

Efeito dos Resíduos de Café Seco e Fermentado por *Monascus Ruber* no Metabolismo de Camundongos Apo E

Effect of Dry Coffee Residues Fermented with Monascus Ruber on the Metabolism of Apo E mice

Larissa Froede Brito, Lívia Dias de Queirós, Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Sônia Machado Rocha Ribeiro, Sérgio Luis Pinto da Matta, José Humberto de Queiroz

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - Brasil

Resumo

Fundamento: A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial. O fungo *Monascus ruber* apresenta atividade hipocolesterolêmica e polifenóis presentes no resíduo de café apresentam atividade antioxidante, podendo auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares. O resíduo de café possui quantidade significativa de açúcares fermentescíveis, constituindo-se em substrato apropriado para o cultivo de fungos.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos resíduos de café seco e fermentado por *Monascus ruber* no metabolismo lipídico de camundongos *knockout* Apo E.

Métodos: O ensaio biológico foi realizado com 30 camundongos *knockout* para o gene Apo E, divididos em cinco grupos e submetidos a diferentes tratamentos. Foi realizada a prospecção fitoquímica e quantificação de compostos fenólicos dos resíduos fermentado e sem fermentar. O soro dos animais foi analisado utilizando kits enzimáticos e o tecido aórtico incluso em parafina e corado com H/E para realização da análise histopatológica.

Resultados: O resíduo de café sem fermentar 2%, em relação ao grupo controle, diminuiu em 42% o nível sérico de triacilgliceróis e em aproximadamente 41% a fração VLDL-c. Os grupos dos animais alimentados com 10% de resíduo não fermentado e 2% de resíduo fermentado diminuíram a área de lesão 10,5% e 15,4%, respectivamente, quando comparados ao controle. O resíduo fermentado apresentou um teor de compostos fenólicos superior ao resíduo não fermentado.

Conclusão: O presente estudo mostra que a fermentação do resíduo de café apresenta potencial efeito benéfico sobre as doenças cardiovasculares, especialmente a aterosclerose. (Arq Bras Cardiol 2012;99(2):747-754)

Palavras-chave: Aterosclerose; café; *monascus*; camundongos *knockout*.

Abstract

Background: Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of multifactorial origin, which occurs in response to endothelial injury. The fungus *Monascus ruber* has hypocholesterolemic activity, and the polyphenols present in coffee residue have an antioxidant activity and can help prevent cardiovascular diseases. Coffee residue has a significant amount of fermentable sugars, being an adequate substrate for growing fungi.

Objective: The objective of this study was to assess the effect of dry coffee residue fermented with *Monascus ruber* on the lipid metabolism of ApoE knockout mice.

Methods: The biological assay was performed with 30 ApoE knockout mice, divided into five groups and undergoing different treatments. The phytochemical prospection and quantification of phenolic compounds of the fermented and non-fermented coffee residues were performed. The sera of the animals were analyzed by using enzyme kits, and the aortic tissue was embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin to undergo histopathological analysis.

Results: Comparing with the control group, the group receiving 2% non-fermented coffee residue showed a reduction of 42% in the serum levels of triacylglycerols and of approximately 41% in VLDL-c. The groups receiving 10% non-fermented coffee residue and 2% fermented coffee residue showed reductions in the lesion areas of 10.5% and 15.4%, respectively, as compared with the control group. The fermented coffee residue showed a higher content of phenolic compounds as compared with the non-fermented coffee residue.

Conclusion: The present study showed that coffee residue fermentation has a potentially beneficial effect on cardiovascular diseases, especially atherosclerosis. (Arq Bras Cardiol 2012;99(2):747-754)

Keywords: Atherosclerosis; coffee; *monascus*; mice, knockout.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Larissa Froede Brito •

Marly de Azevedo, 40/402, Centro. CEP 36570-000, Viçosa, MG – Brasil
E-mail: larissafroede@yahoo.com.br

Artigo recebido em 24/01/12; revisado em 31/01/12; aceito em 23/03/12.

Introdução

O Brasil consolida a posição de maior produtor e exportador mundial de café em grãos, sendo responsável por 30% do mercado mundial¹. No entanto, os subprodutos dessa atividade agrícola, que em muitos casos não são devidamente tratados, gerando despesas e preocupação ambiental, são também uma fonte de compostos com propriedades funcionais².

A casca e a polpa de café, resíduos do despulpamento, possuem uma quantidade significativa de açúcares fermentescíveis, consistindo substrato apropriado para o cultivo de fungos e leveduras³.

O *Monascus ruber*, um ascomiceto, é usado há muito tempo na culinária oriental para a produção de pigmentos, comidas fermentadas e bebidas⁴. Esse fungo despertou o interesse de pesquisadores do mundo todo em razão da atividade hipocolesterolêmica de um dos seus metabólitos, a monacolina K, que possui atividade inibitória sobre a Hidroximetilglutaril-Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima-chave na biossíntese do colesterol⁵.

A aterosclerose é uma doença complexa e multifatorial, sendo afetada por múltiplos fatores genéticos e ambientais. Vários trabalhos mostram que a alta ingestão calórica e consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados acelera a sua aterogênese; no entanto, os efeitos dos componentes individuais dos alimentos ainda são pouco compreendidos⁶.

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, por inibirem a peroxidação lipídica, a lipo-oxigenase e, sobretudo, por atuarem como antioxidantes ou pró-oxidantes em doenças associadas ao metabolismo lipídico, especialmente a aterosclerose^{7,8}.

Nesse contexto, o propósito geral deste trabalho é o aproveitamento do resíduo do café, utilizando-o como meio de cultura para o crescimento do fungo *Monascus ruber* e avaliar os efeitos do produto fermentado em camundongos Apo E hiperlipidêmicos, visando o controle e prevenção das doenças cardiovasculares, especialmente a aterosclerose.

Métodos

Coleta e preparo da amostra do resíduo

Café da variedade Catuaí (*Coffea arabica* L) foi colhido na Zona da Mata Mineira no período de maio a agosto, quando 90% dos frutos encontravam-se no estágio cereja. O resíduo da despulpa, contendo casca, polpa e mucilagem aderidas à casca, foi recolhido após o processamento por via úmida e seco em estufa (Nova Técnica, modelo NT-514) à temperatura média de 55 °C até atingir teor de umidade inferior a 10%.

Micro-organismo e fermentação do resíduo

O fungo *Monascus ruber* CCT 1236 foi utilizado neste estudo. Essa cepa foi adquirida da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil). O micro-organismo foi conservado em meio PDA ("Potato Dextrose Agar") sob refrigeração.

Noventa e cinco mililitros de solução contendo sulfato de magnésio 0,1%, fosfato de potássio dihidrogenado 0,1% e cloreto de amônio 1% foram adicionados a 50 g de resíduo de café para enriquecimento do meio e elevação do teor de umidade. O resíduo foi inoculado com suspensão de esporos do fungo cultivado em meio PDA a 28 °C durante 13 dias. Em seguida, o resíduo fermentado foi seco e triturado para ser utilizado nas dietas experimentais.

Prospecção fitoquímica e quantificação de compostos fenólicos

A identificação dos metabólitos secundários presentes no resíduo de café seco e fermentado foi realizada por cromatografia de camada delgada⁹. O teor de fenóis totais dos resíduos fermentado e não fermentado foi estimado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu¹⁰. Foi utilizada a solução de água/etanol (6:4) como solvente, por apresentar maior eficiência na extração de fenóis totais dos resíduos¹¹. Os resultados foram expressos em Equivalentes de Ácido Gálico (GAE).

Ensaio biológico e análises bioquímicas

O ensaio biológico foi realizado com 30 camundongos *knockout* para o gene Apo E (*knockout* Apo E), de ambos os sexos, pesando em média 22 g. Os animais receberam ração comercial Purina® e água "ad libitum" durante um período de adaptação de 15 dias. Durante 10 semanas, os animais foram submetidos às dietas experimentais e água "ad libitum" e mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, com ventilação natural e ciclos de luminosidade de 12 horas e temperatura média de 22 °C. O planejamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, segundo Processo nº 11/2008. Os camundongos foram divididos em cinco grupos contendo seis animais cada. A dieta dos grupos experimentais foi elaborada segundo recomendação da Association of Official Analytical Chemistry¹². As dietas dos grupos 2 e 3 continham 2% e 10% de resíduo não fermentado, respectivamente. O resíduo fermentado foi adicionado nas mesmas concentrações aos grupos 4 e 5 (Tabela 1).

Ao final do experimento os animais foram pesados, após jejum de 12 horas, anestesiados, eutanasiados e coletado 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 5.000 rpm por 15 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®.

Histopatologia

A região inicial da aorta foi removida e perfundida em tampão salino fosfato (PBS), transferida para uma solução de etanol 70% e conservada até a realização da análise histopatológica. Fragmentos aórticos foram processados em micrótomoto rotativo manual (marca American Optical®) conforme rotina para inclusão em parafina, de forma

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

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)

orientada, obtendo-se cortes histológicos consecutivos, com 5 μm de espessura, a partir da superfície de inclusão. Foram preparadas duas lâminas contendo em média 10 cortes por animal. As preparações foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E), codificadas e submetidas à análise microscópica.

A região inicial da aorta foi utilizada para as análises histológicas dos constituintes arteriais. 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 morfológica foram capturadas imagens dos cortes histológicos dos cinco grupos, e para padronização do número amostral dos grupos foram sorteadas, aleatoriamente, oito imagens para realização das medidas.

As imagens foram obtidas 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.

Análises dos dados

O software SigmaStat (versão 2.03) foi utilizado para análise descritiva dos resultados e testes de comparação das médias dos grupos independentes. A avaliação da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Sminov. Considerando o número amostral por grupo de animais e que algumas variáveis não apresentaram distribuição normal, testes não paramétricos foram realizados para a comparação de cada dois grupos independentes, utilizando o teste de Mann Whitney. As variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise paramétrica, seguida do teste t. As médias foram significativas a $p < 0,05$.

Resultados

Prospecção fitoquímica e quantificação de compostos fenólicos

Os principais grupos de metabólitos secundários identificados nos resíduos de café fermentado e não fermentado por *Monascus ruber* estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados para detecção de saponinas, triterpenos/esteroides, cumarinas, taninos, flavonoides e alcaloides foram positivos para ambos resíduos. No entanto, houve diferença entre os perfis cromatográficos dos extratos quanto aos grupos metabólitos secundários (Tabela 3).

Os resultados mostram que o resíduo fermentado apresentou um teor de fenóis totais estatisticamente superiores ao resíduo não fermentado.

Efeito da ingestão 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.

Os resultados mostram que houve uma diminuição significativa nos níveis séricos de triacilgliceróis e da fração VLDL-c.

Histopatologia aórtica de camundongos knockout Apo E

A Tabela 5 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.

Os resultados mostram que houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de tratamento (Grupos 2, 3 e 4) e o grupo controle (Grupo 1).

A Figura 1 ilustra as lesões na aorta dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado.

Tabela 2 – Resultados da prospecção fitoquímica, por cromatografia de camada delgada dos resíduos de café fermentado e não fermentado

Classe de metabólitos secundários	Resíduo fermentado	Resíduo sem fermentar
Antraquinonas	-	-
Saponinas	+	+
Triterpenos e Esteroides	+	+
Flavonoides	+	+
Taninos	+	+
Cumarinas	+	+
Alcaloides	+	+

Nota - +: presente; -: ausente.

Tabela 3 – Teor de fenóis totais dos resíduos de café seco e fermentado, expressos em Equivalentes de ácido gálico (GAE)

Resíduo	Fenóis totais (mg GAE g resíduo)	Concentração (%)
Não fermentado	7,772 ± 0,0676	0,7772
Fermentado	10,857 ± 0,169*	1,0857

Nota – GAE: Equivalentes de ácido gálico. * diferentes estatisticamente pelo teste t, sendo $p < 0,001$.

Tabela 4 – Teores séricos de triacilgliceróis, colesterol total e frações de camundongos knockout Apo E submetidos a diferentes tratamentos

Parâmetros (mg/dL)	G1	G2	G3 ¹	G4 ¹	G5 ¹
Colesterol	1356,0 ± 437,2	1699,6 ± 221,0	1423,7 ± 99,3	1122,8 ± 193,5	1509,9 ± 227,0
TG	118,1 ± 39,6	57,3 ± 6,2**	124,3 ± 79,6	162,3 ± 106,6	213,9 ± 180,9
LDL	1465,1 ± 429,6	1672,3 ± 220,1	-	-	-
VLDL	22,7 ± 8,6	11,4 ± 1,2*	-	-	-
HDL	14,9 ± 5,3	15,7 ± 0,7	-	-	-

TG: triacilgliceróis

Nota: Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de seis animais nos grupos G1 (controle) e quatro 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).

Tabela 5 – Percentual médio da área das lesões aórticas 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	62,28 ± 1,49	72,63 ± 5,86	55,92 ± 1,51	52,18 ± 1,74	64,19 ± 3,26
Mediana	62,18 ^b	71,40 ^a	55,62 ^c	52,55 ^c	64,75 ^b
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

CV: coeficiente de variação

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).

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente, $p < 0,001$ pelo teste t

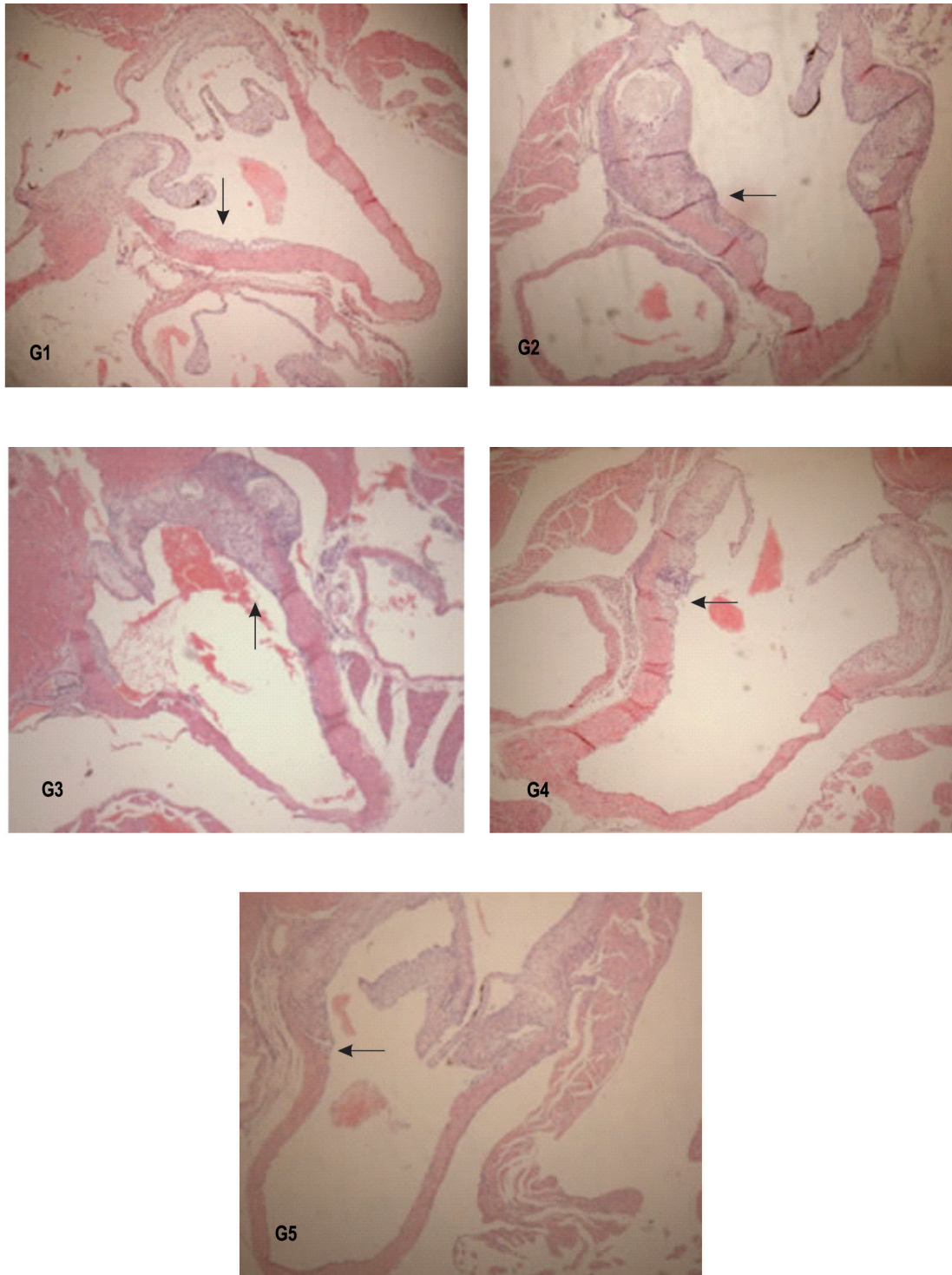


Fig. 1 - Aspecto histológico (H/E) da raiz da aorta dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado. As setas (←, ↑ e ↓) indicam presença de lesão xantomatosa em fase progressiva. 40 x

As lesões aórticas são classificadas como um xantoma em estágio progressivo e ainda não são encontrados deposição evidente de cristais de colesterol, de acordo com a classificação de Virmani e cols.¹³.

A Figura 2 mostra a avaliação morfométrica das lesões aórticas dos camundongos alimentados com as diferentes dietas.

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.

Discussão

O presente estudo avalia, pela primeira vez, o efeito do resíduo de café não fermentado e fermentado pelo fungo *Monascus ruber* no metabolismo lipídico de animais.

Produtos fermentados por fungos do gênero *Monascus* têm sido utilizados no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, especialmente aterosclerose¹⁴. O resíduo do café é rico em polifenóis e compostos bioativos com ação antioxidante, os quais também apresentam ação protetora do sistema cardiovascular¹⁵⁻¹⁷.

O processo de fermentação pode sintetizar ou degradar compostos que apresentam atividade biológica. Neste trabalho foi verificada a presença das mesmas classes de compostos bioativos nos resíduos de café fermentado e não fermentado. No entanto, mediante distintos fatores de retenção, foi possível observar diferentes compostos fitoquímicos nas mesmas classes de metabólitos secundários entre o resíduo fermentado e não fermentado. Essa diferença de compostos pode estar relacionada com o teor superior de polifenóis no resíduo que foi submetido à fermentação.

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 (Grupo 1). O resíduo de café sem fermentar 2% (Grupo 2) diminuiu em 42% o nível sérico de triacilgliceróis ao mesmo tempo em que reduziu a fração VLDL-c em aproximadamente 41% em relação ao grupo controle (Grupo 1), sendo as diferenças estatisticamente significativas.

A aorta dos animais do grupo que recebeu a dieta aterogênica suplementada com resíduo de café sem fermentar a 2% (Grupo 2) apresentou maior área de lesão quando comparado ao grupo controle (Grupo 1), ao contrário de esperado, uma vez que esse grupo apresentou níveis de triacilgliceróis e VLDL-c inferior ao grupo controle. Os grupos dos animais que foram alimentados com 10% de resíduo não

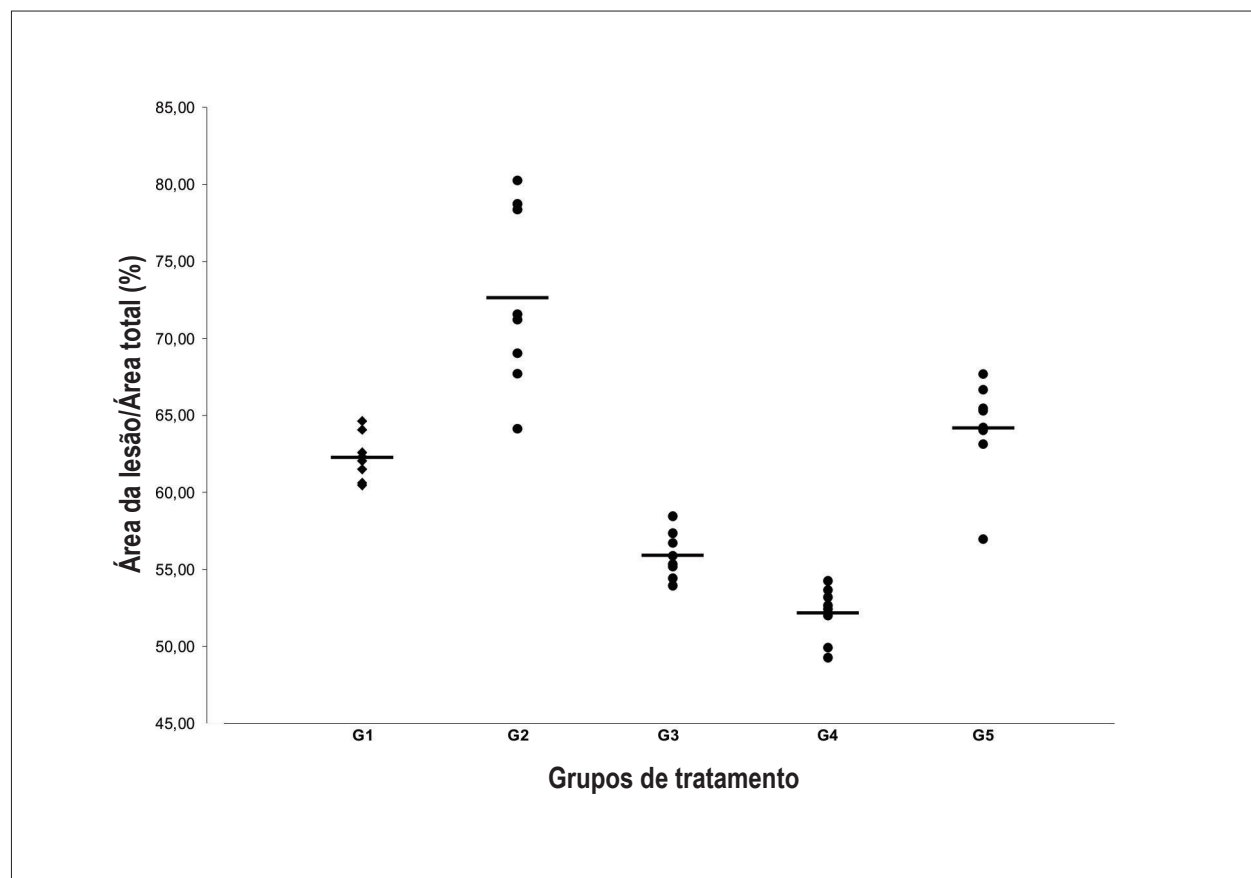


Fig. 2 - Avaliação morfométrica das áreas das lesões aórticas de camundongos knockout Apo E submetidos a diferentes tratamentos com resíduo de café fermentado e não fermentado. Grupo G1 (controle), grupo G2 (2%resíduo não fermentado), grupo G3 (10% resíduo não fermentado), grupo G4(2% resíduo fermentado) e grupo G5 (10% resíduo fermentado)

fermentado (Grupo 3) e 2% de resíduo fermentado (Grupo 4) diminuíram a área de lesão 10,5% e 15,4% respectivamente, quando comparado ao grupo controle, sendo esta diminuição estatisticamente significativa.

Comparando os grupos alimentados com os diferentes resíduos na mesma concentração, Grupo 2 e Grupo 4, observa-se que os animais que consumiram 2% do resíduo fermentado apresentaram diminuição de 26,4% na área de lesão quando comparado ao Grupo 2, 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 (Grupo 5).

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 (Grupo 3) foi eficaz na redução da lesão. Em contrapartida, a menor concentração do resíduo fermentado (Grupo 4) apresentou melhor efeito protetor.

A relação entre o consumo da bebida café e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares tem sido demonstrada na literatura, principalmente envolvendo humanos. Se, por um lado, diversos estudos demonstram o efeito maléfico do café sobre as doenças^{18,19}, por outro, existem evidências de efeitos benéficos dele^{20,21}. Contudo, não foram encontrados relatos na literatura abordando o efeito dos produtos fermentados por fungos do gênero *Monascus* e/ou o resíduo de café sobre o metabolismo animal e humano. O presente trabalho mostrou que o resíduo do café é um meio para o crescimento do fungo *Monascus ruber*, podendo atuar como um aliado para prevenção da aterosclerose.

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. O aumento na concentração desses compostos pode causar injúrias celulares

relacionadas ao surgimento de condições patológicas no organismo²²⁻²⁴. Uma possível explicação para os resultados observados é que a fermentação leva à formação de compostos bioativos específicos que em altas concentrações (10%) tornam-se maléficos e que a 2% essa concentração foi adequada para diminuir essas lesões aórticas. Já no resíduo sem fermentar é possível que a concentração de fenóis no resíduo a 2% seja insuficiente para apresentar efeito protetor no organismo, e que na suplementação de 10% essa concentração seja adequada para tais efeitos.

O estudo apresenta limitações que devem ser mencionadas. O pouco volume sanguíneo obtidos nesse tipo de modelo animal dificulta a realização de diferentes análises.

Conclusões

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que o resíduo de café reduz os níveis séricos de triacilgliceróis e VLDLc.

A fermentação elevou o teor de fenóis totais.

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, evidenciando um efeito dose dependente.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo teve o apoio técnico e financeiro da Fapemig e do CNPq.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Larissa Froede Brito pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG.

Referências

1. Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC). [Citado em 2011 dez 10]. Disponível em: <http://www.abic.com.br/>
2. Esquivel P, Kramer M, Carle R, Jiménez VM. Anthocyanin profiles and caffeine contents of wet-processed coffee (*Coffea arabica*) husks by HPLC/DAD-MS/MS. In: 28th International Horticultural Congress. Book of abstracts. Amsterdam: Elsevier; 2010. p. 129-30.
3. Soccol CR. Resíduo de café um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. Pesquisa dos cafés do Brasil. Brasília: Embrapa; 2002. p. 83-98.
4. Panagou EZ, Skandamis PN, Nychas GJ. Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. J Appl Microbiol. 2003;94(1):146-56.
5. Manzoni M, Bergomi S, Rollini M, Cavazzoni V. Production of statins by filamentous fungi. Biotechnol Lett. 1999;21(3):253-7.
6. Srivastava S, Sithu SD, Vladyskovskaya E, Habertzell P, Hoetker DJ, Siddiqui MA, et al. Oral exposure to acrolein exacerbates atherosclerosis in apoE-null mice. Atherosclerosis. 2011;215(2):301-8.
7. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. J Nat Prod. 1996;59(2):205-15.
8. Soares SE. Phenolic acids as antioxidants. Rev Nutr. 2002;15(1):71-81.
9. Wagner H, Bland S, Zgainski EM. Plant drug analysis. Berlin: Springer-Verlag; 1984.
10. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 1999;299:152-78.
11. Queirós LD, Brito LF, Silva AF, Machado FPP, Queiroz JH. Extração de fenóis totais em resíduo de café seco e fermentado. In: 19ª Semana de Iniciação Científica de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Viçosa; Universidade Federal de Viçosa (MG); 2009.

12. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official methods of analysis of AOAC. 14th ed. Washington; 1989.
13. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1262-75.
14. Endo A, Hasumi K, Nehgishi S. Monacolins J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. *J Antibiot (Tokyo).* 1985;38(3):420-2.
15. Rathinavelu R, Graziosi G. Uso alternativo potencial de detritos e subprodutos do café. Organização Internacional do Café. Trieste (Italia): ICS-Unido, Parque da Ciência Padriciano; Departamento de Biologia, Universidade de Trieste; 2005.
16. Monteiro MC, Trugo LC. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim Nova.* 2005;28(4):637-41.
17. Parra ARP, Moreira I, Furlan AC, Paiano D, Scherer C, Carvalho PLO. Utilização da casca de café na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. *Rev Bras Zootec.* 2008;37(3):433-42.
18. Panagiotakos DB, Pitisavos C, Chrysohoou C, Kokkinos P, Toutouzias P, Stefanadis C. The J-shaped effect of coffee consumption on the risk of developing acute coronary syndromes: the CARDIO2000 case control study. *J Nutr.* 2003;133(10):3228-32.
19. Happonen P, Voutilainen S, Salonen JT. Coffee drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. *J Nutr.* 2004;134(9):2381-6.
20. Esposito F, Morico F, Verde V, Ritieni A, Alezio A, Caporaso N, et al. Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17(4):595-601.
21. Hodgson JM, Chan SY, Puddey IB, Devine A, Wattanapenpaiboon N, Wahavist ML, et al. Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea and coffee derived polyphenol exposure in humans subjects. *Br J Nutr.* 2004;91(2):301-6.
22. Ribeiro SMR, Queiroz JH, Pelúzio MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci J.* 2005;21(3):133-49.
23. Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2006;187(1):1-17.
24. Costa NMB, Rosa COB. (Eds). Alimentos funcionais: benefícios para a Saúde. Viçosa (MG). 2008.