

LARISSA FROEDE BRITO

**EVOLUÇÃO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA E PERIL LIPÍDICO
DE CAMUNDONGOS *KNOCKOUT APO E* ALIMENTADOS COM
RESÍDUO DE CAFÉ SECO E FERMENTADO.**

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2008

LARISSA FROEDE BRITO

**EVOLUÇÃO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA E PERIL LIPÍDICO
DE CAMUNDONGOS *KNOCKOUT APO E* ALIMENTADOS COM
RESÍDUO DE CAFÉ SECO E FERMENTADO.**

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 19 de dezembro de 2008.

Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Co-orientadora)

Sônia Machado Rocha Ribeiro
(Co-orientadora)

Sérgio Luis Pinto da Matta

Daniel Marçal de Queiroz

Prof. José Humberto de Queiroz
(Orientador)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Carlos e Vania,
às minhas irmãs Karla e Thaise.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela presença constante em minha vida. Por colocar pessoas tão maravilhosas em meu caminho e que hoje tenho a oportunidade de agradecer.

A meus pais, Vania e Carlos, pelo amor incondicional, carinho, incentivo e apoio.

As minhas irmãs, Karla e Thaise, e ao meu cunhado Thiago, pela amizade, confiança, apoio, carinho e incentivo sempre.

Ao meu querido orientador, professor José Humberto de Queiroz, pela dedicada orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo companheirismo e pela amizade construída e cultivada durante esses anos de convivência.

A Professora Maria do Carmo Peluzio pela co-orientação, amizade, carinho, conselhos, sugestões e ensinamentos tão valiosos.

A Professora Sônia Ribeiro, além de co-orientadora, uma mãe. Obrigada pelo carinho, amizade, calma, apoio, incentivo e, sobretudo paciência nas horas em que tanto precisei.

Ao Professor Sérgio da Matta pela orientação tão precisa, pelo carinho, atenção, sugestões e ajuda nas dúvidas que surgiram no decorrer deste trabalho.

Ao Professor George Kling pela simpatia, carinho e oportunidades.

Ao Professor Adelson Tinôco, ou melhor, "Paidelson", por ter me acolhido e aberto às portas para realização do meu sonho. Pela eterna confiança,

incentivo e, sobretudo pela verdadeira amizade construída ao longo desses anos.

A Professora Tânia Toledo, pela confiança, amizade e carinho a mim demonstrados.

Aos amigos do laboratório Fabiano, Lucas e Rafael pelos bons momentos que passamos juntos e pelo apoio que sempre me deram.

As minhas estagiárias “maluquinhas”, Lívia e Aline, pela amizade, pelo companheirismo e ajuda sempre prestada. E é claro, pelas ótimas risadas ao longo da realização do experimento. Sabemos que se alguma coisa não saiu como se esperava, a culpa é de quem?

Ao Eduardo, Adenilson, Carlão, Serafim (*in memoriam*), Cassiano, Alex e demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB), do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) e do Departamento de Biologia Geral (DBG) pela ajuda e pelo convívio ao longo desse trabalho.

Aos demais professores do DBB e do DNS pela troca de experiências e incentivo. Em especial ao professor Cláudio Mafra pelo carinho e a professora Neuza Brunoro por ter cedido o laboratório para realização do ensaio biológico.

A professora Maria Catarina Kasuya, por permitir a utilização do microscópio para captura das imagens utilizadas nesse estudo. A Marliane e ao Marlos pela ajuda na realização desse trabalho.

Ao professor Daniel Marçal pela colaboração na realização desse estudo. Ao Enrique pela amizade e ajuda na coleta e secagem do resíduo.

Aos amigos da pós-graduação Ritinha, Izabela, Ronny, Wendel, Patrícia Dias, Rafael, Edvaldo, Priscila, Luciana, Renata, Franciny, Hebréia, Fabrícia, Patrícia Fontes, e demais alunos pela convivência, amizade cultivada e encontros regados a gargalhadas.

As Saideras, Amanda, Carol, Paola, Lalá e Clarice pela amizade, companheirismo, cumplicidade e convivência tão maravilhosa. Sem vocês Viçosa não seria a mesma.

A amiga Mônica Sant'Anna pela amizade compartilhada ao longo desses anos. Pela importante ajuda na conclusão desse trabalho. Ter amiga pouca prática não é fácil.

Aos amigos, Douglas, Carolina Gomes, Marcela Ferreira, Tássia, Lidy, Tatiana, Bráulio, Diego, Davison, Florian, Thiago, Saulo, Carlos e Cacá pelas boas risadas e pelos momentos maravilhosos vividos.

Aos amigos do Rotaract pela amizade eterna.

A Fátima, Felix, Fred, Tio Vicente, Tia Tetê, Marcus, Lúcia e a todos da família Souza e da família Dias, que durante esse tempo em que vivi aqui se tornaram minha família. Obrigada por tudo! Vocês foram essenciais para essa conquista.

A todos que de alguma forma conviveram e contribuíram, direta ou indiretamente, para realização desse sonho. Seja com trabalho, seja com amizade.

A TODOS...
MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

LARISSA FROEDE BRITO, filha de Carlos Alfredo Pinto de Brito e Vania Froede Brito, nasceu em 25 de junho de 1982, na cidade de Teófilo Otoni, Minas Gerais.

Em dezembro de 2003 graduou-se em Nutrição pela Faculdade Arthur Sá Earp Neto, Petrópolis-RJ.

Em setembro de 2006 ingressou no Programa de Treinamento para Aprimoramento Profissional – Nível Superior, no Laboratório de Epidemiologia Nutricional na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em 24 de setembro de 2007.

Em Março de 2007 iniciou o curso de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de *Magister Scientiae* em dezembro de 2008.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Histórico e processamento do café.....	3
2.2. Resíduos do processamento do café:.....	6
2.3. Utilização dos resíduos do fruto do cafeeiro:.....	8
2.4. Doenças Cardiovasculares e <i>Monascus ruber</i> :.....	10
2.5. Camundongos Deficientes no Gene da Apoproteína E.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Coletas de amostras dos resíduos de Café.....	17
3.2. Microorganismo.....	17
3.2.1. Conservação da cepa.....	17
3.3. Produção do Resíduo Fermentado.....	18
3.4. Caracterização do resíduo bruto e do resíduo fermentado.....	19
3.5. Ensaio Biológico.....	19
3.5.1. Origem e manutenção dos animais.....	19
3.5.2. Adição do resíduo fermentado como parte da dieta aterogênica de camundongos knockout <i>Apo E</i>	20
3.6. Crescimento.....	21
3.7. Amostras de sangue.....	21
3.8. Dissecção dos órgãos.....	21
3.9. Análises Histopatológica e Morfométrica.....	22
4. Análises Estatísticas.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. Caracterização do resíduo do café fermentado e não fermentado.....	24
4.2. Consumo alimentar e ganho de peso dos animais.....	25
4.3. Efeito do resíduo de café no perfil de lipídios séricos de camundongos knockout <i>Apo E</i>	29
4.4. Efeito do resíduo de café fermentado e não fermentado sobre os tecidos hepático e aorta de camundongos <i>knockout Apo E</i>	33
4.4.1. Análise histopatológica do tecido hepático.....	33
4.4.2. Histopatologia aórtica.....	37
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

HMG-CoA: Hidroxi-metil-glutaril-coenzima A
CC: Café cereja
CD: Cereja descascado
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LDLr: Receptor de LDL
HDL: Lipoproteína de alta densidade
VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade
TGL: Triacilgliceróis
CT: Colesterol total
QM: Quilomincrons
Apo E: Apoproteína E
Ca: Cálcio
Mg: Magnésio
P: Fósforo
K: Potássio
PDA: ágar de batata dextrosado
MgSO₄: sulfato de magnésio
KH₂PO₄: Hidrogenofosfato de potássio monobásico
ARC: Água residuária de café
H/E: Hematoxilina e eosina
PBS: Salina tamponada com fosfato
cell foam: células espumosas

RESUMO

BRITO, Larissa Froede, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2008. **Evolução da lesão aterosclerótica e perfil lipídico de camundongos *knockout Apo E* alimentados com resíduo de café seco e fermentado.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Sônia Machado Rocha Ribeiro.

A cafeicultura é uma atividade agrícola que produz um grande volume de resíduos líquidos e sólidos, gerando custos com o tratamento e destinação dos mesmos. O resíduo do fruto do cafeeiro, por ser rico em macro e micro nutrientes como açúcares, proteínas, Ca, Mg, P, N e K, torna-se um meio indutor para o crescimento e cultivo de fungos. Os fungos do gênero *Monascus* têm sido utilizados na culinária oriental como corante, condimento e para dar sabor aos alimentos. Os produtos da fermentação por *Monascus* têm sido utilizados na alimentação de animais e de humanos para reduzir os níveis séricos de lipídios pela inibição da HMG-CoA redutase, a enzima chave na biossíntese do colesterol. Dessa maneira, esses produtos auxiliam na prevenção de patologias específicas (dislipidemias), como a aterosclerose. O presente trabalho teve como objetivo determinar a composição centesimal dos resíduos do café fermentado com *Monascus ruber* e não fermentado, bem como avaliar o efeito da adição desses resíduos à dieta de camundongos *knockout Apo E* hiperlipidêmicos como fator atenuante à formação de placas de ateroma. A conservação da cepa foi realizada em meio PDA. Utilizou-se solução contendo 0,1% de $MgSO_4$, 0,1% de KH_2PO_4 e 1% de NH_4Cl para o enriquecimento do meio contendo o resíduo seco e elevação de seu teor de umidade para 50%. A esse meio foi adicionada suspensão de esporos. Análises bromatológicas dos resíduos fermentado e não fermentado foram realizadas segundo os métodos recomendados pelo Instituto Adolfo Lutz. O resíduo seco apresentou 10,2% de umidade, 8,5% de cinzas, 1,4% de lipídios, 11,7% de proteínas e 67,9% de carboidratos totais. Para o resíduo fermentado foram obtidos 9,9% de umidade, 10,2% de cinzas, 1,2% de lipídios, 17% de proteínas e 61,8% de carboidratos totais. O consumo do resíduo de café, fermentado e sem a fermentação, por animais Apo E alimentados com dieta

aterogênica suplementada com diferentes concentrações dos resíduos, não alterou o consumo alimentar, o ganho de peso e o índice hepático quando comparados ao grupo controle (G1). O resíduo de café sem fermentar 2% (G2) diminuiu significativamente em 42% o nível de triacilgliceróis e em 41% a fração VLDL-c quando comparados ao grupo que recebeu somente dieta aterogênica (G1). Os camundongos que foram alimentados com o resíduo fermentado a 2% (G4) e a 10% (G5) apresentaram um aumento de respectivamente, 66,6% e 33,3% no depósito de gordura hepático, enquanto o resíduo sem fermentar não alterou os hepatócitos. Os animais que receberam o resíduo fermentado 2% (G4) apresentaram o melhor efeito na diminuição da área da lesão aórtica. Já os animais que consumiram o resíduo fermentado 10% (G5) não apresentou efeito sob as lesões. Em contrapartida, o grupo que recebeu resíduo sem fermentar 10% (G3) aumentou significativamente as lesões aórticas quando comparadas ao grupo controle (G1).

ABSTRACT

BRITO, Larissa Froede, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december of 2008. **Evaluation of the atherosclerotic lesion and lipid profile of *Apo E* Knockout mice fed with dry residue of coffee and fermented.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co Advisers: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Sônia Machado Rocha Ribeiro.

Coffee-growing is an agricultural activity which generates a large volume of both liquid and solid waste, creating huge costs to its treatment. The residue of the fruit of the coffee, because it is rich in macro and micro nutrients such as sugars, proteins, Ca, Mg, P, N and K, becomes a way to induct the growth and cultivation of fungi. The fungus of the genus *Monascus* has been used in Oriental cooking as coloring, for seasoning and flavoring food, etc. Products fermented by *Monascus* have been used in human and animal nutrition to reduce serum lipids levels by inhibiting HMG-CoA reductase, the cholesterol synthesis key enzyme. This way, these products are able to prevent and decrease dyslipidemias, such atherosclerosis. In the present study, we determinate the centesimal composition of coffee residues unfermented and fermented by *Monascus ruber*. The effects of adding these residues to diets of hyperlipidemic *knockout Apo E* mice were evaluated on occurrence of atheroma plaques. The strain's conservation was held in PDA amid. A solution composed by 0.1% MgSO₄, 0.1% KH₂PO₄ and 1% of NH₄Cl was used to enrich the environment containing the dry residue and to elevate it's moisture content up to 50%. To this environment was added suspension of spores. The fermented and unfermented residue bromatological analysis bromatological were performed using the methods recommended by the Adolfo Lutz Institute (Brazil, 2005). The dry residue showed 10.2% moisture, 8.5% ash, 1.4% lipids, 11.7% protein and 67.9% of total carbohydrates. 9.9% of humidity to the fermented residue were obtained, 10.2% of ashes, 1.2% of fat, 17% of protein and 61.8% of total carbohydrates. The consumption of the coffee residue (fermented and unfermented) by *Apo E* animals, fed with atherogenic diet supplemented with different concentrations of residue, showed no changes in the evolution of weight and weight gain. The serum lipids also showed no difference between the treatment groups; only at the fraction VLDL-C e TG of animals fed with 2% of the waste without ferment (G2) the decrease was

significant. The mice that were fed with fermented residue to 2% (G4) and 10% (G5) showed an increase of respectively 66.6% and 33.3% in the deposit of liver fat, showing that the fermentation contributed to this increase. In the evaluation of the atherosclerotics lesions it was verified that fermentation of the residue is directly related to its concentration, showing that, in low concentration (2%), the fermentation is beneficial. Also, the residue with no fermentation in bigger concentrations (10%) presented positive effect.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os produtos agrícolas trabalhados pelo homem, o café tem grande significado no cenário mundial, constando como grande gerador de divisas, movimentando cerca de 12 a 13 bilhões de dólares nesse meio (GUIMARÃES *et al.*, 2002, citado por FARIA *et al.*, 2006).

Embora a cafeicultura seja importante economicamente, ela é uma atividade agrícola que origina um grande volume de resíduos líquidos e sólidos. O tratamento e destinação desses resíduos elevam os custos de produção (CARVALHO; VEGRO, 1994; ABIC, 2008).

Tradicionalmente a casca e a polpa do café tem tido apenas aplicações limitadas como fertilizantes, ração animal, biocomposto, utilizando apenas uma fração da quantidade disponível. Essas aplicações não são tecnicamente muito eficientes. Estudos recentes focaram suas aplicações como substratos em bioprocessos. Tentativas de detoxificação também foram realizadas para aplicação em ração animal e utilização do material como substrato na elaboração de produtos com maior valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, aromas, cogumelos. Como a casca e a polpa de café possuem uma boa quantidade de açúcares fermentescíveis, estes consistem em substrato apropriado para o cultivo de fungos e leveduras (SOCCOL, 2002).

Os fungos do gênero *Monascus* têm sido utilizados há milhares de anos na China na indústria de fermentação para preparação de vinho tinto de arroz, vinho tinto Shao-Hsing e alimentos nativos, como o queijo de soja vermelho (LIN *et al.*, 1973).

Os alimentos obtidos a partir da fermentação por *Monascus ruber* tem sido utilizado na dieta de animais e em humanos para reduzir os níveis de lipídios séricos, pela atividade inibidora da HMG-CoA redutase, enzima chave da biossíntese de colesterol em humanos (ENDO, 1979; WANG *et al.*, 1997). Segundo Endo *et al* (1985), a monacolina k (mevinolina), isolada a partir de fungos *Monascus ruber*, é um composto com ação hipocolesterolêmica que inibe a enzima HMG-CoA redutase e que pode ajudar na redução de lipídios séricos.

A aterosclerose se caracteriza por alterações da camada íntima, representadas por acúmulo de lipídios, carboidratos complexos,

componentes do sangue, células e material intercelular. Inicia-se com a migração de monócitos da corrente sangüínea para depositarem nas paredes arteriais, após injúria do endotélio, acumulando gorduras (principalmente colesterol) e formando as placas ateroscleróticas ou ateromas. As artérias afetadas perdem elasticidade e se estreitam gradativamente, podendo se romper. O contato das substâncias do interior da placa com o sangue leva a sua coagulação e conseqüente obstrução do vaso (BOTZ *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2005).

O acúmulo de lipídios na parede arterial induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. Estas citocinas promovem o recrutamento de monócitos e o acúmulo de células espumosas, que são o início das estrias gordurosas (OSTERUD; BJORKLID, 2003). A formação e acúmulo de células espumosas caracterizam a estria gordurosa, e contribuem ainda para o aumento do tamanho da lesão, que pode progredir para uma lesão intermediária e finalmente para uma lesão complexa (FERREIRA *et al.*, 2007).

Os camundongos são os modelos animais mais utilizados para o estudo dos lipídios e da aterosclerose. No entanto, nestes animais, as lesões ateroscleróticas induzidas por dietas extremamente hipercolesterolêmicas são limitadas em tamanho, complexidade e distribuição. Isto pode ser modificado com o desenvolvimento de camundongos transgênicos e *knockout* para determinados genes, os quais podem produzir efeitos notáveis nas lipoproteínas plasmáticas e nas lesões arteriais, até mesmo na ausência de manipulações dietéticas (FAZIO; LINTON, 2001).

As preocupações crescentes com problemas ambientais, atualmente, valorizam sobremaneira a destinação e o aproveitamento dos resíduos gerados, levando os pesquisadores a desenvolver métodos eficientes para utilização dos mesmos. Além disso, tem havido grande interesse no estudo da composição dos resíduos e subprodutos do processamento dos frutos do cafeeiro. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo fermentar o resíduo do café com *Monascus ruber*, caracterizar, por meio da composição bromatológica, o resíduo da despulpa do café fermentado e sem fermentação e verificar a adição desses resíduos à dieta de camundongos Knockout Apo E hiperlipidêmicos como fator atenuante à formação de placas de ateroma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico e processamento do café

O café originou-se na Etiópia, tendo indícios de cultivos no Yemen antes mesmo do século XV. Os primeiros “cafés” foram abertos pelos árabes como ponto de encontro para negociantes. Os europeus tiveram seu primeiro contato com o café através dos mercadores de Veneza no século XV. Nesse mesmo tempo, os espanhóis introduziram na Europa outras bebidas quentes, como o chocolate e os chás. O café nessa época era vendido como produto com características medicinais, e somente em 1720 que foi aberto o primeiro café em Veneza. Apesar do cuidado dos árabes em não deixar sementes férteis à disposição de outros povos, os holandeses conseguiram levar o produto para seus jardins botânicos. Em 1668 houve a primeira evidência do produto na América do Norte. Daí em diante, o café passa a ser apreciado nas maiores cidades e centros financeiros americanos, como o New Exchange e o Bank of New Work que começaram a operar com cafés, formando o distrito financeiro conhecido como Wall Street (LEITE; SILVA, 2000; LEITE, 2002).

No Brasil, o café foi inicialmente cultivado nas áreas próximas do litoral, mas logo se percebeu que a temperatura elevada e altitudes baixas não eram adequadas para o seu cultivo. Por esse motivo os produtores mudaram-se para o interior, construindo rodovias e estradas de ferro para transportar o café até os portos. Sendo assim, a produção de café foi um importante fator no desbravamento do interior do país (GRAAFF, 1986; LEITE, 2002). Segundo Matiello (1991), o café da espécie *Coffea arábica* é adaptado às condições de clima tropical de altitude com umidade e temperaturas amenas. Já a espécie *Coffea canephora*, adapta-se às regiões equatoriais baixas, quentes e úmidas.

Na década de 90, o cultivo do café no Brasil ocupava 4% (3.200.000 hectares) da área total cultivada e contratava 5% da mão de obra rural, representando 1% do Produto Interno Bruto, 2% do total de empregos e 10% dos produtos exportados (MENEZES, 1990).

A produção mundial de café na safra de 2005/06 atingiu cerca de 108 milhões de sacas de 60 quilos, das quais o Brasil contribuiu com 30,49% deste montante, cerca de 32,92 milhões de sacas (CONAB, 2006).

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC, 2007), a produção mundial na safra de 2007/08 atingiu 121,43 milhões de sacas, sendo 33,7 milhões de sacas produzidas no Brasil. É esperado que até o fim do ano de 2008 a produção Brasileira alcance o número de 46 milhões de sacas produzidas. Este crescimento está associado a um conjunto de fatores, como aumento do consumo, melhoria contínua da qualidade do café, consolidação do mercado de cafés, melhora da percepção do café quanto aos aspectos dos benefícios para a saúde e melhora das condições econômicas no Brasil (SIMÕES *et al.*, 2008).

O fruto de café maduro, denominado café cereja (CC), é composto pela polpa, formada pelo exocarpo (epiderme) e parte do mesocarpo; a cor da epiderme varia de verde, representado pela clorofila, a amarelo e roxo, representando, principalmente, as antocianinas. Envolvido pela epiderme, encontra-se a mucilagem ou mesocarpo, constituída por uma camada grossa de tecido esponjoso rico em açúcares e pectina que envolve e protege os grãos. As sementes se encontram revertidas por uma dupla camada: o primeiro chamado pergaminho (endocarpo), de cor amarelo pálido e consistência dura e frágil; e a segunda, chamada película prateada (tegumento seminal), mais fina que a anterior e aderida ao grão (ROA, 1999).

O café, ao completar seu desenvolvimento, apresenta coloração vermelha ou amarela, existindo variações. Cortando-se o fruto longitudinalmente, pode-se observar a casca, o grão e um líquido mucilaginoso a eles aderido. O grão contém a semente, usada para fazer a bebida do café. A casca, o café cereja descascado e a mucilagem representam 39%, 39%, e 22% do volume do fruto, respectivamente (ZULUAGA, 2000).

A colheita dos frutos do cafeeiro é feita manual e mecanicamente. Para se obter uma bebida de melhor qualidade, os frutos devem ser colhidos no estágio cereja, identificados pela cor vermelha ou amarela, dependendo da variedade. Devido à desuniformidade de maturação, colhem-se os também os frutos antes e após esse estágio de maturação (SOCCOL, 2002).

O processamento ou preparo dos frutos de café, após a colheita, pode ser feito por via seca, resultando no café natural ou de terreiro, ou por via úmida, obtendo-se o café despulpado. O café cereja descascado (CD) é obtido por um processo intermediário entre estes dois sistemas tradicionais (CUNHA, 1996; LEITE, 2002).

Para obtenção do café cereja descascado (CD), que tem maior valor de mercado, os frutos, assim que chegam da lavoura, passam pelos processos de lavagem e despolpa, depois são submetidos à secagem. Na lavagem e despolpa os cafés verdes e cerejas são separados do café bóia (ROA, 1999).

No Brasil, segundo Leite (1998a), cerca de 90% do café é preparado por “via seca”. A qualidade do produto nesse processo vai depender das condições climáticas durante o preparo dos cafés colhidos, para evitar a fermentação indesejável e a infestação de microorganismos, que ocorre na mucilagem açucarada dos frutos.

No processo por via seca, após a colheita, as cerejas são imediatamente secas ao sol em áreas de secagem. As cerejas são espalhadas em finas camadas ($\pm 30 \text{ kg/m}^2$), revolvidas freqüentemente e cobertas durante a noite no período de chuvas. É, algumas vezes, difícil obter cerejas secas a 12% de umidade por simples secagem ao sol; uma secagem artificial final é então feita em secadores estáticos, rotatórios ou verticais (SOCCOL, 2002).

O processamento por via úmida é mais sofisticado e normalmente produz um café de melhor qualidade, considerando que todas as outras variáveis sejam iguais. É utilizado na Colômbia e em outros países produtores de café arábica suave (LEITE, 1998b; LEITE, 2002).

Segundo Zambolim (2000), no processo via úmida, o café recém-colhido é lavado e são separados os frutos cerejas e verdes; estes seguem direto para fase seguinte em que são separados, através do separador de verdes do despulpador, restando somente os grãos maduros, ideais para consumo mais sofisticado. Posteriormente, os frutos maduros são descascados e levados a um tanque de fermentação, onde permanecem por um período de 24 a 36 horas dependendo da região, e são lavados para eliminação de polpa remanescente. Os grãos são secos ao sol em áreas cimentadas ou artificialmente em secadores. Após a secagem, os grãos são

selecionados eletrônica ou manualmente e então condicionados em sacas (SOCCOL, 2002).

As preocupações crescentes com problemas ambientais, atualmente, valorizam sobremaneira a destinação e o aproveitamento dos resíduos gerados, levando os pesquisadores a desenvolver métodos eficientes para utilização desses resíduos. Além disso, tem havido grande interesse no estudo da composição dos resíduos e subprodutos do processamento dos frutos do cafeeiro, pois tal conhecimento justifica seu determinado uso.

2.2. Resíduos do processamento do café

Segundo Morgano *et al.* (2002), os cafés crus apresentam teores de 8,6 a 12,6% de proteínas, 12,3 a 14 % de lipídios e 3,5 a 4,5% de minerais. Dentre esses minerais essenciais ao funcionamento metabólico normal do organismo destacam-se os macrominerais como: cálcio (954 mg kg^{-1}), potássio (15785 mg kg^{-1}), magnésio (1806 mg kg^{-1}) e fósforo (1380 mg kg^{-1}), e os microminerais como: cobre ($14,7 \text{ mg kg}^{-1}$), cobalto ($0,164 \text{ mg kg}^{-1}$), ferro ($38,5 \text{ mg kg}^{-1}$), manganês ($22,9 \text{ mg kg}^{-1}$) e zinco ($4,93 \text{ mg kg}^{-1}$).

Na composição química da casca encontram-se carboidratos com características biodegradáveis como o amido, pectina, celulose, hemicelulose e lignina (SNIFEN *et al.*, 1992, citados por BARCELOS *et al.*, 2001). Outros compostos localizados na casca são os taninos e a cafeína (SOUZA *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2006).

A celulose é um polissacarídeo constituinte da parede celular dos vegetais, indigeríveis pelas enzimas digestivas humanas, mas sofrem processo de fermentação no intestino grosso (BOAS, 1999). As fibras insolúveis como lignina e a celulose, se ligam a sais biliares e reduzem a absorção de gorduras, sendo ainda úteis no tratamento da constipação e síndrome do intestino irritável, devido à propriedade de aumentar o volume fecal pela absorção de água (ESCOTT-STUMP; MAHAN, 2003).

Segundo Boas (1999), as pectinas, carboidratos formados por unidades básicas de ácido galacturônico, são classificadas como fibras solúveis, com funções de diminuição específica sobre o colesterol - LDL; habilidade de formar gel e aumentar a viscosidade do bolo fecal, retardando o esvaziamento gástrico e a absorção de nutrientes para a corrente sanguínea, o que poderia auxiliar no controle glicêmico (CORREA, 2003).

Estudos prévios mostraram teores de 1,83 e 1,29% de taninos e 0,86 e 0,81% de cafeína na casca de café (BARCELOS *et al.*, 2001). Minerais como potássio (32 g/kg), nitrogênio (17 g/kg), fósforo (1 g/kg) e cálcio (4 g/kg) também podem ser encontrados nesse resíduo (COSTA *et al.*, 2003).

Os taninos fazem parte do grupo de compostos chamados flavonóides, têm o potencial negativo sobre o valor nutritivo dos alimentos, especialmente a redução da digestibilidade das proteínas, a inibição da ação de enzimas digestivas e a interferência na absorção de ferro. Entretanto, eles possuem uma forte ação antioxidante, mas os efeitos do tanino sobre a saúde humana ainda são desconhecidos. Estes compostos têm a capacidade de combinar com proteínas da pele inibindo o processo de putrefação, também conhecido como processo de curtimento do couro (DESHPANDE *et al.*, 1986, citados por SILVA; SILVA, 1999).

A mucilagem é constituída de pectina, com teor entre 30 e 35% do peso seco, sendo o dobro do encontrado em maçãs, comparável ao das frutas cítricas (CLAUDE, 1979, citado por CARVALHO; VEGRO, 1994), monossacarídeos como glicose, galactose, ramnose e arabinose, além de compostos antioxidantes e flavonóides, principalmente as antocianinas e protoantocianinas, e os polifenóis como os ácidos clorogênicos (GRAZIOSI; RATHINAVELU, 2005).

Os ácidos clorogênicos formam uma classe de compostos presentes no café que têm relevantes funções biológicas como antioxidantes, principalmente no cólon, e protegem o organismo contra doenças cardiovasculares (ENCARNAÇÃO; LIMA, 2003).

Avalone *et al.* (2001) encontraram 30%, 9% e 15% de substâncias pécticas, celulose e polissacarídeos não-celulósicos neutros, respectivamente, na mucilagem do café. Além disso, a mucilagem é constituída de proteínas, fibras, compostos antioxidantes, flavonóides, proantocininas incolores, cálcio, magnésio, fósforo, sódio e potássio, dentre outros (ZULUAGA, 2000).

O resíduo líquido é denominado água residuária de café (ARC). Geram-se cerca de 0,1-0,2 litros de ARC na lavagem e 3-5 litros na despolpa de 1 litro de frutos de café, dependendo dos equipamentos e de recirculação de água na unidade de processamento. A ARC possui elevada carga orgânica, podendo provocar problemas na flora e na fauna aquáticas

caso seja lançada em corpos hídricos sem adequado tratamento (MATOS *et al.*, 2001 e 2003; MATOS, 2003; MATOS; LO MÔNACO, 2003).

O resíduo do processamento do café contém água (84%) e substâncias orgânicas como açúcares pectinas e celulose + cinzas, em base seca, apresentam de 45%, 35% e 17%, respectivamente, e não contém cafeína ou tanino, constituindo assim, excelente meio de cultura para crescimento de microorganismos, que se multiplicam rapidamente, provocando forte demanda de oxigênio. Por esta razão, quando a água residuária é lançada em um corpo hídrico, sem adequado tratamento, poderá provocar depleção do oxigênio dissolvido e morte dos seres aquáticos aeróbios, notadamente peixes. Podem-se citar como algumas propriedades medicinais, o uso de fibras dietéticas solúveis para o controle e prevenção de doenças cardiovasculares; as pectinas, que são capazes de formar complexos com o Ca e Fe livres, transportando-os para fora do corpo, reduzindo os níveis séricos destes constituintes nutricionais (ZULUAGA, 2000; MATOS *et al.*, 2001 e 2003; MATOS, 2003; MATOS; LO MÔNACO, 2003).

Como podem ser observadas, muitas são as informações sobre a relação do café com a saúde. Entretanto, pouco se conhece sobre a variedade de substâncias encontradas nos seus resíduos. Alguns componentes do café agem de forma importante no organismo, portanto constituindo um coadjuvante no combate a doenças pelos seus efeitos farmacológicos. Porém é necessário um estudo mais aprofundado para se assegurar os reais efeitos e suas propriedades no organismo animal.

2.3. Utilização dos resíduos do fruto do cafeeiro

Tradicionalmente a casca e a polpa do café obtiveram apenas aplicações limitadas como fertilizantes, ração animal, biocomposto, etc. Esses estudos utilizaram apenas uma fração da quantidade disponível e não foram tecnicamente muito eficientes. Estudos recentes focaram suas aplicações como substratos em bioprocessos. Tentativas de detoxificação também foram realizadas para aplicação em ração animal e utilização do material como substrato na elaboração de produtos com maior valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, aromas e cogumelos. Como a casca e a polpa de café possuem uma boa quantidade de açúcares

fermentescíveis, estes consistem em substrato apropriado para o cultivo de fungos e leveduras (SOCCOL, 2002).

Braham; Bressani (1979) estudaram a composição dos resíduos do processamento dos frutos do cafeeiro e seus usos potenciais, dando ênfase à utilização como alimento para ruminantes, suínos e outras espécies, indicando os tratamentos (físicos e químicos) que cada subproduto deve sofrer antes de sua utilização.

De acordo com a Central de Benefício Ecológico de Anserma, a vermicompostagem, usando como substrato a polpa e a mucilagem do café, mostrou ser um processo eficiente de tratamento, pois transforma estes resíduos em adubo orgânico de excelente qualidade em curto período de tempo. As águas residuais utilizadas no processamento do café também podem ser usadas para irrigar os canteiros de compostagem, garantindo a umidade ideal para a sobrevivência de minhocas (ROA, 1999). Segundo a Embrapa (2007), a polpa do café é um detrito industrial do processamento do café podendo substituir até 20% dos concentrados comerciais usados na alimentação animal, sem efeitos adversos e com uma economia de custos de até 30%.

Barcelos *et al.* (2001) concluíram, em seus estudos sobre a alimentação de ruminantes, que o milho pode ser substituído por polpa de café desidratada em até 30% do total da ração, sem efeitos prejudiciais em termos de aumento de peso ou conversão alimentar. Isto significa que, no final do período de acabamento, cada bezerro criado deixou bastante milho disponível para o consumo humano ou usos alternativos. Além disso, afirmaram que a grande vantagem na utilização da casca de café, comparada ao milho, na alimentação de bezerros é quanto ao armazenamento. A casca do café pode ser armazenada de um ano para o outro sem problemas de ataque de pragas tão comuns ao milho.

Furusho *et al.* (1996), em um estudo realizado com cordeiros, utilizando 15% de casca de café, tratada ou não com uréia, não observaram influência sobre o consumo de matéria seca (MS) e peso bruto (PB).

Além de ruminantes, testes de alimentação com polpa de café têm sido realizados com peixes, aves, cordeiros e coelhos. Nos testes de alimentação têm sido incluídas a determinação do aumento diário de peso, a ingestão diária de substâncias secas e a eficiência na conversão alimentar

(FURUSHO *et al.*, 1996; BARCELOS *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2006; PARRA *et al.*, 2008).

A ensilagem é uma alternativa válida para o manejo e o armazenamento das enormes quantidades de polpa de café produzida nas propriedades rurais. A inclusão de ensilagem nas dietas de alguns animais de fazenda pode contribuir para a redução dos custos de produção de carne e leite, em particular nos países em desenvolvimento, contudo, mais trabalhos são necessários para comprovar tal fato (ROCHA *et al.*, 2006).

Atualmente, a casca é reaproveitada para adubar as lavouras, enquanto a água residuária gerada nas unidades de processamento é descartada. Os restos de cascas e mucilagem dos frutos constituem um excelente substrato para o crescimento de microorganismos (PELIZER *et al.*, 2007).

Diante do exposto, sabendo ainda que grande parte dos resíduos gerados no processamento do café é descartada e/ou não é habitualmente aproveitada, é possível inferir que fonte potencial de nutrientes, especificamente na casca e mucilagem, tem papel fundamental no organismo animal. Além disso, sabe-se que a casca e a polpa do café possuem uma boa quantidade de açúcares fermentescíveis, constituindo um substrato apropriado para o crescimento de fungos e leveduras.

2.4. Doenças cardiovasculares e *Monascus ruber*

Desde a década de 60, as doenças cardiovasculares vêm apresentando aumento progressivo em todo o mundo, sendo que as dilipidemias são consideradas como um dos fatores determinantes para o desenvolvimento dessas enfermidades, principalmente aterosclerose. A elevação nas concentrações de triacilglicerol plasmático (TGL), colesterol total (CT) e sua fração LDL-c (low-density lipoprotein cholesterol), associadas à diminuição nos valores de HDL-c (higher-density lipoprotein cholesterol), aumentam a probabilidade do desenvolvimento dessas patologias (GRILLO *et al.*, 2005). Segundo Souza (2005), as doenças cardiovasculares são responsáveis por altas taxas de morbimortalidade no mundo, em países desenvolvidos ou em desenvolvimento.

O perfil lipídico se altera de maneira assintomática, podendo iniciar na vida intra-uterina e, de forma silenciosa, permanecer assim por longos

períodos, levando à elevação de pressão sanguínea, infartos, acidentes vasculares cerebrais, entre outras (TEIXEIRA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2006).

A hiperlipidemia pode ser traduzida como excesso de substâncias lipidêmicas no sangue, como as lipoproteínas, partículas resultantes da combinação de lipídios e proteínas e que têm a função de carrear o colesterol circulante no sangue para os tecidos. As lipoproteínas são diferenciadas pela sua densidade e respectiva função (BIGGERSTAFF; WOOTEN, 2004; LIMA *et al.*, 2006).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Ela se manifesta clinicamente através das doenças cardiovasculares, que compreendem as doenças cardíacas e as doenças cerebrovasculares. Segundo a III Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias, a aterosclerose é um processo dinâmico, evolutivo, a partir do dano endotelial de origem multifatorial, com características de reparação tecidual. Segundo Portal (2004), a aterosclerose é uma doença complexa que envolve muitos tipos celulares e mediadores circulantes, resultando em um estado inflamatório na parede arterial.

A aterosclerose se caracteriza por alterações da camada íntima, representadas por acúmulo de lipídios, carboidratos complexos, componentes do sangue, células e material intercelular. Inicia-se com a migração de monócitos da corrente sanguínea para depositarem nas paredes arteriais, acumulando gorduras (principalmente colesterol) e formando as placas ateroscleróticas ou ateromas. As artérias afetadas perdem elasticidade e se estreitam gradativamente, podendo se romper. O contato das substâncias do interior da placa com o sangue produz sua imediata coagulação e conseqüente obstrução total e súbita do vaso (BOTZ *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2005).

O acúmulo de lipídios na parede arterial induzirá a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. Estas citocinas irão promover o recrutamento de monócitos e o acúmulo de células espumosas, que são os tipos celulares mais comuns nas estrias gordurosas (OSTERUD; BJORKLID, 2003). A formação e acúmulo de células espumosas caracterizam a estria gordurosa, e contribuem ainda para o aumento do

tamanho da lesão, que pode progredir para uma lesão intermediária e finalmente para uma lesão complexa (FERREIRA *et al.*, 2007).

Determinados fatores se associam ao desenvolvimento mais precoce e acelerado da aterogênese. Segundo Scott (2004), dentre estes, estão as dislipidemias, que constituem fatores de risco modificáveis para a aterosclerose.

A modificação da dieta é um ponto central do tratamento da hipercolesterolemia. Estudos epidemiológicos têm fornecido evidências sobre a importância da dieta como fator de risco para doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e neoplasias. Vários alimentos e nutrientes têm sido relacionados tanto à ocorrência quanto à prevenção de doenças crônicas em diferentes populações (LOPES *et al.*, 2005). Segundo Bertolino *et al.* (2006), o consumo de gorduras trans vem sendo apontado como um fator de risco importante tanto quanto o consumo de ácidos graxos saturados para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em ambos os gêneros.

Ang kak é um produto fermentado por fungo do gênero *Monascus* muito utilizado pelos povos asiáticos, e é um produto obtido pela fermentação do arroz por microorganismos do gênero *Monascus*. Tem um sabor típico e é muito utilizado como corante (principalmente de carnes, peixes e aves) e condimento na produção de alimentos e para dar sabor aos mesmos. Em doses de 0,5-1,0g/kg não têm objeção para sua utilização (WONG; KOEHLER, 1983; FINK-GREMMELS; LEISTNER, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Segundo Lin (1973), fungos do gênero *Monascus* têm sido utilizados há milhares de anos na China na indústria de fermentação para preparação de vinho tinto de arroz, vinho tinto Shao-Hsing e alimentos nativos, como o queijo de soja vermelho.

Os pigmentos de Ang Kak são utilizados nos países asiáticos, não só pela coloração, mas também pelo efeito antibacteriano e pela melhoria das propriedades organolépticas produzidas nos alimentos (FINK-GREMMELS; LEISTNER, 1989).

Palo *et al.* (1960) isolaram amostras de ang kak de um mercado nas Filipinas e identificaram o microorganismo *Monascus purpureus*. Para produção da cor vermelha no arroz por este fungo, foi observado que essa

estirpe em estudo apresentou bom crescimento na faixa de pH 3,5 a 7,5, sendo a temperatura ótima cerca de 27°C.

As condições ideais para o crescimento de *Monascus purpureus* são temperatura de incubação de 30°C, pH 8,0, substrato rico em amido (farinha de amido de arroz) e quantidade suficiente de nitrogênio (KUNZ; OBER, 1987).

Os fungos do gênero *Monascus* produzem grande quantidade de enzimas hidrolíticas, como amilases, proteases e lipases, além de pigmentos vermelhos, amarelos e purpúreos. Os principais pigmentos incluem: monascorubina, rubropunctatina, monascina, ankaflavina, rubropunctaminase e monascorubramina (LIN, 1973; WONG; KOEHLER, 1983).

Segundo Erdogrul *et al.* (2005), o arroz fermentado por fungos do gênero *Monascus* pode auxiliar na redução dos níveis séricos de colesterol total, LDL-c e triacilgliceróis, bem como aumentar os níveis de HDL-c. Estudo realizado utilizando arroz fermentado por *Monascus ruber* na alimentação de coelhos mostrou a eficácia do mesmo nos níveis séricos de triacilgliceróis e colesterol (FONSECA, 2001).

Alimentos fermentados por *Monascus* têm sido utilizado em animais e em humanos para reduzir os níveis de lipídios séricos, pela atividade inibidora da HMG-CoA redutase, enzima chave da biossíntese de colesterol em humanos (ENDO, 1979; WANG *et al.*, 1997). Segundo Endo *et al.* (1985), a monacolina k (mevinolina), isolada a partir de fungos do gênero *Monascus ruber*, é um composto com ação hipocolesterolêmica que inibe a enzima HMG-CoA redutase e que pode ajudar na redução de lipídios séricos.

Existem muitos tipos de medicamentos de origem sintética capazes de normalizar as hiperlipidemias, sendo os mais utilizados as estatinas, os fibratos e os inibidores de HMG-CoA redutase. As drogas inibidoras da HMG-CoA redutase reduzem, efetivamente, a mortalidade e os eventos coronarianos, representando poderoso instrumento na prevenção e no controle da aterosclerose (JORGE *et al.*, 2005). Contudo, existem produtos de origem natural, ou seja, vegetais, substâncias deles isoladas e metabólitos de fungos que agem especificamente inibindo a enzima HMG-

CoA redutase, onde, neste sentido, destacam-se os produtos do *Monascus ruber* (GONÇALVES *et al.*, 2000).

Desta forma, o resíduo do fruto do cafeeiro, por ser rico em macro e micro nutrientes, flavonóides, fibras, dentre outros compostos, torna-se um meio indutor para o crescimento e cultivo do fungo, porém, são necessários estudos objetivando esclarecer melhor sua atuação nesse contexto. Em relação à ação desse resíduo fermentado por *Monascus* no metabolismo animal, estes estudos devem ser conduzidos utilizando modelos experimentais que se assemelham à lesão vista em humanos. Neste caso, os camundongos Apo E são adequados para esse tipo de ensaio biológico.

2.5. Camundongos deficientes no gene da apoproteína E como modelo experimental

Na última década, novos horizontes foram abertos para a pesquisa das patologias cardiovasculares e a demanda pelo uso de modelos animais aumentou porque uma enorme parte dos genes de alguns animais como o camundongo é comum a animais e seres humanos (BRAUNWALD *et al.*, 2001; JANSSEN *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2006).

Os seres humanos e os camundongos possuem, apesar de algumas diferenças, o mesmo conjunto de genes que modulam o metabolismo das lipoproteínas, sendo o gene da apolipoproteína E (Apo E) um dos mais importantes (HOFKER *et al.*, 1998; PELUZIO *et al.*, 2001; JANSSEN *et al.*, 2002). Animais como os camundongos possuem baixos níveis de colesterol VLDL e LDL e transportam a maior parte do colesterol em HDL, o que os faz resistentes naturais ao desenvolvimento da aterosclerose, desenvolvendo lesões semelhantes às encontradas em humanos (ZHANG *et al.*, 1992; PLUMP *et al.*, 1992; BRESLOW, 1996; NEUZIL *et al.*, 1998; HOFKER *et al.*, 1998).

Os camundongos são os modelos animais mais utilizados para o estudo dos lipídios e da aterosclerose. No entanto, as lesões ateroscleróticas induzidas por dietas hipercolesterolêmicas são limitadas em tamanho, complexidade e distribuição. Isto pode ser modificado com o desenvolvimento de camundongos transgênicos e *knockout* para determinados genes, os quais podem produzir efeitos notáveis nas

lipoproteínas plasmáticas e nas lesões arteriais até mesmo na ausência de manipulações dietéticas (FAZIO; LINTON, 2001).

Existem 3 alelos em seres humanos para Apo-E: E2, E3 e E4. A elevação dos níveis séricos de colesterol e triacilgliceróis é causada pela homozigose para o alelo E2 e está associada ao acúmulo de remanescentes de quilomicrons e VLDL no plasma, caracterizando a dislipidemia, podendo desenvolver xantelasma, xantomas tubero-eruptivos e doença coronariana aterosclerótica (VAN REE *et al.*, 1994; QUINTÃO; NAKANDAKARE, 1997).

Apo E é sintetizada no fígado, cérebro, intestino e em outras células e tecidos periféricos, inclusive macrófagos (ZHANG *et al.*, 1992; MAZZONE, 1996; FAZIO *et al.*, 1997). É uma glicoproteína rica em arginina com 34 Kda e 299 aminoácidos, presente como componente estrutural da superfície de QM, QMr, VLDL, IDL e HDL (MARINETTI, 1990; PLUMP *et al.*, 1992; VAN REE *et al.*, 1994). Serve de ligante das lipoproteínas nos receptores de Apo E (receptores de remanescentes) do fígado ou receptores B/E do fígado e tecidos periféricos (MARINETTI, 1990; ALVAREZ-LEITE, 1995).

Camundongos *Knockout* são produzidos a partir da combinação homóloga em células tronco embrionárias que são introduzidas em um zigoto (RUDOLPH *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2006). Segundo Breslow (1996), a deficiência de Apo E resulta em níveis de colesterol elevados devido à remoção defeituosa das lipoproteínas remanescentes no plasma (QM e VLDL), constituindo o estímulo aterogênico nestes animais. Esses camundongos possuem colesterol plasmático cerca de cinco vezes mais alto do que os normais e a evolução da lesão gordurosa na aorta proximal se desenvolvem aos três meses de idade (ZHANG *et al.*, 1992).

As lesões mostram a semelhança existente na composição lipídica de VLDL extraída de placas humanas avançadas e do plasma de camundongos Apo E reforçando a validade desse modelo animal para o estudo experimental da aterosclerose (NEUZIL *et al.*, 1998; PELUZIO *et al.*, 2001).

Segundo Nakashima *et al.* (1994), camundongos *knockout* Apo E alimentados com dieta comercial ou dieta aterogênica apresentam diferenças no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. Observando a seqüência dos eventos celulares, nota-se que o desenvolvimento da lesão nesses animais inicia-se na raiz da aorta e na curvatura menor do arco

aórtico, seguindo os ramos da artéria braquiocefálica, carótida comum direita, artéria mesentérica superior e renal, artéria pulmonar e ramos da aorta abdominal.

As lesões aparecem em 10 semanas nos animais alimentados com dieta comercial, como nódulos amarelados, denominadas células espumosas (cell foam). Com 20 a 30 semanas de vida aparecem as placas fibrosas devido a adesão de células mononucleares formadoras das células espumosas (PELUZIO, 2001).

No entanto, células espumosas se desenvolvem em animais com 8 semanas de idade alimentados com dieta aterogênica, e com 15 semanas a lesão apresenta placa fibrosa. Lesões avançadas, apresentando centro necrótico e grande quantidade de tecido fibroso, podem ser observadas no período de 20 a 40 semanas (REDDICK *et al.*, 1994; NAKASHIMA *et al.*, 1994).

Esse animal tornou-se um modelo atraente devido ao pequeno tamanho, curto período gestacional, crescimento rápido dos filhotes e baixo custo de manutenção. Além disso, a semelhança da lesão em diversos estudos demonstrou que os mecanismos fisiológicos dos camundongos são próximos aos observados em humanos, o que torna interessante o seu emprego em pesquisas (CARVALHO *et al.*, 2006; JANSSEN *et al.*, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos resíduos de café

Foi utilizado no experimento o resíduo do café da variedade catuaí, da espécie *Coffea arabica* L. As amostras foram coletadas em fazendas da Zona da Mata Mineira, na cidade de Viçosa – MG no período de maio a agosto de 2007. Os resíduos foram recolhidos imediatamente após o processamento por via úmida, armazenados em sacos plásticos, lacrados e transportados até o laboratório de armazenamento e secagem de resíduos do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. O material foi separado em bandejas de aço inoxidável e colocado em estufa em temperatura média de 55°C até atingir umidade inferior a 10%.

Após a secagem, foi armazenado em sacos plásticos lacrados para a realização das análises.

3.2. Microorganismo

Para realização do estudo foi utilizada a cepa do fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 1236, adquirida da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas, SP.

3.2.1. Conservação da cepa

A conservação da cepa foi feita em meio PDA. No preparo desse meio utilizou-se Ágar de Batata Dextrosado (da marca Biobrás®). Foram pesados 39g deste ágar e dissolvidos em 1L de água destilada para hidratar por um período de 15 minutos. Depois de hidratada, a suspensão foi aquecida agitando constantemente, ficando sob fervura por 5 minutos. Foram adicionados 10 mL dessa suspensão em tubos de ensaio que foram tampados com rolhas de algodão envolvidas em papel alumínio, e em seguida, esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e inclinados (ágar inclinado). Depois de resfriado o meio PDA, foi feita a repicagem da cepa e incubação à 28°C por 7 dias sendo, após esse período, conservado em geladeira.

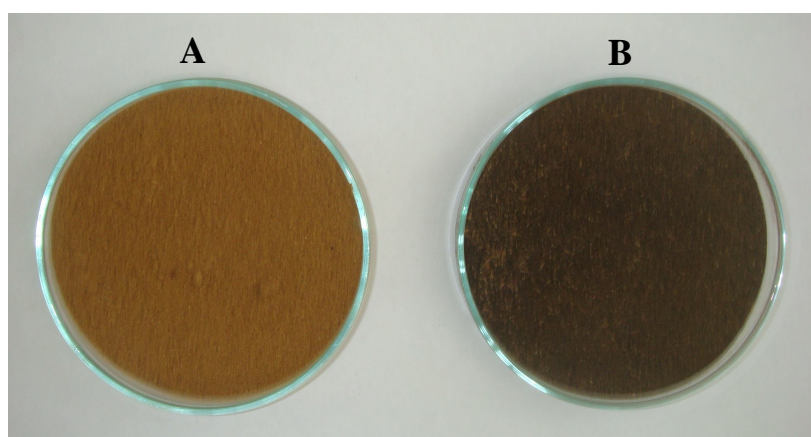
3.3. Produção do resíduo fermentado

Para produção do resíduo fermentado foram inicialmente pesados 50g de resíduo seco e colocados em erlenmeyer de 250mL. Em cada frasco foi adicionado 95mL de uma solução contendo $MgSO_4$ 0,1%, KH_2PO_4 0,1% e NH_4Cl 1%, para enriquecimento do meio e elevação do teor de umidade. Os erlenmeyers foram vedados com rolhas de algodão, sendo estas envolvidas em papel alumínio e esterilizados em autoclave à 120°C por 20 minutos, e então resfriados em temperatura ambiente.

Depois de resfriados, os meios foram inoculados com cepas mantidas em tubos de ensaio com PDA. Para o processo de inoculação foram adicionados 7mL de água destilada esterilizada nos tubos contendo a cepa (*Monascus ruber*), que foram agitados manualmente. A inoculação foi realizada, utilizando-se uma pipeta esterilizada e adicionando-se 5mL da suspensão de esporos em cada erlenmeyer contendo o resíduo. Em seguida, os frascos foram agitados manualmente e colocados em estufa incubadora a 28°C por 13 dias.

Depois de fermentado (Figura 1), o resíduo foi separado em bandejas e colocado em estufa com circulação de ar à temperatura de 55°C, durante 24 horas. Após resfriamento, o resíduo foi triturado em moinho e o pó obtido foi utilizado como parte da dieta experimental dos camundongos.

Figura 1 – Resíduo não fermentado (A) e fermentado (B) triturados.



3.4. Caracterização do resíduo bruto e do resíduo fermentado

Os resíduos foram caracterizados quanto ao teor de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos, matéria seca e fibras.

O teor de água foi determinado pela secagem por aquecimento direto em estufa a 105°C, até atingir o peso constante.

Para determinação das cinzas, as amostras foram carbonizadas em baixa temperatura e incineradas em forno de mufla a 550°C por 6 horas.

A quantificação dos lipídios ou extrato etéreo foi obtida após pesagem do resíduo seco e extração com éter de petróleo, em extrator soxhlet por 8 horas.

As proteínas foram quantificadas pelo método semimicro proposto por Kjeldahl.

O teor de carboidratos foi calculado por diferença percentual, subtraindo-se do total da soma de proteínas, lipídios, cinzas e umidade.

A matéria seca foi obtida a partir da umidade encontrada.

O teor de fibras foi encontrado utilizando-se informações da literatura. O resíduo de café sem fermentar possui em média 75% de fibras (BARCELOS *et al.*, 2002) e o resíduo que sofreu algum processo de fermentação possui em média 65% de fibras (BERNARDINO *et al.*, 2005). A partir desse dado foi calculada a quantidade de fibras da matéria seca do resíduo e subtraída da quantidade de carboidratos encontrada, obtendo-se assim o valor total de fibras do resíduo.

Todas as metodologias utilizadas no estudo foram conforme descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (Brasil, 2005).

3.5. Ensaio Biológico

3.5.1. Origem e manutenção dos animais

Para realização do estudo foram utilizados 30 camundongos *knockout* para o gene Apo E, de ambos os sexos, pesando em média 22g, obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV e da UFMG.

Durante o experimento os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, com ventilação natural e em ciclos de luminosidade de 12 horas (8:00 às 20:00 horas). A temperatura média mantida durante o experimento foi de 22°C.

Antes de iniciar o tratamento os animais passaram por um período de adaptação de 15 dias, quando receberam ração comercial Purina® e água “*ad libitum*”.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (Processo nº 11/2008).

3.5.2. Adição do resíduo fermentado como parte da dieta aterogênica de camundongos *knockout Apo E*

Ao completar 10 semanas de idade, os animais foram divididos em 5 grupos e submetidos a diferentes tratamentos, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Distribuição dos camundongos *knockout Apo E* em cada grupo e seus respectivos tratamentos

Grupo	Tratamento
G1	Dieta Aterogênica
G2	Dieta Aterogênica + resíduo sem fermentar 2%
G3	Dieta Aterogênica + resíduo sem fermentar 10%
G4	Dieta Aterogênica + resíduo fermentado 2%
G5	Dieta Aterogênica + resíduo fermentado 10%

Uma dieta aterogênica é composta por carboidratos, proteínas, lipídios, fibras, vitaminas e minerais, sendo a porção lipídica constituída de 1% de colesterol e 5% de ácidos graxos saturados (A.O.A.C., 1989). Esta dieta induz a hiperlipidemia por meio da formação de placas de ateroma em vasos e aorta dos camundongos, bem como aumenta os lipídios sanguíneos (triacilgliceróis, colesterol total e frações).

As dietas foram calculadas e adequadas para que a ingestão dos nutrientes não fosse desigual nos diferentes grupos de tratamento (Tabela 1). Todas foram preparadas manualmente, conservadas em freezer (congelador) e ofertadas aos animais durante o estudo.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais (g/100 g)

Componente	G1	G2*	G3*	G4**	G5**
Sacarose	48,27	47,94	46,43	47,86	46,24
Caseína	20,0	19,7	18,61	19,6	18,0
Celulose	6,72	5,38	-	5,56	0,87
Óleo de Soja	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Colesterol	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Gordura Vegetal hidrogenada	16,0	15,97	15,86	15,97	15,88
Mistura Vitamínica	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Mistura Mineral	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Colina	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Resíduo	-	2,0	10,0	2,0	10,0
Total	100g	100g	100g	100g	100g

* Resíduo sem fermentar ** Resíduo fermentado

3.6. Crescimento

Durante as 10 semanas de experimento os animais tiveram acesso livre à água e comida. O peso corporal individual foi verificado semanalmente e a ingestão alimentar diariamente. O índice hepático (relação “peso do fígado/peso corporal x 100”) foi utilizado como parâmetro de avaliação do crescimento dos animais.

Após 10 semanas os animais foram eutanasiados para avaliação do efeito dos tratamentos.

3.7. Amostras de sangue

Ao final do experimento os animais foram pesados, após jejum de 12 horas, anestesiados com éter etílico, eutanasiados e colhidas amostras de sangue para dosagem de triacilgliceróis, colesterol total e suas frações. O sangue foi retirado por exsanguinação por secção da aorta abdominal. O soro foi obtido por centrifugação a 5000 rpm por quinze minutos em centrífuga de mesa (Marconi, modelo M.A. 860). As dosagens sorológicas foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé®), utilizando-se kits enzimáticos da marca BioMérieux®.

3.8. Dissecção dos órgãos

O fígado, coração e aorta foram removidos e lavados em tampão salino fosfato (PBS) e fixados pela imersão em paraformaldeído 10% em PBS 0,1 M em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, os órgãos foram transferidos para uma solução de álcool 70% onde foram conservados até a análise histopatológica.

3.9. Análises histopatológicas e morfométricas

Fragmentos de fígado e tecido cardíaco foram processados conforme rotina para inclusão em parafina, de forma orientada, de modo a obterem-se cortes histológicos consecutivos, com 5 μm de espessura, a partir da superfície de inclusão, sendo preparadas 2 lâminas contendo em média 10 cortes por animal. As preparações foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) sendo então codificadas e submetidas à análise. Os cortes foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo manual da American Optical® do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária.

Para análise do tecido hepático foi selecionado aleatoriamente o fígado de 3 animais por grupo para contagem de células em toda área, sendo explorados 20 campos por animal, totalizando 60 campos por grupo. Para analisar e quantificar as células foi utilizado microscópio Olympus® BX41 do Laboratório de Biologia Estrutural e Histofisiologia Reprodutiva e Digestiva do Departamento de Biologia Geral.

A região inicial da aorta foi utilizada para as análises histológicas do tecido cardíaco. Todos os cortes histológicos obtidos foram examinados com o objetivo de localizar as estruturas anatômicas referenciais da válvula aórtica e da raiz da aorta. De acordo com a presença dessas estruturas referenciais, o corte histológico no nível anatômico da válvula aórtica foi selecionado para as medidas. Os cortes foram obtidos em intervalos de 5 μm , sendo a extensão média explorada de 20-30 μm . Para análise morfométrica foram capturadas imagens dos cortes histológicos dos 5 grupos, sendo que para padronização do n dos grupos foram sorteadas, aleatoriamente, 8 imagens para realização das medidas.

As imagens foram obtidas, no Laboratório Associação de Micorrizas do Departamento de Microbiologia, em microscópio Olympus® Bx50 acoplado a uma câmera digital Q-Color 3 Olympus®, sendo as imagens capturadas utilizando o programa Q-Capture Pró, versão 6.0.0.412. As áreas das lesões foram dimensionadas utilizando o programa Image Pró Plus versão 4.5.0.29.

4. Análises estatísticas

Foi utilizado o software SigmaStat, versão 2.03, para análise descritiva dos dados e para os testes de comparação de grupos independentes. Para avaliação da distribuição das variáveis foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv. Considerando o número amostral por grupo de animais e que

muitas variáveis não apresentaram distribuição normal foi realizado testes não paramétricos para a comparação de dois grupos independentes, utilizando-se o teste de Mann Whitney. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi realizada análise paramétrica seguida do teste t. O nível de significância adotado foi de 95% com valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do resíduo do café fermentado e não fermentado

Os resultados da análise bromatológica do resíduo de café fermentado e não fermentado são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição bromatológica dos resíduos do café fermentado e sem fermentação (%)

	Resíduo sem Fermentar	Resíduo Fermentado
Água	10,24	9,95
Cinzas	8,57	10,18
Lipídios	1,40	1,17
Proteínas	11,73	17,04
Carboidratos totais*	67,90	61,80
Matéria seca	89,70	90,05

* Calculado por diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de proteína, lipídio, água e cinzas.

Os teores de água, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos e matéria seca do resíduo de café sem fermentar, obtido por meio da caracterização bromatológica, estão de acordo com os valores médios descritos na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2001; SOCCOL, 2002; BARCELLOS *et al.*, 2002; BLYENY, 2004; BERNARDINO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2006; FARIA *et al.*, 2007; PARRA *et al.*, 2008). Em contrapartida, não foi encontrado relatos sobre a composição bromatológica do resíduo de café fermentado por *Monascus*, uma vez que esse é o primeiro estudo realizado com o resíduo fermentado por este microrganismo e utilizando esse modelo animal para avaliar os efeitos “*in vivo*”.

A fermentação promoveu aumento no teor de proteínas ao mesmo tempo em que provocou diminuição do teor de carboidratos. Esses parâmetros servem como indicadores para o crescimento do fungo utilizado no estudo, uma vez que, o processo fermentativo aumenta a massa protéica do microrganismo mostrando seu desenvolvimento no meio. Pelizer (2007) observou que utilizando o microrganismo *Spirulina platensis* na fermentação de resíduos da agroindústria brasileira, visando à redução do impacto ambiental, houve um incremento protéico após o processo de fermentação. De acordo com Kim (2008), produtos, como o arroz e

preparações a base de arroz, fermentados com fungos do gênero *Monascus* diminui a concentração de carboidratos ao longo da fermentação.

Sampaio (2002), utilizando o fungo *Monascus* para fermentação de arroz, também mostrou aumento dos valores de proteínas e lipídios ao mesmo tempo em que promoveu uma diminuição do teor de carboidratos, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho.

Segundo Macedo (2005), o resíduo de café constitui excelente substrato para fermentação e crescimento de microorganismos. É rico em polifenóis, taninos, cafeína, lignina, celulose, hemicelulose, antocianinas, flavonóides, vitaminas, minerais e outros compostos bioativos que atuam como antioxidantes (GRAZIOSI; RATHINAVELU, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2005; PARRA *et al.*, 2008). A quantificação destes compostos não fazia parte dos objetivos deste estudo. Contudo, sua presença pode justificar alguns dos resultados encontrados, uma vez que os antioxidantes estão diretamente relacionados com a diminuição da evolução das placas de ateroma.

4.2. Consumo alimentar e ganho de peso dos animais

Ao final de 10 semanas de tratamento, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis peso e consumo alimentar entre os grupos, mostrando que a evolução ponderal e a ingestão dietética foi igual para os diferentes tratamentos e que a fermentação do resíduo não interferiu nestes parâmetros (Tabela 3).

Tabela 3 - Peso inicial, peso final, variação de peso, consumo alimentar e peso relativo do fígado de camundongos *knockout Apo E* submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Variação (g)	Consumo Alimentar* (g/dia)	Índice Hepatopométrico (%)
G1	24,3 ± 2,6	25,6 ± 1,2	1,3 ± 1,8	3,93±1,28	6,06 ± 0,58 ^a
G2	24,0 ± 1,4	25,2 ± 1,4	1,2 ± 0,5	3,99±0,63	5,99 ± 0,11 ^{a,b}
G3	21,7 ± 4,4	25,5 ± 2,0	3,7 ± 2,9	4,14±1,28	6,51 ± 0,49 ^{a,c}
G4	21,5 ± 3,2	25,0 ± 1,8	3,5 ± 1,7	4,08±0,93	5,50 ± 0,15 ^{a,b,d}
G5	21,0 ± 3,4	23,1 ± 1,2	2,1 ± 2,3	3,44±0,35	5,97 ± 0,16 ^{a,b,d}

Nota: Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 6 animais nos grupos G1 (controle) e G5 (10% resíduo fermentado) e 4 animais nos grupos G2 (2% resíduo não fermentado), G3 (10% resíduo não fermentado) e G4 (2% resíduo fermentado).

* Média do consumo alimentar calculada, considerando os períodos inicial, intermediário e final do experimento.

Letras diferentes diferem entre si, onde $p < 0,05$, Teste t

Segundo Mizubuti (2006), camundongos LDLr *knockout* que ingeriram 5% e 8% de infusão de café durante quatro semanas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na evolução ponderal e no consumo dietético. Utilizando-se o mesmo modelo animal, Fernandes (2006) verificou que não houve diferença estatística no peso e no consumo alimentar nos animais tratados com goma guar parcialmente hidrolisada em diferentes concentrações. No presente estudo, utilizando-se modelo animal semelhante, o consumo de resíduo de café fermentado e não fermentado em diferentes concentrações não influenciou no consumo alimentar e ganho de peso dos animais.

Camundongos *knockout Apo E*, utilizados nesse estudo e em outros experimentos em que foram submetidos a diferentes tratamentos, como suplementação de α -tocoferol, suplementação de ferro e *Lactobacillus delbrueckii* não mostraram diferença estatisticamente significativa no ganho de peso e consumo ao longo dos estudos (LEE *et al.*, 1999; PELUZIO *et al.*, 2001; PORTUGAL *et al.*, 2006).

Tratando-se do consumo do resíduo de café como suplemento alimentar para bovinos, ovinos, suínos e cordeiros, estes apresentaram diminuição estatisticamente significativos no consumo alimentar e no ganho de peso quando o resíduo foi consumido diariamente, em concentrações entre 10,5 - 20% (FURUSHO *et al.*, 1996; BARCELOS *et al.*, 1996;

OLIVEIRA *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2006; PARRA *et al.*, 2008). Deve-se ressaltar que esses animais são ruminantes e camundongos são monogástricos. Não foram encontrados relatos na literatura de animais iguais ou semelhantes aos utilizados nesse estudo e que receberam esse tipo de alimentação.

A Figura 1 ilustra os resultados referentes ao consumo alimentar dos animais dos diferentes grupos, mostrando que a média de consumo não apresentou alterações durante o experimento.

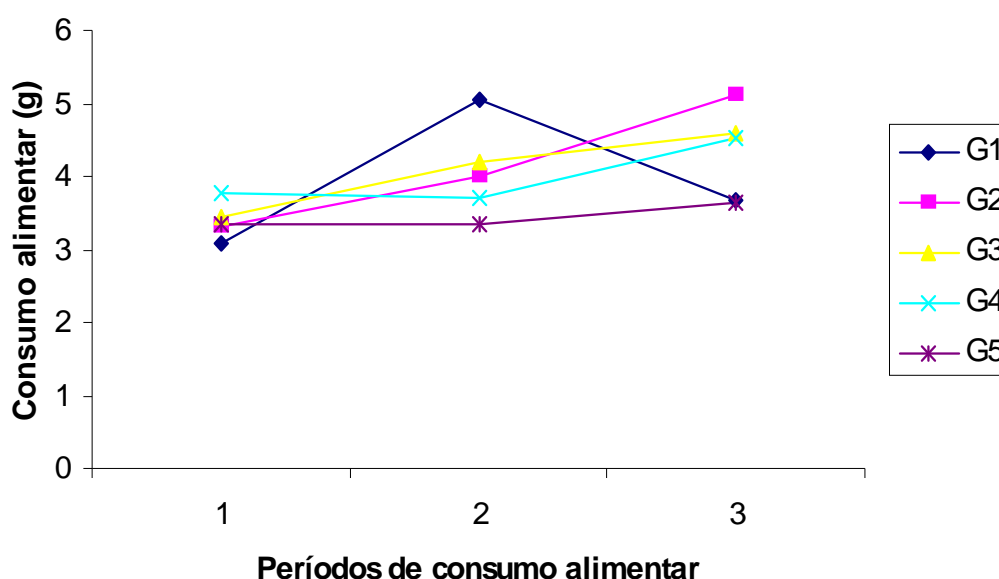


Figura 1 – Evolução do consumo alimentar dos grupos de animais no início (1), meio (2) e fim (3) do experimento durante as 10 semanas de tratamento com resíduo de café fermentado e sem fermentar. Grupo G1 (controle), grupo G2 (2% resíduo não fermentado), grupo G3 (10% resíduo não fermentado), grupo G4 (2% resíduo fermentado) e G5 (10% resíduo fermentado).

Os valores encontrados no presente estudo corroboram com os valores encontrados na literatura, pois as concentrações utilizadas no trabalho são inferiores às concentrações utilizadas nos estudos que verificaram as alterações no consumo alimentar e ganho de peso dos animais (FURUSHO *et al.*, 1996; BARCELOS *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2006; PARRA *et al.*, 2008).

A variável índice hepático (peso do fígado/peso corporal final x 100) foi utilizada para avaliar o crescimento dos animais, uma vez que é o fígado o principal órgão do metabolismo lipídico, de formação das lipoproteínas e de armazenamento de vitaminas (GUYTON, 1992). O seu aumento sugere um comprometimento no desenvolvimento normal desses animais, bem como indica se há hepatotoxicidade. Não foi encontrado na literatura estudos que abordassem essa variável em experimento com esse modelo animal e alimentação semelhante à utilizada neste trabalho.

Analisando os dados da Tabela 3 e comparando os valores obtidos para os grupos de tratamento com o grupo controle (G1), nota-se que as médias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Porém, ao se comparar os grupos entre si, observa-se que o grupo que recebeu a dieta contendo 10% de resíduo sem fermentação (G3) apresentou um aumento estatisticamente significativo no fígado quando comparado aos grupos que receberam 2% do resíduo sem fermentar (G2), 2% de resíduo fermentado (G4) e 10% de resíduo fermentado (G5).

O grupo que recebeu resíduo fermentado a 2% (G4) apresentou o menor índice hepático, sugerindo que o consumo do resíduo nessa concentração não apresentou hepatotoxicidade, resultado este confirmado pela histologia.

A Figura 2 ilustra as médias do índice hepático dos camundongos alimentados com diferentes concentrações dos resíduos com e sem fermentação.

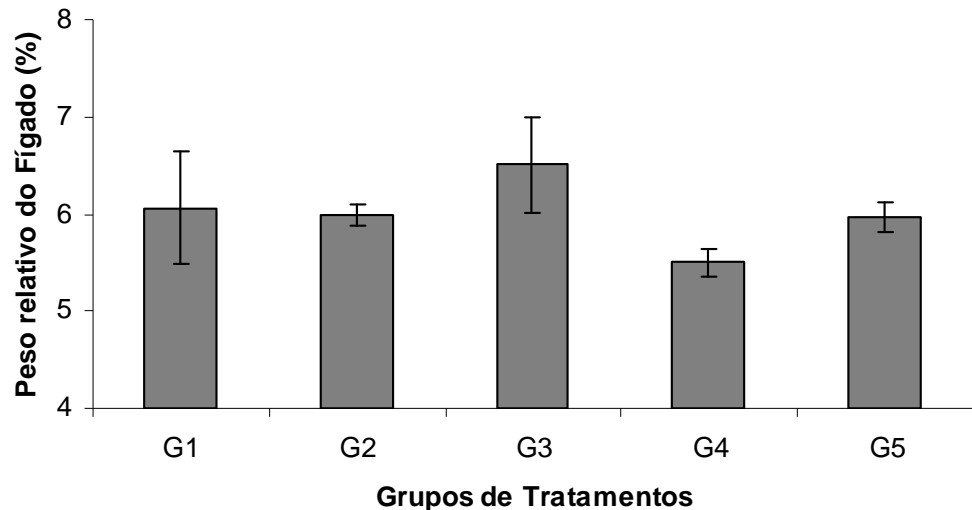


Figura 2 – Peso relativo do fígado dos camundongos que receberam diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e sem fermentar durante as 10 semanas de tratamento. Grupo G1 (controle), grupo G2 (2% resíduo não fermentado), grupo G3 (10% resíduo não fermentado), grupo G4 (2% resíduo fermentado) e G5 (10% resíduo fermentado).

As médias do índice hepático encontrados no estudo demonstraram que não houve comprometimento no crescimento dos animais submetidos aos diferentes tratamentos (G2, G3, G4 e G5) quando comparados com o grupo controle (G1).

4.3. Efeito do resíduo de café no perfil de lipídios séricos de camundongos knockout *Apo E*

A Tabela 4 mostra os valores médios de triacilgliceróis, colesterol total e frações, nos diferentes grupos de tratamento, encontrados no estudo. Não foi encontrado na literatura relatos da utilização do resíduo de café na alimentação de animais com essa finalidade. Dessa forma, serão utilizadas como parâmetros comparativos a bebida do café, alimentos e modelos animais semelhantes.

Tabela 4 – Valores médios dos teores de triacilgliceróis, colesterol total e frações de camundongos Knockout Apo E submetidos a diferentes tratamentos

Parâmetros		G1	G2	G3 ¹	G4 ¹	G5 ¹
Colesterol (mg/dL)	Média±DP	1356,0±437,2	1699,6±221,0	1423,7±99,3	1122,8±193,5	1509,9±227,0
	Mediana	1439,4	1635,7	1398,0	1119,7	1491,0
TG (mg/dL)	Média±DP	118,1±39,6**	57,3±6,2**	124,3±79,6	162,3±106,6	213,9±180,9
	Mediana	105,1	60,2	124,5	111,2	155,6
LDL (mg/dL)	Média±DP	1465,1±429,6	1672,3±220,1	-	-	-
	Mediana	1637,8	1607,8	-	-	-
VLDL (mg/dL)	Média±DP	22,7±8,6*	11,4±1,2*	-	-	-
	Mediana	20,4	12,0	-	-	-
HDL (mg/dL)	Média±DP	14,9±5,3	15,7±0,7	-	-	-
	Mediana	13,6	16,2	-	-	-

Nota: Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e mediana de 6 animais nos grupos G1 (controle) e 4 animais nos grupos G2 (2% resíduo não fermentado), G3 (10% resíduo não fermentado), G4 (2% resíduo fermentado) e G5 (10% resíduo fermentado).

¹ Nos grupos G3, G4 e G5 não houve quantidade de amostra suficiente para análise das frações do colesterol.

* $p = 0,029$ (Mann Whitney).

** $p = 0,010$ (Mann Whitney).

Os resultados encontrados mostraram que houve diferença no perfil lipídico dos camundongos que receberam resíduo sem fermentar quando comparados com o grupo que ingeriu apenas dieta aterogênica (G1). O resíduo de café sem fermentar 2% (G2) diminuiu em 42% o nível sérico de triacilgliceróis (Figura 3), ao mesmo tempo em que reduziu a fração VLDL-c em aproximadamente 41% em relação ao grupo controle (G1) (Figura 4), sendo as diferenças estatisticamente significativas. Os níveis de colesterol total (Figura 5), de HDL-c (Figura 6) e de LDL-c (Figura 7) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle.

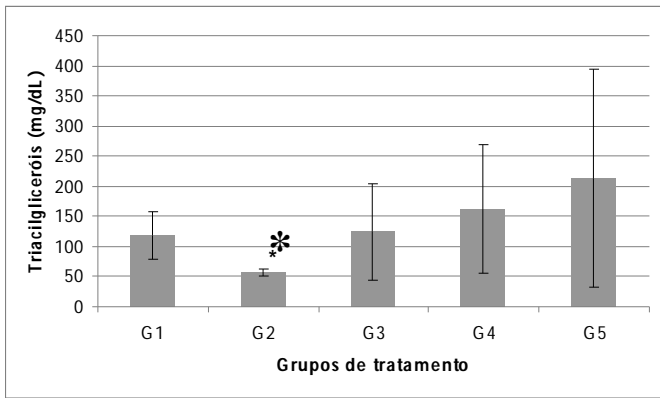


Figura 3 – Teor de triacilgliceróis séricos dos animais que receberam os diferentes tratamentos. Valores expressos em média e desvio padrão

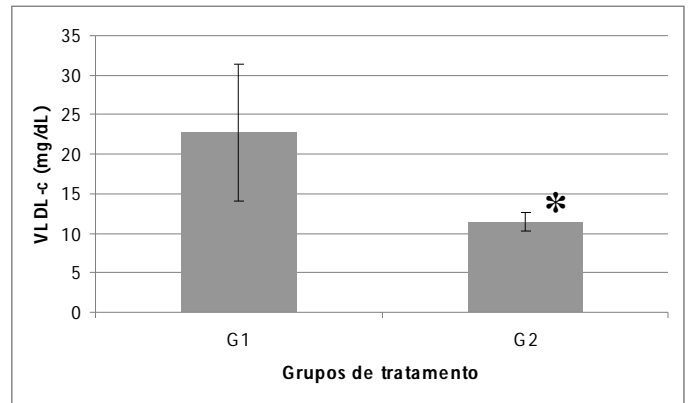


Figura 4 – Teor de VLDL-c sérico dos grupos G1(Controle) e G2 (2% resíduo não fermentado). Valores expressos em média e desvio padrão

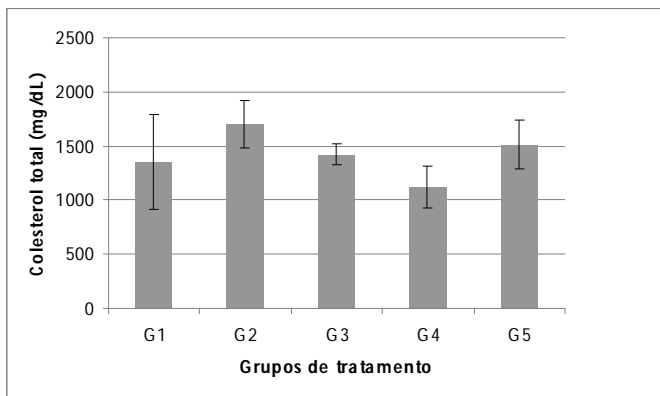


Figura 5 – Teor de colesterol total sérico dos animais que receberam os diferentes tratamentos. Valores expressos em média e desvio padrão

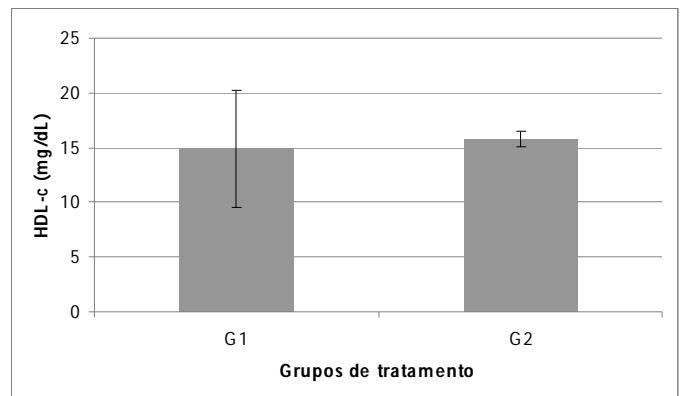


Figura 6 – Teor de HDL-c sérico dos grupos G1 (Controle) e G2 (2% resíduo não fermentado). Valores expressos em média e desvio padrão

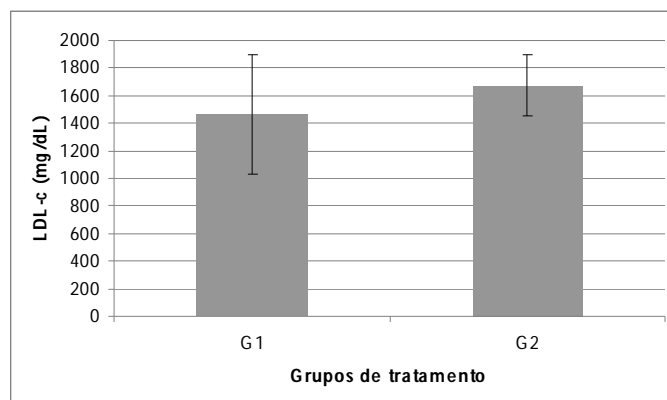


Figura 7 – Teor de LDL-c sérico dos grupos G1 e (Controle) e G2 (2% resíduo não fermentado). Valores expressos em média e desvio padrão

Produtos fermentados por fungos do gênero *Monascus* têm sido utilizados no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, principalmente aterosclerose. O processo de fermentação do fungo produz substâncias como a monacolina k, que são capazes de inibir a HMG-CoA redutase, enzima chave da síntese de colesterol (ENDO *et al.*, 1985).

Segundo Cícero (2005), a suplementação de extrato de *Monascus purpureus* diminuiu a concentração de colesterol total, triacilgliceróis, LDL-c, bem como aumentou a concentração do HDL-c no organismo humano. Esse mesmo efeito é observado quando pacientes dislipidêmicos ingerem medicamentos como provastatina. Estudo realizado com coelhos hipercolesterolêmicos demonstrou a eficácia dos medicamentos produzidos a partir da monacolina nos níveis séricos de lipídios (JORGE *et al.*, 2005). Os resultados do presente estudo não mostraram a mesma eficácia dos produtos fermentados por *Monascus* no perfil lipídico de camundongos. Segundo Kuo (2008), ratos hipercolesterolêmicos alimentados com produto fermentado por *Monascus pilosus* em cultura submersa acrescida de alho, não apresentou efeito inibitório da HMG-CoA redutase.

O uso do café ainda é controverso. Estudos sugerem o café como um alimento com elevada ação antioxidante. Entretanto, compostos presentes no grão do café, como os polifenóis, são considerados hipercolesterolemiantes (MIZUBUTI, 2006; COSTA *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2008).

Segundo Mizubuti (2006), camundongos LDLr *knockout*, modelo semelhante ao utilizado no presente estudo, que ingeriram 5% de infusão de café durante quatro semanas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na concentração plasmática de lipídios. Contudo, no mesmo estudo, utilizando-se 8% da infusão na alimentação dos animais no mesmo período, o nível de triacilgliceróis apresentou aumento estatisticamente significativo.

Camundongos *knockout* Apo E alimentados com diferentes concentrações de α -tocoferol, suplementação de ferro e *Lactobacillus delbrueckii* não demonstraram diferença estatisticamente significativa nos níveis de colesterol total e triacilgliceróis (LEE, *et al.*, 1999; PELUZIO *et al.*, 2001; PORTUGAL *et al.*, 2006). O presente trabalho mostrou que, no

mesmo modelo experimental, o consumo de resíduo de café fermentado e sem fermentação não alterou o perfil lipídico dos animais.

Estudos realizados a fim de verificar a eficácia dos flavonóides da uva, do vinho tinto e do suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose mostraram que os polifenóis podem diminuir, mas também podem aumentar as concentrações plasmáticas dos lipídios, bem como aumentar a concentração sérica de homocisteína (VAN DER GAAG *et al.*, 2000; CHOU *et al.*, 2001; O'BYRNE *et al.*, 2002; NAISSIDES *et al.*, 2006; GIEHL *et al.*, 2007).

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que o resíduo de café não interfere nos parâmetros sanguíneos de camundongos dislipidêmicos.

4.4. Efeito do resíduo de café fermentado e não fermentado sobre os tecidos hepático e aorta de camundongos *knockout Apo E*

4.4.1 – Análise histopatológica do tecido Hepático

A tabela 5 mostra o número de hepatócitos com gordura encontrado no fígado dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado.

Tabela 5 – Número de hepatócitos (mm^2) com gotículas de gordura no citoplasma em camundongos *Knockout Apo E* submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado

Parâmetros	G1	G2	G3	G4	G5
Média±DP	10,51±5,95	11,83±6,82	10,60±9,30	15,53±8,86	14,41±8,89
Mediana	9,00 ^a	10,50 ^b	9,00 ^c	15,00 ^{ab}	12,00 ^{ac}
Min – Máx	2,00-29,00	4,00-41,00	0,00-55,00	1,00-49,00	2,00-57,00
CV (%)	56,61	57,65	87,73	57,05	61,69
<i>p</i>	-	<i>p</i> = 0,258	<i>p</i> = 0,492	<i>p</i> = 0,001	<i>p</i> = 0,003

Nota: Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e mediana de 6 animais por grupo de tratamento. Grupo G1 (controle), grupo G2 (2% resíduo não fermentado), grupo G3 (10% resíduo não fermentado), grupo G4 (2% resíduo fermentado) e grupo G5 (10% resíduo fermentado).

Letras iguais diferem entre si pelo teste *Mann Whitney*

^a : grupos de tratamento comparados com o grupo controle (G1). O valor de *p* está representado na tabela.

^b : *p* < 0,004 ; ^c : *p* < 0,003 comparação entre os grupos de tratamento na mesma concentração, porém o resíduo sendo fermentado e sem fermentação.

Os resultados mostraram que os grupos de tratamento (G4 e G5) apresentaram diferenças estatisticamente significativas no percentual médio de células de gordura quando comparados ao grupo controle (G1).

Os camundongos que foram alimentados com o resíduo fermentado a 2% (G4) e com o resíduo fermentado a 10% (G5) apresentaram um aumento estatisticamente significativo no depósito de gordura hepática quando comparado ao grupo controle (G1). Ao se comparar os grupos que receberam o resíduo fermentado (G4 e G5) com os que receberam o resíduo sem a fermentação (G2 e G3) na mesma concentração, observa-se que houve diferença estatisticamente significativa entre eles, mostrando que a fermentação contribuiu para maior deposição de gordura no fígado.

A figura 8 ilustra a mediana do percentual de células com gordura encontradas no fígado dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado.

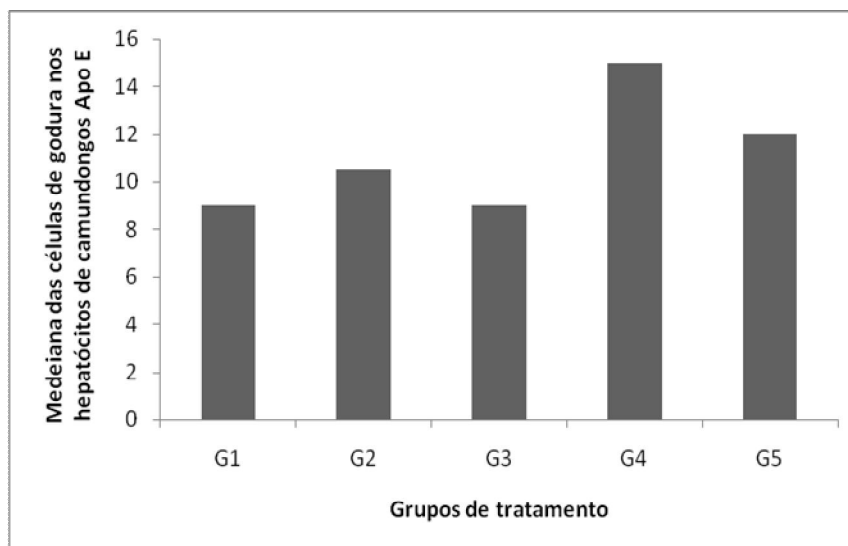


Figura 8 – Mediana do percentual de células com gordura, no fígado de camundongos *knockout Apo E*, submetidos a diferentes tratamentos. Grupo G1 (controle), grupo G2 (2% resíduo não fermentado), grupo G3 (10% resíduo não fermentado), grupo G4 (2% resíduo fermentado) e grupo G5 (10% resíduo fermentado).

Os dados encontrados sugerem que a fermentação aumentou o número de gotículas de gordura em hepatócitos dos animais que receberam os diferentes tratamentos.

Em estudo utilizando-se a infusão de café, em animais semelhantes ao utilizado neste trabalho, nas concentrações 5% e 8% não apresentaram diminuição da peroxidação lipídica em camundongos LDLr (MIZUBUTI, 2006). O mesmo modelo animal, quando tratado com goma guar parcialmente hidrolisada, também não apresentou diminuição em camundongos hiperglicêmicos, enquanto que animais euglicêmicos tiveram um maior aumento do colesterol hepático (FERNANDES *et al.*, 2006). Os resultados encontrados não afirmam os achados, uma vez que não foi encontrada na literatura a ação do resíduo do café no metabolismo animal.

A figura 9 mostra os cortes do fígado dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos.

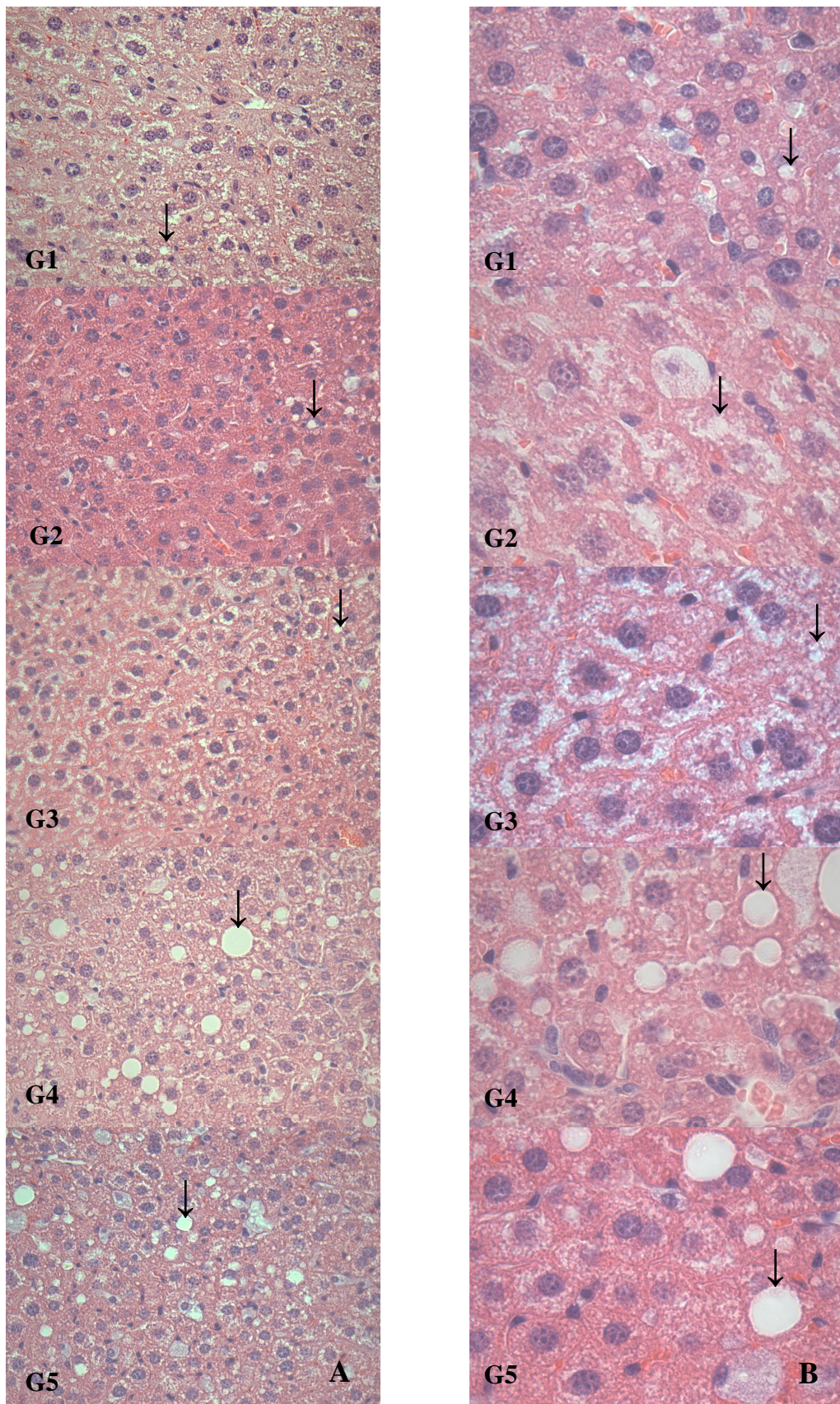


Figura 9 – Aspecto histológico do fígado de camundongos *Knockout Apo E* submetidos a diferentes tratamentos. ↓ Gordura depositada em hepatócitos. A (40 x) e B (100 x).

A adição de α -tocoferol, ferro e de *Lactobacillus delbrueckii* durante 6 semanas, 3 meses e 6 meses, respectivamente, na dieta de camundongos *knockout* Apo E, não apresentou redução significativa na deposição de lipídios no fígado (LEE *et al.*, 1999; PELUZIO *et al.*, 2001; PORTUGAL *et al.*, 2006). O mesmo modelo animal foi utilizado no presente trabalho e não mostrou redução das gotículas de gordura nos hepatócitos dos camundongos, mostrando que a ingestão do resíduo de café, que não foi submetido à fermentação, não interfere nesse parâmetro avaliado.

Não foram encontrados relatos na literatura sob número de células de gordura no tecido hepático de camundongos que ingeriram algum produto fermentado por fungos do gênero *Monascus* ou que fizeram ingestão de resíduo de café. Dessa forma, faz-se necessário estudos mais aprofundados para que tais resultados possam ser melhor esclarecidos.

4.4.2 – Histopatologia aórtica

A tabela 6 mostra o percentual médio (mm^2) da área da lesão aórtica em camundongos submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado.

Tabela 6 – Percentual médio da área das lesões aórticas em camundongos *knockout Apo E* submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado

	G1	G2	G3	G4	G5
Média±DP	62,28 ± 1,49	72,63 ± 5,86	55,92 ± 1,51	52,18 ± 1,74	64,19 ± 3,26
Mediana	62,18 ^a	71,40 ^{abd}	55,62 ^{acd}	52,55 ^{abe}	64,75 ^{ce}
Min – Máx	60,46–64,63	64,14–80,26	53,96–58,45	49,27–54,26	56,97–67,70
CV (%)	2,39	8,06	2,70	3,33	5,07
<i>p</i>	-	<i>p</i> = 0,001	<i>p</i> = 0,001	<i>p</i> = 0,001	<i>p</i> = 0,154

Nota: Grupo G1 (controle), grupo G2 (2% resíduo não fermentado), grupo G3 (10% resíduo de café não fermentado), grupo G4 (2% resíduo de café fermentado) e grupo G5 (10% resíduo de café fermentado).

Letras iguais diferem entre si pelo teste *t*

^a: grupos de tratamento comparados com o grupo controle (G1). O valor de *p* está representado na tabela.

^b: *p* < 0,001; ^c: *p* < 0,001: comparação entre os grupos de tratamento na mesma concentração, porém o resíduo sendo fermentado e não fermentado.

^d: *p* < 0,001; ^e: *p* < 0,001: comparação entre os grupos que consumiram o mesmo resíduo, porém em diferentes concentrações.

Os resultados mostram que houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de tratamento (G2, G3 e G4) e o grupo controle (G1).

A aorta dos animais do grupo que recebeu a dieta aterogênica suplementada com resíduo de café sem fermentar a 2% (G2) apresentou maior área de lesão quando comparado ao grupo controle (G1). Os grupos dos animais que foram alimentados com dieta aterogênica suplementada com 10% de resíduo não fermentado (G3) e 2% de resíduo fermentado (G4) diminuiu a área de lesão 10,5% e 15,4% respectivamente, quando comparado ao grupo G1, sendo esta diminuição estatisticamente significativa.

Comparando os grupos alimentados com os diferentes resíduos na mesma concentração, G2 e G4, observa-se que os animais que consumiram 2% do resíduo fermentado apresentaram diminuição de 26,4% na área de lesão quando comparado ao grupo G2, mostrando que a fermentação teve efeito benéfico, reduzindo a formação da placa de ateroma. Na concentração de 10%, somente o resíduo que não foi submetido à fermentação mostrou efeito benéfico, reduzindo a lesão em 14,1% quando comparado ao grupo de animais alimentados com 10% do resíduo fermentado (G5).

Quando comparados os resíduos iguais, porém em diferentes concentrações, verificou-se que as concentrações influenciam na formação das lesões ateroscleróticas, mostrando que a maior concentração de resíduo não fermentado (G3) foi eficaz na redução da lesão. Em contrapartida, a menor concentração do resíduo fermentado (G4) apresentou melhor efeito protetor.

A figura 10 ilustra as lesões na aorta dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado. A figura 11 mostra a avaliação morfométrica das lesões aórticas dos camundongos alimentados com as diferentes dietas.

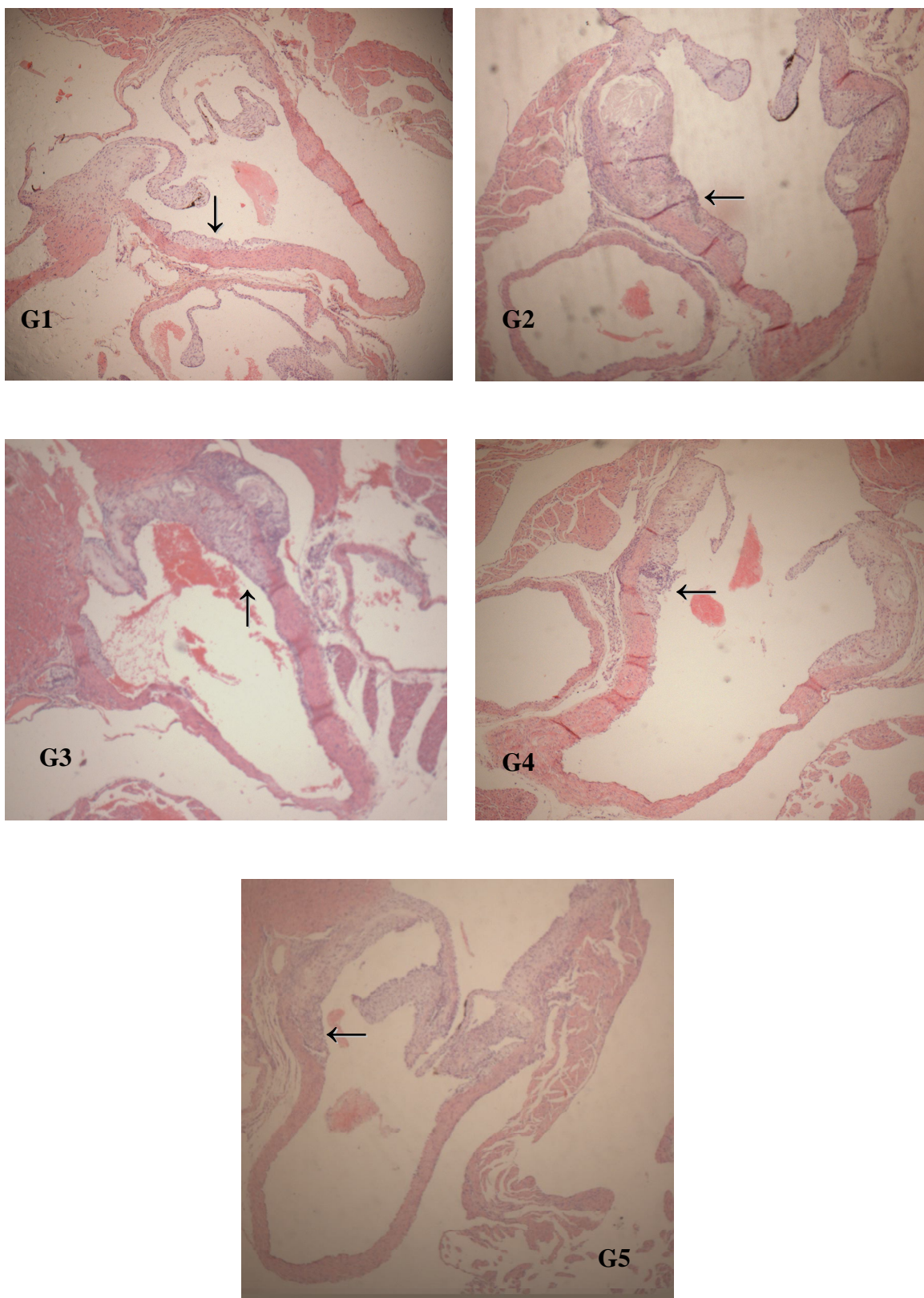


Figura 10 – Aspecto histológico da região de origem da aorta de camundongos *knockout Apo E* submetidos a diferentes tratamentos. Setas (←, ↑ e ↓) Lesão aterosclerótica. 40 x .

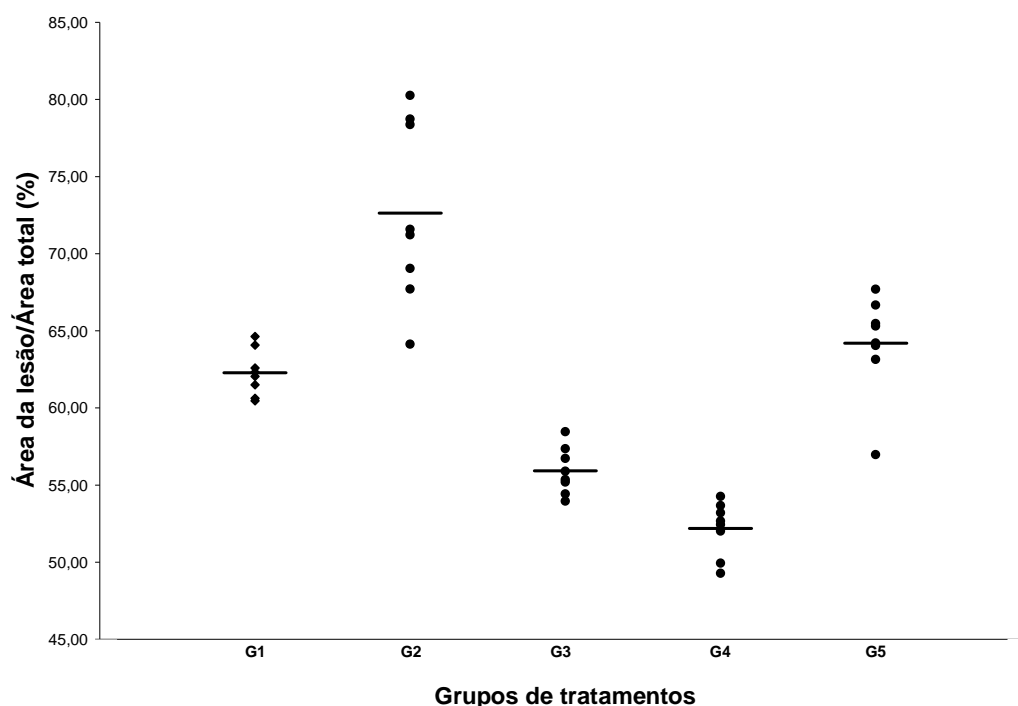


Figura 11 – Avaliação morfométrica das áreas das lesões do tecido cardíaco de camundongos *knockout Apo E* submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado. Grupo G1 (controle), grupo G2 (2% resíduo não fermentado), grupo G3 (10% resíduo não fermentado), grupo G4 (2% resíduo fermentado) e grupo G5 (10% resíduo fermentado).

A relação entre o consumo de café e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares tem sido extensamente demonstrada na literatura, principalmente envolvendo humanos. Se por um lado diversos estudos demonstram o efeito maléfico do café sobre as doenças cardiovasculares (PANAGIOTAKOS *et al.*, 2003; HAPPONEN *et al.*, 2004), por outro crescem a cada dia as evidências de efeitos benéficos do mesmo (ESPOSITO *et al.*, 2003; HODGSON *et al.*, 2003). Contudo, não foram encontrados relatos na literatura abordando o efeito dos produtos fermentados por fungos do gênero *Monascus* e/ou o resíduo de café sob o metabolismo animal e humano. O presente trabalho mostrou que o resíduo do café é um bom meio para o crescimento do fungo *Monascus ruber*, podendo atuar como um aliado para prevenção da aterosclerose.

Os resultados encontrados sugerem que o efeito do resíduo fermentado está inversamente relacionado com sua concentração na dieta. O grupo que recebeu 2% de resíduo fermentado apresentou uma diminuição

de 15% na área da lesão. Segundo alguns autores (GRAZIOSI e RATHINAVELU, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2005; PARRA *et al.*, 2008), o resíduo do café é rico em polifenóis e compostos bioativos com ação antioxidante. Contudo, os resultados desse trabalho não podem ser atribuídos a esses compostos, uma vez que a sua caracterização não fazia parte dos objetivos do estudo.

O efeito antioxidante é obtido quando os compostos bioativos são utilizados em baixas concentrações, funcionando como mediadores de sinalização em mecanismos de ajuste, proliferação, defesa e morte celular. Quando há um aumento na concentração dessas moléculas pode causar injúrias celulares relacionadas ao surgimento de condições patológicas no organismo (RIBEIRO *et al.*, 2005; KALIORA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2008). Uma possível explicação para os resultados observados é que a fermentação leva à formação de compostos bioativos específicos que em altas concentrações tornam-se maléficos. Já no resíduo sem fermentar é possível que a concentração de antioxidantes no resíduo a 2% é insuficiente para apresentar efeito protetor no organismo, e que na suplementação de 10% essa concentração é adequada para tais efeitos.

Segundo Mizubuti (2006), camundongos *knockout* LDLr que consumiram 5% e 8% de infusão de café durante quatro semanas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas lesões aórticas. O mesmo modelo animal foi utilizado por Fernandes (2006) a fim de avaliar diferentes concentrações de goma guar hidrolisada no aumento das lesões aórticas, verificando que as mesmas não apresentaram diminuição. Utilizando os camundongos *knockout* Apo E, alimentados com 2% do resíduo de café fermentado pelo fungo do gênero *Monascus* apresentou efeito protetor na área da lesão aórtica.

Camundongos *knockout* alimentados com α -tocoferol e suplementação de ferro, durante 6 semanas e 3 meses respectivamente, apresentaram redução na lesão aterosclerótica (LEE *et al.*, 1999; PELUZIO *et al.*, 2001), resultados estes que corroboram aos resultados encontrados no presente trabalho utilizando o mesmo modelo animal. Entretanto, camundongos *knockout* alimentados com dieta hipercolesterolemica suplementada com *Lactobacillus delbrueckii* durante 6 semanas, não demonstrou efeito no tecido cardíaco dos camundongos (PORTUGAL *et al.*, 2006).

Adicionando vinho tinto sem álcool na alimentação de camundongos *knockout* Apo E durante 20 semanas, notou-se um aumento estatisticamente significativo na deposição de lipídios na aorta (WADDINGTON *et al.*, 2004), o que não foi verificado no estudo. Já a adição de vinho tinto com álcool nesse tipo de animal durante 6 semanas, assim como os resultados apresentados no presente trabalho, mostrou uma redução significativa na área de lesão aterosclerótica (HAYEK *et al.*, 1997; GIEHL *et al.*, 2007).

Sob esse foco, muitos estudos têm falhado ao tentar demonstrar o efeito de determinados resíduos, produtos fermentados, compostos antioxidantes e variados compostos bioativos no metabolismo lipídico. Pouco pode ser dito em relação à preponderância desses produtos, compostos e substâncias, sendo necessárias novas pesquisas com maior duração e mais minuciosas para melhor esclarecer os mecanismos abordados neste estudo, sugerindo-se, dentre elas, a identificação dos compostos fenólicos do resíduo de café e avaliação de suas diferentes doses no organismo animal.

5. CONCLUSÕES

1. O resíduo de café submetido à fermentação aumentou o teor de proteínas e diminuiu o teor de carboidratos indicando o crescimento do fungo no meio.
2. O consumo de resíduos de café fermentado e sem fermentar não alterou o ganho de peso, o consumo alimentar e o índice hepático dos camundongos.
3. A utilização do resíduo de café como parte da dieta de animais em concentrações abaixo de 10% não acarreta perda de peso e diminuição no consumo.
4. A ingestão dos resíduos reduziu os níveis séricos de triacilgliceróis e da fração VLDL-c nos animais que receberam a dieta contendo resíduo de café sem fermentar a 2%.
5. Na deposição de gordura nos hepatócitos, os grupos que foram alimentados com resíduo fermentado apresentaram aumento de gotículas de gordura no tecido hepático, enquanto o resíduo sem fermentar não alterou os hepatócitos.
6. Os animais que receberam o resíduo fermentado a 2% apresentaram o melhor efeito na diminuição da área da lesão aórtica. Já os animais que consumiram o resíduo fermentado a 10% não apresentou efeito sob as lesões.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. 14 ed. Washington; A.O.A.C, 1989.
- ABIC – Associação Brasileira de Café. Disponível em: <http://www.abic.com.br/>
- ALVAREZ – LEITE, J.I.. Lipoproteínas e transporte de lipídios no organismo. In: Vieira, E.C.; Figueiredo, E. ^a; Alvarez – Leite, J.I.; Gomez, M.V. *Química fisiológica*. 2^o ed. Atheneu, Rio de Janeiro, p.17-31, 1995.
- AVALLONE, S.; BRILLOUET, J.M.; GUIRAUD, J.P.; GUYOT, B. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. *Journal. Agricultural Food Chemistry*; Davis, EUA, v.49, n.11, p.5556-5559, 2001.
- BARCELOS, A.F.; ANDRADE, I.F.; TIESENHAUSEN, I. M. E. V. V; FERREIRA,J.J.; SETTE, R.S.; AMARAL, R.; PAIVA, P.C.A. Aproveitamento da casca de café na Alimentação de Bezerros em crescimento. In: *XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Fortaleza. V. 1. p. 537-539, 1996.
- BARCELOS, A.F.; CARDOSO, R.M.; PAIVA, P.C. de A.; PÉREZ, J.R.O; SANTOS, V.B. dos. Estimativa das frações dos carboidratos, da casca e polpa desidratada de café (*Coffea arábica* L.) armazenadas em diferentes períodos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v.30, n.5, p.1566-1571, 2001.
- BARCELOS, A.F.; CARDOSO, R.M.; PAIVA, P.C. de A.; PÉREZ, J.R.O; SANTOS, V.B. dos. Fatores antinutricionais da casca e da polpa desidratada de café (*Coffea arábica*, L.) armazenadas em diferentes períodos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v.30, n.4, p.1325-1331, 2001.
- BARCELOS, A.F.; PAIVA, P.C.A.; PEREZ, J.R.O.; SANTOS, V.B.; CARDOSO, R.M. Parâmetros bromatológicos da casca e polpa desidratada de café (*coffea arábica* L.) armazenadas em diferentes períodos. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, MG, v. 26, n.4, p. 780-790, 2002.
- BERNARDINO, F.S.; GARCIA, R.; ROCHA, F.C.; SOUZA, A.L.; PEREIRA, O.G. Produção e Características do Efluente e Composição Bromatológica as Silagem de Capim-Elefante contendo diferentes níveis de Casca de Café. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v.34, n.6, p. 2185-2191, 2005.

- BERTOLINO, C. N.; CASTRO, T. G.; SARTORELI, D. S.; FERREIRA, S. R.G.; CARDOSO, M. A. Influência do Consumo Alimentar de ácidos graxos trans no perfil de lipídeos séricos em nipo-brasileiros de Bauru, São Paulo, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. V. 22, n.2, p.357-364, 2006.
- BIGGERSTAFF KD & WOOTEN JS. Understanding lipoproteins as transporters of Cholesterol and other lipids. *Advances in Physiology Education*, V. 28, p. 105-106, 2004.
- BLYENY, H. P. A. Análise comparativa da composição química de cafés do cerrado mineiro e do sul de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal de Uberlândia, 2004.
- BOAS, E. V. B.V. *Alimentos e Nutrientes*. Lavras: FAEPE, p. 73; 1999.
- BOTZ, M. L.; HOES, A. W.; KOUDSTAAL, P. S.; HOFMAN, A. GROBBEE, D. E. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*, V. 96, p. 1432-1437, 1997;
- BRAHAN, J. E.; BRESSANI, R. Coffe pulp: composition, technology, and utilization. Ottawa: *International Development Reserch Centre*, 1979. 95p.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos físico-químicos para análise de alimentos/Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018p.
- BRAUNWALD, E.; ZIPES, D.P.; LIBBY, P. *Heart diseases*. 6ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 2001.
- BRESSLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 272: 685-688, 1996.
- CARVALHO, F.C. de; VEGRO, C.L.R. Disponibilidade e utilização de resíduos gerados no processamento agroindustrial do café. São Paulo: *IEA*, 1994. 9 p.
- CARVALHO, T.H.F.; LOPES, O.U. O emprego de camundongos geneticamente modificado como modelo de estudo para doenças cardiovasculares. *X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular*. Medicina (Ribeirão Preto). V. 39, n. 1, p. 110-116. 2006.

- CHOW, E.J.; KEEVIL, J.G.; AESCHLIMANN, S. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. *American Journal Cardiology*. V. 88, p. 553-558, 2001.
- CICERO, A.F.G.; BRANCALEONI, M.; LAGHI, L.; DONATI, F.; MINO, M. Antihyperlipidaemic effect of a *Monascus purpureus* brand dietary supplement on a large sample of subjects at low risk for cardiovascular disease: A pilot study. *Complementary Therapies in Medicine*. V. 13, p. 273-278, 2005.
- CORRÊA, A. D. *Fibras na prevenção de doenças*. Lavras: FAEPE, p. 43; 2002.
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C.O.B. *Alimentos Funcionais: Benefícios para a Saúde*. Viçosa-MG, 2008. 298p
- COSTA, R.S.C. da; LEÔNIDAS, F. das C.; RODRIGUES, V.G.S. Uso da casca do café para aumento da produtividade, controle de plantas e fornecimento de nutrientes para cafezal em Rondônia. *Porto Velho: EMBRAPA*, 2003.
- CUNHA, M.L. *Estudo da secagem do café cereja descascado pelo processo a ar quente assistido a microondas*. Campinas, 1996. 74p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.
- DEVLIN, T. *Manual de Bioquímica com correlações clínicas*. Tradução da 4^o edição. Ed. Edgard Bluncher, 2000. 957p.
- EMBRAPA CAFÉ. Disponível em: <http://www.embrapa.br>
- ENCARNAÇÃO, R.O.; LIMA, D.R. *Café e saúde humana*. Brasília: EMBRAPA Café, 2003. 64 p.
- ENDO, A. Monacolin K a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Journal Antibiotics*, v.32, n. 8, p. 852-854. 1979.
- ENDO, A.; HASUMI, K. Dihydromonacolin L and Monacolin X, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis. *Journal Antibiotics*, v.38, n. 3, p. 321-327. 1985.
- ENDO, A.; HASUMI, K.; NEHGISHI, S. Monacolin J and L new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. *Journal Antibiotics*, v.38, n. 3, p. 420-422. 1985.

- ERDOGRUL, O., AZIRAK, S. A review on the Red Yeast Rice (*Monascus Purpureus*). *Journal of Science and Engineering*, v. 8, n. 1, p. 10-15. 2005.
- ESCOTT-STUMP, S.; MAHAN, L.K. Minerais. In: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 10ed. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 5, p. 106-145.
- ESPOSITO, F.; MORICO, F.; VERDE, V.; RITIENI, A.; ALEZIO, A.; CAPORASO, N.; FOCLIANO, V. Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. V. 17, p. 595-601, 2003.
- FARIA, D.J.G.; GARCIA, R.; PEREIRA, O.P.; FONSECA, D.M.; MELLO, R.; RIGUEIRA, J.P.S. Composição químico-bromatológica de silagem de capim-elefante com níveis de casca de café. *Revista Brasileira de zootecnia*. V. 36, n. 2, p. 301-308, 2007.
- FARIA, M. A. de; FIGUEIREDO, V.B.; SILVA, E.L. da. Crescimento inicial do cafeeiro irrigado com água salina e salinização do solo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Campina Grande, PB, v.10, n.1, p.50-57, out. 2006.
- FAZIO, S.; BAAEV, V.R.; MURRAY, A.B.; HASTY, A. H.; CARTER, K. J.; GLEAVES, L.A.; ATHINSON, J.B.; LINTON, M.F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 94: p.4647-4652, 1997.
- FAZIO, S.; LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience*, V. 6, p. 515-525, 2001.
- FERNANDES, L.R.; XISTO, M.D.; PENNA, M.G.; MATOSINHOS, I.M.; LEAL, M.C.; PORTUGAL, L.R.; LEITE, L.I.A. Effect of partially hydrolyzed guar gum on lipid metabolism and atherogenesis of mice. *Revista de Nutrição*. V. 19, n. 5, p. 563-571, 2006.
- FERREIRA, V.; van DIJK, K.W.; GROEN, A.K.; VOS, R.M.; van der KAA, J.; GIJBELS, M.J.J.; HAVEKES, L.M.; PANNEKOEK, A.K. Macrophage-specific inhibition of NF- κ B activation reduces foam-cell formation. *Atherosclerosis*, V. 192, p. 283-290, 2007.
- FILHO, E.R.; BANYS, V.L.; BARCELOS, A.F.; CARDOSO, R.M.; PAIVA, P.C. de A.. Efeito da casca de café (*Coffea arábica*, L.) no desempenho de

- novilhos mestiços de holandês-zebu na fase de recria. *Revista Ciência e Agrotecnologia*. Lavras: UFLA, v.24, n.1, 2000, 8 p.
- FINK-GREMMELS, J.; LEISTNER, L. Biological effects of *Monascus purpureus*. *Fleiswchwertsch*, v.69, n.1, p.115-122, 1989.
- FONSECA, C. S. *Efeito hipolipidêmico do arroz fermentado por Monacus ruber CCT 1236 em coelhos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- FURUSHO-GARCIA, I.F. ; PÉREZ, J. R. O. ; TEIXEIRA, J. C. ; BARBOSA, M. C. P. ; OLIVEIRA, M. V. M. ; ALVES, E. L. Terminação de cordeiros cruzados, em confinamento, com casca de café como parte da dieta. Consumo.. In: *XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Fortaleza. V. 1. p. 537-539, 1996.
- GIEHL, M.R.; BOSCO, S.M.D.; LAFLOR, C.M.; WEBER, B. Efficacy of grape, red wine and grape juice flavonoids in the prevention and secondary treatment of atherosclerosis. *Scientia Medica*. V.17, n.3, p. 145-155, 2007.
- GONÇALVES, M. C. R.; MOURA, L. S. A.; RABELO, L. A.; FILHO, J. M. B.; CRUZ, H. M. M.; CRUZ, J. Produtos naturais inibidores da enzima HMG-CoA redutase. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 81, n. ¾, p.63-71, 2000.
- GRAAFF, J. *The economics of coffe*. Wageningen. Pudoc, 1986. p. 1-30.
- GRAZIOSI, G.; RATHINAVELU, R. Uso alternativo potencial de detritos e subprodutos do café. *Organização Internacional do Café*, ago. 2005.
- GRILLO, L. P.; CRISPIM, S. P.; SIEBERT, A. N.; ANDRADE, A. T. W.; ROSSI, A.; CAMPOS, I. C. Perfil Lipídico e Obesidade em escolares de baixa renda. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. São Paulo-SP Vol. 8, p. 75-81, 2005.
- GUYTON, A.C. *Tratado de fisiologia médica*. Ed. Guanabara Koogan, 8º edição, 1992. 837p.
- HAPPONEN, P.; VOUTILAINEN, S.; SALONEN, J.T. Coffe drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. *Journal Nutrition*. V. 134, p. 2381-2386, 2004.
- HAYEK, T.; FUHRMAN, B.; VAYA, J. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of

LDL to oxidation and aggregation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. V.17, p. 2744-2752, 1997.

HODGSON, J.M.; CHAN, S.Y.; PUDDEY, I.B.; DEVINE, A.; WATTANAPENPAIBOON, N.; WAHQVIST, M.L.; LUKITO, W.; BURKE, V.; WADR, N.C.; PRINCE, R.L.; CROFT, K.D. Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea and coffee derived polyphenol exposure in humans subjects. *Brasilian Journal Nutrition*. V. 91, p. 301-305, 2004.

HOFLER, M.H.; VAN VLIJMEN, B. J. M.; HAVEKES, L.M. Transgenic mouse models to study the role of APO E in hiperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 137: p. 1-11, 1998.

JANSSEN, B.J.A.; SMITS, J.F.M. Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetic modification. *Journal Regulator, Integrative and Comparative Physiology*. V. 282, p. 1545-1564. 2002.

JORGE, P. A. R.; ALMEIDA, E. A.; OZAKI, M. R.; JORGE, M.; CARNEIRO, A. Effects of Atorvastatin, Fluvastatin, Pravastatin, and Simvastatin on Endothelial Function, Lipid Peroxidation, and Aortic Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Rabbits. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 84, n 4, abril 2005.

KALIORA, A.C.; DEDOISSIS, G.V.Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants In preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*. V. 187, p. 1-17, 2006.

KIM, S.Y.; KIM, Y.S.; KIM, J.M.; SUH, H.J. The application of monascus rice in rice beverage preparation. *Food Science and Technology*. V. 41, p. 1204-1209, 2008.

KUO, C.F.; JAO, Y.C.; YANG, P. Downregulation of hepatic lipoprotein assembly in rats by fermented products of *Monascus pilosus*. *Nutrition*. V. 24, p. 477-483, 2008.

LEE, T.S.; SHIAO, M.S.; PAN, C.C.; CHAU, L.Y. Iron-Deficient diet reduces atherosclerotic lesions in Apo E-Deficient Mice. *Circulation journal of The American Heart Association*. V. 99, p. 1222-1229, 1999.

LEITE, C. A. M. *Desafios da cafeicultura no final do século XX*. In: AGUIAR, D. D. R., PINHO, J. B., *O agronegócio brasileiro: desafios e perspectivas*.

- Brasília: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 1998(a). 1086p.
- LEITE, C. A. M., SILVA, D. M. A demanda de cafés especiais. In: ZAMBOLIM, L. *Café: produtividade, qualidade e sustentabilidade*. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. 2000. p. 51-73.
- LEITE, R. A. *Mucilagem residual e Qualidade da Bebida do Café Cereja Descascado*. Botucatu - SP, 2002. Tese (Doutorado em Agronomia) – UNESP.
- LEITE, R. A. *Qualidade tecnológica do café (coffea arábica L.) pré-processado por “via seca” e “via úmida”*. Viçosa, 1998(b). 54p. Dissertação (Mestrado em Engenharia agrícola) – Universidade Federal de Viçosa.
- LIMA, W. A.; GLANER, M.F. Main Factors of risk related to the cardiovascular diseases. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano*, v. 8, n.1, p. 96-104, 2006.
- LIN, C. F. Isolation and Cultural conditions of *Monascus sp* for the production of pigment in a submerged culture. *Journal Fermentation Technology*. Amsterdam, v.51, n.6, p.407-414, 1973.
- LOPES, A. C. S.; CAIAFFA, W. T.; SICHIERI, R.; MINGOTI, S. A.; COSTA, M. F. L. Consumo de nutrientes em adultos em idosos em estudo de base populacional: Projeto Bambuí. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.21, n.4, p. 1201-1209, 2005.
- MACEDO, A.G.; MATSUDA, L.K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de Tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. *Ciência Agrotécnica*. Lavras. V. 29, n 4, p. 833-838, 2005.
- MARINETTI, G. V. Disorders of lipid metabolism: dislipoproteinemias. In: *Disorders of Lipid Metabolism*. Plenum Press, New York: 75-120, 1990.
- MATIELLO, J.B. *O café do cultivo ao consumo*. São Paulo: Globo, 1991. 320p
- MATOS, A. T. de; BRASIL, M. da S. ; FONSECA, S. P. P. *Aproveitamento de efluentes líquidos domésticos e agroindustriais na agricultura*. In: ENCONTRO DE PRESERVAÇÃO DE MANANCIAS DA ZONA DA MATA MINEIRA, Viçosa-MG, ABES/ MG, 2003. p. 25-79.

- MATOS, A.T. de; LO MONACO, P.A. . *Tratamento e aproveitamento agrícola de resíduos sólidos e líquidos de lavagem e despolpa dos frutos do cafeeiro*. Viçosa: UFV, 2003. 68 p. (Engenharia na Agricultura. Boletim Técnico, 7).
- MATOS, A.T. de; LO MONACO, P.A.; SILVA, J.S. *Tratamento de águas residuárias. Secagem e armazenagem do café; tecnologias e custos*. Viçosa: UFV, CBP&D – Café, 2001. p. 149 – 162.
- MATOS, A.T. de; MONACO, P.A. Lo; PEREIRA, O.G.; PINTO, A.B.; SOARES, A.A. Produtividade de forrageiras utilizadas em rampas de tratamento de águas residuárias da lavagem e despolpa dos frutos do cafeeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Campina Grande, PB, v.7, n.1. p. 154-158, jan/apr. 2003.
- MATOS, A.T. Tratamento e destinação final dos resíduos gerados no beneficiamento do fruto do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. ed. *Produção integrada de café*. Viçosa: UFV; DFP, 2003. p. 647-707.
- MAZZONE, T. Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Current Opinion Lipid*. 7: p. 303-307, 1996.
- MENEZES, H. C. *Variação dos monoisômeros e diisômeros do ácido cafeilquínico com a maturação do café*. Campinas-SP, 1990. 120p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de São Paulo.
- MIZUBUTI, Y.G.G. Efeito do consumo de café sobre o sistema antioxidante e os níveis séricos de lipídeos em camundongos LDLr knockout e C57BL/6. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2006.
- MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Química Nova*. V. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.
- MORGANO, M. A.; PAULUCI, L. F.; MANTOVANI, D. M. B.; MORY, E. E. M. Determinação de Minerais em café Cru. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, SP. V. 22, Nº 1, p. 19-23, 2002.
- NAISSIDES, M.; MAMO, J.C.L.; JAMES A.P. The effect of chronic consumption of red wine on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. V. 185, p. 438-445, 2006.

- NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A S.; RAINES, E. W.; BRESLOW, J.L.; ROSS, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 4: p. 133-140, 1994.
- NEUZIL, J.; CHRISTISON, J. K.; IHEANACHO, E.; FRAGONAS, J. C.; ZAMMIT, V.; HUNT, N.H.; STOCKER, R. Radical-induced lipoprotein and plasma lipid oxidation in normal and apolipoprotein E gene Knock-out (apo E $\text{-}\text{-}$) mice: apo E $\text{-}\text{-}$ mouse as model for testing the role of tocopherol-mediated peroxidation in atherogenesis. *Journal of Lipid Research*. 39: p. 354-368, 1998.
- NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. São Paulo, SP. 4^o ed, 2005.
- O'BYRNE, D.J.; DEVARAJ, S.; GRUNDY, S.M. Comparison of the antioxidant effects of concord grape juice flavonoids and α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *American Journal Nutrition*. V. 76, p. 1367-1374, 2002.
- OLIVEIRA, T. T.; NAGEN, T. J.; LOPES, R. M.; MACHADO, H.; MELLO, V. J.; LIMA, E. Q.; MARTINS, E. S. Efectos del Monascus sobre albumina, creatinina, urea y ácido úrico en conejos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. V.39, n.4, p. 429-434. 2005.
- OLIVEIRA, V.; FIALHO, E.T.; LIMA, J.A.F.; OLIVEIRA, A. I. G.; FREITAS, R. T. F. Substituição do milho por casca de café em rações isoenergéticas para suínos em crescimento e terminação. *Ciência Agrotécnica*. V. 25, n. 2, p. 424-436, 2001.
- OSTERUD, B.; BJORKLID, E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiological Reviews*, V. 83, p. 1069-1112, 2003.
- PANAGIOTAKOS, D.B.; PITISAVOS, C.; CHRYSOHOOU, C.; KOKKINOS, P.; TOUTOUZAS, P.; STEFANADIS, C. The J-shaped effect of coffee consumption on the risk of developing acute coronary syndromes: The CARDIO2000 Case control study. *Journal Nutrition*. V. 133, p. 3228-3232, 2003.

- PARRA, A. R. P.; MOREIRA, I.; FURLAN, A.C.; PAIANO, D.; SCHERER, C.; CARVALHO, P.L.O. Utilização da casca de café na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. *Revista Brasileira de zootecnia*. V. 37, n. 3, p. 433-442, 2008.
- PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos Agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*. V. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.
- PELUZIO, M.C.G. Redução do desenvolvimento de Lesões Ateroscleróticas por α -tocoferol em camundongos com diferentes dietas e em estágios diferentes da lesão. Papel da Expressão de MCP-1. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.
- PELUZIO, M.C.G.; HOMEM, A.P.P.; AZEVEDO, G.S., *et al.*; Influences of α -tocopherol on cholesterol metabolism and fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed na atherogenic diet. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*. V.34, p. 1539-1545. 2001.
- PLUMP, A S.; SMITH, J. D.; HAYER, T.; AALTO-SETALA, K; WALSH, A; VERSTUYFT, J.G.; RUBIN, E. M.; BRESLOW, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 71: p. 343-353. 1992.
- PORTAL, V.L.; Aterosclerose – Uma doença complexa. *Revista da Sociedade Brasileira de Cardiologia do Rio Grande do Sul*. Ano XIII, nº 03, Set/Out/Nov/Dez, 2004.
- PORTUGAL, L.R.; GONÇALVES, J.L.; FERNANDES, L.R.; SILVA, H.P.S.; ARANTES, R.M.E.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R.; LEITE-ALVAREZ, J.I. Effect of *Lactobacillus delbrueckii* on cholesterol metabolism in germ-free mice and on atherogenesis in apolipoprotein E knockout mice. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*. V. 39, p. 629-635, 2006.
- QUINTÃO, E.; NAKANDAKARE, E.R. Manual de Referência em Dislipidemias. Novartis, são Paulo: 106p, 1997.
- REDDICK, R.L.; ZHANG, S. H.; MAEDA, N. Atherosclerotic in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. Biol. 14: p. 141-147, 1994.

- RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. a formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience journal*. V.21, n 3, p. 133-149, 2005.
- ROA, M.G. *Beneficio ecológico del café*. Chinchiná (Colômbia): CENICAFÉ, 1999. 300p.
- ROCHA, F. C.; GARCIA, R.; FREITAS, A. W. P.; BERNARDINO, F. S.; FILHO, S. C. V.; ROCHA, G. C. Valor energético de dietas contendo diferentes níveis de casca de café para bovinos e ovinos. *Acta Scientiarum Animal Sciences*. Maringá, Pr. V. 28, n 1, p. 81-87, 2006.
- RUDOLPH, U.; MOHLER, H. Genetically modified animals in pharmacological research: future trends. *European Journal Pharmacology*. V.375, n.1, p. 327-337. 1999.
- SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, V. 14, p. 271-279, 2004.
- Segunda Previsão da safra de café 2006/2007. Conab 2006. Disponível em: www.conab.gov.br
- SIMÕES, R.O.; FARONI, L.R.D.; QUEIROZ, D.M. *Qualidade dos grãos de café (Coffe arábica L.) em coco processados por via seca*. Caatinga, v.21, n 2, p. 139-146, 2008.
- SOCOL, C. R. Resíduo de café um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. *Pesquisa dos cafés do Brasil*. 1 ed. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 83-98, 2002.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/>
- SOUZA *et al.* Composição químico-bromatológica da casca do café tratada com amônia anidra e sulfeto de sódio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG. V. 30, n.3, p. 983-991, 2001.
- SOUZA, A.L.; GARCIA, R.; BERNARDINO, F.S.; CAMPOS, J.M.S.; *et al.* Casca de café em dietas para novilhas leiteiras: consumo, digestibilidade e desempenho. *Revista Brasileira de Zootecnia*. V. 35, n 3, p. 921-927, 2006.

- SOUZA, L. V.; CASTRO, C. C.; CERRI, G. G. Avaliação da aterosclerose carótida por intermédio de ultra-sonografia e ressonância magnética. *Radiologia Brasileira*. v. 38, n.2, p. 81-94, 2005.
- TEIXEIRA, P. J.; SARDINHA, L. B.; GOING, S. B.; LOHMAN, T.G. Total and regional fat and serum cardiovascular disease risk factors in lean and obese children and adolescent. *Obesity Research*. V. 9, p. 432-442, 2001.
- TRUEBE, G.P. Los Flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*. V. 22, n 1, p. 48-57, 2003.
- VALVERDE, I.M.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. V. 50, n 1, p. 5-18, 2000.
- VAN DER GAAG, M.S.; UBBINK, J.B.; SILLANAUKEE, P. Effect of consumption of red wine, sprits and beer on serum homocystein. *Lancet*. V.355, p. 1522, 2000.
- VAN REE, J.H.; VAN DEN BROEK, W.J. A A; DAHLMANS, V.E.H.; GROOT, P.H.E.; VIDGEON-HART, M.; FRANTS, R.R.; WIERINGA, B.; HAVEKES, L.M.; HOFKER, M.H. Diet induced hipercholesterolemia and atherosclerosis in heterozigous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 111: p. 25-37, 1994.
- VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; FRANCO, M.V.M.J.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO-JR, A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina*. V. 31, p. 31-44, 1998.
- WADDINGTON, E.; PUDDEY, I.B.; CROFT, K.D. Red wine polyphenolic compounds inhibit atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice independently of effects on lipid peroxidation. *American Journal Clinical Nutrition*. V. 79, p. 54-61, 2004.
- WILLIAMS, R.S.; WAGNER, P.D. Transgenic animals in integrative biology: approaches and interpretations of outcome. *Journal of Applied Physiology*. v.18, p. 1119-1126. 2000.
- WONG, H. C.; KOEHLER, P. E. Production of red water-soluble Monascus pigments. *J. Food Sci. Chicago*, v.48, p.1200-1203, 1983.

- ZAMBOLIM, L. *Café: produtividade, qualidade e sustentabilidade*. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2000. 396p.
- ZHANG, H.S.; REDDICK, R.L.; PIETRAHITA, J. A; MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: p. 468-471, 1992.
- ZULUAGA, V. J. Procesamiento de frutos de café por via humeda y generacion de subproductos. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN COFFEE AGROINDUSTRY, 3, Londrina, 2000. *Proceedings...* Londrina: IAPAR; IRD; Curitiba: UFPR. p. 345-355, 2000.