

Essa análise foi realizada em leitor de placas Molecular Devices (SPECTRAmax), utilizando-se placas de poliestireno transparentes com 96 poços (Greiner Bio One). O lisado de eritrócito foi inicialmente diluído (1:400) com

tampão fosfato de potássio (0,01 mol/L; pH 7,0). A primeira absorbância (A1) foi medida em 505 nm a 37°C, 30 segundos após a adição de 25 µL de xantina oxidase aos poços, os quais já continham 170 µL de substrato misto e 5 µL de amostra diluída, e a segunda absorbância (A2) após 3 minutos. Uma unidade de SOD é a quantidade que causa inibição de 50% na taxa de formação do Formazan. A atividade desta enzima foi expressa em unidades por grama de hemoglobina (U/g Hb). As análises foram realizadas em duplicata.

Figura 9. Reação do radical ânion superóxido com o INT para formação do corante Formazan e reação competitiva catalisada pela SOD, com formação de H₂O₂.

4.4.3.3 Glutathione peroxidase

A atividade da GPx foi determinada pelo kit RANSEL (Randox Lab), segundo Paglia e Valentine (125). As análises foram realizadas em duplicata.

A GPx catalisa a oxidação da GSH, pelo hidroperóxido de cumeno, à glutathione oxidada (GSSG). Na presença de glutathione redutase e NADPH, a GSSG é convertida para a forma reduzida, com a concomitante oxidação de NADPH a NADP⁺, levando a um decréscimo na absorbância (figura 10).

Essa análise foi realizada em leitor de placas Molecular Devices (SPECTRAmax), utilizando-se placas UV transparentes com 96 poços (Greiner Bio One). O lisado de eritrócito foi inicialmente diluído (1:40) com o agente de diluição (R3) presente no kit e, após 5 minutos, foi adicionado 1 mL reagente de hemoglobina diluído (1:24, v/v) com água ultra-pura. As absorbâncias foram medidas em 340 nm,

a 37°C, a cada minuto até 3 minutos. Uma unidade de GPx é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de NADPH em minuto. A atividade da GPx em unidades por litro foi dividida pela concentração de hemoglobina em gramas por litro, para se obter seu valor em unidades por grama de hemoglobina (U/g Hb).

Figura 10. Reação de oxidação da GSH com hidroperóxido de cumeno, na presença de GPx, e posterior redução pela GR.

4.5 CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A quantificação dos produtos de oxidação foi realizada por meio da dosagem de 8-isoprostano e de LDL-ox no plasma. Para estes ensaios, 10 μL de BHT (Butil hidroxitolueno) em etanol (5 mg/mL) foram adicionados a 1 mL de plasma antes do congelamento, para evitar a ocorrência de oxidação durante o armazenamento e análise. As análises foram realizadas em duplicata.

A dosagem de 8-isoprostano foi realizada, conforme instruções do fabricante, utilizando-se o *kit 8-isoprostane EIA* (Cayman Chemical, MI, EUA). Este *kit* é um imunensaio competitivo entre o 8-isoprostano da amostra e o 8-isoprostano conjugado com acetilcolinesterase (8-isoprostano *Tracer*), em um número limitado de sítios de ligação de anticorpos específicos para 8-isoprostano. A concentração de 8-isoprostano *Tracer* mantém-se constante enquanto a de 8-isoprostano varia. Portanto, a quantidade de 8-Isoprostano *Tracer* capaz de se ligar ao anticorpo será inversamente proporcional à concentração de 8-isoprostano no poço. Os anticorpos 8-isoprostano (livre ou *Tracer*) ligam-se à anti-imunoglobulina G (IgG) de coelho, previamente aderida ao poço. A placa é lavada para remover reagentes não ligados. Então, o reagente de Ellman, o qual contém o substrato para acetilcolinesterase, é

adicionado ao poço. O produto desta reação enzimática tem uma coloração amarela, medida em 412 nm. A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de 8-Isoprostano *Tracer* ligado ao poço, o qual é inversamente proporcional à quantidade de 8-Isoprostano livre no poço durante a incubação.

A dosagem de LDL-ox foi realizada segundo instruções do fabricante, no Laboratório de Lípidos do InCor, utilizando-se o *kit Oxidized LDL ELISA* (Mercodia AB, Uppsala, Suécia), o qual consiste em um imunoensaio de fase sólida com dois sítios. Emprega-se a técnica de captura ou sanduíche direto, no qual dois anticorpos monoclonais, marcados no poço da microplaca, são dirigidos contra determinantes antigênicos separados da molécula de apolipoproteína B oxidada. Durante a incubação, a LDL-ox presente na amostra reage com os anticorpos anti LDL-ox. Após lavagem, pela qual são removidos componentes plasmáticos que não reagiram, adiciona-se o anticorpo anti apolipoproteína B humano conjugado com peroxidase, o qual reconhece a LDL-ox. Após a segunda incubação, há outra etapa de lavagem pela qual se remove o excesso de conjugado não ligado. O conjugado ligado é detectado pela adição e incubação com 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB). A reação é bloqueada pela adição de ácido sulfúrico, para estabelecer o ponto final da reação. A leitura foi realizada em 450 nm e os resultados expressos em U/L.

4.6 MARCADORES INFLAMATÓRIOS

As análises de fibrinogênio e de PCR de alta sensibilidade (PCR-as) foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do InCor. O fibrinogênio foi determinado pelo método de Clauss usando o *Destiny Max* (MedLab) e a PCR-as por ensaio imunonefelométrico com detecção ultra-sensível em BN II (Siemens Diagnostics). Indivíduos com valores de fibrinogênio superiores a 400 mg/dL e de PCR-as superiores a 3 mg/dL foram considerados de alto risco para eventos cardiovasculares.

As concentrações plasmáticas de IL-6, IL-1 β , ICAM-1 solúvel (sICAM-1), VCAM-1 solúvel (sVCAM-1), selectina E solúvel (sE-selectina), MCP-1, TNF- α e

PAI-1 foram medidas no Instituto Gênese, por meio de painéis para doenças cardiovasculares (Millipore, Missouri, EUA), utilizando a tecnologia Luminex xMAP (*Multiple Analyte Profiling*), a qual envolve um processo exclusivo que cora microesferas de poliestireno com dois fluoróforos. Os kits Milliplex empregam a técnica de captura sanduíche. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão conjugados à superfície das microesferas por meio de ligações covalentes não reversíveis. Após a ligação do analito aos anticorpos de captura, a detecção final é feita por meio de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina, ligado ao anticorpo de detecção. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois *lasers* diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo quantifica o sinal de reporte em cada microesfera (figura 11) (126).

Figura 11. Esquema da tecnologia Luminex xMAP. Cada conjunto de microesferas está acoplado com anticorpo de captura específico (a), que se liga ao analito (b); o anticorpo de detecção biotinizado liga-se ao analito (c) e à ficoeritrina (d), a qual emite um sinal fluorescente. As microesferas passam através do fluxo celular Luminex e cada esfera é identificada e seu sinal quantificado (e) (126).

4.7 INDICADORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Os exames bioquímicos (hemograma completo; sódio, potássio, magnésio e fósforo; uréia e creatinina; coagulograma e velocidade de hemossedimentação; triacilgliceróis, colesterol total, LDL, HDL e Lp(a); glicemia e insulinemia de jejum e pós-prandial, hemoglobina glicada - HbA1c, frutossamina; homocisteína total

plasmática e ácido fólico) foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do InCor no início do período de intervenção (basal) e após cada intervenção.

4.7.1 Perfil lipídico

Os níveis séricos de CT, HDL e TG foram determinados no soro, por meio de ensaios enzimático-colorimétricos automatizados (*Dimension RXL, Siemens Diagnostics*, Los Angeles, CA, EUA). Os níveis de LDL foram estimados pela fórmula de Friedewald (127). Os valores de referência propostos pelo *National Cholesterol Education Program* (NCEP-ATPIII) foram adotados para classificar os indivíduos (128). Foram, ainda, calculadas as razões CT/HDL e LDL/HDL (índices de Castelli I e II, respectivamente) (129).

4.7.2 Lipoproteína(a)

A Lp(a) foi determinada no soro por meio do ensaio imunonefelométrico automatizado (*BN II, Siemens Healthcare Diagnostics*, Los Angeles, CA, EUA).

4.7.3 Homocisteína total plasmática e ácido fólico

As concentrações plasmáticas de homocisteína total e ácido fólico foram determinadas por imunoensaio por quimioluminescência em *Immolute 2000 Analyzer* (*Siemens Healthcare Diagnostics*, Los Angeles, CA, EUA) e expressa em $\mu\text{mol/L}$ de plasma. Concentrações de homocisteína inferiores a $15 \mu\text{mol/L}$ foram consideradas normais.

4.7.4 Glicemia, hemoglobina glicada, frutossamina e insulina

Concentrações séricas de glicose e insulina foram determinadas em jejum e após o consumo de um lanche composto por pão com frios e suco artificial. A classificação da glicemia e da HbA1c dos indivíduos foi realizada segundo preconização da *American Diabetes Association* (ADA) (130).

As glicemias de jejum e pós-prandial foram determinadas no soro, por meio de ensaio enzimático automatizado (*Dimension RXL, Siemens Healthcare Diagnostics*, Llanberis, Gwynedd, Reino Unido).

A HbA1c foi determinada em sangue total pelo método imunoturbidimétrico e a frutossamina pelo método colorimétrico (*Dimension RXL, Siemens Healthcare Diagnostics*, Llanberis, Gwynedd, Reino Unido). Os valores de frutossamina foram considerados normais quando compreendidos entre 205 e 285 $\mu\text{mol/L}$.

As concentrações séricas de insulina de jejum e pós-prandial foram determinadas por meio de ensaio de quimioluminescência em Immulite 2000 Analyzer (*Siemens Healthcare Diagnostics*, Llanberis, Gwynedd, Reino Unido), utilizando-se o kit Insulina Immulite (*Siemens Healthcare Diagnostics*, Llanberis, Gwynedd, Reino Unido). O valor de referência para a insulina de jejum foi $\leq 29,1 \mu\text{IU/mL}$.

A glicemia e a insulina de jejum foram utilizadas para cálculo do índice HOMA-IR = glicemia de jejum (mmol/L) x insulina de jejum ($\mu\text{U/mL}$)/22,5. Para conversão dos valores de glicose de mg/dL para mmol/L utilizou-se o fator 0,05551. A resistência à insulina foi definida segundo o IMC e HOMA-IR: IMC $> 27,5 \text{ kg/m}^2$ e HOMA-IR $> 3,6$ (131).

4.7.5 Hemograma completo

O hemograma foi realizado em sangue total, por meio de contador eletrônico automatizado (*Advia 120, Siemens Healthcare Diagnostics, Llanberis, Gwynedd, Reino Unido*) e/ou avaliação morfológica em esfregaços corados.

4.7.6 Minerais séricos

As concentrações séricas de sódio e potássio foram determinadas pelo método do eletrodo íon-seletivo. O fósforo, pelo método de fosfomolibdato automatizado e o magnésio por ensaio colorimétrico automatizado (*Dimension RXL, Siemens Healthcare Diagnostics, Gwynedd, Reino Unido*). As concentrações foram consideradas normais quando compreendidas entre: sódio 135 a 149 mEq/L; potássio 3,5 a 4,9 mEq/L; magnésio 1,5 a 2,0 mEq/L; fósforo 2,5 a 4,9 mg/dL.

4.7.7 Uréia e creatinina

As dosagens de uréia e creatinina foram realizadas no soro, por ensaio enzimático automatizado (*Dimension RXL, Siemens Healthcare Diagnostics, Llanberis, Gwynedd, Reino Unido*). As concentrações de uréia e creatinina foram consideradas normais quando compreendidas, respectivamente, entre 15 e 40 mg/dL e 0,6 e 1,0 mg/dL para homens e 0,8 a 1,3 mg/dL para mulheres.

4.8 INDICADORES ANTROPOMÉTRICOS

Peso, estatura, circunferência abdominal e percentual de gordura corporal foram mensurados antes do período de *washout* e do início das intervenções (basal) e após cada intervenção. Peso e estatura foram medidos com os voluntários em pé, descalços, com os calcanhares juntos, costas eretas, os braços estendidos ao longo do corpo e vestindo roupas leves. O peso foi medido em balança mecânica, da marca Welmy, modelo 110, com capacidade máxima de 150 kg e precisão de 100 g e a estatura em estadiômetro acoplado à balança, com extensão de 2,0 m, dividido em centímetros e subdividido em milímetros. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso em quilogramas dividido pelo quadrado da estatura em metros (kg/m^2), e a classificação do estado nutricional realizada conforme preconizado pela OMS, 2000 (132). A circunferência abdominal foi medida sobre a cicatriz umbilical, com uma fita métrica flexível e inelástica, sem comprimir os tecidos. A estratificação de risco para DCV, utilizando essa medida, foi realizada segundo a SBC, 2007 (58). O percentual de gordura corporal foi medido em balança eletrônica portátil da marca Plenna, modelo Lumina MEA-02550, por meio de bioimpedância bipolar.

4.9 PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial foi medida antes do período de intervenção (basal) e após cada intervenção, por meio da monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA), a qual fornece 24 horas consecutivas de medidas, utilizando o monitor portátil 90207 (*Spacelabs Healthcare, Washington, EUA*). O monitor foi programado para realizar 6 medidas por hora da pressão arterial durante o dia (entre 7:00 e 22:00h) e 3 medidas por hora à noite (22:00 às 7:00h). Medições extras podiam ser iniciadas manualmente pelo indivíduo a qualquer momento. O tempo médio de uma medição variou de acordo com a pressão arterial e a atividade física, estando ao redor de 30 segundos. O dispositivo cancelou qualquer processo de

medição que não foi bem sucedido após 90 segundos e armazenou códigos de erro específicos, para que fosse possível identificar a causa do erro. Foram obtidas as médias e os respectivos desvios-padrão das medidas da PAS e da PAD e da frequência cardíaca realizadas durante o dia e a noite. Foram consideradas anormais as médias de pressão arterial de 24 horas superiores a 125 x 75 mmHg, vigília superiores a 130 x 85 mmHg e sono superiores a 110 x 70 mmHg (89).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SPSS (versão 18.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois, EUA) e expressos como média e desvio-padrão. As concentrações de antioxidantes e a TAC das 2 bebidas de café (torra média-clara e torra média) foram comparadas pelo teste t para amostras independentes. Diferenças nas variáveis medidas nos indivíduos, antes e após a ingestão do café preparado com cada torra, foram verificadas pela análise de variância para medidas repetidas, para comparação entre as torras e de cada torra com o basal. A avaliação do perfil das médias dos dois grupos foi realizada para avaliar os efeitos da ordem de consumo das torras e eventualmente o efeito acumulativo (*carryover*). Valores de $p < 0,05$ (bicaudal) foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NAS BEBIDAS DE CAFÉ

Para validação do método, foram determinados o tempo de retenção do 5-ACQ e da cafeína e a precisão das áreas, por meio da análise de oito replicatas da bebida de café intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). O LD e o LQ foram calculados com base nos parâmetros das curvas de calibração do 5-ACQ e cafeína (tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros de validação do método analítico (CLUE-DAD) para caracterização das bebidas de café.

Composto	Precisão intra-dia		Precisão inter-dia		LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
	TR	Área do pico	TR	Área do pico		
5-ACQ	0,25	0,08	0,62	1,98	0,62	1,89
Cafeína	0,21	0,68	0,64	1,65	0,36	1,10

Resultados de precisão expressos como coeficiente de variação (CV%) (n = 8). TR: tempo de retenção; LD: limite de detecção e LQ: limite de quantificação.

Com base nos espectros de absorção UV e espectro de massas, foram identificados sete compostos fenólicos nas amostras, sendo quatro isômeros do ACQ, um isômero do ácido feruloilquínico (AFQ) e duas lactonas (CQL; compostos formados durante a torrefação). Não foram encontrados os ácidos cafêico, ferúlico e *p*-cumárico nas formas livres. A identificação desses compostos no DAD é apresentada nos cromatogramas (figura 12 A e B) e no detector de massas, modo de ionização negativo, na tabela 3.

Figura 12. Cromatogramas CLUE-DAD ($\lambda = 324$ nm) com compostos fenólicos presentes: A) na bebida de café torra média-clara; B) na bebida de café torra média. Picos 1, 2 e 4: ácidos cafeoilquínicos; pico 3: ácido 5-cafeoilquínico; picos 5 e 7: cafeoilquínico lactona; pico 6: ácido feruloilquínico.

Tabela 3. Identificação dos compostos fenólicos nas bebidas de café por CLUE-ESI/MS no modo de ionização negativo

Pico	Tempo de retenção (min) DAD	Íon molecular (m/z)	Íon(s) produto (m/z)	Composto
1	1,1	353	179	Ácido cafeoilquínico
2	1,7	353	191, 179	Ácido cafeoilquínico
3	2,2	353	191	Ácido 5-cafeoilquínico
4	2,5	353	179	Ácido cafeoilquínico
5	4,7	335	161	Cafeoilquínico lactona
6	6,3	367	191	Ácido feruloilquínico
7	6,5	335	161	Cafeoilquínico lactona

Os cromatogramas com a identificação da cafeína na bebida de café torra média-clara e torra média são apresentados na figura 13 A e B. A confirmação da identidade do composto no detector de massas foi realizada utilizando os íons com m/z 195 (molecular) e 138 (produto), no modo de ionização positivo.

Figura 13. Cromatogramas CLUE-DAD ($\lambda = 272$ nm) com identificação da cafeína presente na bebida de café torra média-clara (A) e na de torra média (B)

Os teores de compostos fenólicos totais, ácidos fenólicos e cafeína na bebida de café preparada com a torra média-clara e torra média são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Concentrações de antioxidantes na bebida de café, segundo tipo de torra utilizado no preparo da bebida.

	Torra média-clara	Torra média
Compostos fenólicos totais (mg equiv. 5-ACQ/mL)*	11,09 ± 0,29 ^a	10,53 ± 0,56 ^a
Ácido 5-cafeoilquínico (mg/mL)	0,85 ± 0,01 ^b	0,48 ± 0,00 ^a
ACQ totais (mg equiv. 5-ACQ/mL)	1,81 ± 0,01 ^b	1,08 ± 0,01 ^a
AFQ totais (mg equiv. 5-ACQ/mL)	0,17 ± 0,00 ^b	0,16 ± 0,00 ^a
ACQL totais (mg equiv. 5-ACQ/mL)	0,25 ± 0,00 ^b	0,16 ± 0,00 ^a
ACG totais (mg equiv. 5-ACQ/mL)	2,23 ± 0,02 ^b	1,40 ± 0,02 ^a
Cafeína (mg/mL)	1,54 ± 0,01 ^a	1,63 ± 0,02 ^b
Melanoidinas (absorbância 420 nm)	0.38 ± 0.00 ^a	0.50 ± 0.00 ^b

Valores expressos em média ± DP (n = 3). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05), pelo Teste t para amostras independentes.

* Determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. O perfil de fenólicos e a cafeína foram determinados por HPLC. A concentração de melanoidinas foi estimada pela medida de absorbância a 420 nm.

Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ); ácidos cafeoilquínicos (ACQ); ácidos feruloilquínicos (AFQ); ácidos cafeoilquínico lactonas (ACQL); ácidos clorogênicos (ACG).

Cada xícara de café (150 mL) preparado com torra média-clara e com torra média forneceu aos voluntários, respectivamente, 334 mg e 210 mg de ACG. Na torra média-clara e torra média, os ACQ compuseram 81% e 77% do total, os AFQ 7% e 11% e as CQL 11% e 12%. O principal composto, 5-ACQ, representou 47% e 45% dos ACQ e 38% e 35% do conteúdo de ACG, respectivamente.

Segundo o teste t para amostras independentes, houve redução nos teores de 5-ACQ e de outros fenólicos (p < 0,001) com o aumento do grau de torra dos grãos, confirmando a influência do processo de torrefação na composição química do café. Como consequência da degradação térmica, houve uma diminuição de aproximadamente 37% na composição de ACG da torra média quando comparada à torra média-clara. Resultados semelhantes foram observados em outro estudo (67).

Os teores de fenólicos totais determinados pelo método de Folin-Ciocalteu foram significativamente superiores aos de ACG totais obtidos por cromatografia líquida. Embora o primeiro seja um método amplamente utilizado, de fácil execução

e baixo custo, o reagente de Folin-Ciocalteu pode interagir com outros compostos não fenólicos, levando a resultados superestimados (133).

O consumo de cafeína, por xícara, foi de 231 mg para a torra média-clara e 244 mg para a torra média, havendo diferença significativa entre os dois tipos de bebidas ($p = 0,003$). Esse fato pode ser atribuído, principalmente, às diferenças entre as combinações de grãos (*blends*) utilizadas pelas indústrias. Cafês provenientes de grãos robusta apresentam maiores teores de cafeína que os grãos arábica. Tendo em vista a estabilidade térmica da cafeína, as perdas que ocorrem durante a torrefação são pequenas (134).

Assim como ocorreu com a cafeína, as concentrações de melanoidinas foram significativamente superiores na bebida preparada com torra média em relação àquela preparada com torra média-clara ($p < 0,001$).

Considerando que os ACG são indicados como compostos com potente atividade antioxidante (6, 7), os resultados encontrados na análise cromatográfica sugerem que a bebida de café, cujos grãos foram submetidos à torra média-clara, deveria apresentar maior poder de proteção contra danos oxidativos. Entretanto os resultados da análise da TAC das bebidas (figura 14) mostraram que não houve diferença significativa entre as torras.

Valores expressos em média $\pm$ DP ($n = 3$). DPPH: capacidade de sequestrar o radical livre DPPH; ORAC: capacidade de absorbância de radical oxigênio. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$), pelo teste t para amostras independentes.

Figura 14. Capacidade antioxidante total (DPPH e ORAC) de bebidas de café, segundo tipo de torra utilizado em seus preparos.

Os resultados apresentados na figura 14 mostram que a atividade sequestrante de radicais DPPH e a ORAC não diferiram de acordo com o grau de torra dos grãos. Ambos os tipos de bebidas analisadas apresentaram percentuais relevantes de sequestro de radicais livres.

Possivelmente, a cafeína e melanoidinas compensaram as perdas de ACG naturalmente presentes no café e contribuíram para a TAC da torra média. Em concordância com este estudo, Bakuradze et al. (67) também não observaram diferença significativa na ORAC entre bebidas de café preparadas com torra clara e média.

5.2 ESTUDO CLÍNICO

5.2.1 População

Foram avaliados 20 voluntários saudáveis, com idade média de 49 ± 9 anos (37 a 63 anos), sendo a maioria mulheres (70%). Os participantes forneceram informações que contribuíram para a caracterização da população (tabela 5).

Tabela 5. Características basais da população estudada.

Variável	População (n = 20)
Sexo [n (%)]	
Homens	6 (30)
Mulheres	14 (70)
Idade (anos)	49,5 ± 8,9
Consumo habitual de café (mL/dia)	307,5 ± 110,4
Fisicamente ativos (%)	25
Escolaridade (%)	
Básico	5
Fundamental	25
Médio	40
Superior	30
Tabagismo (%)	
Nunca fumou	65
Fumante pregresso	35
Consumo diário de bebidas alcoólicas (%)	
Nunca consumiu	95
Parou	5
Ingestão hídrica (%)	
Adequada (≥ 2 L/dia)	65
História de risco cardiovascular em parentes de primeiro grau (%)	30

Valores expressos em média ± DP, números e/ou percentual.

Foram considerados fisicamente ativos os voluntários que referiram participação em atividade física em momentos de lazer, pelo menos, três vezes por semana e com uma hora de duração (135). Observou-se que 75% da população eram sedentários. A maioria dos participantes cursou até o ensino médio, mostrando habilidade de compreensão das informações e orientações recebidas. A maioria dos voluntários referiu nunca ter fumado e não ter hábito de consumir bebidas alcoólicas diariamente. A ingestão hídrica foi satisfatória em 65% dos voluntários. Durante o estudo houve um aumento discreto no consumo médio de café em relação ao período anterior, passando de 307 ± 110 para 482 ± 61 mL.

Após o período de *washout*, os voluntários foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, sendo que 45% deles (55,6% de mulheres) iniciaram o estudo

ingerindo a bebida de café preparada com torra média-clara e 55% (81,8% de mulheres) com torra média. Após 4 semanas, houve inversão do tipo de torra consumido.

Comparando-se as médias das variáveis dos grupos após 4 semanas e seus perfis ao longo do tempo, pode-se observar que, para a maioria das variáveis, ambos os grupos tiveram o mesmo comportamento, mostrando que não houve efeito acumulativo de uma torra sobre a outra (*carryover*) ($p > 0,05$).

5.2.2 Consumo de nutrientes

As informações contidas no recordatório de 24 horas foram comparadas àquelas obtidas no registro alimentar de 3 dias, para verificação de possíveis divergências. Os dados referentes ao consumo de macro e micronutrientes, baseados no registro alimentar de 3 dias, podem ser visualizados na tabela 6. Pode-se observar que não houve alteração significativa dos hábitos alimentares durante o estudo.

Tabela 6. Consumo diário de macro e micronutrientes, segundo o grau de torra dos grãos de café utilizados no preparo da bebida, anterior ao início do período de intervenção e após o consumo de cada torra.

Nutrientes	Basal	Torra média-clara	Torra média
Energia (kcal)	1831 $\pm$ 535	1812 $\pm$ 538	1866 $\pm$ 527
Carboidratos (% energia)	52,2 $\pm$ 9,2	54,5 $\pm$ 10,0	56,6 $\pm$ 11,0
Proteínas (% energia)	20,0 $\pm$ 6,3	18,0 $\pm$ 6,1	16,9 $\pm$ 4,6
Lipídeos (% energia)	27,8 $\pm$ 8,5	21,5 $\pm$ 8,7	26,5 $\pm$ 7,8
Gordura saturada (g)	12,6 $\pm$ 8,1	11,8 $\pm$ 8,2	15,8 $\pm$ 10,7
Gordura monoinsaturada (g)	12,8 $\pm$ 7,8	10,5 $\pm$ 7,2	14,0 $\pm$ 9,8
Gordura polinsaturada (g)	7,7 $\pm$ 5,5	6,2 $\pm$ 5,2	6,4 $\pm$ 3,7
Colesterol (mg)	157,3 $\pm$ 71,9	153,8 $\pm$ 91,2	151,4 $\pm$ 89,6
Fibras totais (g)	15,7 $\pm$ 8,5	15,8 $\pm$ 11,8	14,0 $\pm$ 7,3
Vitamina A (RE)*	503,1 $\pm$ 480,8	520,2 $\pm$ 436,9	860,2 $\pm$ 247,0
Vitamina E (mg)	11,8 $\pm$ 10,2	7,5 $\pm$ 7,4	8,5 $\pm$ 5,8
Vitamina C (mg)	128,7 $\pm$ 220,9	186,7 $\pm$ 355,3	148,3 $\pm$ 271,0
Folato (μ g)	110,0 $\pm$ 121,7	94,3 $\pm$ 72,0	82,7 $\pm$ 57,7
Vitamina B12 (μ g)	2,9 $\pm$ 2,5	2,0 $\pm$ 1,6	2,9 $\pm$ 3,2
Selênio (μ g)	63,4 $\pm$ 31,8	62,2 $\pm$ 31,9	54,9 $\pm$ 45,6
Zinco (mg)	8,2 $\pm$ 5,8	8,1 $\pm$ 6,4	8,3 $\pm$ 6,7
Sódio (g)	1,3 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 1,0
Potássio (g)	1,7 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 1,1	1,9 $\pm$ 0,8
Magnésio (mg)	176,0 $\pm$ 83,1	204,4 $\pm$ 99,7	182,8 $\pm$ 78,3

Valores expressos em média $\pm$ DP (n = 20)

*expresso em equivalentes de retinol

5.2.3 Indicadores antropométricos

Os resultados de IMC, percentual de gordura corporal e circunferência abdominal, segundo grau de torra, podem ser visualizados na tabela 7.

Tabela 7. Índice de massa corporal (IMC), percentual de gordura corporal e circunferência abdominal antes do início do período de intervenção e após o consumo de bebida de café preparada com torra média-clara e torra média.

Indicadores antropométricos	Basal	Torra média-clara	Torra média
IMC (kg/m^2)	$27,0 \pm 3,8$	$27,2 \pm 3,9$	$27,1 \pm 3,9$
Gordura corporal (%)	$34,9 \pm 5,5$	$35,7 \pm 4,9$	$35,7 \pm 5,1$
Circunferência abdominal (cm)	$94,3 \pm 8,2$	$93,8 \pm 7,9$	$94,4 \pm 7,7$

Valores expressos em média $\pm$ DP (n = 20)

A tabela 7 mostra que não houve alterações significativas dos parâmetros antropométricos durante o estudo. A classificação do estado nutricional dos indivíduos, segundo o IMC, pode ser visualizada na figura 15.

Figura 15. Distribuição do estado nutricional dos voluntários, segundo IMC, durante o estudo

A classificação do IMC mostrou predomínio de indivíduos com pré-obesidade, fato que se constitui em fator de risco para DCV (58).

Para a circunferência abdominal, observou-se que três (18%) voluntários apresentaram baixo risco para DCV (< 80 cm para mulheres e < 94 cm para homens), nove (53%) risco aumentado (entre 80 e 88 cm para mulheres e 94 e 102 cm para homens) e cinco (29%) risco muito aumentado (> 88 cm para mulheres e > 102 cm para homens) (132). As mulheres apresentaram circunferência abdominal média

acima do recomendado para o baixo risco cardiovascular (≥ 88 cm) e IMC médio acima do adequado ($\geq 24,9$ kg/m²). A adiposidade central, medida por meio da circunferência abdominal, é um forte determinante de risco cardiovascular. Frequentemente, fatores de risco adicionais, como resistência à insulina, hipertensão, hipertrigliceridemia e HDL baixo, estão presentes, caracterizando a síndrome metabólica, que apresenta elevado valor preditivo ao risco de DCV (128).

5.2.4 Indicadores hematológicos e bioquímicos

Os indicadores bioquímicos, segundo o grau de torra dos grãos de café utilizados para preparo da bebida, são mostrados na tabela 8.

Os dados referentes ao hemograma, uréia e creatinina, utilizados para verificação do estado de saúde dos indivíduos, foram considerados normais para idade e sexo e não se alteraram significativamente ao longo do estudo (resultados não mostrados).

Tabela 8. Variáveis bioquímicas no basal e após o consumo de bebida de café preparada com torra média-clara ou torra média.

Variáveis bioquímicas	Basal	Torra média-clara	Torra média
Triacilgliceróis (mg/dL)	98,4 ± 38,3 ^a	109,8 ± 47,2 ^a	107,0 ± 51,6 ^a
Colesterol total (mg/dL)	185,6 ± 24,2 ^a	203,5 ± 35,7 ^b	208,3 ± 33,0 ^b
HDL (mg/dL)	47,4 ± 9,5 ^a	49,4 ± 10,0 ^a	51,0 ± 9,1 ^b
LDL (mg/dL)	118,5 ± 19,5 ^a	132,2 ± 28,4 ^b	135,4 ± 26,8 ^b
CT/HDL	4,04 ± 0,89 ^a	4,25 ± 1,02 ^b	4,21 ± 1,04 ^a
LDL/HDL	2,61 ± 0,75 ^a	2,77 ± 0,80 ^b	2,75 ± 0,82 ^a
Lp(a) (mg/dL)	21,6 ± 26,5 ^a	23,4 ± 29,0 ^a	22,5 ± 26,4 ^a
Homocisteína total (μmol/L)	9,2 ± 3,0 ^a	9,3 ± 3,0 ^a	9,0 ± 4,0 ^a
Glicemia de jejum (mg/dL)	87,4 ± 10,1 ^a	88,0 ± 7,9 ^a	89,2 ± 11,5 ^a
Glicemia pós-prandial (mg/dL)*	89,8 ± 15,1 ^a	----	90,7 ± 11,8 ^a
Hemoglobina glicada (%)*	5,5 ± 0,3 ^a	----	5,5 ± 0,3 ^a
Frutosamina (μmol/L)*	226,6 ± 12,7 ^a	----	229,2 ± 12,2 ^a
Insulina de jejum (μU/mL)*	3,65 ± 3,45 ^a	----	4,19 ± 4,33 ^a
Insulina pós-prandial (μU/mL)*	13,02 ± 8,82 ^a	----	21,12 ± 12,42 ^a
HOMA-IR	0,80 ± 0,81 ^a	----	0,94 ± 1,09 ^a
Ácido fólico (ng/mL)	14,3 ± 4,7 ^a	13,0 ± 5,0 ^a	13,8 ± 5,1 ^a
Sódio (mEq/L)	139,3 ± 1,7 ^a	139,3 ± 1,6 ^a	139,8 ± 1,2 ^a
Potássio (mEq/L)	4,3 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,4 ^a	4,4 ± 0,5 ^a
Magnésio (mEq/L)	1,7 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,1 ^a
Fósforo (mg/dL)	3,2 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,5 ^a	3,3 ± 0,5 ^a

Valores expressos como média ± DP (n = 20). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p < 0,05), pelo teste de ANOVA para medidas repetidas.

HOMA-IR: índice *homeostasis model assessment for insulin resistance*.

* somente dosadas após o consumo da torra média

Houve aumento significativo do CT e LDL plasmáticos após a ingestão das bebidas preparadas com as duas torras (p < 0,01). Entretanto, observou-se elevação da HDL (p = 0,003) após o consumo da torra média. A elevação dessa partícula é de grande relevância, visto que tem sido reconhecida como anti-aterogênica. Alguns

mecanismos propostos para essa ação protetora são: transporte reverso do colesterol, inibição da oxidação da LDL, redução da viscosidade sanguínea, regulação da síntese de prostaglandinas e tromboxano e ativação da fibrinólise, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estímulo à liberação de óxido nítrico. Apesar do aumento nas concentrações de CT e LDL, suas médias ficaram na faixa limítrofe (58). Além disso, essas concentrações não se alteraram significativamente entre 4 e 8 semanas (dados não mostrados), portanto é provável que tenha ocorrido estabilização dessas concentrações após determinado período de consumo de café. Pode-se, ainda, observar que não houve alteração significativa desses lipídeos quando comparada a ingestão de uma torra com a outra, mostrando que provavelmente o tipo de torra não se relaciona ao aumento de lipídeos plasmáticos.

Em relação aos índices de Castelli, observou-se aumento de 5% em CT/HDL ($p = 0,01$) e de 6% em LDL/HDL ($p = 0,03$) após o consumo da torra média-clara. Entretanto, os resultados obtidos, após o consumo de ambas as torras, ficaram abaixo daqueles que caracterizam o alto risco para DCV (CT/HDL $> 5,0$ e LDL/HDL $> 3,0$) (129).

Dados referentes ao impacto do café filtrado sobre os lipídeos plasmáticos ainda são limitados e contraditórios (136). O aumento de CT e LDL são mais pronunciados com café não-filtrado, enquanto que o filtrado tem sido menos frequentemente associado ao aumento desses lipídeos (28). Ainda não se sabe qual o mecanismo para o aumento do colesterol sérico causado pela ingestão de café filtrado. É possível que os diterpenos, cafestol e kaweeol, os quais possuem efeito hipercolesterolêmico, sejam parcialmente removidos pelo filtro (66, 137-139). Estudos anteriores (137, 138, 140) encontraram aumento significativo no CT e na LDL, mas não na HDL, após o consumo de café. Poucos estudos observaram uma associação positiva entre a ingestão de café filtrado e o aumento na concentração de HDL (104, 141), como nós observamos, o que pode contrabalancear os efeitos deletérios da LDL aumentada.

Foram avaliados fatores de risco primários e secundários para DCV. Os primários compostos por: história familiar de DCV prematura em parentes de primeiro grau (abaixo de 45 anos para homens e 55 anos para mulheres); hipertensão;

elevação dos níveis de CT, LDL e TG e diminuição de HDL, e os secundários por: sedentarismo, excesso de peso, diminuição de tolerância à glicose, elevação de Lp(a) e homocisteína (58). Desses fatores, a elevação de CT e LDL, excesso de peso e sedentarismo foram os que apresentaram maior relevância na população estudada. Durante o estudo, não houve alteração significativa da Lp(a) e homocisteína total plasmática, as quais se constituem em fatores de risco para DCV.

Os parâmetros associados ao diabetes não se alteraram significativamente ao longo do estudo. A glicemia pós-prandial, a HbA1c, a frutossamina e a insulina de jejum e pós-prandial foram determinadas apenas nos voluntários após o consumo da torra média, pois tanto a frutossamina quanto a HbA1c refletem a glicemia média de período anterior à coleta de sangue (quatro a seis semanas e dois a três meses, respectivamente), não havendo necessidade de medi-las em todos os períodos. Embora HbA1c e frutossamina possam sofrer influência do período anterior ao estudo, alterações de glicemia durante a intervenção fariam as médias sofrerem variações. Além disso, estas medidas foram complementares à glicemia de jejum. A medida desses parâmetros é de grande relevância para o diagnóstico do DM2 e, consequentemente, prevenção de DCV (130). Assim como neste, outros estudos não observaram efeito do consumo de café sobre indicadores relacionados ao diabetes (14, 104).

Em relação aos minerais séricos, não houve alteração em suas concentrações durante o período de intervenção, contrariando os achados de Watanabe et al. (94), os quais mostraram que a ingestão de ACG, presentes no café, relaciona-se à redução de minerais séricos em ratos, devido à sua estrutura fenólica capaz de se ligar a metais.

5.2.5 Pressão arterial

As médias da PAS e da PAD e a frequência cardíaca de 24 horas, diurna e noturna, medidas por meio da MAPA, podem ser visualizadas na tabela 9.

Tabela 9. Pressão arterial sistólica e diastólica e frequência cardíaca média de 24 horas, diurnas e noturnas, antes e após à ingestão da bebida de café preparada com torra média-clara e torra média.

Pressão arterial e frequência cardíaca	Basal	Torra média-clara	Torra média
24 horas			
PAS (mm Hg)	110,2 ± 9,7	111,4 ± 11,9	110,2 ± 7,4
PAD (mm Hg)	70,5 ± 6,9	70,6 ± 8,8	69,9 ± 5,8
FC (batimentos/minuto)	77,2 ± 10,1	78,4 ± 9,6	76,8 ± 10,1
Diurno			
PAS (mm Hg)	113,5 ± 11,1	114,6 ± 11,9	113,6 ± 7,6
PAD (mm Hg)	73,2 ± 7,5	73,8 ± 9,1	73,1 ± 5,9
FC (batimentos/minuto)	80,4 ± 9,9	80,8 ± 9,0	79,5 ± 10,3
Noturno			
PAS (mm Hg)	101,4 ± 9,9	101,4 ± 14,4	101,0 ± 9,0
PAD (mm Hg)	62,8 ± 8,5	61,0 ± 11,3	61,2 ± 8,3
FC (batimentos/minuto)	69,1 ± 10,5	70,6 ± 11,9	69,2 ± 9,6

Valores expressos em média ± DP (n = 20)

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca

A pressão arterial foi considerada normal quando a média de 24 horas era inferior a 125 x 75 mmHg, a de vigília a 130 x 85 mmHg e a de noturno inferior a 110 x 70 mmHg e a média de FC estava entre 60 e 100 batimentos por minuto (89). Portanto, pode-se verificar na tabela 9 que PAS, PAD e FC foram consideradas normais durante todo o estudo. Não houve diferença significativa na PAS e PAD e na FC média de 24 horas, diurna e noturna antes e após o consumo de ambos os tipos de torra de café. A ingestão de café não causa aumento da pressão arterial em consumidores habituais, devido à indução de tolerância à cafeína (14). Esse efeito somente é observado após período prolongado de abstinência (142).

Rakic et al. (143) compararam a pressão arterial de indivíduos normotensos, acima de 50 anos, consumidores de café filtrado (5 xícaras por dia) e não consumidores. Após 2 semanas de intervenção, não observaram diferença

significativa entre os dois grupos. Yamaguchi et al. (96) verificaram que os ACG do café sem hidroxihidroquinona apresentaram efeito anti-hipertensivo dose-dependente. Entretanto, a ingestão da bebida preparada com pó de café, do qual a hidroxihidroquinona não havia sido removida, não alterou a PAS e PAD. Esses estudos corroboram para mostrar que o café filtrado não influencia na pressão arterial.

Alguns estudos referiram que a hidroxihidroquinona, presente no café, aumenta a pressão arterial (96, 98, 144). Entretanto, outros componentes deste, como ACG, possuem atividade anti-hipertensiva, mediada pela atividade antioxidante, que melhora a função endotelial pela redução dos ânions superóxidos, os quais reagem com o óxido nítrico (fator de relaxamento endotelial). Embora haja perda de ACG durante a torrefação, o desenvolvimento dos PRM pode manter ou até aumentar as propriedades anti-hipertensivas da bebida de café. A hidroxihidroquinona é uma fonte de ERO, as quais podem inibir a ação anti-hipertensiva dos ACG, o que pode explicar a ausência de efeito sobre a pressão arterial, observada em nosso estudo (90).

Estudos epidemiológicos não sustentam a hipótese de que o café filtrado apresente efeito maléfico na pressão arterial. Contrariamente, há evidências de que seu alto consumo (superior a 4 xícaras por dia) pode reduzir o risco de hipertensão, especialmente em mulheres (142). Lopez-Garcia et al. (103) avaliaram o efeito do café com e sem cafeína na função endotelial de 730 mulheres saudáveis e 663 com DM2 e não encontraram associação. Nesse estudo, observou-se maior proporção de hipertensas no grupo que consumiu 1 xícara de café por dia (25%) comparada com menos de 1 xícara por mês (8%) e 2 ou mais xícaras por dia (17%).

Em estudo com duração de 11 anos, Uiterwaal et al. (92) avaliaram mais de 5000 indivíduos normotensos, de ambos sexos, os quais ingeriam ou não café diariamente. Os autores verificaram que mulheres de meia idade (≥ 39 anos) que consumiram mais de 6 xícaras de café/dia apresentaram 33% de redução do risco de hipertensão quando comparadas àquelas cujo consumo era inferior a 3 xícaras/dia, embora a diferença na PAD não tenha sido significativa. Nos homens, os resultados não foram significativos.

Palatini et al. (145) estudaram 2505 finlandeses, com idades entre 25 e 64 anos, durante 13 anos e observaram um aumento de 20 a 30% no risco de hipertensão nos indivíduos que ingeriram de 2 a 7 xícaras de café por dia, comparados àqueles cujo consumo foi de 0 a 1 xícara. Entretanto, 12% da coorte utilizavam bebida não filtrada.

5.2.6 Atividade antioxidante no sangue

A TAC foi verificada no plasma e a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GPx e CAT) em lisado de eritrócitos. Os resultados desses parâmetros podem ser visualizados na tabela 10.

Tabela 10. Capacidade antioxidante total plasmática (TAS e ORAC) e atividade das enzimas antioxidantes, anterior e posterior à ingestão de café preparado com torra média-clara ou torra média.

	Basal	Torra média-clara	Torra média	p
TAS (mmol/L)	0,97 ± 0,30 ^a	1,17 ± 0,28 ^b	1,22 ± 0,29 ^b	0,001
ORAC (µmol TE/mL)	7,68 ± 1,40 ^a	8,56 ± 1,50 ^b	8,59 ± 2,26 ^{ab}	0,004
SOD (U/g Hb)	1569 ± 526 ^a	2386 ± 703 ^b	2743 ± 500 ^b	< 0,001
GPx (U/g Hb)	18,18 ± 6,16 ^a	29,43 ± 7,71 ^b	27,16 ± 7,80 ^b	< 0,001
Catalase (U/g Hb)	1387 ± 136 ^a	1565 ± 146 ^b	1561 ± 138 ^b	< 0,001

Valores expressos em média ± DP (n = 20). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa, por ANOVA para amostras repetidas. p = nível de significância estatística. GPx: glutathione peroxidase; ORAC: capacidade de absorbância de radical oxigênio; SOD: superóxido dismutase; TAS: *Total antioxidant status*.

Comparado ao basal, houve aumento significativo na TAC após o consumo da bebida de café preparada com ambas as torras, sendo de 21% no TAS e 12% na ORAC após ingestão da torra média-clara e 26% no TAS após ingestão da torra média. Como não se observou alteração no consumo de nutrientes antioxidantes

durante o estudo (tabela 6), é possível que a ingestão de café tenha contribuído para este efeito.

Em relação à atividade das enzimas antioxidantes, ocorreu aumento significativo para as três enzimas após o consumo da bebida de café preparada com ambos os tipos de torra. Para a atividade da SOD, observou-se um aumento de 52% após o consumo da torra média-clara e de 75% após o consumo da torra média. Para a GPx, o aumento foi, respectivamente, de 62% e 49%. Houve uma elevação de 13% na atividade da CAT após o consumo de ambas as torras. Aumento significativo na atividade dessas enzimas também foi observado em outro estudo (4), após a ingestão de bebida de café preparada com torra clara por 4 semanas, porém houve redução da TAC plasmática. Já para o torra escura, os autores verificaram redução de 5,6% na atividade da SOD e aumento de 15% na atividade da CAT.

A elevação da atividade da SOD pode ser causada por um aumento na formação de íons radical superóxido, enquanto o aumento da atividade da GPx e da CAT por níveis elevados de peróxidos. O aumento da atividade das enzimas antioxidantes pode ter ocorrido por: maior produção de ERO intracelular, ativando a via *Nrf2/antioxidant response elements* (ARE), a qual regula a expressão de enzimas antioxidantes; regeneração dos níveis de α -tocoferol endógeno pelos ACG ingeridos, combatendo as ERO e restabelecendo os níveis dessas enzimas; ingestão de ACG e N-metilpiridina, composto formado a partir da trigonelina durante a torrefação, os quais parecem ativar o sistema de defesa antioxidante endógeno por representarem potentes ativadores do fator de translocação nuclear Nrf2 (42, 59, 66, 68); ingestão de cafestol e kawool, os quais têm se relacionado ao aumento de expressão de enzimas importantes para a síntese de antioxidantes endógenos (59).

Não se observou diferença significativa entre as torras para os parâmetros antioxidantes. A bebida preparada com torra média apresentou menor concentração de ACG, porém maior concentração de cafeína e melanoidinas, as quais podem ter compensado a perda de ACG durante a torrefação, contribuindo para a atividade antioxidante. Embora cerca de 30% das melanoidinas sejam absorvidas por humanos (3, 146), esses compostos podem ter contribuído como antioxidante, o que explicaria os efeitos antioxidantes semelhantes entre as duas intervenções.

Os resultados obtidos sugerem que os efeitos antioxidantes do café podem ser importantes para proteção dos sistemas biológicos contra ERO e, consequentemente, para redução do risco de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo.

5.2.7 Capacidade de inibição da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é o primeiro processo oxidativo que contribui para DCV. Portanto, o foco deste estudo foram os biomarcadores de peroxidação lipídica 8-isoprostano e LDL-ox (figura 16).

Valores expressos em média $\pm$ DP (n = 20). Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$), por ANOVA para amostras repetidas.

Figura 16. Indicadores de peroxidação lipídica do plasma antes e após a ingestão de café preparado com torra média-clara e torra média

Embora o consumo de café tenha aumentado a TAC e a atividade das enzimas antioxidantes nos indivíduos, não se observaram alterações significativas dos níveis plasmáticos de 8-isoprostano e LDL-ox. Possivelmente a quantidade de bebida consumida não foi suficiente para promover mudança desses parâmetros, uma vez que em outro estudo (147) comparou-se o consumo de 0, 450 e 900 mL de café

filtrado em homens saudáveis por 3 semanas e também não se verificou alteração significativa no nível plasmático de 8-isoprostano. Kempf et al. (104) observaram redução deste, porém após o consumo diário de 1200 mL de café regular filtrado por 1 mês, quantidade 2 a 3 vezes superior à utilizada em nosso estudo. Uma diminuição na concentração de 8-isoprostano foi observada quando indivíduos saudáveis ingeriram 800 mL/dia de café solúvel por 5 dias. Entretanto, o tipo de café não foi o mesmo utilizado em nosso estudo e a análise foi realizada em urina, na qual a concentração de 8-isoprostano é maior (148).

Em relação à LDL-ox, o efeito da ingestão de café solúvel (148) ou filtrado (149) sobre este biomarcador foi avaliado após 5 dias de intervenção. Entretanto, assim como neste estudo, não foram observadas alterações significativas.

5.2.8 Biomarcadores inflamatórios relacionados à disfunção endotelial

Os biomarcadores inflamatórios foram avaliados no plasma dos voluntários antes e após o consumo da bebida de café preparada com cada tipo de torra e seus valores médios podem ser visualizados na tabela 11.

Tabela 11. Biomarcadores inflamatórios medidos no plasma antes do período de intervenção e após a ingestão de café preparado com torra média-clara ou torra média.

Biomarcadores inflamatórios	Basal	Torra média-clara	Torra média
PCR-as (mg/L)	2,2 ± 2,1 ^a	2,1 ± 2,0 ^a	2,6 ± 2,2 ^a
IL-1β (pg/mL)	0,1 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,2 ^a
IL-6 (pg/mL)	1,2 ± 0,8 ^a	1,7 ± 2,6 ^a	1,3 ± 1,2 ^a
TNF-α (pg/mL)	2,8 ± 1,4 ^a	3,3 ± 2,4 ^a	2,9 ± 2,0 ^a
MCP-1 (pg/mL)	75,4 ± 19,3 ^a	79,6 ± 15,7 ^a	80,1 ± 17,9 ^a
Fibrinogênio (mg/dL)	357,1 ± 48,3 ^a	362,3 ± 67,8 ^a	385,8 ± 67,7 ^b
sE-selectina (pg/mL)	33,6 ± 12,0 ^a	37,7 ± 14,8 ^b	34,4 ± 11,6 ^{ab}
sVCAM-1 (pg/mL)	1049 ± 174 ^a	1235 ± 256 ^b	1191 ± 299 ^b
sICAM-1 (pg/mL)	220,5 ± 62,5 ^a	243,1 ± 91,7 ^a	237,6 ± 85,9 ^a
tPAI-1 (pg/mL)	54,6 ± 20,3 ^a	53,8 ± 20,1 ^a	54,1 ± 21,4 ^a

Valores expressos em média ± DP (n = 20). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p < 0,05), por ANOVA para amostras repetidas.

IL: interleucina; MCP-1: proteína quimiotática para monócitos 1; PCR-as: proteína C reativa de alta sensibilidade; sVCAM-1: molécula de adesão celular vascular 1 solúvel; sICAM-1: molécula de adesão intercelular 1 solúvel; TNF-α: fator de necrose tumoral α; tPAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1 tecidual.

Observou-se 8% de aumento na concentração plasmática de fibrinogênio (p = 0,01) após o consumo da bebida de café preparada com a torra média e 12% na concentração de sE-selectina após a ingestão de café torra média-clara (p = 0,02). Após o consumo da torra média, a concentração de sE-selectina aumentou, porém não significativamente. O sVCAM-1 plasmático aumentou 18% após a ingestão da torra média-clara (p = 0,001) e 14% após a torra média (p = 0,04). Para todos os biomarcadores inflamatórios, não houve diferença significativa quando comparada a ingestão de uma torra com a outra, sugerindo que o grau de torra não se relacionou com o aumento da concentração desses biomarcadores.

Em diversos estudos citados na revisão de Galkina e Ley (150), sugere-se que a LDL-ox estimula a expressão de moléculas de adesão na superfície das células

endoteliais. Entretanto, neste estudo não se observou alteração significativa na concentração de LDL-ox após a ingestão da bebida de café preparada com ambas torras. A concentração de fibrinogênio e a expressão de moléculas de adesão estão positivamente correlacionadas com as concentrações de TNF- α , IL-6, PCR-as, IMC, pressão arterial e glicemia (150, 151). Entretanto, esses parâmetros não se alteraram significativamente durante o estudo.

A elevação na concentração de TNF- α , IL-6 e IL-1 β relaciona-se ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes (48). Entretanto, não se observou alteração significativa desses biomarcadores inflamatórios após a ingestão das bebidas de café.

Até o momento, dados referentes à relação entre o consumo do café e biomarcadores inflamatórios são escassos e contrastantes. Um estudo recente (104) também não observou alteração significativa de PCR e IL-6 após ingestão de 1200 mL de café regular filtrado por 1 mês. Zampelas et al. (105) verificaram aumento na concentração de PCR, IL-6, TNF- α com o consumo de café superior a 200 mL/dia, quando comparados a não consumidores. Entretanto, esse estudo foi transversal e não houve definição da forma de preparo da bebida. Os componentes do café responsáveis pelo aumento de biomarcadores inflamatórios ainda não são conhecidos (104).

5.3 LIMITAÇÕES E PONTOS FORTES DO ESTUDO

Este estudo apresenta algumas limitações. Primeiramente, este estudo foi composto por um pequeno tamanho de amostra, que pode ser explicado pelo longo período do estudo (9 semanas) e pela grande quantidade da bebida de café consumida. O fato das torras serem similares pode também ser uma limitação; entretanto deve ser notado que a concentração de antioxidantes das duas torras foi significativamente diferente. Finalmente, a ausência do período de *washout* entre as intervenções era uma potencial limitação, porém a análise estatística mostrou que não houve efeito de uma torra sobre a outra (*carryover*). Foram comparadas as

médias das variáveis dos grupos após 4 semanas e seus perfis ao longo do estudo e se observou que ambos tiveram o mesmo comportamento.

Como pontos fortes, esse é o primeiro estudo de intervenção a mostrar aumento de biomarcadores de disfunção endotelial em indivíduos saudáveis, após o consumo de bebida de café e a comparar os efeitos de duas torras sobre a inflamação. Estudos anteriores sobre os efeitos da ingestão de café em biomarcadores inflamatórios são geralmente observacionais ou transversais. Um desses estudos foi de intervenção (104), entretanto não houve alteração nas concentrações dos biomarcadores inflamatórios avaliados em nosso estudo. Além disso, é o primeiro estudo de intervenção a analisar vários biomarcadores de risco cardiovascular. Ainda, há somente um estudo (4) que comparou o efeito de diferentes torras de café na atividade antioxidante e peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis. Entretanto, as torras avaliadas não foram as mesmas e o biomarcador de peroxidação lipídica avaliado (malonaldeído) é menos específico que aqueles utilizados em nosso estudo.

5.4 MANUSCRITOS

Este trabalho resultou em 2 manuscritos, os quais foram submetidos à revistas indexadas na área de Nutrição. O primeiro, o qual contempla a capacidade antioxidante nas bebidas e nos indivíduos e a capacidade de inibição de peroxidação lipídica (anexo 7), já foi aceito para publicação na *Plant Foods for Human Nutrition* (DOI: 10.1007/s11130-012-0297-x). O segundo foi submetido à *Nutrition*, (NUT-S-12-00591), entretanto ainda não obtivemos resposta. Esse manuscrito contém indicadores bioquímicos, pressão arterial e biomarcadores inflamatórios (anexo 8).

6 CONCLUSÕES

- Apesar da distinta composição de antioxidantes das torras, não houve diferença na capacidade antioxidante total;
- O consumo das duas torras relacionou-se a efeitos maléficos semelhantes sobre colesterol total e LDL, entretanto a ingestão da torra média aumentou a HDL, o que pode contrabalancear os efeitos deletérios da LDL aumentada;
- O grau da torra consumida não se relacionou a alterações na pressão arterial, frequência cardíaca e nos biomarcadores de diabetes;
- Ambas as torras mostraram efeitos antioxidantes nos indivíduos, não havendo diferença significativa entre elas. Apesar do potencial antioxidante, a ingestão de ambas as torras causou aumento em biomarcadores inflamatórios relacionados à disfunção endotelial.
- Conclusão geral: O consumo de café filtrado aumentou a capacidade antioxidante nos indivíduos, independente do grau de torra utilizado para preparo da bebida, fato que pode ser de grande relevância para redução do risco de DCV. Além disso, o consumo de café não teve efeito sobre biomarcadores de peroxidação lipídica e a maioria dos biomarcadores inflamatórios. Embora tenha aumentado o colesterol total e LDL, não se relacionou à alteração de homocisteína, Lp(a), pressão arterial e fatores de risco relacionados ao metabolismo glicídico. O consumo moderado de café pode causar alguns efeitos maléficos no risco cardiovascular em indivíduos saudáveis, independentemente do seu teor de antioxidantes. Como o café é uma das bebidas mais consumidas mundialmente, a identificação de seus compostos relacionados aos efeitos maléficos e o estudo de seus compostos antioxidantes isolados é de grande relevância. Nesse sentido, mais estudos intervencionais, especialmente aqueles que reflitam a ingestão da bebida preparada com diferentes graus de torra, em doses diárias diferentes daquelas utilizadas neste estudo, por longo tempo, são necessários para esclarecer se algum composto específico causa os efeitos prejudiciais ou se estes foram devido à quantidade diária de café consumida.

7 REFERÊNCIAS

1. Almeida MB, Benassi MT. Atividade antioxidante e estimativa do teor de melanoidinas em cafês torrados comerciais. *Semina: Ciênc Agrárias*. 2011;32(supl. 1):1893-900.
2. Liu Y, Kitts DD. Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Res Int*. 2011;44(8):2418-24.
3. Gómez-Ruiz J, Ames J, Leake D. Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *Eur Food Res Technol*. 2008;227(4):1017-24.
4. Kotyczka C, Boettler U, Lang R, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I, et al. Dark roast coffee is more effective than light roast coffee in reducing body weight, and in restoring red blood cell vitamin E and glutathione concentrations in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(10):1582-6.
5. Lima AR, Pereira RGFA, Abrahão SA, da Silveira Duarte SM, de Araújo Paula FB. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. *Quim Nova*. 2010;33(1):20-4.
6. Abrahão SA, Pereira RGFA, da Silveira Duarte SM, Lima AR, Alvarenga DJ, Ferreira EB. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). *Ciênc Agrotenol*. 2010;34(2):414-20.
7. Duarte SMS, Abreu CMP, Menezes HC, Santos MH, Gouvêa CMCP. Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(2):387-93.
8. Verzelloni E, Tagliazucchi D, Del Rio D, Calani L, Conte A. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. *Food Chem*. 2011;124(4):1430-5.

9. Di Castelnuovo A, Di Giuseppe R, Iacoviello L, De Gaetano G. Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease. *Eur J Intern Med*. 2011;23(1):15-25.
10. Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J. Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol Res*. 2007;55(3):187-98.
11. Baylin A, Hernandez-Diaz S, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. Transient exposure to coffee as a trigger of a first nonfatal myocardial infarction. *Epidemiology*. 2006;17(5):506-11.
12. Bohn SK, Ward NC, Hodgson JM, Croft KD. Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. *Food Funct*. 2012;3:575-91.
13. Buscemi S, Verga S, Batsis JA, Donatelli M, Tranchina MR, Belmonte S, et al. Acute effects of coffee on endothelial function in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(5):483-9.
14. Riksen NP, Rongen GA, Smits P. Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: implications for coronary heart disease. *Pharmacol Ther*. 2009;121(2):185-91.
15. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zampelas A, Zeimbekis A, Chryschoou C, Papademetriou L, et al. The association between coffee consumption and plasma total homocysteine levels: the "ATTICA" study. *Heart Vessels*. 2004;19(6):280-6.
16. van Dam RM. Coffee consumption and coronary heart disease: paradoxical effects on biological risk factors versus disease incidence. *Clin Chem*. 2008;54(9):1418-20.
17. Butt MS, Sultan MT. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011;51(4):363-73.

18. Loopstra-Masters R, Liese A, Haffner S, Wagenknecht L, Hanley A. Associations between the intake of caffeinated and decaffeinated coffee and measures of insulin sensitivity and beta cell function. *Diabetologia*. 2011;54(2):320-8.
19. Winkelmayr WC, Stampfer MJ, Willett WC, Curhan GC. Habitual caffeine intake and the risk of hypertension in women. *JAMA*. 2005;294(18):2330-5.
20. Wu JN, Ho SC, Zhou C, Ling WH, Chen WQ, Wang CL, et al. Coffee consumption and risk of coronary heart diseases: A meta-analysis of 21 prospective cohort studies. *Int J Cardiol*. 2009;137(3):216-25.
21. Sofi F, Conti AA, Gori AM, Eliana Luisi ML, Casini A, Abbate R, et al. Coffee consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(3):209-23.
22. Foncea R, Carvajal C, Almarza C, Leighton F. Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. *Biol Res*. 2000;33(2):86-96.
23. Gordon MH, Wishart K. Effects of chlorogenic acid and bovine serum albumin on the oxidative stability of low density lipoproteins in vitro. *J Agric Food Chem*. 2010;58(9):5828-33.
24. Andersen LF, Jacobs DR, Carlsen MH, Blomhoff R. Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(5):1039-46.
25. Lima FA, Sant'ana AEG, Ataíde TR, Omena CMB, Menezes MES, Vasconcelos SML. Coffee and human health: a focus on the substances of the beverage related to cardiovascular disease. *Rev Nutr*. 2010;23(6):1063-73.
26. Melo WLB. A importância da informação sobre o grau de torra e sua influência nas características organolépticas da bebida.: Embrapa.; 2004 [cited 2011 Abril 20]. Available from: http://www.cnpdia.embrapa.br/publicacoes/download.php?file=CT58_2004.pdf.

27. Classificação por meio do sistema AGTRON/SCAA roast classification color disk [cited 2011 Nov 23]. Available from: <http://treasurecup.com/Learn/DegreeOfRoast.aspx>.
28. Ranheim T, Halvorsen B. Coffee consumption and human health - beneficial or detrimental? - Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49(3):274-84.
29. Higdon JV, Frei B. Coffee and health: A review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46(2):101-23.
30. Farah A, Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. *Braz J Plant Physiol*. 2006;18(1):23-36.
31. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):727-47.
32. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. 2006;99(1):191-203.
33. Farah A, De Paulis T, Moreira DP, Trugo LC, Martin PR. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *J Agric Food Chem*. 2006;54(2):374-81.
34. Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr*. 2007;137(10):2196-201.
35. Renouf M, Guy PA, Marmet C, Fraering AL, Longet K, Moulin J, et al. Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption: Small intestine and colon are key sites for coffee metabolism. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(6):760-6.

36. Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman M, van Amelsvoort JMM, Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr.* 2003;133(8):1806-14.
37. Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Remesy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr.* 2003;133(6):1853-9.
38. Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem.* 2002;50(20):5735-41.
39. Gomez-Ruiz JA, Leake DS, Ames JM. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J Agric Food Chem.* 2007;55(17):6962-9.
40. Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem.* 2002;50(21):6211-6.
41. Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, Obad A, et al. The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. *Atherosclerosis.* 2008;197(1):250-6.
42. Matsumoto RLT, Bastos DHM, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky Jr W, Ribeiro ML, et al. Effects of Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *J Agric Food Chem.* 2009;57(5):1775-80.
43. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007;30(5):1323-38.
44. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 2 ed. ed. New York: Clarendon Press; 1991.
45. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr.* 2002;15(1):71-81.

46. Çimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*. 2008;390(1-2):1-11.
47. Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Biochem Biophys*. 2009;46(6):421-40.
48. Leite HP, Sarni RS. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. *Rev Bras Nutr Clin*. 2003;18(2):60-5.
49. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*. 2001;37(3):293-303.
50. Hollman PCH, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, et al. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr*. 2011;141(5):989S-1009S.
51. Abdalla DSP, Sena KCM. Lipid peroxidation biomarkers in atherosclerosis. *Rev Nutr*. 2008;21(6):749-56.
52. Natella F, Nardini M, Belelli F, Scaccini C. Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(3):604-9.
53. del Castillo MD, Gordon MH, Ames JM. Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *Eur Food Res Technol*. 2005;221(3-4):471-7.
54. Cheng JC, Dai F, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem*. 2007;104(1):132-9.
55. Araújo FA, Mancini-Filho J. Compostos bioativos do café e seus benefícios à saúde. *Hig Alim*. 2006;20(143):60-5.
56. Duncan BB, Stevens A, Iser BPM, Malta DC, Silva GA, Schmidt MI. Mortalidade por doenças crônicas no Brasil: situação em 2009 e tendências de 1991 a

2009. In: Secretaria de Vigilância em Saúde MdS, editor.: Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cap_5_saude_brasil_2010.pdf. 2010.
57. Mendis S, Puska P, Norrving B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control Geneva: World Health Organization, World Heart Federation and the World Stroke Organization.; 2011 [cited 2012 Jun 06]. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf.
58. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, et al. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol. 2007;88:2-19.
59. Bohn SK, Ward NC, Hodgson JM, Croft KD. Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. Food Funct. 2012.
60. Happonen P, Voutilainen S, Salonen JT. Coffee drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. J Nutr. 2004;134(9):2381-6.
61. Wu JN, Ho SC, Zhou C, Ling WH, Chen WQ, Wang CL, et al. Coffee consumption and risk of coronary heart diseases: a meta-analysis of 21 prospective cohort studies. Int J Cardiol. 2009;137(3):216-25.
62. Floegel A, Pischon T, Bergmann MM, Teucher B, Kaaks R, Boeing H. Coffee consumption and risk of chronic disease in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)–Germany study. Am J Clin Nutr. 2012;95:901-8.
63. Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB, van Dam RM. Coffee Consumption and Risk of Stroke in Women. Circulation. 2009;119(8):1116-23.
64. Mineharu Y, Koizumi A, Wada Y, Iso H, Watanabe Y, Date C, et al. Coffee, green tea, black tea and oolong tea consumption and risk of mortality from cardiovascular disease in Japanese men and women. J Epidemiol Community Health. 2011;65(3):230-40.

65. de Koning Gans JM, Uiterwaal CSPM, van der Schouw YT, Boer J, Grobbee DE, Verschuren WM, et al. Tea and coffee consumption and cardiovascular morbidity and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(8):1665-71.
66. Chu Y. Coffee: emerging health effects and disease prevention. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012.
67. Bakuradze T, Lang R, Hofmann T, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I, et al. Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell free systems and human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(12):1734-43.
68. Boettler U, Volz N, Pahlke G, Teller N, Kotyczka C, Somoza V, et al. Coffees rich in chlorogenic acid or N methylpyridinium induce chemopreventive phase II enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(5):798-802.
69. Ricketts ML. Does coffee raise cholesterol? *Future Lipidol.* 2007;2(4):373-7.
70. Francisco G, Hernández C, Simó R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. *Clin Chim Acta.* 2006;369(1):1-16.
71. Siqueira AFA, Abdalla DSP, Ferreira SRG. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):334-43.
72. LDL oxidation in atherogenesis Applied Biosystems; 2009 [cited 2009 Oct 07]. Available from: <http://www5.appliedbiosystems.com/tools/pathway/pathway.php?pathway=LDL%20Oxidation%20in%20Atherogenesis>.
73. Duarte M, Moresco RN, de Bem AF. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. *Rev Bras Anal Clin.* 2008;40(2):101-6.
74. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):508-19.

75. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-43.
76. Naito HK. Coronary artery disease and disorders of lipid metabolism. In: Kaplan LA, Pesce AJ, Kamierczak SC, editors. *Clinical chemistry: theory, analysis, correlations*. 4 ed. Saint Louis: Mosby; 2003. p. 603-38.
77. Reis JP, Loria CM, Steffen LM, Zhou X, van Horn L, Siscovick DS, et al. Coffee, decaffeinated coffee, caffeine, and tea consumption in young adulthood and atherosclerosis later in life. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(10):2059-66.
78. Natella F, Nardini M, Belevi F, Pignatelli P, Di Santo S, Ghiselli A, et al. Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *Br J Nutr*. 2008;100(6):1276-82.
79. Huang JJ, de Paulis T, May JM. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. *J Nutr Biochem*. 2004;15(12):722-9.
80. SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes; 2009 [cited 2011 Oct 21]. Available from: http://www.diabetes.org.br/attachments/diretrizes09_final.pdf.
81. Bidel S, Hu G, Tuomilehto J. Coffee consumption and type 2 diabetes - An extensive review. *Cent Eur J Med*. 2008;3(1):9-19.
82. Van Dieren S, Uiterwaal CSPM, Van der Schouw YT, van der A DL, Boer JMA, Spijkerman A, et al. Coffee and tea consumption and risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(12):2561-9.
83. Rosengren A, Dotevall A, Wilhelmsen L, Thelle D, Johansson S. Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up study. *J Intern Med*. 2004;255(1):89-95.
84. van Dam RM, Dekker JM, Nijpels G, Stehouwer CDA, Bouter LM, Heine RJ. Coffee consumption and incidence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Diabetologia*. 2004;47(12):2152-9.

85. Salazar-Martinez E, Willett WC, Ascherio A, Manson JE, Leitzmann MF, Stampfer MJ, et al. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2004;140(1):1-8.
86. Tuomilehto J, Hu G, Bidel S, Lindstrom J, Jousilahti P. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged Finnish men and women. *JAMA.* 2004;291(10):1213-9.
87. Odegaard AO, Pereira MA, Koh WP, Arakawa K, Lee HP, Yu MC. Coffee, tea, and incident type 2 diabetes: the Singapore Chinese Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(4):979-85.
88. Boggs DA, Rosenberg L, Ruiz-Narvaez EA, Palmer JR. Coffee, tea, and alcohol intake in relation to risk of type 2 diabetes in African American women. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(4):960-6.
89. Giorgi DMA, Brandão AA, Rodrigues CI, Consolim-Colombo F, Plavnik FL, Malachias MV, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(1 Suppl):1-51.
90. Chikama A, Yamaguchi T, Ochiai R, Kataoka K, Tokimitsu I. Effects of Hydroxyhydroquinone-reduced Coffee on Blood Pressure in High-normotensives and Mild Hypertensives. *J Health Sci.* 2008;54(2):162-73.
91. Klag MJ, Wang NY, Meoni LA, Brancati FL, Cooper LA, Liang KY, et al. Coffee intake and risk of hypertension: the Johns Hopkins precursors study. *Arch Intern Med.* 2002;162(6):657-62.
92. Uiterwaal C, Verschuren WMM, Bueno-De-Mesquita HB, Ocke M, Geleijnse JM, Boshuizen HC, et al. Coffee intake and incidence of hypertension. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(3):718-23.
93. Corti R, Binggeli C, Sudano I, Spieker L, Hanseler E, Ruschitzka F, et al. Coffee acutely increases sympathetic nerve activity and blood pressure independently of caffeine content - Role of habitual versus nonhabitual drinking. *Circulation.* 2002;106(23):2935-40.

94. Watanabe T, Arai Y, Mitsui Y, Kusaura T, Okawa W, Kajihara Y, et al. The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2006;28(5):439-49.
95. Zhang Z, Hu G, Caballero B, Appel L, Chen L. Habitual coffee consumption and risk of hypertension: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(6):1212-9.
96. Yamaguchi T, Chikama A, Mori K, Watanabe T, Shioya Y, Katsuragi Y, et al. Hydroxyhydroquinone-free coffee: A double-blind, randomized controlled dose-response study of blood pressure. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis*. 2008;18(6):408-14.
97. Medina-Remón A, Zamora-Ros R, Rotchés-Ribalta M, Andres-Lacueva C, Martínez-González MA, Covas MI, et al. Total polyphenol excretion and blood pressure in subjects at high cardiovascular risk. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis*. 2010;21(5):323-31.
98. Rufian-Henares JA, Morales FJ. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins. *J Agric Food Chem*. 2007;55(4):1480-5.
99. Donath MY, Størling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T. Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med*. 2003;81(8):455-70.
100. De Lorenzo A, Del Gobbo V, Premrov MG, Bigioni M, Galvano F, Di Renzo L. Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am J Clin Nutr*. 2007;85(1):40-5.
101. Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(3):537-49.
102. Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. *Am J Med*. 2004;116(6):9-16.

103. Lopez-Garcia E, van Dam RM, Qi L, Hu FB. Coffee consumption and markers of inflammation and endothelial dysfunction in healthy and diabetic women. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(4):888-93.
104. Kempf K, Herder C, Erlund I, Kolb H, Martin S, Carstensen M, et al. Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(4):950-7.
105. Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoshoou C, Stefanadis C. Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(4):862-7.
106. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang XM, Iwahashi H, et al. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry (Mosc)*. 2004;69(1):70-4.
107. Huxley R, Lee CMY, Barzi F, Timmermeister L, Czernichow S, Perkovic V, et al. Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2009;169(22):2053-63.
108. Esposito F, Morisco F, Verde V, Ritieni A, Alezio A, Caporaso N, et al. Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17(4):595-601.
109. Dupas CJ, Marsset-Baglieri AC, Ordonaud CS, Ducept FMG, Maillard MN. Coffee antioxidant properties: Effects of milk addition and processing conditions. *J Food Sci*. 2006;71(3):S253-8.
110. Renouf M, Marmet C, Guy P, Fraering AL, Longet K, Moulin J, et al. Nondairy creamer, but not milk, delays the appearance of coffee phenolic acid equivalents in human plasma. *J Nutr*. 2010;140(2):259-63.
111. Cammerer B, Kroh LW. Antioxidant activity of coffee brews. *Eur Food Res Technol*. 2006;223(4):469-74.

112. Singleton VL, Rossi Jr JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3):144-58.
113. Jaiswal R, Patras MA, Eravuchira PJ, Kuhnert N. Profile and characterization of the chlorogenic acids in green robusta coffee beans by LC-MSn: identification of seven new classes of compounds. *J Agric Food Chem.* 2010;58(15):8722-37.
114. Kuhnert N, Jaiswal R, Eravuchira P, El-Abassy RM, von der Kammer B, Materny A. Scope and limitations of principal component analysis of high resolution LC-TOF-MS data: the analysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans as a case study. *Anal Methods* 2011;3(1):144-55.
115. Mullen W, Nemzer B, Ou B, Stalmach A, Hunter J, Clifford MN, et al. The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. *J Agric Food Chem.* 2011;59(8):3754-62.
116. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim I, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova.* 2004;27:771-80.
117. Yen WJ, Wang BS, Chang LW, Pin-Der D. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J Agric Food Chem.* 2005;53(7):2658-63.
118. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 1995;28(1):25-30.
119. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.* 2001;49(10):4619-26.
120. Prior RL, Wu X, Schaichs K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005;53(10):4290-302.
121. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.* 2001;49(10):4619-26.

122. Bauer JD, Ackermann PG, Toro G. Clinical Laboratories Methods. London: Mosby Company; 1974.
123. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzimol.* 1984;105:121-6.
124. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *J Biol Chem.* 1969;244(22):6056-63.
125. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-69.
126. Millipore. MILLIPLEX™ MAP and Cardiovascular Disease 2010 [cited 2010 Out 01]. Available from: <http://www.millipore.com>.
127. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
128. NCEP. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation.* 2002;106(25):3143-421.
129. Castelli WP, Abbott RD, McNamara PM. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation.* 1983;67(4):730-4.
130. Association AD. Standards of Medical Care in Diabetes 2012. *Diabetes Care.* 2012;35(Suppl 1):S11-S63.
131. Stern SE, Williams K, Ferrannini E, DeFronzo RA, Bogardus C, Stern MP. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. *Diabetes.* 2005 February 1, 2005;54(2):333-9.

132. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000 [cited 2012 Jun 01]. Available from: http://libdoc.who.int/trs/WHO_TRS_894.pdf.
133. Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*. 2005;53(5):1370-3.
134. Monteiro MC, Trugo LC. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quím Nova*. 2005;28(4):637-41.
135. Ainsworth B, Haskell W, Whitt M, Irwin M, Swartz A, Strath S, et al. Compendium of physical activitys: an update of activity codes and METS intensities. *Med Sci Sports Exerc*. 2000;32(19suppl):S498-516.
136. Burke MF, Khera AV, Rader DJ. Polyphenols and cholesterol efflux is coffee the next red wine? *Circ Res*. 2010;106(4):627-9.
137. Christensen B, Mosdol A, Retterstol L, Landaas S, Thelle DS. Abstention from filtered coffee reduces the concentrations of plasma homocysteine and serum cholesterol - a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(3):302-7.
138. Strandhagen E, Thelle DS. Filtered coffee raises serum cholesterol: results from a controlled study. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57(9):1164-8.
139. Thelle DS, Strandhagen E. Coffee and disease: an overview with main emphasis on blood lipids and homocysteine. *Scand J Food Nutr*. 2005;49(2):50-61.
140. Jee SH, He J, Appel LJ, Whelton PK, Suh, II, Klag MJ. Coffee consumption and serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Am J Epidemiol*. 2001;153(4):353-62.
141. Fried RE, Levine DM, Kwiterovich PO, Diamond EL, Wilder LB, Moy TF, et al. The effect of filtered-coffee consumption on plasma lipid levels. *JAMA*. 1992;267(6):811-5.

142. Geleijnse JM. Habitual coffee consumption and blood pressure: an epidemiological perspective. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(5):963-70.
143. Rakic V, Burke V, Beilin LJ. Effects of coffee on ambulatory blood pressure in older men and women - A randomized controlled trial. *Hypertension.* 1999;33(3):869-73.
144. Chikama A, Yamaguchi T, Watanabe T, Mori K, Katsuragi Y, Tokimitsu I, et al. Effects of chlorogenic acids in hydroxyhydroquinone-reduced coffee on blood pressure and vascular endothelial function in humans. *Prog Med.* 2006;26:1723-36.
145. Palatini P, Dorigatti F, Santonastaso M, Cozzio S, Biasion T, Garavelli G, et al. Association between coffee consumption and risk of hypertension. *Ann Med.* 2007;39(7):545-53.
146. Morales FJ, Somoza V, Fogliano V. Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids.* 2010:1-13.
147. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Alfthan G, Virtanen JK, Rissanen TH, et al. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(4):527-34.
148. Hoelzl C, Knasmüller S, Wagner KH, Elbling L, Huber W, Kager N, et al. Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(12):1722-33.
149. Misik M, Hoelzl C, Wagner KH, Cavin C, Moser B, Kundi M, et al. Impact of paper filtered coffee on oxidative DNA-damage: Results of a clinical trial. *Mutat Res.* 2010;692(1-2):42-8.
150. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(11):2292-301.

151. Kaptoge S, White IR, Thompson SG, Wood AM, Lewington S, et al. Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: the fibrinogen studies collaboration. *Am J Epidemiol.* 2007;166(8):867-79.
152. Fisberg RM, Slater B, Marchioni DML, Martini LA. *Inquéritos alimentares: métodos e bases científicas.* São Paulo: Manole; 2005.

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1.Dados de Identificação

Nome do Paciente:
 Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
 Bairro:.....Cidade:.....
 CEP:.....Telefone:.....

2.Responsável

Legal:.....
 Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):
 Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
 Bairro:.....Cidade:.....
 CEP:.....Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa: Efeito da ingestão de café filtrado sobre biomarcadores do estresse oxidativo e da resposta inflamatória em indivíduos saudáveis

Pesquisadores:

Telma Angelina Faraldo Corrêa - aluna de Doutorado em Nutrição em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres – Profª. Associada do Depto de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Luiz Antonio Machado César – Diretor da Unidade Clínica de Coronariopatia Crônica

Avaliação de Risco da Pesquisa

() Sem Risco (X) Risco Mínimo () Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior

Duração da Pesquisa: 3 meses

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO SUJEITO DA PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1 – Estamos convidando o Sr(a). para participar de um estudo que avalia os efeitos do café na pressão arterial e na taxa de gordura e açúcar no sangue. Queremos saber o quanto tomar café, numa quantidade de três ou quatro xícaras ao dia, influencia os exames de sangue e MAPA (aparelho que fica preso no braço durante 24h medindo sua pressão). Estamos realizando esse estudo com pessoas saudáveis (que não têm alguma evidência de doença no coração, Diabetes mellitus ou pressão alta). Você foi convidado a participar, pois se enquadra nestas condições.

2 – Durante o estudo, vamos rever a sua história clínica, seus sinais vitais (pressão arterial e frequência cardíaca), e será realizado exame físico e laboratorial, peso e altura, avaliação nutricional e MAPA. Todos os exames mencionados já são consagrados e bastante utilizados na prática clínica atual.

3 – Os desconfortos esperados são: pode aparecer uma mancha roxa ou irritação de pele (no local que colocou a agulha para coleta de sangue e, em alguns casos, o desconforto por ficar durante todo um dia com o MAPA.

4 – Não existem benefícios diretos pela sua participação nessa pesquisa, mas os resultados poderão esclarecer o verdadeiro efeito do café em pessoas saudáveis e se esse efeito poderá ajudar no tratamento ou na prevenção de doenças do coração, diabetes e pressão alta.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de eventuais dúvidas. Entrar em contato com a Doutoranda Telma Angelina Faraldo Corrêa, com a Profa. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres, que podem ser encontradas no Depto de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP) - Av. Dr. Arnaldo, 715 - tel: (11) 3066-7771 ou com Dr. Luiz Antonio Machado César, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 44 – Bloco 2 – AB – Unidade Clínica de Coronariopatia Crônica - Telefone: 011 3069-5387 ou 3069-5377. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Saúde Pública da USP – Avenida Dr. Arnaldo, 715 - térreo - Assessoria Acadêmica - Cep: 01246-904, São Paulo; tel: (11) 30617779 ou 30617742, e-mail: coep@fsp.usp.br ou com o Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da USP - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br;

- 2 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento;
- 3 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente; e serão tratadas conforme as leis brasileiras;
- 4 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 5 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. O Sr (a), durante sua participação no estudo, receberá vale transporte e refeição de acordo com as visitas clínicas previstas. Não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 6 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
- 7 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto “Estudo da ação antioxidante e dos efeitos dos compostos bioativos do café sobre o metabolismo glico-lipídico e pressão arterial”. Eu discuti com Telma Angelina Faraldo Corrêa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente / representante legal

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo 2 - Questionário clínico e nutricional

Protocolo SDC 2500/04/0120	NI <u>01</u> <u> </u> <u> </u> <u> </u> <u> </u> N° do Centro N° do paciente Iniciais do paciente: <u> </u> <u> </u> <u> </u> <u> </u>	Cronograma _ A ou _ B
Rubrica do Investigador:		Data: / /

Exames laboratoriais para inclusão/ exclusão no estudo

Valores de referência

Contagem global de eritrócitos (sangue total): _____ milh/ mm ³ milhões/mm ³ M	4,0 a 5,4 F/ 4,4 a 5,7
Contagem global de leucócitos (sangue total): _____ / mm ³	4000 a 11000/ mm ³
Hemoglobina (sangue total): _____ g/ dL	12,0 a 16,0 g/ dL F/ 13,0 a 18,0 g/dL M
Hematócrito (sangue total): _____ %	35 a 47% F/ 40 a 52% M
Colesterol (soro): _____ mg/ dL	< 200 mg/ dL = ótimo 200 a 239 mg/dL = limítrofe >= 240 mg/ dL = alto
HDL - colesterol (soro): _____ mg/ dL Método colorimétrico enzimático homogêneo automatizado	>= 40 mg/ dL
LDL – colesterol (soro): _____ mg/ dL Estimado pela equação de Friedewald	< 100 mg/ dL = ótimo 100 a 129 mg/dL = desejável 130 a 159 mg/dL = limítrofe 160 a 189 mg/dL = alto >= 190 mg/ dL = muito alto
Triglicérides (soro): _____ mg/ dL Método colorimétrico enzimático automatizado	< 150 mg/ dL = ótimo 150 a 199 mg/dL = limítrofe 200 a 499 mg/dL = alto >= 500 mg/ dL = muito alto
Glicose (soro): _____ mg/ dL Método enzimático automatizado	70 a 99 mg/ dL = ótimo 100 a 125 mg/dL = inadequada >= 126 mg/ dL = elevada
Creatinina (soro): _____ mg/ dL	0,6 a 1,0 mg/dL F/ 0,8 a 1,3 mg/dL M

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO – todos os que seguem devem ser **SIM**:

	Não	Sim
1. Voluntário saudável com idade ≥ 20 e ≤ 65 anos.	☐	☐
2. Ausência de medicamentos de uso contínuo.	☐	☐
3. Ausência de doenças crônicas cardiovasculares, renais e hepáticas, <i>Diabetes mellitus</i> e hipertensão arterial	☐	☐
4. Não tabagista ou ex-tabagista há mais de 2 anos.	☐	☐
5. Não etilista.	☐	☐

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO – todos os que seguem devem ser **NÃO**:

	Não	Sim
1. Taxa de colesterol > 240 mg/dL.	☐	☐
2. Glicemia de jejum > 100 .	☐	☐
3. Paciente portador de disfunção hepática.	☐	☐
4. História de qualquer doença que, na opinião do Investigador, poderia confundir os resultados do estudo ou colocar o paciente em risco adicional.	☐	☐
5. Incapacidade de compreender os procedimentos do estudo e/ou assinar o Consentimento Livre e Esclarecido.	☐	☐

DADOS DEMOGRÁFICOS

Data de Nascimento: / /

Dia mês ano

Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino

Raça:

☐ Branco ☐ Oriental ☐ Negro ☐ Pardo ☐ Outro (especificar): _____ .

Grau de Escolaridade:

☐ Analfabeto ☐ Básico incompleto ☐ Fundamental incompleto ☐ Médio incompleto
 ☐ Básico completo ☐ Fundamental completo ☐ Médio completo
 ☐ Superior incompleto ☐ Superior completo

Profissão: _____

☐ Exerce ☐ Licença ☐ Aposentado ☐ Trabalha em outro ramo.

Especificar:

Fumante: Quanto tempo fuma ou fumou: anos

☐ Não Quantidade aproximada de cigarros por dia:

☐ Sim

☐ Parou de fumar

Data que parou de fumar: /

mês ano

Consumo de álcool: Quanto tempo consumiu ou consome: anos

☐ Não Quantidade aproximada de consumo por semana:

☐ Sim _____ unidades/ semana

☐ Parou de beber: /

mês ano

Nota: Uma unidade de álcool é definida como 280 mL de cerveja, 1 taça (125 mL) de vinho, uma dose (25 mL) de gin, whisky, conhaque ou rum.

HISTÓRIA CLÍNICA								
Assinalar abaixo, se aplicável, a data do diagnóstico de história clínica ou cirúrgica importante, como doenças preexistentes:								
	Data do diagnóstico (dia/mês/ano)	Persistência da doença						
1	/ /	☐ Não	Sim ☐ Não tratada ☐ Tratada ou em tratamento*					
2	/ /	☐ Não	Sim ☐ Não tratada ☐ Tratada ou em tratamento*					
3	/ /	☐ Não	Sim ☐ Não tratada ☐ Tratada ou em tratamento*					
4	/ /	☐ Não	Sim ☐ Não tratada ☐ Tratada ou em tratamento*					
5	/ /	☐ Não	Sim ☐ Não tratada ☐ Tratada ou em tratamento*					
HISTÓRIA CIRÚRGICA								
	Data da operação ou procedimento médico (dia/mês/ano)							
1	/ /							
2	/ /							
3	/ /							
4	/ /							
5	/ /							
*Se a doença descrita ainda está em tratamento, registre o tratamento na tabela seguinte denominada “ <i>medicação concomitante</i> ”.								
MEDICAÇÃO CONCOMITANTE								
Nº	Medicação	Indicação	Dose diária	Posologia	Datas			Via
					Início (dia/mês/ano)	Término (dia/mês/ano)	Em Tratamento	
1							☐ Sim ☐ Não	
2							☐ Sim ☐ Não	
3							☐ Sim ☐ Não	
4							☐ Sim ☐ Não	

SINAIS VITAIS		
Pressão arterial: x mmHg	Frequência Cardíaca: bat/ min	
EXAME FÍSICO		
Peso: Kg	Altura: m	
Exame Físico Geral	Normal	Se anormal, especifique abaixo
Aspecto Geral		
Alergia		
Pele		
Dentes		
Sistema Respiratório		
Coração		
Abdômen		
Outro, especificar:		
Grupo de estudo		

O sujeito de pesquisa:

1. Preenche todos os critérios de inclusão e exclusão? ☐ **SIM** (mandatório) ☐ **NÃO**

2. Tomará o tipo de café:

☐ Café Filtrado torra média-clara

☐ Café Filtrado torra média

Avaliação Nutricional					
Idade: anos	Peso Atual: ____kg	Altura:____m	IMC: kg/m ²	CA: ____cm	
% gordura:		%Água:		% massa muscular:	
Diagnóstico nutricional:					
Dados Clínicos					
DIA ALIMENTAR:					
ALIMENTO	1 DOSE equivalente a	Manhã	Tarde	Após 16h	MÉDIA DIÁRIA
Cafê	mL				
Chá mate	mL				
Chá preto	mL				
Achocolatado	mL				
Chocolate	mL				
Balas com chocolate	1 bala				
Balas com café	1 bala				
Cappuccino	mL				
Coca-cola	mL				
Cerveja	mL				
Vinho	mL				
Doses de bebida destilada	mL				
Outros, especificar:	_____				

Observação: 1 copinho descartável de café = 50 mL; 1 copo descartável = 180 mL; 1 copo de requeijão = 180 mL; 1 xícara de chá = 150 mL.

Recordatório de 24 horas**Café da manhã** ____h**Lanche** ____h**Almoço** ____h**Lanche** ____h**Jantar** ____h**Ceia** ____h

EXAMES LABORATORIAIS

Data da realização: / /			Horário da realização:		
Parâmetros	Valor / Unidade de medida	Relevância clínica?	Parâmetros	Valor / Unidade de medida	Relevância clínica?
HEMÁCIAS		☐ Sim ☐ Não	LEUCÓCITOS		☐ Sim ☐ Não
HEMOGLOBINA		☐ Sim ☐ Não	PLAQUETAS		☐ Sim ☐ Não
HEMATÓCRITO		☐ Sim ☐ Não	PCR-as		☐ Sim ☐ Não
BASÓFILOS		☐ Sim ☐ Não	LINFÓCITOS		☐ Sim ☐ Não
MONÓCITOS		☐ Sim ☐ Não	NEUTRÓFILOS		☐ Sim ☐ Não
EOSINÓFILOS		☐ Sim ☐ Não	TRIGLICÉRIDES		☐ Sim ☐ Não
SÓDIO		☐ Sim ☐ Não	COLESTEROL TOTAL		☐ Sim ☐ Não
POTÁSSIO		☐ Sim ☐ Não	HDL		☐ Sim ☐ Não
CREATININA		☐ Sim ☐ Não	LDL		☐ Sim ☐ Não
URÉIA		☐ Sim ☐ Não	Lp(a)		☐ Sim ☐ Não
COAGULOGRAMA		☐ Sim ☐ Não	FOLATO		☐ Sim ☐ Não
VHS		☐ Sim ☐ Não	HOMOCISTEÍNA		☐ Sim ☐ Não
MAGNÉSIO		☐ Sim ☐ Não	INSULINA DE JEJUM		☐ Sim ☐ Não
FÓSFORO		☐ Sim ☐ Não	INSULINA PÓS PRANDIAL		☐ Sim ☐ Não
GLICEMIA DE JEJUM		☐ Sim ☐ Não	FIBRINOGENIO		☐ Sim ☐ Não
GLICEMIA PÓS PRANDIAL		☐ Sim ☐ Não	VCM		☐ Sim ☐ Não
HEMOGLOBINA GLICADA		☐ Sim ☐ Não	HCM		☐ Sim ☐ Não
FRUTOSAMINA			CHCM		☐ Sim ☐ Não

Algum resultado apresenta significância clínica? Se sim, comentar:

Informações ao Paciente

Nesta visita, o paciente deve ser orientado adequadamente a retornar na Visita T0 dentro de 22 dias, no dia / /

Paciente deverá permanecer SEM CAFÉ durante pelo menos 1 SEMANA que antecede a visita T0

Instruir o voluntário que nenhuma medicação concomitante deve ser usada durante o período de estudo do consumo de café.

O investigador deverá fornecer ao paciente do estudo um telefone de contato no qual o mesmo possa utilizar no caso de intercorrências clínicas e reações adversas.

Protocolo SDC 2500/04/0120	NI 01 N° do Centro N° do paciente Iniciais do paciente:	Visita ____ Cronograma _ A ou _ B
Rubrica do Investigador:		Data: / /

Eventos Adversos
<p>Ocorreu algum evento adverso desde a última visita?</p> <p> ☐ Não ☐ Sim, especificar no formulário de eventos adversos </p>

Medicação Concomitante
<p>O paciente ingeriu, desde a última visita, alguma medicação durante o estudo?</p> <p> ☐ Não ☐ Sim, especificar no formulário de medicação concomitante </p>

SINAIS VITAIS	
Pressão arterial x mmHg	Frequência cardíaca: bat/min

MAPA		
Cargas pressóricas	PRESSÃO SISTÓLICA (%)	PRESSÃO DIASTÓLICA (%)
MÉDIA		
24 horas		
Vigília		
Sono		

Descenso pressórico noturno (%) (Assinale apenas 1 das opções abaixo)		
☐ Presente	☐ Ausente	☐ Atenuado

Presença de hipotensão arterial?	
☐ Não	☐ Sim

Anexo 3 - Registro alimentar de três dias

Nome: _____

Instruções para preenchimento

Peço que você registre **todos** os alimentos e bebidas consumidos durante o dia e a noite em **2 dias de semana e 1 de final de semana** (Exemplo: quinta-feira, sexta-feira e sábado ou domingo, segunda-feira e terça-feira). Este registro deverá ser trazido ao Instituto do Coração (InCor) em sua próxima consulta.

Por favor, mantenha este registro com você durante todo o tempo dos dias em que estiver fazendo as anotações e o utilize para registrar todos os alimentos e bebidas que você consumir durante todo o dia e a noite.

Pedimos que você forneça o máximo possível de informações, pois isso possibilitará maior precisão na avaliação de sua dieta (Exemplo de como preencher informações completas: 1 lata de guaraná diet, 1 fatia de pão integral, 1 copo de requeijão de suco de abacaxi com açúcar, 1 xícara de leite desnatado com café solúvel e 1 colher de sopa de açúcar, 1 fatia fina de queijo branco, 1 bife médio grelhado, 10 unidades de batata frita, etc.).

Sempre que possível utilize pesos, medidas e marcas que constam nas embalagens dos alimentos ou bebidas para indicar a quantidade de alimento/ bebida que você consumiu. No caso de alimentos ou bebidas preparados em casa, use medidas como colher de sopa, colher de chá, colher de café, concha, escumadeira, colher de arroz, xícara de chá, xícara de café, copo americano, copo de requeijão, prato raso, prato fundo, prato de sobremesa, pires, etc.

Por favor, não altere seu consumo usual de alimentos ou bebidas a fim de que o registro represente a sua dieta habitual.

Se o espaço não for suficiente para suas anotações, você poderá utilizar folhas extras e entregá-las junto com o registro.

Caso você tenha alguma dúvida ou necessite de ajuda para o preenchimento do registro diário, por favor, ligue para mim: Telma Faraldo (Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública da USP: (11) 30617748; celular: (11) 64812584. Estou a sua inteira disposição.

Muito obrigada pelas informações.

Dia da semana: _____**Data:** ____/____/____

Hora	Descrição do alimento ou bebida	Quantidade

Fonte: Fisberg et al. (152)

Anexo 4 - Orientação nutricional para o período de *washout*

Instituto do Coração

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Alimentos que devem ser evitados:

Bebidas: Café, Cappuccino, Nescafé, Achocolatados, Chocolate em pó, Chá mate, Chá verde, Chá preto, Chá de canela, Chás industrializados (Ice tea, mate, verde), Chimarrão.

Bebidas energéticas e/ou alcoólicas: Red Bull, Flash Power, Cerveja, Vinho, Bebidas destiladas.

Refrigerantes à base de cola ou guaraná: Coca-cola, Coca-cola light, Coca-cola zero, Pepsi, Pepsi light, Dolly cola, guaraná, guaraná diet.

Doces: Balas de chocolate, de café ou caramelo, Chocolates em barra, Bolo de chocolate ou café, Biscoitos de chocolate ou café, Croissant de chocolate, Brigadeiro, Milk - shake de chocolate ou café, Sorvete de chocolate ou café, Frapê de chocolate ou café.

Preparações e produtos que contenham chocolate e café em sua receita.

Diminuir o consumo desses alimentos gradualmente por 2 semanas, e à partir daí retirá-los da dieta habitual.

Alimentos que podem ser consumidos:

Bebidas: Leites, Iogurtes, Chá de erva doce, Chá de camomila, Chá de maçã e Chá com frutas.

Refrigerantes: Água tônica, Água com gás, Fanta laranja, Fanta uva, Sprite ou H2OH.

Doces: Goiabada, Marmelada, Bolos e bolachas sem café e chocolate, Frutas em calda, Balas de frutas.

Deve-se ler sempre a embalagem do produto para se certificar a ausência de cafeína ou chocolate na elaboração do produto.

Anexo 5 - Registro do estudo

[Home](#) | [Logout](#) | [Contact us](#) | [Feedback](#)

[Register Trial](#) | [Trial Search](#) | [View/Edit Personal Details](#) | [FAQ](#)

Trial Details

indicate updates made to monitored data item(s) since trial registration. These data item(s) are monitored to ensure they comply with the WHO / journal editors standards.

[View Trial at Registration](#)
[View History](#)

Request Number:	320867
ACTR Number:	ACTRN12609001064291
Trial Status:	Registered
Date Submitted:	1/12/2009
Date Registered:	11/12/2009

Page 1

Public title:	Effect of filtered coffee intake in healthy subjects.
ANZCTR registration title:	Effect of filtered coffee intake on biomarkers of the oxidative stress and of the inflammation in healthy volunteers
Secondary ID:	<div>None</div> <div> <div></div> <div></div> </div>
UTN:	U1111-1112-6149

Anexo 6 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

OF.COEP/115/09

PROTOCOLO	1974
PROJETO DE PESQUISA	ESTUDO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE E DOS EFEITOS DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ SOBRE O METABOLISMO GLICO-LIPÍDICO E PRESSÃO ARTERIAL
PESQUISADOR(A)	Telma Angelina Faraldo Corrêa
ÁREA TEMÁTICA	Grupo III

São Paulo, 24 Abril de 2009.

Prezado(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – COEP *analisou*, em sua 3.ª/09 Sessão Ordinária, realizada em 17/04/2009, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – CNS e suas complementares, o protocolo de pesquisa acima intitulado e o considera **APROVADO**.

Cabe lembrar que conforme Resolução CN /196/96, são deveres do (a) pesquisador (a):

1. Comunicar, de imediato, qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), para dar continuidade à pesquisa;
2. Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP, no caso eventual auditoria;
3. Comunicar, formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto;
4. Elaborar e apresentar relatórios parciais e finais;
5. Justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Cláudio Leone

Professor Associado

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP

Ilm.ª Sr.ª

Prof.ª Assoc. Elizabeth Aparecida F. da Silva Torres
Departamento de Nutrição
Faculdade de Saúde Pública

Anexo 7 - Manuscrito 1

Medium Light and Medium Roast Paper-Filtered Coffee Increased Antioxidant Capacity in Healthy Volunteers: Results of a Randomized Trial

Abbreviations

BHT	Butylated hydroxytoluene
CAT	Catalase
CGA	Chlorogenic acids
CQA	Caffeoylquinic acids
CQL	Caffeoylquinic lactone
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl-hydrate
FQA	Feruloylquinic acids
GPx	Glutathione peroxidase
LDL	Low density lipoprotein
MLR	Medium light roast
MR	Medium roast
MRPs	Maillard reaction products
8- <i>epi</i> -PGF2 α	8- <i>epi</i> -prostaglandin F2 α
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
oxLDL	Oxidized low density lipoprotein
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
TAS	Total antioxidant status

Abstract We compared the effects of medium light roast (MLR) and medium roast (MR) paper-filtered coffee on antioxidant capacity and lipid peroxidation in healthy volunteers. In a randomized crossover study, 20 volunteers consumed 482 ± 61 mL/day of MLR or MR for 4 weeks. Plasma total antioxidant status (TAS), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), oxidized LDL and 8-epi-prostaglandin F₂ α , erythrocyte superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT) activity were measured at baseline and after the interventions. MLR had higher chlorogenic acids - CGA (334 mg/150 mL) and less caffeine (231 mg/150 mL) than MR had (210 and 244 mg/150 mL, respectively). MLR also had fewer Maillard reaction products (MRP) than MR had. Compared with baseline, subjects had an increase of 21% and 26% in TAS, 13% and 13% in CAT, 52% and 75% in SOD, and 62% and 49% in GPx after MLR and MR consumption ($P < 0.001$), respectively. ORAC increased after MLR ($P = 0.004$). No significant alteration in lipid peroxidation biomarkers was observed. Both coffees had antioxidant effects. Although MLR contained more CGAs, there were similar antioxidant effects between the treatments. MRP may have contributed as an antioxidant. These effects may be important in protecting biological systems and reducing the risk of diseases related to oxidative stress.

Keywords: Antioxidant enzymes - Antioxidant capacity - Chlorogenic acid - Coffee- Lipid peroxidation - Maillard reaction

Introduction

Coffee is widely consumed worldwide and contributes to the total antioxidant ingestion in several countries [1]. The roasting process leads to intense changes in coffee's chemical composition, which includes thermal degradation of natural chlorogenic acids (CGA) and formation of the Maillard reaction products (MRP) with antioxidant activity [2]. A previous study reported that the antioxidant activity of coffee is more dependent on the roasting techniques than on the brewing methods and the source of the coffee beans [3]. Some recent studies [4-6] have reported on the effect of different coffee roasts on antioxidative potential in vitro. However, so far it has not been determined which roast degree creates the greatest antioxidant capacity.

Human epidemiological studies have indicated that moderate consumption of coffee is associated with a lower incidence of heart disease, type 2 diabetes, hypertension, and other chronic diseases related to reactive oxygen species (ROS) [7]. In addition, in vitro cell studies and animal experiments have consistently shown that antioxidants in coffee may reduce low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) susceptibility to oxidation and scavenging ROS [6,8-10]. Gordon and Wishart [9] found that CGA increased LDL-c resistance to oxidation in a concentration-dependent manner. The authors indicate that a small concentration of CGA could bind to LDL-c and contribute to the inhibition of oxidation. Furthermore, an in vitro study [10] showed that MRPs were incorporated into LDL and protected them against oxidation.

We raised the hypothesis that the effects of antioxidants in coffee differ among the different degrees of roasting. We tested whether paper-filtered coffees with different degrees of roasting (medium light and medium roast) have different antioxidant

properties by comparing their effects on antioxidant activity and lipid peroxidation biomarkers in healthy volunteers.

Materials and Methods

Subjects

Healthy volunteers were recruited and provided informed consent. The study was approved by the Institutional Review Board of the School of Public Health, University of São Paulo (São Paulo, Brazil) and registered on Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ACTRN12609001064291).

Potential participants were screened for good health by medical history questionnaire, physical examination, and standardized blood tests, including a complete blood cell count with leukocyte differential, clinical chemistry panel, and lipid profile. Eligibility criteria were age 20-65 years, healthy, plasma cholesterol <240 mg/dL, blood glucose <100 mg/dL, nonsmoker or former smoker (more than 2 years), alcohol consumption <1 time/week, absence of chronic illnesses, no use of any medication or supplements with antioxidative or lipid-lowering properties.

Two subjects dropped out during the washout period. One could not attend the meetings, and one consumed coffee. Twenty healthy subjects (14 women) were evaluated.

Study Design

This randomized, crossover, clinical trial lasted 8 weeks. After a 1-week run-in, subjects consumed medium light (MLR) or medium roast (MR) paper-filtered coffee for

4 weeks and then switched to the other roast for an additional 4 weeks (Figure 1. Online Resource 1). A computer-generated list of random numbers was used for allocation of the participants.

Subjects were asked to make no other changes to their diets or lifestyle during the study. We asked about their physical activity in the baseline interview and after each 4-week intervention period. A 3-day food diary (2 days during the week and 1 on the weekend) was collected before baseline and during each intervention period to control for possible confounding factors and to check compliance with the dietary instructions. Nutrient intake was calculated using the computer-based nutrient calculation program Avanutri 4.0.

Weight, height, abdominal circumference, and body fat were measured after the run-in period and after each intervention. Body mass index was calculated as weight (kg) divided by height (m^2). Body fat percentage was measured by bipolar impedance on a portable electronic scale (Plenna, São Paulo, Brazil).

At the end of each intervention period, venous blood samples were taken after a 12-hour overnight fast and centrifuged for plasma separation. For lipid peroxidation assays, 10 μ L of BHT (butylated hydroxytoluene) in 5 mg/mL ethanol was added per 1 mL of plasma. Erythrocyte sediment was washed 4 times with 9 g/L NaCl with centrifugation between washes. Plasma and erythrocyte samples were stored at -80 °C until analyses.

Coffee Samples and Brew Preparations

Two commercially available blends (80% *Coffea arabica* L. cv. Bourbon and 20% *C. canephora* cv. Robusta) of caffeinated, roasted, ground coffee were used in the study. Both coffees were cultivated in the same geographic region. They were vacuum packed in 500 g aluminized bags, and were provided by the same manufacturer. Packages were kept at 4°C (refrigerator) and in the dark to preserve coffee antioxidants during the analyses. A study conducted in our laboratory found that there was not significant loss of phenolic compounds in commercial coffee samples stored at 4°C for up to 2 months (unpublished data). Roasting degree classification was done according to “Roast Color Classification System” (Agtron/ SCAA, Reno, NV, 1995).

Coffee was distributed to participants in 500 g packages at the beginning of the each intervention. Subjects were instructed to prepare the brew in the household coffee maker filtering the coffee (15 g per one 150 mL cup) through the paper filters, and consume the total daily amount in 3 or 4 separate cups without a fixed schedule.

Determination of Antioxidants in MLR and MR Coffee Brews

All analyses were performed immediately after coffee preparation. We prepared the coffee beverages as instructed to the subjects. Phenolic compounds and caffeine were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detector (DAD) and mass spectrometer [11]. Total phenolic content was also estimated using the Folin-Ciocalteu method [12]. A 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) calibration curve was used. The MRP content was estimated by the browning indices at 420 nm [13]. Total antioxidant capacity (TAC) was measured by DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-

hydrazyl-hydrate) scavenging capacity [14] and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) [15] assays.

Antioxidant Characterization in Subjects

Plasma TAC was determined using a commercial kit (total antioxidant status - TAS, Randox Labs, Crumlin, UK) and by ORAC [15].

To express the enzyme activities as units per gram hemoglobin (U/g Hb), Hb concentration was measured by the Drabkin method [16]. Superoxide dismutase (SOD) activity was determined with the Ransod SD 125 kit (Randox Labs, Crumlin, UK), glutathione peroxidase (GPx) activity with the Ransel RS 504 kit (Randox Labs, Crumlin, UK) and catalase (CAT) activity according to Aebi [17].

Plasma Lipid Peroxidation Biomarkers

Oxidized LDL (oxLDL) analysis was performed according to the manufacturer's protocol using Oxidized LDL ELISA kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Total (free and esterified) F₂-isoprostanes were isolated using an F₂-isoprostane affinity column (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). The 8-*epi*-prostaglandin F₂ α (8-*epi*-PGF₂ α) concentration was measured according to the manufacturer's protocol by a specific enzyme immunoassay (EIA) kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

Statistical Analysis

Data are reported as mean $\pm$ standard deviation. Antioxidant content and TAC of the 2 types of roasted coffees were compared by *t* test for independent samples. Differences in human variables were analyzed by repeated-measures analysis of variance for comparisons of MLR coffee intake with MR and of each roast with the baseline. Evaluation of the 2 groups' mean profiles was carried out to measure the effects of the MLR and MR order of consumption and the potential carryover effect. Statistical analyses were performed using SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A two-tailed $P < 0.05$ was considered significant.

Results and Discussion

Subjects

Twenty habitual coffee drinkers (49 ± 9 years, range 37-63) were evaluated. Most subjects were female (70%), overweight (76%), and sedentary (physical activity less than 3 hours/week) (75%). Their baseline characteristics are summarized in Table I (Online Resource 2).

After the run-in period, participants were randomly assigned to 1 of the 2 interventions (MLR or MR). During the first 4-week intervention period, 45% of the participants (55.6% women) ingested MLR coffee and 55% (81.8% women) MR coffee. In the next 4-week period, they switched to the opposite roasted coffee. Coffee consumption was 482 ± 61 mL throughout the study.

Self-reported diets showed that none of the subjects consumed a significant quantity of polyphenol-rich foods other than coffee during the study, and the nutritional

intake was similar before and after each intervention period in all subjects ($P>0.05$). In addition, we did not find any significant differences in physical activity and body composition throughout the study (data not shown).

Antioxidant Characterization of Coffee Brews

Five CGA (4 caffeoylquinic acids - CQA isomers and 1 feruloylquinic acid - FQA isomer) and 2 caffeoylquinic lactones (CQL) were identified in the MLR and MR coffees. Caffeic, ferulic, and *p*-coumaric acids were not identified in free form. Total phenolic content, CGA, caffeine, and MRP in MLR and MR coffees are presented in **Table 1**. A 150 mL cup of coffee prepared with either MLR or MR contained 334 mg and 210 mg of total CGA, respectively. According to the *t* test for independent samples, CGA were statistically lower and MRP was higher ($P<0.001$) with the increased degree of roasting, confirming the influence of the roasting process on the chemical composition of coffee beans. Similar results were obtained in another study [18].

Caffeine consumption was 231 mg/cup of MLR and 244 mg/cup of MR ($P=0.003$). Although caffeine's antioxidant properties have been described, it is unlikely that this compound was primarily responsible for the antioxidant activity, because MR had no significant difference in ORAC compared with baseline. Another study showed that caffeine had no antioxidant activity at concentrations up to 570 times those found in our study [19]. A recent study compared the ORAC values of decaffeinated and regular coffees and concluded that caffeine had little or no direct antioxidant activity [8].

Comparing the antioxidant activity of the 2 brewed coffees, we observed that there were no significant differences in DPPH scavenging activity and ORAC between the MLR and MR coffees (data not shown). Possibly, MRP balanced the thermal loss of

naturally occurring phenolic compounds. Consistent with our results, Bakuradze et al [18] did not observe a significant difference in ORAC between the MLR and MR extracts.

Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation in the Subjects

Table 2 shows the results of antioxidant activity and lipid peroxidation.

Compared with baseline, there was a 21% increase in TAS and 12% in ORAC after MLR coffee intake. After consumption of MR, we observed a 26% increase in TAS and a 12% increase in ORAC.

Erythrocyte antioxidant enzyme activity increased significantly after consumption of both types of coffee. In MLR and MR, SOD activity increased 52% and 75%, and GPx activity 62% and 49%, respectively. CAT activity increased 13% after both intervention periods. We did not observe a significant difference in antioxidant effects between the 2 intervention periods. Although about 30% of melanoidins (the most abundant compounds of Maillard reaction) are absorbed in the human body [10,20], these compounds may have contributed as antioxidants, which explains the similar antioxidant effects between the 2 intervention periods.

We observed a significant increase in plasma TAC and in erythrocyte antioxidant enzyme activities after both MLR and MR intake. Plasma TAC is the sum of endogenous and exogenous antioxidants, as well as the synergistic effects that occur among them [21]. Because there were no changes in dietary composition during the study, we suggest that coffee antioxidants may have contributed to these effects. Other studies [19,22-24] support our findings that coffee antioxidants contribute to the antioxidant effect both in animals and humans. Our data suggest that the antioxidant

effect of coffee may be important in protecting biological systems against oxidants and, consequently, reducing the risk of chronic diseases related to ROS.

Antioxidant enzymes are the first line of defense against oxidative stress. The intracellular antioxidant enzyme activity protects cells against superoxide radical anions and peroxides [24].

There are some hypotheses for the increase in antioxidant enzyme activity. An increase in SOD activity may be caused by an increased formation of superoxide radical anions, whereas an increase in GPx and CAT activity may be due to high concentrations of peroxides. The increased intracellular ROS production activates the Nrf2/antioxidant response elements (ARE) pathway, which regulates the expression of genes encoding for antioxidant enzymes. This hypothesis needs further investigation since TAC concentration increased and lipid peroxidation biomarkers did not change. The ingested CGA may regenerate the endogenous α -tocopherol, and consequently decrease the ROS concentration and restore the antioxidant enzyme concentration; coffee GCA and N-methyl pyridinium, a compound formed from trigonelline during the roasting process, may induce antioxidant enzymes in erythrocytes, because they are a strong inducer of ARE-dependent phase II gene expression in vitro [4,22,25]; coffee cafestol and kahweol, as well as ROS, are related to the activation of Nrf2 [25].

Although both MLR and MR coffee had increased TAC and antioxidant enzyme activities, there were no significant changes in plasmatic concentration of 8-*epi*-PGF2 α and oxLDL. Possibly, the intervention time and/or the amount of coffee consumed were not sufficient to promote changes in these parameters. A study that compared the consumption of 0, 450, and 900 mL of filtered coffee for 3 weeks in healthy subjects also did not observe significant changes in plasma 8-*epi*-PGF2 α concentration [23].

Kempf et al [26] verified a decrease in these concentrations after a daily intake of 1200 mL of filtered coffee for 1 month, twice the amount consumed in our study. A decrease in the 8-*epi*-PGF2 α concentration was also observed by Hoelzl et al [27], albeit when healthy subjects ingested 800 mL/day of instant coffee, containing around 300 mg CGA, for 5 days. However 8-*epi*-PGF2 α concentration was measured from urine, where it is greater than in plasma. Relative to oxLDL, recent studies evaluated the consumption of 800 mL/day of instant [27] and filtered coffee [25] and also did not observe a significant change in this biomarker.

Lipid peroxidation is the primary oxidation process that contributes to cardiovascular disease. Therefore, we focused on lipid peroxidation biomarkers.

Only one study has compared the effects of 2 roasts of coffee on antioxidant activity and lipid peroxidation in healthy subjects [22]. However, the degree of roasting was not the same, and the lipid peroxidation biomarker (malonaldehyde) evaluated was less specific than the one used in our study [28,29].

Our study has 2 limitations. First, our study comprised a small sample size, which may be explained by its considerable participation period (8 weeks) and the large coffee intake. Finally, the absence of a washout period between the interventions was a potential limitation. However, the statistical analysis showed that there was no carryover effect.

Both coffee roasts showed antioxidant effects in the subjects and did not change lipid peroxidation biomarkers. Although MLR contained more CGAs, there were similar antioxidant effects between the 2 treatments. Because coffee is a much-consumed beverage, the study of its antioxidant effects is of great relevance. More

clinical trials comparing different coffee roasts are needed to assess which are the compounds that contribute to its antioxidant effects.

Acknowledgments Authors thank the volunteers for their participation, FAPESP for financial support (grant 2009/05792-7) and a PhD fellowship to TAFC (Process 2008/10933-6), and Melitta do Brasil for providing the roasted ground coffees and paper filters.

References

1. Ranheim T, Halvorsen B (2005) Coffee consumption and human health - beneficial or detrimental? - Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Mol Nutr Food Res* 49:274-284
2. Verzelloni E, Tagliazucchi D, Del Rio D, Calani L, Conte A (2011) Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. *Food Chem* 124:1430-1435
3. Sacchetti G, Di Mattia C, Pittia P, Mastrocola D (2009) Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J Food Engin* 90:74-80
4. Boettler U, Volz N, Pahlke G, Teller N, Kotyczka C, Somoza V, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I, Lang R (2011) Coffees rich in chlorogenic acid or N-methylpyridinium induce chemopreventive phase II enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res* 55:798-802
5. Hecimovic I, Belscak-Cvitanovic A, Horzic D, Komes D (2011) Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem* 129:991-1000
6. Duarte SMS, Abreu CMP, Menezes HC, Santos MH, Gouvêa CMCP (2005) Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciênc Tecnol Aliment* 25:387-393

7. Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J (2007) Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol Res* 55:187-198
8. Chu YF, Brown PH, Lyle BJ, Chen Y, Black RM, Williams CE, Lin YC, Hsu CW, Cheng IH (2009) Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *J Agric Food Chem* 57:9801-9808
9. Gordon MH, Wishart K (2010) Effects of chlorogenic acid and bovine serum albumin on the oxidative stability of low density lipoproteins in vitro. *J Agric Food Chem* 58:5828-5833
10. Gómez-Ruiz J, Ames J, Leake D (2008) Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *Eur Food Res Technol* 227:1017-1024
11. Jaiswal R, Patras MA, Eravuchira PJ, Kuhnert N (2010) Profile and characterization of the chlorogenic acids in green robusta coffee beans by LC-MSn: identification of seven new classes of compounds. *J Agric Food Chem* 58:8722-8737
12. Singleton VL, Rossi Jr JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
13. Yen WJ, Wang BS, Chang LW, Pin-Der D (2005) Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J Agric Food Chem* 53:2658-2663
14. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology* 28:25-30
15. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49:4619-4626
16. Bauer JD, Ackermann PG, Toro G (1974) *Clinical laboratories methods*. Mosby Company, London
17. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzimol* 105:121-126
18. Bakuradze T, Lang R, Hofmann T, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C (2010) Antioxidant effectiveness of coffee extracts

- and selected constituents in cell free systems and human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* 54:1734–1743
19. Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C (2002) Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem* 50:6211–6216
 20. Morales FJ, Somoza V, Fogliano V (2010) Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids* 1–13
 21. Perez-Jimenez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Diaz-Rubio ME, Garcia-Diz L, Goni I, Saura-Calixto F (2009) Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods Hum Nutr* 64:102–107
 22. Kotyczka C, Boettler U, Lang R, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I, Hofmann T, Marko D, Somoza V (2011) Dark roast coffee is more effective than light roast coffee in reducing body weight, and in restoring red blood cell vitamin E and glutathione concentrations in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res* 55:1582–1586
 23. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Alfthan G, Virtanen JK, Rissanen TH, Happonen P, Nyyssonen K, Kaikkonen J, Salonen R, Salonen JT (2005) The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. *Free Radic Biol Med* 38:527–534
 24. Viana ALM, Fonseca MDM, Meireles ELJ, Duarte SMS, Rodrigues MR, Paula FBA (2012) Effects of the consumption of caffeinated and decaffeinated instant coffee beverages on oxidative stress induced by strenuous exercise in rats. *Plant Foods Hum Nutr* 67:82–87
 25. Misik M, Hoelzl C, Wagner KH, Cavin C, Moser B, Kundi M, Simic T, Elbling L, Kager N, Ferk F, Ehrlich V, Nersesyan A, Dusinska M, Schilter B, Knasmüller S (2010) Impact of paper filtered coffee on oxidative DNA-damage: Results of a clinical trial. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 692:42–48
 26. Kempf K, Herder C, Erlund I, Kolb H, Martin S, Carstensen M, Koenig W, Sundvall J, Bidel S, Kuha S, Tuomilehto J (2010) Effects of coffee consumption

- on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. *Am J Clin Nutr* 91:950-957
27. Hoelzl C, Knasmüller S, Wagner KH, Elbling L, Huber W, Kager N, Ferk F, Ehrlich V, Nersesyan A, Neubauer O, Desmarchelier A, Marin-Kuan M, Delatour T, Verguet C, Bezencon C, Besson A, Grathwohl D, Simic T, Kundi M, Schilter B, Cavin C (2010) Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules. *Mol Nutr Food Res* 54:1722-1733
 28. Roberts LJ, Morrow JD (2000) Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 28:505-513
 29. Gutteridge JMC, Halliwell B (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-135.

Table 1. Total phenolic, 5-CQA, CGA, and caffeine content in coffee according to the coffee beans' degree of roasting.

	Light medium roast	Medium roast
Total phenolic content (mg 5-CQAE/mL)	11.09 $\pm$ 0.29 ^a	10.53 $\pm$ 0.56 ^a
5-CQA (mg/mL)	0.85 $\pm$ 0.01 ^b	0.48 $\pm$ 0.00 ^a
Total CQA (mg 5-CQAE/mL)	1.81 $\pm$ 0.01 ^b	1.08 $\pm$ 0.01 ^a
Total FQA (mg 5-CQAE/mL)	0.17 $\pm$ 0.00 ^b	0.16 $\pm$ 0.00 ^a
Total CGA (mg 5-CQAE/mL)	1.98 $\pm$ 0.02 ^b	1.24 $\pm$ 0.01 ^a
Total CQL (mg 5-CQAE/mL)	0.25 $\pm$ 0.00 ^b	0.16 $\pm$ 0.00 ^a
Caffeine (mg/mL)	1.54 $\pm$ 0.01 ^a	1.63 $\pm$ 0.02 ^b
MRPs (absorbance 420 nm)	0.38 $\pm$ 0.00 ^a	0.50 $\pm$ 0.00 ^b

Data are reported as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Different letters on the same line indicate significant difference ($P < 0.05$), by t test for independent samples.

5-CQAE = 5-caffeoylquinic acid equivalents; CQA = caffeoylquinic acid; FQA = feruloylquinic acid; CGA= chlorogenic acid; CQL = caffeoylquinic lactone.

Table 2. Plasma total antioxidant capacity, erythrocyte antioxidant enzyme activities, and plasma lipid peroxidation biomarkers at baseline and after ingestion of light medium roast and medium roast brews.

	Baseline	Light medium	Medium	<i>P</i>
TAS (mmol/L)	0.97 ± 0.30 ^a	1.17 ± 0.28 ^b	1.22 ± 0.29 ^b	0.001
ORAC (μmol TE/mL)	7.68 ± 1.40 ^a	8.57 ± 1.50 ^b	8.59 ± 2.26 ^{ab}	0.004
SOD (U/g Hb)	1569 ± 526 ^a	2386 ± 703 ^b	2743 ± 500 ^b	<0.001
GPx (U/g Hb)	18.18 ± 6.16 ^a	29.43 ± 7.71 ^b	27.16 ± 7.80 ^b	<0.001
CAT (U/g Hb)	1387 ± 136 ^a	1565 ± 146 ^b	1561 ± 138 ^b	<0.001
8- <i>epi</i> -PGF2α (pg/mL)	212.01 ± 92.67 ^a	200.24 ± 84.20 ^a	206.40 ± 96.92 ^a	>0.05
oxLDL (U/L)	56.83 ± 28.44 ^a	53.87 ± 36.09 ^a	48.10 ± 32.92 ^a	> 0.05

Data expressed as mean ± standard deviation (*n* = 20). Different letters in the same line

indicate significant difference (ANOVA for repeated measures); *P*: significance levels

TAS: Total antioxidant status; ORAC: Oxygen radical absorbance capacity; SOD:

Superoxide dismutase; GPx: Glutathione peroxidase; CAT: Catalase; 8-*epi*-PGF2α: 8-

epi-prostaglandin F2α; oxLDL: oxidized LDL.

Anexo 8 - Manuscrito 2

Paper-filtered coffee increases cholesterol and inflammation biomarkers independent of roasting degree: a clinical trial

Running head: Paper-filtered coffee and cardiovascular risk factors

Telma A.F. Corrêa, M.S.^a, Marcelo M. Rogero, Ph.D.^a, Bruno M. Miotto, B.D.^b, Daniela Tarasoutchi, B.S.^b, Vera L. Tuda, B.S.^b, Luiz A.M. César, Ph.D.^b, Elizabeth A.F.S. Torres, Ph.D.^{a,*}

^a Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^b The Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil.

Role of each author in the work: TAFC contributed to the study design, data collection, analysis and interpretation, and wrote the manuscript; MMR contributed to study design and data analysis and interpretation; BMM, DT, and VLT contributed to the study design and data collection; LAMC and EAFST contributed to study design, and data analysis and interpretation.

Entire manuscript: 3383 words

1 Figure and 2 Tables

Corresponding author: Torres EAFS. Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, CEP 01246-904, São Paulo, Brazil.

Phone: 55-11-3061-7857. Fax: 55- 11- 3061-7130. E-mail: eatorres@usp.br

ABSTRACT

Objective: To compare the effects of medium light roast (MLR) and medium roast (MR) paper-filtered coffee on cardiovascular risk factors in healthy volunteers.

Methods: This randomized crossover trial compared the effects of consuming 3 or 4 cups (150 mL)/day of MLR or MR coffee for 4 weeks in 20 healthy volunteers. Plasma lipids, lipoprotein(a) – Lp(a), total homocysteine, and endothelial dysfunction-related inflammation biomarkers, serum glycemic biomarkers, and blood pressure were measured at baseline and after each intervention.

Results: Both roasts increased plasma total cholesterol, LDL-cholesterol, and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) concentrations (10%, 12%, and 18% for MLR; 12%, 14%, and 14% for MR, respectively) ($P<0.05$). MR also increased HDL-cholesterol concentration by 7% ($P=0.003$). Plasma fibrinogen concentration increased 8% after MR intake ($P=0.01$), and soluble E-selectin increased 12% after MLR intake ($P=0.02$). No changes were observed for Lp(a), total homocysteine, glycemic biomarkers, and blood pressure.

Conclusion: Moderate paper-filtered coffee consumption may have undesirable impact on plasma cholesterol and inflammation biomarkers in healthy subjects regardless of its antioxidant content.

Keywords: Antioxidants; Cardiovascular disease; Cholesterol; Coffee; Endothelial dysfunction; Inflammation; Risk factors

Introduction

Dyslipidemia, hypertension, diabetes or glucose intolerance, and obesity are associated with a marked increase in vascular reactive oxygen species (ROS) production, which play important roles in atherosclerosis, diabetes, and cardiovascular diseases (CVD). It should be highlighted that ROS are involved in endothelial dysfunction, monocyte migration, low density lipoprotein (LDL-c) oxidation, and vascular smooth muscle cell growth, as well as ROS induce the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) on the endothelial cell surface.

Coffee is widely consumed as a beverage worldwide; however its effect on cardiovascular risk is still controversial [1-3]. Roasted coffee contains naturally present antioxidants and others that are formed during the roasting process [4]. Chlorogenic acids (CGA) and caffeine have been extensively studied because they may play a role in the inhibition of lipid peroxidation, free radical scavenging, metal chelation, and anti-inflammatory activity. They may also reduce the risk of development and progression of atherosclerosis [5] and insulin resistance [6, 7], and they may decrease blood pressure [8, 9]. Coffee contains diterpenes, cafestol and kahweol, which have a cholesterol-raising effect. However, most of them are retained by the paper filter, which substantially reduces the cholesterol-raising effects potentially associated with coffee [10, 11].

Epidemiological studies have indicated that regular coffee consumption is associated with a lower risk of CVD [3, 12, 13]. However, the coffee compounds responsible for the suggestive protective effects are still unknown [1]. The data related to the effect of coffee on inflammation are conflicting, showing that coffee consumption by healthy subjects can be either directly [14], inversely [4], or not associated with proinflammatory biomarkers [15]. Therefore, we compared the effects of ingesting medium light roast (MLR) or medium roast

(MR) filtered coffee in plasma lipids, total homocysteine (tHcy), endothelial dysfunction-related inflammation biomarkers, glycemic biomarkers, and blood pressure in healthy volunteers.

Subjects and methods

Subjects

Twenty-two healthy and habitual coffee drinkers were recruited and gave informed consent. This study was approved by the School of Public Health of São Paulo University Review Board and registered as a clinical trial (ACTRN12609001064291). Eligibility criteria were age 20–65 years, plasma cholesterol <6.21 mmol/L, blood glucose <5.56 mmol/L, nonsmoker or former smoker (>2 years), alcohol consumption <1 time/day, absence of chronic diseases, and no use of regular medication. Two subjects declined participation, one could not attend the meetings, and one consumed coffee during the washout period. Twenty healthy subjects (14 women) were evaluated (figure 1).

Study design

This randomized, crossover clinical trial lasted 9 weeks. After a 1-week run-in, subjects consumed MLR or MR paper-filtered coffee for 4 weeks and then switched to the other roast for an additional 4 weeks.

Subjects were asked to make no changes in their diet or lifestyle. We questioned physical activity of the participants in the baseline interview and after each intervention period. A 3-day food diary (2 days during the week and 1 on the weekend) was collected before baseline and during each intervention to control for possible confounding factors and check for compliance with dietary instructions.

Coffee samples and beverage preparation

Two commercially available blends of caffeinated, roasted, ground coffee were used in the study. Roasting degree classification was done according to the “Roast Color Classification System” (Agtron/ SCAA, Reno, NV, 1995). Coffee was distributed to participants in 500 g packages at the beginning of each intervention period. Subjects were instructed on how to prepare the beverage (15 g of coffee/150 mL cup) in a household coffee maker by filtering through paper, and to consume the total daily amount in 3 or 4 separate cups without a fixed schedule.

Blood collection and biomarker assessment

At baseline, and at the end of each intervention, venous blood samples were taken after a 12-hour overnight fast and centrifuged for plasma separation. Plasma samples were stored at -80°C for inflammation biomarker analyses.

Plasma concentrations of total cholesterol, HDL-c, and triacylglycerol were measured by enzymatic assays on a Dimension RXL (Siemens Healthcare Diagnostics Deerfield, IL, USA). LDL-c was calculated according to the Friedewald formula [16]. Plasma lipoprotein(a) concentration was assessed by immunonephelometric assay on a BN II analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). Plasma tHcy concentration was measured by a chemiluminescence immunoassay on an Immulite 2000 Analyzer (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

Fasting serum glucose concentration was determined by a commercial kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). Blood glycated hemoglobin and fructosamine were measured by immunoturbidimetric and colorimetric assays, respectively. Fasting serum insulin concentration was determined by a chemiluminescence assay. These analyses were performed by use of an automated analyzer (Dimension RXL, Siemens Healthcare Diagnostics, Llanberis, Gwynedd, UK). Insulin resistance was estimated by homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) [17, 18].

Plasma fibrinogen concentrations were measured by the Clauss method [19] on a Destiny Max (MedLab) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) concentration by use of a high-sensitivity latex-enhanced immunonephelometric assay on BN II analyzer

(Siemens Diagnostics). Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), MCP-1, soluble E-selectin (sE-selectin), sVCAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), and tissue-type plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were quantified by bead-based multiplex Luminex xMAP technology assays (Millipore, Missouri, USA) on a Luminex 200 analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

Assessment of other measurements

Weight, height, abdominal circumference, and body fat were measured after the washout period and after each intervention. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m²). Body fat percentage was measured by bipolar impedance on a portable electronic scale (Plenna, São Paulo, Brazil).

Blood pressure was measured by ambulatory blood pressure monitoring, using a 90207 portable monitor (Spacelabs Healthcare, Washington, USA), scheduled for 6 measurements during the day (between 7:00 a.m. and 10:00 p.m.) and 3 at night (between 10:00 p.m. and 7:00 a.m.).

Statistical analysis

The results are expressed as means $\pm$ standard deviation. CGA and caffeine content of the two coffee beverages were compared by *t* test for independent samples. Differences in biomarker concentrations were analyzed by repeated-measures analysis of variance for comparisons of MLR coffee intake with MR and of each roast with the baseline. Evaluation of the two groups' mean profile was carried out to measure the effects of the MLR and MR order of consumption and possible carryover effect. All analyses were performed using SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A two-tailed $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Subjects

Twenty healthy subjects (49 ± 9 years, range 37-63) were evaluated. Table 1 shows their baseline characteristics. Most subjects were female (70%) and overweight (76%).

During the first 4-week intervention period, 45% of the participants (55.6% women) ingested MLR coffee and 55% (81.8% women) MR coffee. In the next 4-week period, they switched to the opposite roasted coffee. Coffee consumption was 482 ± 61 mL/day throughout the study. Coffee provided 334 mg of CGA/cup in MLR and 210 mg/cup in MR ($P<0.001$) and 231 mg of caffeine/cup in MLR and 244 mg/cup in MR ($P=0.003$). MLR provided more CGA and less caffeine and melanoidins ($P<0.001$) than MR.

Self-reported diets showed that none of the subjects consumed a significant amount of polyphenol-rich foods other than coffee during the study and the nutritional intake was similar before and after each intervention period for all subjects ($P>0.05$). In addition, we found no significant differences in physical activity, body composition, and blood pressure throughout the study (data not shown).

Cardiovascular risk biomarkers

Table 2 shows a significant increase in total cholesterol and LDL-c after intake of each coffee roast when compared to the baseline. Total cholesterol concentrations increased 0.46 mmol/L after MLR ($P<0.01$) and 0.59 mmol/L after MR ($P<0.001$). LDL-c increased 0.36 mmol/L and 0.44 mmol/L after MLR ($P<0.01$) and MR ($P<0.001$), respectively. HDL-c increased 0.09 mmol/L after MR intake ($P<0.01$). We observed no difference in total cholesterol and LDL-c between the two intervention periods. However, there was an increase of 0.04 mmol/L in HDL-c after MR intake in relation to MLR ($P=0.04$). Plasma triacylglycerols increased, but it was not significant.

No significant effect of the two coffee roasts was observed on plasma lipoprotein(a), and tHcy, and serum glycemic biomarkers (data not shown).

We observed an 8% increase in plasma fibrinogen concentration after MR intake ($P<0.01$) and 12% in sE-selectin after consumption of MLR ($P<0.05$). Fibrinogen increased

after MLR and sE-selectin increased after MR, but these were not significant. Fibrinogen concentration also increased 6.5% after MR in relation to MLR ($P=0.02$). Plasma sVCAM-1 increased 18% and 14% after MLR ($P<0.001$) and MR ($P<0.05$), respectively (Table 2). No significant changes were found for hs-CRP, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, sICAM-1, and tPAI-1.

Discussion

We observed an increase in HDL-c after MR consumption, which is of great relevance, as this particle has been recognized as an anti-atherogenic. Some proposed mechanisms for this protective action are: reverse cholesterol transport, inhibition of LDL-c oxidation, blood viscosity reduction, regulation of prostaglandins and thromboxane synthesis, activation of fibrinolysis, inhibition of adhesion molecules and monocytes to endothelium, and stimulation of nitric oxide release [20].

Total cholesterol and LDL-c concentrations increased after consumption of each coffee roast when compared to baseline. However, there was no significant change in these lipids between the coffee roasts, indicating that the roasting degree is not related to an increase in these lipid concentrations. Data on the effects of filtered coffee intake on plasma lipids are still limited and contradictory [21]. Increased plasma total cholesterol and LDL-c are more pronounced with unfiltered coffee, while paper-filtered coffee has been less frequently reported to raise these lipids [6]. It is possible that some remaining diterpenes caused an elevation in total cholesterol and LDL-c concentrations. Indeed, it has been shown that diterpenes are only partly removed by the paper filter [10, 11]. Previous studies [11, 22] found significant increases in total cholesterol and LDL-c, but not in HDL-c, after coffee consumption. A few studies found a positive association between filtered coffee consumption and an increase in HDL-c concentration [4, 23], as we did, which can counterbalance the deleterious effects of increased LDL-c.

We observed no significant change in glycemic biomarkers after the intervention periods. Another interventional trial [4] also observed no significant changes in these biomarkers after filtered coffee intake.

We observed a significant increase in plasma fibrinogen concentration after MR consumption. We also observed an increase in sE-selectin after MLR, and in sVCAM-1 after

intake of each coffee roast, which suggests an inflammatory effect related to coffee consumption.

Several studies suggest that ox-LDL stimulates the expression of adhesion molecules in endothelial cell surface [24]. However, in another study [25], we observed no significant changes in ox-LDL after consumption of both coffee roasts. Fibrinogen concentration and adhesion molecule expression are positively correlated with TNF- α , hs-CRP, BMI, blood pressure, and blood glucose [24, 26]; however these parameters did not change significantly in this study. To date, data on the relationship of coffee consumption and inflammation biomarkers are scarce and contrasting. One study found an increase [14] in inflammation biomarkers after coffee consumption for healthy subjects. Other studies have found no significant changes for the inflammation biomarkers evaluated in our study [4, 15]. Coffee components responsible for the increase of these biomarkers are still unknown [4].

We observed no significant difference in lipid profile and inflammation biomarkers between 4 and 8 weeks of coffee consumption when compared to the baseline. This finding suggests that the increase in lipids and inflammation biomarkers concentration is an acute effect of coffee that is unrelated to a potential accumulative effect of longer periods of coffee consumption.

Our study has some limitations. Firstly, our study comprised a small sample size, which may be explained by its considerable participation period (9 weeks) and the large coffee intake. The fact that roasting degrees were similar may also constitute a limitation but it should be noted that their antioxidant composition is different and that HDL and fibrinogen concentration increased only after MR intake and sE-selectin increased only after MLR intake. Lastly, the absence of a run-in period between the interventions was a potential limitation. However, the statistical analysis showed that there was no carryover effect.

As strengths, this is the first interventional trial to show an increase in inflammation biomarkers of healthy subjects after coffee consumption and to compare the effects of two different coffee roasts on inflammation. Previous studies of the effect of coffee on inflammation markers were generally observational or cross-sectional studies [14, 15]. One study was an interventional trial, but the amount of coffee consumed was 3 times higher than the amount used in our study and fewer proinflammatory markers were analyzed [4]. In addition, our study analyzed several cardiovascular risk biomarkers.

Moderate filtered coffee consumption has undesirable effects on cholesterol and inflammation biomarkers in healthy subjects, regardless of its antioxidant content. More interventional trials and the evaluation of other coffee components are needed to clarify its effects on cardiovascular risk factors and to identify the main players associated with these effects.

Acknowledgments

The a wish to thank the following volunteers for their participation, Dr. Geni Sampaio PhD for technical support, Julia Fukushima M.S. for statistical support; FAPESP for financial support (Process 2009/05792-7) and for the student fellowship of TAFC (Process 2008/10933-6); and Melitta for providing the roasted ground coffees and paper filters.

Author responsibilities: TAFC contributed to the study design, data collection, analysis and interpretation, and wrote the manuscript; MMR contributed to study design and data analysis and interpretation; VLT, DT, and BMM contributed to the study design and data collection; LAMC and EAFST contributed to study design, data analysis and interpretation. EAFST had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript and none of the authors have a conflict of interest.

References

- [1] Bohn SK, Ward NC, Hodgson JM, Croft KD. Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. *Food Funct.* 2012;3:575-91.
- [2] Mineharu Y, Koizumi A, Wada Y, Iso H, Watanabe Y, Date C, et al. Coffee, green tea, black tea and oolong tea consumption and risk of mortality from cardiovascular disease in Japanese men and women. *J Epidemiol Community Health.* 2011;65:230-40.
- [3] de Koning Gans JM, Uiterwaal CSPM, van der Schouw YT, Boer J, Grobbee DE, Verschuren WM, et al. Tea and coffee consumption and cardiovascular morbidity and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1665-71.
- [4] Kempf K, Herder C, Erlund I, Kolb H, Martin S, Carstensen M, et al. Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:950-7.
- [5] Butt MS, Sultan MT. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51:363-73.
- [6] Ranheim T, Halvorsen B. Coffee consumption and human health - beneficial or detrimental? - Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49:274-84.
- [7] Van Dieren S, Uiterwaal CSPM, Van der Schouw YT, van der A DL, Boer JMA, Spijkerman A, et al. Coffee and tea consumption and risk of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2009;52:2561-9.
- [8] Yamaguchi T, Chikama A, Mori K, Watanabe T, Shioya Y, Katsuragi Y, et al. Hydroxyhydroquinone-free coffee: A double-blind, randomized controlled dose-response study of blood pressure. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis.* 2008;18:408-14.
- [9] Medina-Remón A, Zamora-Ros R, Rotchés-Ribalta M, Andres-Lacueva C, Martínez-González MA, Covas MI, et al. Total polyphenol excretion and blood pressure in subjects at high cardiovascular risk. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis.* 2010;21:323-31.
- [10] Thelle DS, Strandhagen E. Coffee and disease: an overview with main emphasis on blood lipids and homocysteine. *Scand J Food Nutr.* 2005;49:50-61.

- [11] Strandhagen E, Thelle DS. Filtered coffee raises serum cholesterol: results from a controlled study. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57:1164-8.
- [12] Andersen LF, Jacobs DR, Carlsen MH, Blomhoff R. Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:1039-46.
- [13] Freedman ND, Park Y, Abnet CC, Hollenbeck AR, Sinha R. Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. *N Engl J Med.* 2012;366:1891-904.
- [14] Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chryschoou C, Stefanadis C. Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:862-7.
- [15] Lopez-Garcia E, van Dam RM, Qi L, Hu FB. Coffee consumption and markers of inflammation and endothelial dysfunction in healthy and diabetic women. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:888-93.
- [16] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499-502.
- [17] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28:412-19.
- [18] Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes care.* 2004;27:1487-95.
- [19] Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol.* 1957;17:237-46.
- [20] NCEP. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation.* 2002;106:3143-421.
- [21] Burke MF, Khera AV, Rader DJ. Polyphenols and cholesterol efflux is coffee the next red wine? *Circ Res.* 2010;106:627-9.
- [22] Jee SH, He J, Appel LJ, Whelton PK, Suh, II, Klag MJ. Coffee consumption and serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Am J Epidemiol.* 2001;153:353-62.

- [23] Fried RE, Levine DM, Kwiterovich PO, Diamond EL, Wilder LB, Moy TF, et al. The effect of filtered-coffee consumption on plasma lipid levels. *JAMA*. 1992;267:811-5.
- [24] Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2292-301.
- [25] Corrêa TAF, Monteiro MP, Mendes TM, Oliveira DM, Rogero MM, Benites CI, et al. Medium light and medium roast paper-filtered coffee increased antioxidant capacity in healthy volunteers: results of a randomized trial. *Plant Foods Hum Nutr*. In press 2012.
- [26] Kaptoge S, White IR, Thompson SG, Wood AM, Lewington S, Lowe GD, et al. Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: the fibrinogen studies collaboration. *Am J Epidemiol*. 2007;166:867-79.

Table 1. Baseline characteristics of the participants ($n = 20$)

Gender (male/female, n)	6/14
Age (years)	49.5 ± 8.9
Body mass index (kg/m^2)	27.0 ± 3.8
Body fat (male/female, %)	$29.1 \pm 3.0/ 37.5 \pm 4.2$
Abdominal circumference (male/female, cm)	$98.7 \pm 4.9/ 92.8 \pm 9.0$
Lipoprotein(a) (mg/dL)	21.6 ± 26.5
Total homocysteine ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	9.2 ± 3.0
Fasting glucose (mmol/L)	4.8 ± 0.6
Glycated hemoglobin (%)	5.5 ± 0.3
Fructosamine ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	226.6 ± 12.7
Fasting insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$)	3.6 ± 3.4
HOMA-IR	0.8 ± 0.8
24 hour blood pressure averages (mm Hg)	
Systolic	110.2 ± 9.7
Diastolic	70.5 ± 6.9
24 hour heart rate averages (beats/min)	77.2 ± 10.1
Habitual coffee consumption (mL/day)	307 ± 110
Energy intake (kcal/d)	1831 ± 535
Carbohydrate (% energy)	52.2 ± 9.2
Protein (% energy)	19.9 ± 6.3
Total fat (% energy)	27.8 ± 8.5
Cholesterol (mg/day)	157.3 ± 71.9
Family history of cardiovascular diseases (%)	30

Data expressed as mean $\pm$ standard deviation, numbers or %. HOMA-IR: homeostasis model assessment for insulin resistance

Table 2. Lipid profile and inflammation biomarkers at baseline and after intake of each roast of filtered coffee

Biomarkers	Baseline	Medium light	Medium
Lipids			
<i>Total cholesterol (mmol/L)</i>	4.8 ± 0.6	5.3 ± 0.9 ^a	5.4 ± 0.8 ^b
<i>HDL-cholesterol (mmol/L)</i>	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.2 ^{a,d}
<i>LDL-cholesterol (mmol/L)</i>	3.1 ± 0.5	3.4 ± 0.7 ^a	3.5 ± 0.7 ^b
<i>Triacilglycerols (mmol/L)</i>	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.6
Inflammation biomarkers			
Fibrinogen (mg/dL)	357.1 ± 48.3	362.3 ± 67.8	385.8 ± 67.7 ^{a,d}
sE-selectin (pg/mL)	33.6 ± 11.9	37.7 ± 14.8 ^c	34.4 ± 11.6
sVCAM-1 (pg/mL)	1049 ± 174	1235 ± 256 ^b	1191 ± 299 ^c
hs-CRP (mg/L)	2.2 ± 2.1	2.1 ± 2.0	2.6 ± 2.2
IL-1β (pg/mL)	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2
IL-6 (pg/mL)	1.2 ± 0.8	1.7 ± 2.6	1.3 ± 1.2
TNF-α (pg/mL)	2.8 ± 1.4	3.3 ± 2.4	2.9 ± 2.0
MCP-1 (pg/mL)	75.4 ± 19.3	79.6 ± 15.7	80.1 ± 17.9
sICAM-1 (pg/mL)	220.5 ± 62.5	243.1 ± 91.7	237.6 ± 85.9
tPAI-1 (pg/mL)	54.6 ± 20.3	53.8 ± 20.1	54.1 ± 21.4

Data expressed as means ± SD (n = 20). hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; IL-1β: Interleukin-1 beta; IL-6: Interleukin-6; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule-1; TNF-α: Tumor necrosis factor-alpha; tPAI-1: total plasminogen activator inhibitor-1.

^{a-c} Significantly different from baseline (analysis of variance of repeated measures): ^a*P*<0.01, ^b*P*<0.001, ^c*P*<0.05.

^d Significantly different from medium light roast (analysis of variance of repeated measures): ^d*P*<0.05

Anexo 9 - Primeira página do *curriculum lattes* da aluna

Telma Angelina Faraldo Corrêa
Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Telma Angelina Faraldo Corrêa
Nascimento 21/09/1980 - Botucatu/SP - Brasil
CPF 29036808847

Formação Acadêmica/Titulação

- 2009** Doutorado em Nutrição em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Comparação da capacidade antioxidante de torras de café e seus efeitos sobre fatores de risco cardiovascular em indivíduos saudáveis
Orientador: Elizabeth A F S Torres
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2005 - 2007** Mestrado em Alimentos e Nutrição.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Título: Aumento do comprimento e peso do intestino delgado, do peso do fígado e pâncreas de ratos devido à ingestão de feijão-comum cozido e de caseína acrescida de fibras dietéticas com teores crescentes e solubilidade similar a do feijão-comum., Ano de obtenção: 2007
Orientador: Admar Costa de Oliveira
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2000 - 2004** Graduação em Nutrição.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Jaguariúna - FAJ

Vínculo institucional

2007 - 2009 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor Assistente I , Carga horária: 2, Regime: Parcial

Anexo 10 - Primeira página do *curriculum lattes* da orientadora

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Concluiu o Doutorado em Ciência dos Alimentos (São Paulo, SP) pela Universidade de São Paulo, em 1988. Foi Visiting Scholar na MSU de 1986 a 1987, como bolsista Fulbright Commission. Professora Associada - desde 2000 na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Publicou 89 artigos em periódicos especializados e 126 trabalhos em anais de eventos. Possui 4 livros publicados, 1 processo, 1 software e 1 patente técnica além de outros 30 itens de produção técnica. Participou de 11 eventos no exterior e 78 no Brasil. Supervisionou 1 pós-doutor com bolsa da FAPESP e supervisiona um Jovem Pesquisador com auxílio e bolsa da FAPESP. Orientou 23 dissertações de Mestrado, 13 teses de Doutorado e co-orientou 1 tese de Doutorado, em complemento orientou 22 trabalhos de Iniciação Científica nas áreas de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nutrição e Saúde Coletiva. Vários AT foram treinados. Recebeu 6 Prêmios/Homenagens. Atua diretamente na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos com ênfase em quatro linhas de pesquisa: 1) Lipídios, ácidos graxos, colesterol, fitoesterol e seus produtos de oxidação. 2) Antioxidantes e substâncias bioativas. 3) Carnes, Aves e Pescados 4) Microssomos, Lipossomos e Sistemas Modelo. Em suas atividades profissionais, interagiu com 165 colaboradores em co-autorias de trabalhos científicos. Em seu CVLattes, os termos mais frequentes na contextualização da produção científica, tecnológica e artístico cultural, são: aulas ministradas, comissões, grupos de trabalho, valor nutricional, segurança alimentar, lipídios, qualidade higiênico sanitária, substitutos de gordura, alimentos funcionais e tecnologia de alimentos. Em 09/09/2010 apresentou fator H=8 na base SCOPUS.

Última atualização do currículo em 30/05/2012

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9804923403746874>

Dados pessoais

Nome	Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres
Nome em citações bibliográficas	TORRES, E. A. F. S.; Torres, Elizabeth Aparecida Ferraz Da Silva; Torres, Elizabeth A. F. S.
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Av. Dr. Arnaldo, 715 HNT Cerqueira César 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617857 Fax: (11) 30617130 URL da Homepage: www.fsp.usp.br/~eatorres/