

ACÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE CAFÉ VERDE EM BIOMARCADORES METABÓLICOS DE ANIMAIS, COM OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA

Thainara Queiroz Pereira, Manuella Domiciano Nascimento, Natália Alves de Souza Meneguelli, André dos Santos Carvalho, André Gustavo Vasconcelos Costa.

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Farmácia e Nutrição, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Alto Universitário, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, thainara.pereira@edu.ufes.br, manuella.nascimento@edu.ufes.br, natalia.a.souza@edu.ufes.br, andre.carvalho.62@edu.ufes.br, andre.g.costa@ufes.br.

Resumo

Avaliou-se o efeito do extrato aquoso de café verde conilon (ECV) sobre biomarcadores hepáticos, perfil lipídico e glicemia de animais, com obesidade induzida pela dieta. O ECV foi obtido por percolação e determinados teor de ácido clorogênico (CGA) e cafeína. Ratos machos (Wistar) divididos nos grupos (n=12/grupo): CT (dieta comercial), HF (dieta para indução da obesidade), HFP (dieta para indução da obesidade mais ECV desde a 1ª semana) e HFT (dieta para indução da obesidade mais ECV a partir da 8ª semana). Na 15ª semana, foi realizado o teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT). Na 16ª semana os animais foram eutanasiados e amostras de sangue coletadas. O consumo alimentar foi superior no grupo CT em relação a HF. O coeficiente de eficiência alimentar e calórica, e o ganho de peso foi superior no grupo HF. O consumo de CGA e cafeína não diferiu entre HFP e HFT. A área sob a curva no ipGTT foi superior no grupo HF, em relação ao CT, mas não houve diferença entre HF, HFP e HFT. O aspartato aminotransferase diferiu entre CT e HF. O HDL diferiu entre HF e HFP. E a glicemia não diferiu. Concluindo, o ECV não foi efetivo para minimizar os agravos relacionados à obesidade.

Palavras-chave: Conilon. Obesidade. Dislipidemia. Resistência insulínica. Biomarcadores.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde – Nutrição.

Introdução

Obesidade é um problema de saúde mundial, que provoca alterações no metabolismo lipídico, como dislipidemia (LOBSTEIN, *et. al.*, 2022). Levando ao desenvolvimento de danos hepáticos, identificados por marcadores bioquímicos, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (ARSLAN, 2014). Também levando à hiperglicemia e, conseqüentemente, à resistência insulínica (WHALEY-CONNELL; SOWERS, 2017). Outro fator importante, é o aumento dos níveis inflamatórios (XU *et. al.*, 2003) e do estresse oxidativo (FURUKAWA *et. al.*, 2017). Assim, uma dieta balanceada, e inclusão de alimentos com compostos bioativos, como o café verde podem prevenir esta condição (PEPE *et. al.*, 2022; MILENKOVIC *et. al.*, 2017).

O café é um importante produto para a economia mundial, e o Brasil é o seu maior produtor e exportador (EMBRAPA, 2024). Os grãos de café são ricos em compostos bioativos, incluindo cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos (CGA's), que estão associados à diminuição de biomarcadores relacionados a dislipidemia e obesidade (SANLIER; ATIK; ATIK, 2019). Entretanto, durante a torra, o café perde compostos, como os CGA's. Dito isso, o café verde ganha destaque, por se tratar do grão maduro não torrado (ABRAHÃO *et. al.*, 2013; MILENKOVIC *et. al.*, 2017).

Esses compostos, possuem efeitos anti-inflamatórios, e reduzem os biomarcadores de dislipidemias e obesidade (SANLIER; ATIK; ATIK, 2019). Um estudo, utilizando o extrato de café obteve efeito na diminuição da gordura visceral e do peso corporal dos animais (JESZKA-SKOWRONJ *et. al.*, 2017). E, constatou-se que os CGA's podem modular o metabolismo da glicose, por inibir a liberação desta, e a absorção no intestino delgado (NAVEED *et al.*, 2018). Considerando a relevância do café verde e seus constituintes em benefício à saúde, a hipótese do estudo é que o extrato aquoso de café verde contribui para a melhoria de biomarcadores hepáticos, perfil lipídico e níveis glicêmicos de animais com obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica.

Metodologia

O café verde, tipo Conilon (*Coffea canephora*), foi adquirido do Caparaó Capixaba, seco de forma indireta, a uma temperatura média de 180°C por aproximadamente 50 horas, moídos em moinho de facas tipo Willy SL-31 (Solab, Brasil) e peneirados, obtendo partículas inferiores a 1,18 mm (NEVES, et al., 2019).

O extrato de café verde (ECV) foi obtido por percolação (1:1,6 mL de água destilada a 90°C), em filtro de papel (SILVA *et al.* 2022). A determinação de cafeína e CGA's (5-ACQ) foi realizada num sistema cromatográfico UPLC Acquity (Waters Corporation, EUA). As amostras foram filtradas (0,22 µm). Foram injetados 2 µL das amostras de extrato aquoso em uma coluna de fase reversa a 40°C. A fase móvel, uma mistura de metanol, água e ácido acético (20:80:1 (v/v)), fluxo de 0,1 mL/min, eluição isocrática e tempo de corrida de 8 minutos. A identificação dos compostos foi feita por cromatogramas a 272 nm, comparando padrões comerciais e compostos de interesse.

Utilizou-se ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus*) com três semanas. Os animais foram alojados individualmente, com iluminação (ciclo claro/escuro) de 12 horas, sendo mantidos à 22 °C (\pm 1 °C), com dieta e água *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, campus Sul, sob o número 001/2023.

Os animais foram divididos (n= 12/grupo): CT: dieta comercial, sem extrato; HF: induzidos à obesidade e sem extrato; HFP: induzidos à obesidade e extrato desde a 1ª semana; e HFT: com indução à obesidade e extrato a partir da 8ª semana. A ingestão foi avaliada diariamente e o ganho de peso semanalmente. A dieta dos HF foi baseada na AIN-93M, com adição de 31,2% de banha de porco, tornando-a hiperlipídica e hipercalórica (CINTRA *et al.* 2012; MOURA-ASSIS *et al.*, 2018; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Foi adicionado à dieta 2 mL de extrato (SILVA *et al.*, 2022).

Na 15ª semana foi realizado o teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT). Uma solução de glicose a 50% (2,0 g/kg de peso corporal) foi administrada no peritônio e as amostras de sangue foram coletadas da veia caudal nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. A área sob a curva de glicose (AUC) foi calculada pelo método trapezoidal (BONORA *et al.*, 1987; DRAGANO *et al.*, 2013). Ao final do experimento os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas, e anestesiados. Após, foi realizada a punção cardíaca, o sangue coletado foi centrifugado e o soro armazenado de 2 °C a 8 °C.

As análises das enzimas AST e ALT, bem como do colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), triacilgliceróis e glicose foram realizadas por analisador bioquímico semi-automático (Bio-2000IL, BioPlus). As dosagens foram determinadas a partir do soro por kits comerciais da marca Gold Analisa®. O conteúdo de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foi estimado pela Equação de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

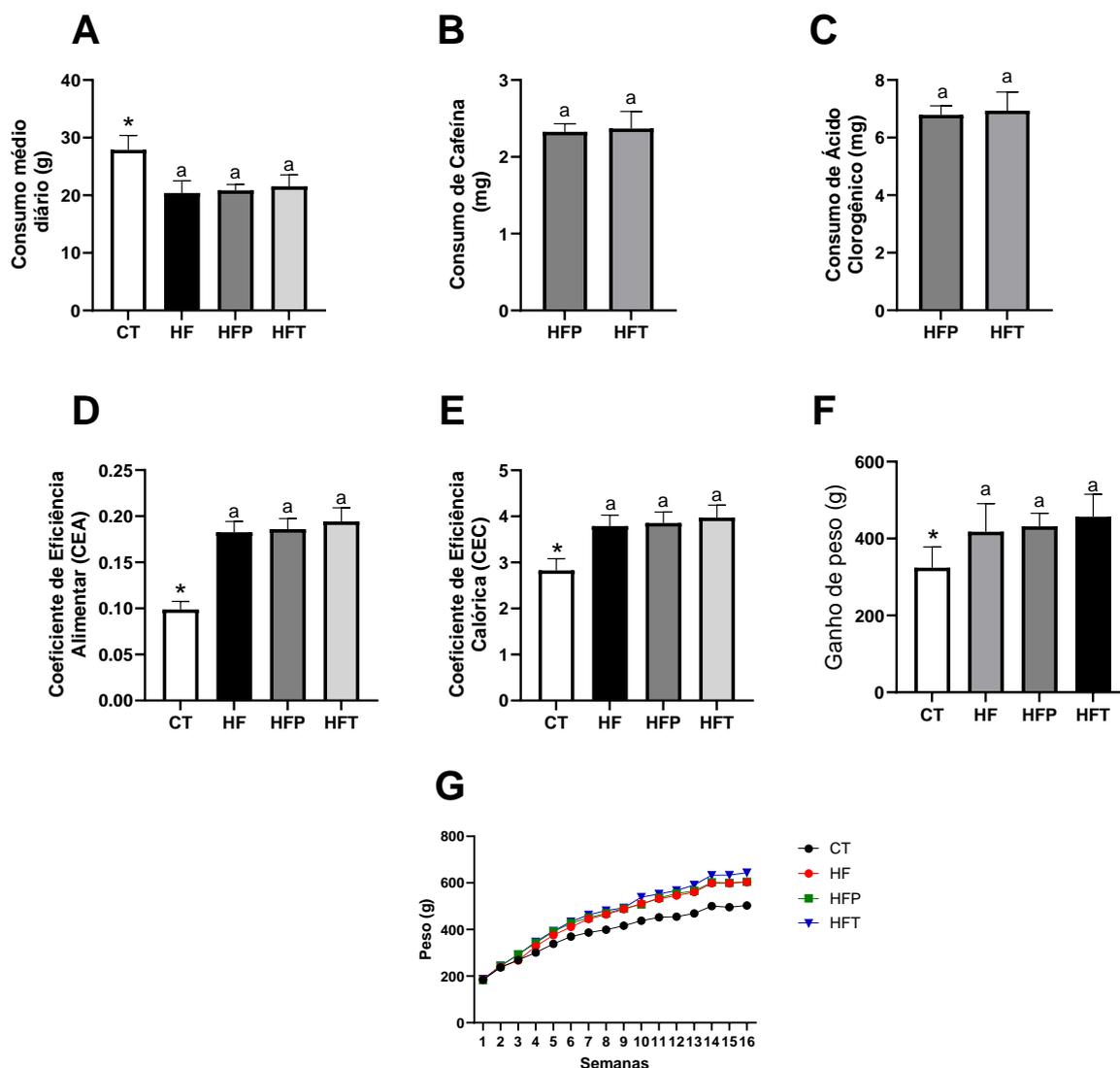
A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os outliers foram identificados pelo teste de Grubbs e removidos dos grupos. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar as médias entre dois grupos (CT e HF). Aplicou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparar as médias os grupos HF, HFP e HFT. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, utilizando o programa estatístico Graph Pad PRISMv10.2.2.

Resultados

No presente estudo, foram encontradas concentrações de compostos bioativos nas seguintes quantidades: CGA em $5,53 \pm 1,79$ mg/mL e cafeína em $1,84 \pm 0,35$ mg/mL. Com relação ao consumo de dieta dos animais (Figura 1A), o grupo CT apresentou maior ingestão quando comparado ao HF. Dentre os grupos HF, HFP e HFT, não houve diferença significativa no consumo. O consumo de cafeína e ACG não diferiu significativamente entre os grupos. Observou-se que o coeficiente de eficiência alimentar (Figura 1D) e o coeficiente de eficiência calórica (Figura 1E) foram superiores no grupo HF, em relação ao CT. Porém, não diferiu entre os grupos HF, HFP e HFT.

O ganho de peso dos animais (Figura 1F), representa o ganho de peso ao final do experimento, onde todos os animais HF, HFP, HFT obtiveram um ganho aumentado quando comparado aos animais do grupo CT. Também houve o acompanhamento do ganho de peso semanal (Figura 1G), demonstrando a indução da obesidade obtida a partir da 8ª semana, onde os animais apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos CT e HF.

Figura 1 – Gráficos de consumo, ganho de peso e coeficientes.



A - Consumo per capita diário; B - Consumo de Cafeína; C - Consumo de Ácido Clorogênico; D - Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA); E - Coeficiente de Eficiência Calórica (CEC); F - Média do ganho de peso total; G - Ganho de peso semanal; CT - Grupo controle; HF - Grupo High-Fat, sem extrato de café verde; HFP - Grupo High-Fat Prevenção; HFT - Grupo High-Fat Tratamento.

* representa a diferença estatística entre os grupos CT e HF ($p < 0,05$).

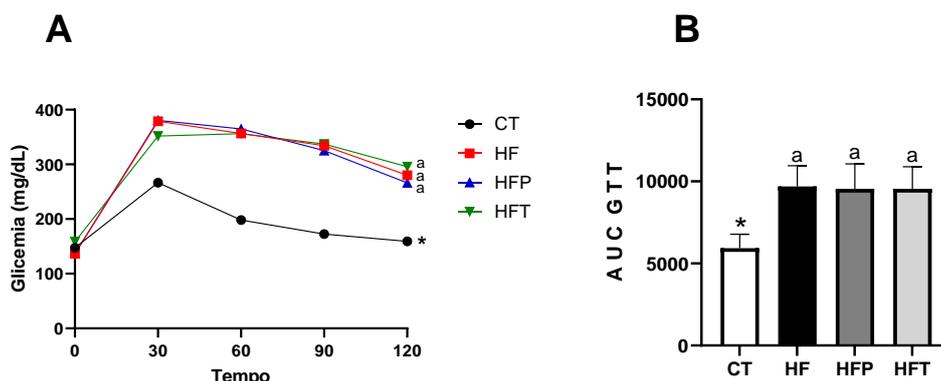
^a representa a diferença estatística entre o grupo HF e os grupos com extrato

Os dados da figura estão apresentados como média dos grupos \pm DP.

Fonte: Produção do próprio autor.

A evolução da glicemia durante os 120 minutos de teste está apresentada na Figura 2A. O grupo CT diferiu significativamente do grupo HF, e observa-se um comportamento semelhante entre os grupos HF, HFP e HFT, não apresentando diferença significativa entre eles. A Figura 2B representa a área sob a curva de glicemia, com valores próximos entre os grupos HF, HFP e HFT, não diferindo significativamente entre eles, e um valor de área reduzido para os animais com dieta comercial em relação ao HF, apresentando diferença significativa entre estes.

Figura 2 – Gráficos de glicemia e área sob a curva glicêmica



A - Glicemia média dos grupos; B - Área sob a curva de glicose dos grupos; CT - Grupo controle; HF - Grupo High-Fat; HFP - Grupo High-Fat Prevenção; HFT - Grupo High-Fat Tratamento. "a" representa a diferença estatística entre o grupo HF e os grupos com extrato

Os dados da figura estão apresentados como média dos grupos \pm DP.

Fonte: Produção do próprio autor.

O marcador AST, apresentou aumento significativo, quando comparados os grupos CT e HF. Já o HDL, apresentou diferença entre o grupo HFP em relação ao HF.

Tabela 1 – Marcadores bioquímicos e hepáticos

	CT	HF	HFP	HFT
AST (U/L)	62 \pm 9,7*	82,6 \pm 24,2	75,5 \pm 11,1	71,4 \pm 25,3
ALT (U/L)	39,9 \pm 9,8	46,3 \pm 15,9	45,8 \pm 12,4	42,4 \pm 15,1
Colesterol Total (mg/dL)	65,6 \pm 10,2	57,4 \pm 9,9	58,9 \pm 9,1	62,7 \pm 10,4
HDL (mg/dL)	26,6 \pm 5,0	23,8 \pm 4,9 ^b	26,9 \pm 3,4 ^{ab}	28,4 \pm 2,9 ^a
LDL (mg/dL)	25,3 \pm 8,9	18,4 \pm 6,2	17,8 \pm 8,8	16,7 \pm 10,5
Triglicerídeos (mg/dL)	74,7 \pm 24,0	63,5 \pm 22,4	68,9 \pm 32,5	71,3 \pm 16,3
Glicemia (mg/dL)	353,9 \pm 92,7	310,3 \pm 59,9	324,4 \pm 59,6	361,1 \pm 78,6

Dados apresentados em média \pm DP. * indica diferença estatística entre CT e HF pelo teste t ($p < 0,05$). Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística entre grupos HF, HFP e HFT pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor.

Discussão

O café conilon (*Coffea canephora*) é importante para a economia do Brasil e do mundo (EMBRAPA, 2024). Após a torra, o café sofre redução de compostos, como os ACG's, por degradação térmica (FRANCA; MENDONÇA; OLIVEIRA, 2005). Este é o principal composto bioativo do café, com alto potencial antioxidante, e capacidade de reduzir níveis glicêmicos e melhorias metabólicas em indivíduos obesos (AWWAD *et al.*, 2021; PIMPLEY *et al.*, 2023).

Os animais foram submetidos à dieta rica em gordura saturada, aumentando as concentrações de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (SANTOS *et al.*, 2013). Além de afetar o metabolismo da glicose, por aumento da inflamação, inibindo a sinalização insulínica, e levando à hiperglicemia e resistência insulínica (WHALEY-CONNELL; SOWERS, 2017). No estudo de Alamri (2020), a indução da obesidade utilizando dieta com banha de porco, obteve resultados semelhantes ao ganho de peso e glicemia, apresentando índices maiores comparado ao controle positivo.

No estudo, houve um consumo de aproximadamente 7mg de ACG/dia/animal. No de Pimpley *et al.* (2023), utilizou-se 100mg e 200mg/kg de ácido clorogênico, e não observou alteração no consumo,

contudo, o ganho de peso, acúmulo de gordura e resposta glicêmica foram significativamente reduzidos, sendo dose-dependente.

Os grupos CT e HF diferiram significativamente em relação aos valores de AST, entretanto, os animais que receberam dieta HF, HFP e HFT, não apresentaram diferença significativa. No estudo de Abdel-Mohsen (2023), foi utilizado doses de 50 e 100 mg/kg de extrato de café verde, observando assim alteração positiva nos marcadores hepáticos e lipídicos dos animais que receberam dieta high-fat com a suplementação do extrato, em comparação com os que não receberam a suplementação.

Conclusão

O CGA foi o composto mais abundante no extrato de café verde. O modelo de indução de obesidade utilizado foi efetivo, contudo, a suplementação com extrato aquoso de café verde, como prevenção ou tratamento da obesidade, não provocou melhoria dos biomarcadores analisados. Dessa forma, outros estudos devem ser realizados utilizando o extrato de café verde, com diferentes doses e tempo de tratamento, para avaliar os efeitos promotores de saúde presentes nesse extrato.

Referências

ABDEL-MOHSEN, D. M. et al. O extrato de grão de café verde melhora potencialmente a lesão hepática devido ao diabetes induzido por HFD/STZ em ratos. **Rev. de Bioquímica Alimentar**, 2023.

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

ALAMRI, O. D. et al. Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities as well as the renal protective potential of green coffee extract in high fat-diet/streptozotocin-induced diabetes in male albino rats. **Journal of Functional Foods**, v. 71, p. 103996, 2020.

ARSLAN, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 44, p. 16452-16463, 2014.

AWWAD, S. et al. Quantification of caffeine and chlorogenic acid in green and roasted coffee samples using HPLC-DAD and evaluation of the effect of degree of roasting on their levels. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7502, 2021.

CINTRA, D. et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção mundial de café para safra 2023-2024 totaliza 171,4 milhões de sacas de 60kg. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/88547345/producao-mundial-de-cafe-para-safra-2023-2024-totaliza-1714-milhoes-de-sacas-de-60kg> Acesso em: 20 de abril de 2024.

FRANCA, A. S.; MENDONÇA, Juliana CF; OLIVEIRA, Sami D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 7, p. 709-715, 2005.

FRIEDEWALD W.T., LEVY R.I., FREDRICKSON D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**. 1972.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2017.

JESZKA-SKOWRON, M. et. al. Positive and negative aspects of green coffee consumption—antioxidant activity versus mycotoxins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 12, p. 4022-4028, 2017.

LOBSTEIN, T.; BRINDEN, H.; NEVEUX, M. **World Obesity Atlas 2022**. 2022.

MILENKOVIC, D. et al. Interindividual variability in biomarkers of cardiometabolic health after consumption of major plant-food bioactive compounds and the determinants involved. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 558-570, 2017.

MOURA-ASSIS, A. et al. Flaxseed oil rich in omega-3 protects aorta against inflammation and endoplasmic reticulum stress partially mediated by GPR120 receptor in obese, diabetic and dyslipidemic mice models. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 53, p. 9-19, 2018.

NAVEED, M. et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

NEVES, J. et al. Total phenolic content and primary antioxidant capacity of aqueous extracts of coffee husk: chemical evaluation and beverage development. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 348-353, 2019.

PEPE, R. B.; et al. Posicionamento sobre o tratamento nutricional do sobrepeso e da obesidade: departamento de nutrição da Associação Brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica - **ABESO**, 2022.

PIMPLEY, V. A. et al. Modulatory effect of green coffee bioactives on high-fat diet-induced obesity in C57BL6 mice model. **Nutrition**, v. 115, p. 112141, 2023.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939– 1951, 1993.

SANLIER, N.; ATIK, A.; ATIK, I. Consumption of green coffee and the risk of chronic diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2573-2585, 2019.

SANTOS, R. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia: I diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, supl.3, p.1-40, 2013.

SILVA, *et al.* Green coffee extract (*Coffea canephora*) improved the intestinal barrier and slowed colorectal cancer progression and its associated inflammation in rats. **PharmaNutrition**, v. 22, p. 100314, 2022.

WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R. Obesity and kidney disease: from population to basic science and the search for new therapeutic targets. **Kidney International**, v. 92, n. 2, p. 313– 323, 2017.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento (Edital 28/2022 – TO 838/2023). A Universidade Federal do Espírito Santo importante para a realização deste trabalho. Além do suporte oferecido pela própria e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fornecimento das bolsas de Iniciação Científica (Edital PiiC 2023/2024).