



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

NATÁLIA ALVES DE SOUZA MENEGUELLI

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE CAFÉ VERDE (*Coffea canephora*) NA
SAÚDE INTESTINAL DE RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERCALÓRICA E HIPERLIPÍDICA**

ALEGRE – ES
SETEMBRO - 2024

NATÁLIA ALVES DE SOUZA MENEGUELLI

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE CAFÉ VERDE (*Coffea canephora*) NA
SAÚDE INTESTINAL DE RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERCALÓRICA E HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Grancieri

ALEGRE – ES
SETEMBRO – 2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M541e Meneguelli, Natália Alves de Souza, 1996-
Efeito do extrato aquoso de café verde (*Coffea canephora*)
na saúde intestinal de ratos wistar alimentados com dieta
hipercalórica e hiperlipídica / Natália Alves de Souza
Meneguelli. - 2024.
71 p. : il.

Orientador: André Gustavo Vasconcelos Costa.

Coorientadores: Mariana Grancieri, Leonardo Oliveira
Trivilin.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Obesidade. 2. Intestino. 3. Conilon. 4. Ácido clorogênico.
5. Ácidos graxos de cadeia curta. 6. Proteínas de junção. I. Costa,
André Gustavo Vasconcelos. II. Grancieri, Mariana. III.
Trivilin, Leonardo Oliveira. IV. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.


CDU: 664

NATÁLIA ALVES DE SOUZA MENEGUELLI

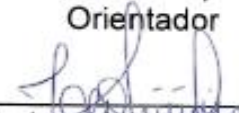
“EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE CAFÉ VERDE (*Coffea canephora*) NA SAÚDE INTESTINAL DE RATOS *Wistar* ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA E HIPERLIPÍDICA”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

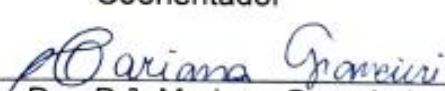
Aprovada em 23 de setembro de 2024.



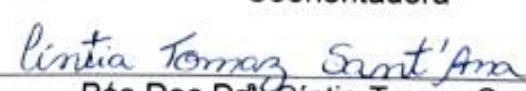
Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Orientador



Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Coorientador



Pós Doc Drª. Mariana Grancieri
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Coorientadora



Pós Doc Drª. Cíntia Tomaz Sant'Ana
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Membro Interno

Dennys Esper Cintra

Digitally signed by Dennys Esper Cintra
Date: 2024.09.25 08:04:20 -03'00'

Prof. Dr. Dennys Correa Cintra
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meu caminho até aqui, por todos os livramentos e proteção ao longo de minha vida. Em cada desafio enfrentado e em cada conquista alcançada, me dando forças que eu mesma desconhecia!

À minha família: meus pais, meu irmão, minha cunhada e meu namorado, por todo o suporte incondicional e compreensão ao longo desta caminhada. Obrigada por toda ajuda e tranquilidade que me transmitiam. Obrigada por acreditarem em mim muito mais do que eu mesma. O apoio de vocês foi essencial para essa conquista!

Ao meu orientador, Prof. André, pela orientação, paciência e valiosos ensinamentos durante todo o processo de pesquisa, essenciais para a execução deste trabalho. Minha eterna admiração!

Aos meus coorientadores, Mariana Grancieri e Leonardo Trivilin por todos os ensinamentos e contribuições para este trabalho. Os momentos que compartilhamos foram muito enriquecedores e especiais. Vocês são incríveis!

À Dra. Cíntia Sant'Ana, pelos ensinamentos e momentos compartilhados, além de toda a disponibilidade para auxiliar na execução e entendimento de muitas análises que foram realizadas durante este período. E ao Prof. Dennys Correa pelas contribuições para realização deste trabalho. Muito obrigada!

Agradeço também às professoras Neuza, Mirelle e Pollyanna, sempre presentes durante a execução desta pesquisa, cujas aulas e discussões promovidas foram essenciais para minha vida acadêmica e pessoal.

À minha eterna dupla, Manuella Domiciano, por absolutamente tudo que compartilhamos durante esses 7 anos de amizade. Não sei o que seria de mim esses anos sem você! Te admiro demais!

Aos meus queridos amigos, Layla, Ana Clara, Dara, Gabriella, Lanna, Renato e Tiago, que de perto ou de longe, sempre estiveram presentes oferecendo ajuda, incentivo e tornando os momentos difíceis mais leves e alegres. Minha gratidão eterna!

Aos alunos Thainara Queiroz, André Carvalho e Pedro Eyke por toda colaboração e dedicação ao longo da execução deste trabalho.

Aos técnicos de laboratórios, Eduardo, Mayara, Maurício, Letícia e Kelly sempre solícitos e dispostos a ajudar, cuja contribuição foi essencial para a realização das análises ao longo deste período.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento do estudo (Edital FAPES Universal, nº 28/2022 – TO 838/2023).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), o presente trabalho foi realizado com apoio desta - Código de Financiamento 001.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais sincero agradecimento.

LISTA DE SIGLAS

% - porcentagem

°C – graus Celsius

µg - micrograma

µL - microlitro

µM – micromolar

® - Marca registrada

ACG - Ácido Clorogênico

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

CEA - Coeficiente de Eficiência Alimentar

CEC – Coeficiente de Eficiência Calórica

g - grama

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IL- Interleucina

IMC – Índice de Massa Corporal

Kg - quilograma

LPS – Lipopolissacarídeos

mg- miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mMol - milimolar

nm - nanômetro

ON - Óxido Nítrico

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

sIgA - Imunoglobulina A secretora

SOD - Superóxido Dismutase

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

v – volume

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da torrefação sobre a concentração de compostos dos grãos de café	22
Tabela 2 - Efeito do extrato de café verde e de seus componentes sobre a saúde intestinal	30
Tabela 3 - Composição da dieta experimental hipercalórica e hiperlipídica (HF)	38
Tabela 4 – Quantificação de compostos majoritários do extrato de café verde	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do desenho experimental.....	37
Figura 2 - Consumo alimentar dos animais.....	44
Figura 3 - Ganho de peso corporal, Índice de Lee e Tecido adiposo epididimal.....	46
Figura 4 - Valores de pH e ácidos graxos de cadeia curta dos animais.....	48
Figura 5 - Concentração de IgA e biomarcadores de estresse oxidativo.	49
Figura 6 – Análises morfométricas da mucosa colônica dos animais experimentais.	51
Figura 7 - Quantificação de proteínas claudina e ocludina no intestino grosso dos animais experimentais.....	53

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. Compostos bioativos do café verde	19
3.2. Saúde intestinal.....	24
3.2.1. Impactos da dieta hiperlipídica na saúde intestinal.....	26
3.3. Café verde e saúde intestinal.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Extrato Aquoso de Café Verde.....	34
4.2. Determinação dos teores de cafeína, ácido clorogênico e trigonelina	34
4.3. Estudo em modelo animal de obesidade	35
4.4. Delineamento experimental.....	35
4.5. Dietas experimentais.....	37
4.6. pH Intraluminal do Cólon.....	38
4.7. Determinação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)	38
4.8. Dosagem de Imunoglobulina A secretora (sIgA).....	39
4.9. Preparo do homogenato e determinação do estresse oxidativo	39
4.10. Análises morfométricas da mucosa colônica	40
4.11. Quantificação das proteínas claudina e ocludina no intestino grosso.....	41
4.12. Análise estatística	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Composição do extrato aquoso de café verde	43
5.2. Consumo alimentar dos animais	43
5.3. Ganho de peso corporal dos animais.....	45
5.4. pH intestinal e Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC).....	47
5.5. Determinação de IgA e marcadores de estresse oxidativo	48
5.6. Análises morfométricas da mucosa colônica	50

5.7. Quantificação das proteínas claudina e ocludina no intestino grosso	52
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO	61
8. REFERÊNCIAS	62
ANEXO.....	71
Anexo A – Aprovação comitê de ética.	71

RESUMO

MENEGUELLI, Natália Alves de Souza. **Efeito do extrato aquoso de café verde (*Coffea canephora*) na saúde intestinal de animais alimentados com dieta hipercalórica e hiperlipídica.** 2024. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa. Coorientador(es): Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivillin e Profa. Dra. Mariana Grancieri.

Hábitos alimentares inadequados, como o excesso calórico e dietas ricas em gordura saturada, estão relacionados ao desenvolvimento da obesidade e a alterações intestinais. O café verde é rico em compostos bioativos antioxidantes, que podem auxiliar no manejo da obesidade. No entanto, seus efeitos sobre a saúde intestinal, especialmente no contexto da obesidade, ainda não estão totalmente esclarecidos. O objetivo foi avaliar o efeito do extrato aquoso de café verde na saúde intestinal de um modelo animal de obesidade. Foram utilizados 32 ratos Wistar adultos, divididos em quatro grupos experimentais (n=8): grupo CT – controle negativo (dieta controle comercial, sem suplementação de extrato de café verde), HF – controle positivo (induzido à obesidade, sem extrato de café verde), HFP – grupo experimental de prevenção (induzido à obesidade, com suplementação do extrato desde a 1ª semana experimental) e HFT – grupo experimental de tratamento (induzido à obesidade, com suplementação de extrato a partir da 8ª semana). A obesidade foi induzida durante oito semanas com uma dieta hipercalórica e hiperlipídica (HF). Ao final da 16ª semana, os animais foram eutanasiados. Coletaram-se amostras do tecido colônico para análises de marcadores oxidativos (catalase, superóxido dismutase - SOD e óxido nítrico - ON), morfometria e proteínas de junção. O conteúdo cecal e colônico foi utilizado para as análises de pH, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e imunoglobulina A. O consumo alimentar foi monitorado diariamente, e o peso semanalmente. Na análise estatística, aplicou-se teste *t* entre CT e HF, e ANOVA seguido de Tukey para HF, HFP e HFT, adotando-se 5% de probabilidade. Em comparação à CT, o grupo HF apresentou médias significativamente maiores ($p < 0,05$) para coeficiente de eficiência alimentar e calórica, ganho de peso e parâmetros murinométricos, confirmando a indução à obesidade. Observou-se também, redução significativa ($p < 0,05$) do pH intestinal, ON, SOD, parâmetros morfométricos, claudina e ocludina. Contudo, a suplementação com o extrato não alterou os parâmetros relacionados ao consumo alimentar e murinométrico dos animais. Por outro lado, no grupo HFP, o extrato preveniu as alterações na mucosa e a redução das proteínas de junção, enquanto no grupo HFT houve redução do pH intestinal, aumento de butirato e acetato e recuperação morfométrica e aumento de claudina e ocludina. Esses achados evidenciam os benefícios do extrato aquoso de café verde para a saúde intestinal, destacando seu potencial como estratégia na prevenção e tratamento de alterações intestinais induzidas por uma dieta high-fat.

Palavras-chave: obesidade, conilon, ácido clorogênico, ácidos graxos de cadeia curta, proteínas de junção.

ABSTRACT

MENEGUELLI, Natália Alves de Souza. **Effect of aqueous extract of green coffee (*Coffea canephora*) on the intestinal health of animals fed a high-calorie and high-fat diet. 2024. Dissertation (Master's degree in Food Science and Technology) – Federal University of Espírito Santo, Alegre – ES.** Advisor: Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa. Co-advisor: Prof. Dsc. Leonardo Oliveira Trivillin and Prof. Dsc. Mariana Grancieri.

Inadequate eating habits, such as excessive caloric intake and diets high in saturated fats, are associated with the development of obesity and intestinal alterations. Green coffee is rich in bioactive antioxidant compounds, which may assist in obesity management. However, its effects on intestinal health, particularly in the context of obesity, remain unclear. This study aimed to evaluate the effect of aqueous green coffee extract on intestinal health in an animal model of obesity. A total of 32 adult Wistar rats were divided into four experimental groups (n=8): CT – negative control (commercial control diet without green coffee extract supplementation), HF – positive control (obesity-induced without green coffee extract), HFP – prevention experimental group (obesity-induced with extract supplementation from the first experimental week), and HFT – treatment experimental group (obesity-induced with extract supplementation starting from the 8th week). Obesity was induced over eight weeks through a hypercaloric and high-fat diet (HF) diet. At the end of the 16th week, the animals were euthanized. Colon tissue samples were collected for analysis of oxidative markers (catalase, superoxide dismutase - SOD, and nitric oxide - NO), morphometric parameters and junction protein. Cecal and colonic contents were used to analyze pH, short-chain fatty acids (SCFAs), and immunoglobulin A (IgA). Food intake was monitored daily, and body weight was measured weekly. For statistical analysis, a t-test was applied between CT and HF groups, while ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used for HF, HFP, and HFT groups, adopting a 5% significance level. Compared to the CT group, the HF group exhibited significantly higher means ($p < 0.05$) for feed and caloric efficiency coefficients, weight gain, and murinometric parameters, confirming the induction of obesity. A significant reduction ($p < 0.05$) in intestinal pH, NO, SOD, morphometric parameters, claudin, and occludin was also observed. However, supplementation with the green coffee extract did not influence parameters related to food intake or murinometric measurements. On the other hand, in the HFP group, the extract prevented mucosal alterations and the reduction of junction proteins, whereas in the HFT group, it promoted a reduction in intestinal pH, an increase in butyrate and acetate levels, morphometric recovery, and increased claudin and occludin quantification. These findings demonstrate the beneficial effects of aqueous green coffee extract on intestinal health, highlighting its potential as a strategy for preventing and treating intestinal alterations induced by a high-fat diet.

Keywords: obesity, conilon, chlorogenic acid, short-chain fatty acids, junction proteins.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde pública mundial. Estima-se que, até o ano de 2035, pelo menos 50% da população adulta mundial apresentará excesso de peso corporal, o qual é caracterizado pelo índice de massa corporal (IMC) superior a 25 Kg/m². Esse dado é preocupante, uma vez que entre as mortes anuais atribuídas às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), 5 milhões ocorrem em decorrência do excesso de peso da população (LOBSTEIN; POWIS; JACKSON-LEACH, 2024).

O aumento da prevalência de obesidade está diretamente relacionado ao estilo de vida, como sedentarismo e padrão alimentar inadequado, marcado pelo excesso no consumo de calorias e gorduras (JACOB et al., 2022). Esse padrão dietético, possui um impacto negativo para a saúde intestinal, evidenciado por danos à estrutura da mucosa (HUANG et al., 2020; LEE et al., 2017; TANAKA et al., 2020) e redução das proteínas de junção, como claudina, ocludina e ZO-1 (BRANDT et al., 2019; XIE et al., 2021; YANG et al., 2019). Essas alterações aumentam a permeabilidade intestinal, facilitando a translocação de conteúdo do lúmen para a circulação sistêmica, o que desencadeia a resposta imunológica exacerbada (BRANDT et al., 2019; XIE et al., 2021; YANG et al., 2019). Além disso, o consumo de dieta hipercalórica e hiperlipídica está associada a perda da diversidade bacteriana e disbiose, reduzindo a abundância de bactérias benéficas produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (XIE et al., 2021; XU et al., 2020; YANG et al., 2019), bem como, associada ao desequilíbrio das respostas oxidativas, caracterizadas pelo aumento de marcadores oxidativos e diminuição da capacidade antioxidante (YANG et al., 2019).

Em condições normais, a mucosa intestinal, a microbiota e o sistema imunológico associado ao intestino interagem para manter a homeostase intestinal. Resumidamente, a mucosa, formada por células epiteliais especializadas, atua como uma barreira física e bioquímica, regulando interações com microrganismos e o sistema imunológico, sustentada pelas proteínas de junção intestinal claudina e ocludina (PÉREZ-REYTOR et al., 2021; PETERSON; ARTIS, 2014). A microbiota intestinal, composta principalmente por Firmicutes e Bacteroidetes, exerce funções metabólicas, como a produção de AGCC (acetato, propionato e butirato) e proteção

contra patógenos (IACOB; IACOB; LUMINOS, 2019; KAYAMA; OKUMURA; TAKEDA, 2020; ZHENG et al., 2023). Os AGCC são utilizados como fonte de energia para as células intestinais, regulam a integridade das proteínas de junção intestinal (KAYAMA; OKUMURA; TAKEDA, 2020; PÉREZ-REYTOR et al., 2021), e apresentam efeitos anti-inflamatórios (ZHENG et al., 2021). O sistema imunológico intestinal, por sua vez, está intimamente ligado à defesa contra infecções e à regulação das respostas imunológicas, através de componentes como a imunoglobulina A (IgA), um anticorpo fundamental na neutralização de patógenos, sem desencadear inflamação exacerbada, e reforçando a barreira intestinal (PIETRZAK et al., 2020; KAYAMA; OKUMURA; TAKEDA, 2020). Esses sistemas interagem para manter a integridade da barreira intestinal, modulando inflamações e equilíbrio oxidativo, sendo essenciais para a homeostase intestinal e a saúde geral do organismo (TIAN; WANG; ZHANG, 2017; ZHANG et al., 2020). Alterações nessas funções, como disbiose e desequilíbrios no estresse oxidativo, podem comprometer a saúde intestinal e favorecer inflamações crônicas (IACOB; IACOB; LUMINOS, 2019; TIAN; WANG; ZHANG, 2017; ZHANG et al., 2020).

Diante disso, a manutenção e recuperação da homeostase intestinal tornam-se essenciais, dada a relação existente entre a saúde intestinal e o desenvolvimento de complicações, como doenças inflamatórias intestinais (ZHANG et al., 2017; ZHENG et al., 2023), câncer de cólon (SILVA et al., 2022), doenças cardiovasculares (TANG; KITAI; HAZEN, 2017), neurológicas (FILOSA; DI MEO; CRISPI, 2018) e hepáticas (HUSSAIN et al., 2020). Logo, estratégias que visam restaurar as condições intestinais podem oferecer abordagens promissoras para serem utilizadas no co-tratamento de doenças crônicas não transmissíveis. Nesse contexto, o café tem sido considerado como uma opção interessante devido aos seus compostos com potencial anti-inflamatório, antioxidante e prebiótico (DAI et al., 2023; XU et al., 2020; ZHANG et al., 2018).

O café possui duas variedades que dominam a produção mundial, sendo elas o café arábica e conilon (ICO, 2024). Essas duas espécies apresentam algumas diferenças quanto a sua composição química, com destaque ao maior teor de sacarose nos grãos arábica em detrimento à maior quantidade de compostos bioativos como os compostos fenólicos e a cafeína presentes no conilon (HUANG et al., 2021;

MANNINO; KUNZ; MAFFEI, 2023; PINHEIRO et al., 2021). Além disso, apesar da popularidade da bebida preparada a partir do café torrado, o café verde, obtido dos grãos crus e não torrados, tem ganhado destaque em estudos devido a diferença de composição e potencial antioxidante comparado aos grãos torrados (FREITAS et al., 2023; HERAWATI et al., 2019). Entre seus diversos compostos, destacam-se o ácido clorogênico, a trigonelina e a cafeína, que têm demonstrado efeitos benéficos significativos à saúde (ABDEL-MOHSEN et al., 2023; ALAMRI et al., 2020; COSTA et al., 2020; HERAWATI et al., 2019; KHAN et al., 2019).

No contexto intestinal, o uso do café verde mostra-se promissor para a manutenção da homeostase local. Estudos em modelo in vivo e in vitro de câncer de cólon observaram que o extrato de café verde auxilia na recuperação da barreira intestinal e aumento de IgA, além de redução de marcadores inflamatórios e potencial antiproliferativo em células cancerígenas (MOJICA et al., 2018; SILVA et al., 2022).

Embora ainda haja poucos estudos sobre o impacto do extrato de café verde em parâmetros intestinais, evidências do uso de seus compostos majoritários isolados, apontam os efeitos positivos dessa suplementação, incluindo a modulação da microbiota e aumento da diversidade bacteriana (DAI et al., 2023; YE et al., 2021), melhora da morfologia intestinal e redução da permeabilidade intestinal (YE et al., 2021) e redução de processos inflamatórios (ZHANG et al., 2017; ZHENG et al., 2023).

Neste contexto, a hipótese do presente estudo foi de que a suplementação com o extrato de café verde (*Coffea Canephora*) em animais alimentados com dieta hipercalórica e hiperlipídica, durante 16 semanas, promove a manutenção da saúde intestinal. Acredita-se que a suplementação precoce com o extrato de café verde, ou seja, concomitante à administração de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica previna alterações intestinais, ao passo que a suplementação tardia, ou seja, após a obesidade instalada, seja capaz de recuperar parâmetros relacionados a integridade e funcionalidade intestinal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato aquoso de café verde (*Coffea Canephora*) nas alterações intestinais decorrentes do consumo de dieta hiperlipídica e hipercalórica em modelo experimental de obesidade.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o teor de cafeína, ácido clorogênico e trigonelina dos extratos de café verde;
- Induzir a obesidade nos animais experimentais a partir da dieta hipercalórica e hiperlipídica;
- Avaliar o ganho de peso e consumo alimentar dos ratos;
- Avaliar o efeito do extrato aquoso de café verde sobre o pH intestinal e o conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta;
- Avaliar o efeito do extrato aquoso de café verde sobre a produção de IgA secretora e biomarcadores do estresse oxidativo intestinal;
- Verificar a ação do extrato aquoso de café verde sobre a morfologia intestinal e a quantificação de proteínas de junção no intestino grosso.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Compostos bioativos do café verde

O café é uma das bebidas mais consumidas e apreciadas no mundo, conhecido por seu sabor e aroma característicos, além de seu efeito estimulante atribuído ao conteúdo de cafeína presente (LEMOS et al., 2020; LOWERY et al., 2023). Apesar do amplo consumo da bebida, preparada a partir dos grãos torrados, há um crescente interesse nos estudos sobre os efeitos à saúde associados ao café verde, especialmente devido às diferenças no conteúdo de componentes com potencial antioxidante (DO CARMO et al., 2022; HERAWATI et al., 2019; SILVA et al., 2022).

O termo “café verde” refere-se aos grãos crus e não torrados, provenientes dos frutos dos arbustos do gênero *Coffea* (ŞEMEN et al., 2017). Esses grãos são considerados uma rica fonte de compostos antioxidantes e têm sido objeto de estudos, devido aos seus efeitos benéficos à saúde (ABDEL-MOHSEN et al., 2023; RIZK et al., 2021; ROSHAN et al., 2018; SILVA et al., 2022).

A composição dos grãos de café verde inclui carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas e minerais, além de um complexo de compostos bioativos, incluindo ácidos fenólicos (ácido clorogênico), alcaloides (trigonelina, cafeína, teobromina, teofilina), diterpenos (cafestol e kahweol) e ácidos nicotínicos (vitamina B3) (JESZKA-SKOWRON; FRANKOWSKI; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, 2020; NOVAES et al., 2023; PURWOKO et al., 2022).

Entre os compostos bioativos, os ácidos clorogênicos, a cafeína e a trigonelina se destacam por exercer influência positiva sobre diversos aspectos fisiológicos, como o controle da progressão do câncer (YAMAGATA et al., 2018), ação anti inflamatória e antioxidante (COSTA et al., 2020), além de efeito sobre o estado de alerta e a função cognitiva (KILLGORE; KAMIMORI, 2020).

Os ácidos clorogênicos (ACG), principais compostos fenólicos do café, são ésteres de ácidos transcinâmicos (ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico) e ácido quínico, formando os principais grupos de ACG, a saber: ácidos cafeoilquínicos (CQA), ácidos dicafeoilquínicos (diCQA), ácidos feruloilquínicos (FQA), ácidos p-cumaroilquínicos (p-CoQA) e ácidos cafeoilferuloilquínicos (CFQA) (BADMOS; LEE;

KUHNERT, 2019). Esses compostos, amplamente encontrados em plantas como berinjela e cenoura, são especialmente abundantes no café verde, onde o ácido cafeoilquínico pode representar mais de 85% do total de fenólicos, com destaque para o isômero 5-CQA (BADMOS; LEE; KUHNERT, 2019; HALL; TREVISAN; DE VOS, 2022; LU et al., 2020). De uma maneira geral, os ACG se destacam por seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, sendo associado a efeitos benéficos na morfologia e microbiota intestinal (Zhang et al., 2018), potencial neuroprotetor (GAO et al., 2020) e nefroprotetor (AL-MEGRIN et al., 2020), prevenção contra a obesidade (HE et al., 2021) e atividade antitumoral (WANG; DU; CHEN, 2020).

A cafeína é um alcaloide conhecido por seus efeitos estimulantes do sistema nervoso central (KILLGORE; KAMIMORI, 2020) e pelo uso como recurso ergogênico na prática esportiva (LARA et al., 2021), sendo o café a principal fonte dietética dessa substância. Após a ingestão, a absorção da cafeína ocorre de maneira rápida e quase completa (99%), distribuindo-se pelos tecidos corporais e sendo metabolizado pelo fígado e excretado pelos rins (DEPAULA; FARAH, 2019). Além das funções já citadas, a cafeína possui propriedades anti-carcinogênicas e anti-metastáticas (POUNIS et al., 2017), além de efeitos positivos quanto a redução da progressão do Parkinson (HONG; CHAN; BAI, 2020) e Alzheimer, devido à sua ação antioxidante e anti-inflamatória (IKRAM et al., 2020).

A trigonelina, também denominada ácido N-metil nicotínico, é um alcaloide encontrado em grande quantidade nos grãos de café, representando cerca de 1% de seu peso seco (JESZKA-SKOWRON; FRANKOWSKI; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, 2020). O uso dessa substância demonstra sua capacidade de modular o estresse inflamatório e oxidativo, além de regular o metabolismo dos lipídios e da glicose para a restauração da homeostase (NGUYEN et al., 2024). Esse composto apresenta efeitos neuroprotetores e contribui para o alívio de lesões celulares cardiovasculares, hepáticas, renais e gástricas, além de possuir propriedades anticarcinogênicas e antidiabéticas (NGUYEN et al., 2024).

Ressalta-se que a quantidade desses compostos pode variar de acordo com a espécie do café e o processo de torra. As espécies *Coffea arábica* e *Coffea canephora* dominam a produção mundial de café (ICO, 2024). O café arábica é reconhecido por seu elevado teor de sacarose, associado à qualidade da bebida (HUANG et al., 2021;

PINHEIRO et al., 2021), a variedade conilon se destaca pelo maior conteúdo de polifenóis (incluindo ACG), cafeína e maior capacidade antioxidante (BABOVA; OCCHIPINTI; MAFFEI, 2016; FREITAS et al., 2023; MANNINO; KUNZ; MAFFEI, 2023).

O processo de torra, essencial para o desenvolvimento das características de cor, sabor e aroma do café, envolve a aplicação controlada de calor aos grãos, mas também pode afetar a composição química, especialmente o conteúdo de ácido clorogênico (HU et al., 2020) (TABELA 1). Os ácidos clorogênicos são mais suscetíveis à degradação durante a torra, com uma redução de 80-95% dependendo da intensidade do tratamento térmico, o que pode diminuir a capacidade antioxidante do café (AWWAD et al., 2021; FREITAS et al., 2023).

Tabela 1 – Efeito da torrefação sobre a concentração de compostos dos grãos de café

Compostos	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>		Fonte
	Verde	Torrado	Verde	Torrado	
Ácido Clorogênico	4.22 ^{1*}	1.94 ^{1*}	9.84 ^{1**}	0.9 ^{1**}	(SUALEH; TOLESSA; MOHAMMED, 2020)* (HERAWATI et al., 2019)**
	3.13 ^{1*}	1.00 ^{1*}	-	15.03 ^{2**}	(ACIDRI et al., 2020)* (FREITAS et al., 2023)**
	-	6.11 ^{2*}	-	1.55 ^{1**}	(FREITAS et al., 2023)* (WONGSA et al., 2019)**
	59.73 ^{2*}	-	70.96 ^{2*}	-	(GUTIÉRREZ ORTIZ et al., 2019)*
	4.94 ^{1*}	-	62.18 ^{2**}	-	(BARBOSA et al., 2019)* (PURWOKO et al., 2022)**
Cafeína	1.19 ^{1*}	1.16 ^{1*}	6.54 ^{1**}	5.32 ^{1**}	(SUALEH; TOLESSA; MOHAMMED, 2020)* (HERAWATI et al., 2019)**
	0.97 ^{1*}	1.31 [*]	-	30.19 ^{2**}	(ACIDRI et al., 2020)* (FREITAS et al., 2023)**

¹ valores expressos em g/100g. ² valores expressos em mg/g. Os asteriscos, (*) ou (**), na mesma linha indicam a relação entre a quantidade do composto analisado e o estudo correspondente.

Tabela 1 – Continua

Compostos	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>		Fonte
	Verde	Torrado	Verde	Torrado	
Cafeína	-	7.19 ^{2*}	-	1.76 ^{1**}	(FREITAS et al., 2023)* (WONGSA et al., 2019)**
	1.27 ^{1*}	-	18.64 ^{2**}	-	(BARBOSA et al., 2019)* (PURWOKO et al., 2022)**
Trigonelina	0.91 ^{1*}	0.84 ^{1*}	-	5.34 ^{2**}	(SUALEH; TOLESSA; MOHAMMED, 2020)* (FREITAS et al., 2023)**
	0.65 ^{1*}	0.85 ^{1*}	-	-	(ACIDRI et al., 2020)*
	-	5.58 ^{2*}	-	-	(FREITAS et al., 2023)*

¹ valores expressos em g/100g. ² valores expressos em mg/g. Os asteriscos, (*) ou (**), na mesma linha indicam a relação entre a quantidade do composto analisado e o estudo correspondente.

Nesse contexto, os grãos verdes da espécie *Coffea canephora* apresentam um perfil superior de compostos bioativos e atividade antioxidante, sugerindo um maior potencial para benefícios à saúde. Importante ressaltar que além da variedade outros fatores podem estar relacionados às alterações químicas dos grãos de café, como a estocagem dos grãos e método de processamento (KRÓL et al., 2020), bem como o grau de maturação, microbiota associada, fatores climáticos e geográficos (BASTIAN et al., 2021). Portanto, ao considerar a complexa mistura de componentes químicos nos grãos de café verde e seus potenciais benefícios à saúde, a compreensão sobre a composição química desses grãos torna-se essencial.

3.2. Saúde intestinal

O intestino é um importante órgão do trato gastrointestinal, responsável pelos processos de digestão e absorção de nutrientes. Sua estrutura é composta por um epitélio que atua como barreira física contra potenciais substâncias nocivas, uma microbiota altamente diversificada, com funções metabólicas e imunológicas e o sistema imunológico associado ao tecido linfóide intestinal (GALT), essencial para a regulação das respostas imunológicas (IACOB; IACOB; LUMINOS, 2019; KAYAMA; OKUMURA; TAKEDA, 2020). A interação entre esses componentes contribui para funcionamento adequado do intestino e, conseqüentemente, para a saúde geral do organismo, destacando a importância de preservar essa estrutura.

As células epiteliais do intestino desempenham um importante papel como uma barreira física e bioquímica entre o meio interno do corpo e o conteúdo do lúmen, além de regular a interação entre os microrganismos residentes e os componentes do sistema imunológico. O epitélio intestinal é formado por uma camada única de células que circunda todo o lúmen intestinal, sendo constituído por células com funções absorptivas, secretoras e imunológicas (PETERSON; ARTIS, 2014). Entre essas, os enterócitos e colonócitos, principais células do intestino delgado e grosso, respectivamente, possuem função absorptiva e apresentam microvilosidades que aumentam a superfície absorptiva. As células enteroendócrinas secretam hormônios relacionados ao processo digestivo, enquanto as células de Paneth (intestino delgado) e células caliciformes (intestino delgado e grosso) produzem proteínas

antimicrobianas e muco, respectivamente, formando uma importante camada de proteção sobre o epitélio intestinal. Além disso, as células M, localizadas no epitélio intestinal, transportam microrganismos e antígenos do lúmen para o GALT, modulando a resposta imunológica (PETERSON; ARTIS, 2014).

A integridade do epitélio intestinal é sustentada pelas proteínas de junção, como claudina e ocludina, presentes nas *tight junctions* (junções apertadas) na região apical basolateral das células epiteliais. Essas proteínas formam complexos que selam o espaço intercelular, regulando a permeabilidade paracelular e mantendo a barreira contra microrganismos, íons e moléculas (PÉREZ-REYTOR et al., 2021).

Além da barreira física de células, a manutenção de um ambiente intestinal saudável depende da interação com a microbiota residente, composta majoritariamente pelos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (IACOB; IACOB; LUMINOS, 2019; ZHENG et al., 2023). Essa microbiota associa-se ao muco intestinal, formando uma barreira extra de proteção contra patógenos, competindo por espaço e nutrientes e produzindo substâncias antimicrobianas. Também participa da síntese de vitaminas, digestão de carboidratos complexos e produção dos AGCC - acetato, propionato e butirato - a partir da fermentação de componentes alimentares (IACOB; IACOB; LUMINOS, 2019; KAYAMA; OKUMURA; TAKEDA, 2020).

Os AGCC desempenham múltiplas funções benéficas, como fonte de energia para células intestinais, estímulo à produção de muco e regulação da integridade epitelial, modulando as proteínas de junção, como claudina, ocludina e ZO-1 (KAYAMA; OKUMURA; TAKEDA, 2020; PÉREZ-REYTOR et al., 2021). Além disso, a interação da microbiota intestinal e seus metabólitos com o GALT exerce efeitos imunomoduladores, equilibrando as respostas inflamatórias e oxidativas (IACOB; IACOB; LUMINOS, 2019; KAYAMA; OKUMURA; TAKEDA, 2020). No entanto, alterações na composição da microbiota, com prevalência de microrganismos patogênicos (disbiose), podem reduzir a produção de AGCC, comprometer a barreira intestinal e desencadear inflamações crônicas (IACOB; IACOB; LUMINOS, 2019).

O sistema imunológico intestinal é essencial para a homeostase intestinal, protegendo contra patógenos e reforçando a barreira intestinal. As células imunológicas, como linfócitos, células dendríticas e macrófagos, estão distribuídas no

epitélio, na lâmina própria e no tecido linfóide associado ao intestino, como as placas de Peyer e folículos linfóides isolados (PIETRZAK et al., 2020). Entre os componentes deste sistema estão os linfócitos B, que produzem o anticorpo imunoglobulina A (IgA), considerada a principal imunoglobulina no intestino. Após ser secretada, a IgA migra para o lúmen, onde regula a microbiota, impede a adesão de patógenos e protege contra infecções sem desencadear inflamações exacerbadas (PIETRZAK et al., 2020; KAYAMA; OKUMURA; TAKEDA, 2020).

O estresse oxidativo também desempenha um papel relevante na saúde intestinal. Marcadores como o óxido nítrico (ON) em níveis adequados participa da defesa contra patógenos e função vasodilatadora, enquanto a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) atuam como antioxidantes, controlando o estresse oxidativo e danos à barreira intestinal. Entretanto, desequilíbrios na produção de ON e antioxidantes podem resultar em processos inflamatórios, prejudicando a mucosa intestinal. Logo, o equilíbrio na produção desses marcadores é essencial para a manutenção da saúde intestinal (TIAN; WANG; ZHANG, 2017; ZHANG et al., 2020).

Nesse contexto, fatores como o estresse, uso contínuo de antibióticos, tabagismo e componentes da dieta, como o alto consumo de gorduras saturadas (ANANTHAKRISHNAN, 2015; XIE et al., 2021), prejudicam a homeostase intestinal e contribuem para patologias intestinais, como câncer de cólon (SILVA et al., 2022), colite ulcerativa (ZHANG et al., 2017) e síndrome do intestino irritável (ZHENG et al., 2023), além de condições sistêmicas, doenças neurológicas (FILOSA; DI MEO; CRISPI, 2018), hepáticas (HUSSAIN et al., 2020), cardiovasculares (TANG; KITAI; HAZEN, 2017) e obesidade (HARAKEH et al., 2016).

3.2.1. Impactos da dieta hiperlipídica na saúde intestinal

O consumo de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas é reconhecido como um dos principais fatores dietéticos associados ao desenvolvimento da obesidade. Esse padrão alimentar, caracterizado por um alto teor de gorduras, é frequentemente utilizado em modelos experimentais para a indução da obesidade, permitindo o estudo das suas consequências metabólicas e sistêmicas (ABDEL-MOHSEN et al., 2023; CARO-GÓMEZ et al., 2019; COSTA et al., 2020; XU et al., 2020). Entre essas,

destaca-se o impacto na saúde intestinal, que tem se mostrado um alvo crítico das alterações promovidas pela obesidade (XIE et al., 2021; XU et al., 2020; YANG et al., 2019).

A obesidade induzida por dietas hiperlipídicas provoca alterações estruturais na mucosa e compromete significativamente a integridade da barreira intestinal. Estudos científicos mostraram que esse padrão alimentar está associado a alterações estruturais no epitélio intestinal, incluindo a redução do comprimento das vilosidades (YANG et al., 2019), atrofia da mucosa (HUANG et al., 2020; TANAKA et al., 2020), danos à estrutura das criptas (XIE et al., 2021) e redução do número de células caliciformes (LEE et al., 2017). Sugere-se que esses efeitos estão relacionados à lipotoxicidade induzida pelo excesso de gordura dietética, que afeta a função das células tronco intestinais, prejudicando os processos de proliferação e diferenciação celular, resultando em danos à mucosa intestinal (HUANG et al., 2020; LEE et al., 2017).

Além disso, o padrão alimentar hiperlipídico compromete a integridade da barreira intestinal, reduzindo a quantificação de proteínas de junção apertada, como claudina, ocludina e ZO-1 (BRANDT et al., 2019; XIE et al., 2021; YANG et al., 2019). Uma vez consumida, a dieta hipercalórica e hiperlipídica pode promover a produção de toxinas por microrganismos patogênicos, que, por sua vez, induzem a cascatas de sinalização nas células intestinais com a ativação da proteína PKC α . Esses eventos resultam na fosforilação da ZO-1, desconectando-a das proteínas de junção e da F-actina, desorganizando a estrutura das junções apertadas e comprometendo a integridade do epitélio intestinal (PÉREZ-REYTOR et al., 2021). Essas alterações à mucosa aumentam a permeabilidade intestinal, facilitando a translocação de moléculas pró-inflamatórias, como lipopolissacarídeos (LPS), para a circulação sistêmica (BRANDT et al., 2019; XIE et al., 2021; YANG et al., 2019), o que pode também comprometer a absorção de nutrientes e a proteção da mucosa contra danos físicos e químicos.

Essas alterações estruturais do epitélio frequentemente estão associadas a um desequilíbrio imunológico local e sistêmico, caracterizado pelo aumento de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (XIE et al., 2021; YANG et

al., 2019). Além disso, observa-se uma disfunção na resposta oxidativa, evidenciada pelo aumento na expressão de iNOS (BRANDT et al., 2019), pela elevação dos níveis de malondialdeído (MDA), um biomarcador de peroxidação lipídica, e pela redução da capacidade antioxidante total endógena, incluindo a diminuição da atividade de marcadores antioxidantes como a glutathiona peroxidase (GSH-Px) (YANG et al., 2019). Portanto, o consumo de dieta hiperlipídica reforça o papel do estresse oxidativo na progressão dos danos intestinais e na perpetuação do estado inflamatório.

Adicionalmente, o consumo de dietas ricas em gorduras e calorias promove alterações significativas na composição da microbiota intestinal. Evidências científicas indicam uma redução na diversidade e abundância microbiana (XIE et al., 2021; XU et al., 2020; YANG et al., 2019), acompanhada por um aumento de bactérias potencialmente patogênicas, como *Escherichia* gram-negativas (XIE et al., 2021) e *Lachnospiraceae* (XU et al., 2020), além de uma diminuição de bactérias benéficas, incluindo os gêneros *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus* (YANG et al., 2019). Esse desequilíbrio resulta em um perfil disbiótico, que compromete a produção de AGCC e intensifica processos inflamatórios e oxidativos (XIE et al., 2021; YANG et al., 2019).

Esses achados evidenciam o efeito negativo do consumo de dieta hiperlipídica sobre a integridade e funcionalidade do intestinal, reforçando a importância de estratégias alimentares para mitigar os efeitos adversos desse padrão alimentar na saúde intestinal. Diante disso, o consumo de compostos bioativos tem se mostrado promissor na manutenção da saúde intestinal, atuando na integridade da barreira intestinal, regulação do sistema imunológica (SILVA et al., 2022) e proliferação de microrganismos benéficos (GOWD et al., 2019; YE et al., 2021; ZHANG et al., 2017). Nesse contexto, o café verde, rico em polifenóis como o ácido clorogênico, pode promover efeitos significativos, auxiliando no funcionamento intestinal e na redução do risco de patologias (FARAG et al., 2021; SILVA et al., 2022; ZHANG et al., 2017; ZHENG et al., 2023).

3.3. Café verde e saúde intestinal

Os efeitos do café verde e de seus compostos têm sido relatados como benéficos à saúde intestinal devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e prebióticas, que promovem a melhoria da morfologia e de biomarcadores intestinais e, conseqüentemente, um ambiente mais saudável. Contudo, estudos que exploram a relação entre o extrato de café verde e a saúde intestinal ainda são limitados (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do extrato de café verde e de seus componentes sobre a saúde intestinal

Composto	Dosagem	Tempo	Modelo Experimental	Principais resultados	Autor
Extrato de café verde	2 mL de extrato	15 semanas	Ratos Wistar com indução de CCR	Melhora da barreira intestinal e aumento dos níveis de IgA secretora.	(SILVA et al., 2022)
Extrato de café verde	500 e 1000 ppm	72 horas	Células de câncer de cólon (Caco-2 e HT-29)	Efeito antiproliferativo em células de câncer colorretal.	(MOJICA et al., 2018)
Ácido clorogênico	20 e 50 mg/Kg	14 dias	Ratos Sprague Dawley com injeção de LPS (1 mg/kg)	Melhora da morfologia intestinal; redução da permeabilidade intestinal; aumento das proteínas de junção.	(RUAN et al., 2014)
ACG do extrato de café verde	220 mg/Kg (3x/semana)	14 semanas	Camundongos ApoE -/- (dieta HF)	Redução da perda da diversidade microbiana intestinal.	(CARO-GÓMEZ et al., 2019)
Ácido clorogênico	150 mg/Kg	20 semanas	Camundongos C57BL/6 (dieta HF)	Aumento do comprimento do cólon e das proteínas de junção; redução da PI e de Firmicutes e	(YE et al., 2021)

aumento de Bacteroidetes e Verrucomicrobia e *Akkermansia*.

Tabela 2 – Continua

Ácido clorogênico	1 mM	15 dias	Camundongos C57BL/6 induzidos à colite por DSS à 2,5%	Melhora do índice de atividade da doença; melhora de lesões no cólon e da produção de mucina; redução sérica de IFN γ , TNF α e IL-6; melhora da infiltração de células imunes; aumento da diversidade da microbiota fecal.	(ZHANG et al., 2017)
Ácido clorogênico	60 mg/kg	28 dias	Sprague-Dawley com lesão intestinal induzida por endotoxina (300 μ g/Kg)	Aumento do peso do ID; redução da PI, da injúria e inflamação tecidual; melhora do perfil oxidativo; aumento da função metabólica mitocondrial.	(ZHOU et al., 2016)
Ácido clorogênico	50 mg/Kg	1 semana	Sprague Dawley induzidos à síndrome do intestino irritável com ácido acético à 4%	Redução da sensibilidade visceral, da inflamação e da PI; aumento das proteínas de junção; alteração da diversidade da microbiota.	(ZHENG et al., 2023)

Tabela 2 – Continua

Cafeína	>400 mg/dia	-	Pacientes com diagnóstico de síndrome do intestino irritável	Alteração na composição microbiana (maior diversidade bacteriana).	(BARANDOUZI et al., 2021)
Cafeína	>130 mg/dia	-	Pacientes saudáveis (50 e 75 anos)	Maior riqueza e uniformidade das bactérias intestinais; Aumento de <i>Faecalibacterium</i> e <i>Alistipes</i> e redução de <i>Erysipelatoclostridium</i> .	(DAI et al., 2023)

CCR: câncer colorretal; DSS: sulfato de dextrano sódico; ID: intestino delgado; IFN γ : interferon gama; IgA: imunoglobulina A; e IL-6: interleucina 6; LPS: lipopolissacarídeo; PI: permeabilidade intestinal; TNF α : fator de necrose tumoral alfa.

Os processos inflamatórios podem comprometer a estrutura da mucosa, aumentando a permeabilidade intestinal pela redução na expressão de proteínas de junção, o que resulta em uma barreira intestinal disfuncional. Nesse contexto, o ácido clorogênico demonstra potencial para reduzir a infiltração de macrófagos, células T e neutrófilos, além de redução de citocinas pró inflamatórias, como interferon gama (IFN γ), TNF α e IL-6, possivelmente pela inibição da sinalização de NF- κ B. Como consequência, há um aumento da expressão de ocludina e ZO-1, além de melhora na estrutura intestinal, com aumento do comprimento das vilosidades, redução das lesões teciduais e aumento na produção de mucina (RUAN et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

Alterações na composição da microbiota intestinal, ou disbiose, estão relacionadas a disfunções locais e sistêmicas. O consumo de café verde ou de seus compostos isolados demonstram efeito positivo sobre a comunidade microbiana intestinal, alterando a composição a aumentando a diversidade microbiana, estimulando microrganismos associados a efeitos positivos à saúde, como *Desulfovibrio* e *Mogibacteriaceae*, que apresentam efeitos anti-inflamatórios e associados a um menor risco de trombose, respectivamente (CARO-GÓMEZ et al., 2019); *Faecalibacterium* e *Alistipes*, que estão relacionados à produção de butirato e à redução do risco de colite ulcerativa, respectivamente (DAI et al., 2023); além de *Dubosiella*, *Romboutsia* e *Mucispirillum*, produtoras de AGCC (YE et al., 2021), conferindo um efeito prebiótico ao café verde.

Além disso, o café verde contribui para a manutenção da saúde intestinal ao reduzir a permeabilidade intestinal, por meio do estímulo à expressão de proteínas de junção. Esse efeito pode ser explicado, em parte, pela produção de AGCC, por microrganismos da microbiota intestinal, como butirato, propionato e acetato. Esses compostos podem atuar ativando cascatas de sinalização ao se ligarem a receptores acoplados à proteína G, como GPR41, GPR43 e GPR109A, presentes no colón. Essa ligação induz a ativação da proteína quinase C beta (PKC β), que fosforila ZO-1, permitindo que essa proteína se acople à ocludina e claudina, restaurando a integridade da barreira intestinal (PÉREZ-REYTOR et al., 2021).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido nos Laboratórios da Universidade do Espírito Santo (UFES), campus Sul Capixaba.

As amostras de café verde da espécie Conilon (*Coffea canephora*) foram obtidas dos produtores da Fazenda Pessin (20°20'17.8" S, 41°24'04.9" W), situada no município de Muniz Freire – ES, correspondentes à colheita da safra 2021/22. De acordo com o produtor, o café foi colhido manualmente seguido por um período de secagem aproximado de 50 horas à 180 °C. Então, a casca externa foi removida mecanicamente e o endosperma interno foi separado para utilização no estudo.

4.1. Extrato Aquoso de Café Verde

Os grãos de café verdes foram moídos em moinho de facas tipo Willy SL-31 (Solab, Brasil) e, posteriormente, peneirados para obtenção de partículas com tamanho de até 1.18 mm (14 mesh). O composto triturado resultante foi acondicionado em embalagens à vácuo e armazenado ao abrigo da luz até a utilização para a preparação do extrato. Para a obtenção do extrato aquoso, diariamente, o café verde foi submetido à água destilada à 90°C (1:1.66 v/v), empregando um sistema de filtração simples com filtro de papel (SILVA et al., 2022).

4.2. Determinação dos teores de cafeína, ácido clorogênico e trigonelina

A determinação dos teores de cafeína, ácido clorogênico (ACG) e trigonelina no extrato de café verde foi realizada utilizando-se um sistema cromatográfico UPLC Acquity (Waters Corporation, EUA), equipado com sistema de bomba quaternária e detector de arranjo de diodos (DAD). As amostras e a fase móvel foram filtradas em membranas de 0.22 µm antes da análise. Foram injetados 2 µL das amostras de extrato aquoso em uma coluna de fase reversa C18 (21 x 50 mm, 1.7 µm, Waters Acquity), mantida a 40 °C. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de água, metanol e ácido acético na proporção de 80:20:1 (v/v), com fluxo de 0,1 mL/min, eluição isocrática e com tempo de corrida de 8 minutos. A identificação dos compostos foi

feita por cromatogramas registrados a 272 nm, comparando os padrões comerciais com os compostos de interesse e a quantificação foi feita com concentrações conhecidas dos compostos (Ácido clorogênico: $y = 9E+06x - 11586$, $R^2 = 0.9996$; Cafeína: $y = 5E+07x - 249.14$, $R^2 = 0.9998$; Trigonelina: $y = 2E+07x + 4995.8$, $R^2 = 0.9996$).

4.3. Estudo em modelo animal de obesidade

Foram utilizados 32 ratos machos adultos da linhagem Wistar (três semanas de vida), com peso médio inicial de 175 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de aço inoxidável, onde foram controladas as condições de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro), temperatura mantida a 23 °C e fornecimento *ad libitum* de água e dieta. Após um período de adaptação de 7 dias, foi iniciada a monitorização diária do consumo alimentar e o registro semanal do ganho de peso dos animais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, campus Alegre, sob o número 001/2023 (Anexo A).

4.4. Delineamento experimental

No ensaio biológico, foram testados os efeitos do extrato de café verde como medida preventiva e de tratamento da obesidade ao longo de 16 semanas. A indução da obesidade foi realizada durante as primeiras 8 semanas do estudo, por meio da administração de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica (HF) (MOURA-ASSIS et al., 2018). Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=8/grupo), a saber: grupo CT - controle negativo (dieta controle comercial, sem suplementação com extrato de café verde), HF - controle positivo (com indução à obesidade e sem extrato de café verde), HFP - grupo experimental de prevenção (com indução da obesidade e suplementação do extrato durante as 16 semanas de experimento) e HFT - grupo experimental de tratamento (com indução à obesidade e adição do extrato a partir da 8ª semana até o final do experimento) (Figura 1). As concentrações de

caféina e de ácido clorogênico analisados no extrato de café foram utilizadas para determinar o percentual de suplementação da dieta dos animais. Todos os grupos receberam água e dieta *ad libitum*.

O consumo alimentar foi registrado diariamente, e o peso individual dos animais foi monitorado semanalmente para cálculo da média de ingestão alimentar total, ingestão dos principais componentes do extrato de café verde, ganho de peso médio, calorias consumidas e coeficientes de eficiência alimentar (CEA) e calórica (CEC). O CEA foi determinado pela razão entre o ganho de peso dos animais (diferença entre peso inicial e final, em gramas) e o consumo total de dieta em cada grupo experimental. O CEC, por sua vez, foi calculado pela razão entre o ganho de peso dos animais e o consumo médio de calorias em cada grupo experimental. Na última semana de experimento (16^a semana), foi mensurado o comprimento naso-anal (CNA, em cm) nos animais para o cálculo do Índice de Lee, obtido pela relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento naso-anal do animal [$3 \sqrt{\text{Peso (g)}/\text{CNA (cm)}}$].

Ao final do experimento os animais foram anestesiados pela administração intraperitoneal de 0.4 mL/100 g de peso corporal de solução anestésica contendo cetamina, xilazina e soro fisiológico (1.5:1:1.5 v/v/v), e posteriormente submetidos à eutanásia por exsanguinação, via punção cardíaca. Seguiu-se a necropsia, e toda a extensão do intestino grosso foi removida e lavada com solução salina. O conteúdo presente no cólon foi coletado para a análise de IgA secretora, enquanto o conteúdo cecal foi utilizado para determinação do pH e de ácidos graxos de cadeia curta. O intestino grosso foi dividido igualmente em três fragmentos (proximal, medial e distal em relação ao ceco). As seções proximal e medial foram utilizadas para análises de marcadores do estresse oxidativo. Todo o conteúdo cecal, colônico e amostras de tecido foram armazenados a -80 °C até o momento da análise. Já as seções distais do cólon foram coletadas e fixadas em formol tamponado (10%), seguidas de armazenamento em etanol (70% v/v) e inclusão em parafina para análise morfométrica e de imunohistoquímica. O tecido adiposo epididimal foi removido e pesado para confirmação do modelo experimental de indução da obesidade.

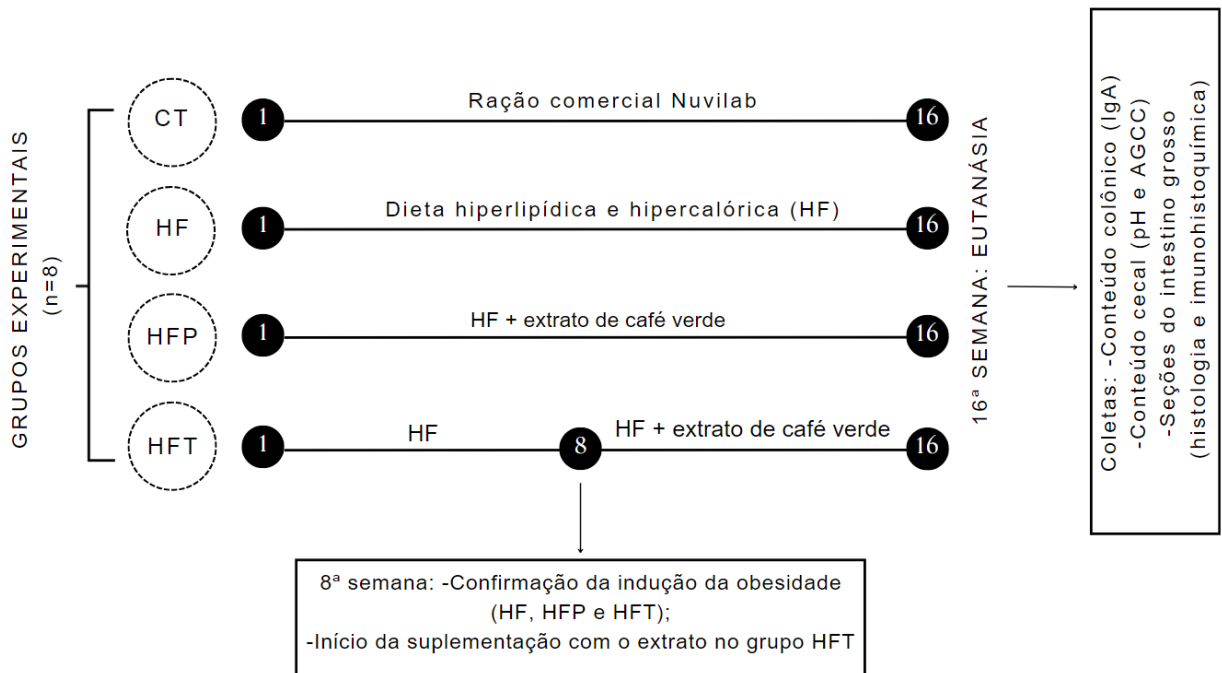


Figura 1 - Esquema do desenho experimental. Grupo CT: dieta controle comercial, sem suplementação de extrato de café verde; HF: com indução à obesidade e sem extrato de café verde; HFP: com indução da obesidade e suplementação com o extrato aquoso de café verde durante as 16 semanas de experimento; HFT: com indução da obesidade e adição do extrato aquoso de café verde a partir da 8ª semana até o final do experimento.

4.5. Dietas experimentais

Os animais do grupo CT receberam ração comercial Nuvilab[®] (388 Kcal/100 g; sendo 63% de carboidratos, 26% de proteínas e 11% de lipídios) (DE VICENTE et al., 2021) durante todo o estudo. As dietas experimentais para indução da obesidade foram produzidas com base na formulação AIN-93M estabelecida pelo Instituto Americano de Nutrição (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), modificadas pela adição de banha de porco (Aurora[®]), com o objetivo de promover uma dieta com alto teor de lipídios e calorias (MOURA-ASSIS et al., 2018), conforme detalhado na Tabela 3. As dietas foram produzidas semanalmente e armazenadas sob refrigeração em embalagens plásticas até o momento da utilização.

O extrato de café verde foi produzido e incorporado diariamente ao total de dieta dos respectivos grupos, sendo a mesma fracionada e entregue na mesma porção para cada animal. Foram ofertados 2 mL de extrato por animal/dia, enquanto o grupo HF recebeu água em quantidade equivalente. A quantidade de extrato adicionado à dieta dos animais foi ajustada com base na análise do teor de cafeína,

garantindo que a ingestão diária deste composto não excedesse 45 mg de cafeína por quilograma de peso corporal (ILBÄCK; SILLER; STÅLHANDSKE, 2007).

Tabela 3 - Composição da dieta experimental hipercalórica e hiperlipídica (HF)

Ingredientes (g/Kg)	HF
Amido de milho (Maizena®)	115,5
Amido dextrinizado (Rhoster®)	132
Caseína (Rhoster®) *	200
Sacarose (União®)	100
Óleo de soja (Soya®)	40
Banha de porco (Aurora®)	312
Celulose (Rhoster®)	50
Mix de minerais (Rhoster®)	35
Mix de vitaminas (Rhoster®)	10
L-cisteína (Rhoster®)	3
Bitartarato de colina (Rhoster®)	2,5
Carboidrato (%)	34,75
Proteína (%)	17
Lipídio (%)	35,20
Densidade calórica (Kcal/g)	5,35

*Pureza de 85%.

4.6. pH Intraluminal do Cólon

O conteúdo do ceco foi diluído na proporção de 1:10 em água destilada e homogeneizado em vórtex (AP-56, Phoenix). A medição do pH foi conduzida em um pHmetro de bancada (Kasvi) (GRANCIERI et al., 2017).

4.7. Determinação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

Os AGCCs, acetato, propionato e butirato foram avaliados a partir no conteúdo cecal dos animais. Foram utilizados 100 mg de amostra, preparada de acordo a

metodologia de Siegfried et al. (1984), com modificações. A análise foi realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Cromatógrafo LC-20A Prominence Shimadzu, Japão) equipado com detector de índice refrativo RID-20A. Alíquotas de 20 μ L das amostras foram injetadas em uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm, 9 μ m, Munich, Germany). Como fase móvel utilizou-se uma solução de 5 mM de ácido sulfúrico (Merck) em água ultrapura, com fluxo de 0.7 mL/min, eluição isocrática e temperatura à 45 °C. Os resultados foram convertidos para mg/g de conteúdo colônico.

4.8. Dosagem de Imunoglobulina A secretora (sIgA)

O conteúdo do cólon foi diluído (1:2 m/v) em água destilada, homogeneizado por vortex e centrifugado (1000 \times g, 20 min, 5 °C) (Hermle, modelo Z326K, Alemanha). O sobrenadante foi coletado e avaliado através do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) utilizando o kit comercial Rat sIgA (Secretory Immunoglobulin A - Nº E-EL-R0875) (Elabscience, Biotechnology Inc., USA), seguindo as recomendações do fabricante para sIgA. A absorbância das amostras foi medida em um leitor de microplaca (Thermo Scientific, Multiskan GO) a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em ng/mL.

4.9. Preparo do homogenato e determinação do estresse oxidativo

Para a determinação dos marcadores do estresse oxidativo - óxido nítrico, superóxido dismutase e catalase, foi utilizado amostras do intestino grosso. O homogenato do intestino foi preparado com 200 mg do tecido, ao qual foram adicionados 1000 μ L de tampão fosfato (50mM), contendo 1 mM de EDTA (pH 7.4). O conteúdo foi macerado e centrifugado (1200 \times g, 10 min, 4 °C), e o sobrenadante foi coletado para a análise do estresse oxidativo.

Para a quantificação do óxido nítrico, 100 μ L do homogenato (1:200 v/v) foram adicionados aos poços de uma placa de Elisa, seguido pela adição de 100 μ L de reagente de Griess ao abrigo da luz e deixado em repouso por 10 min. A absorbância foi então medida a 540 nm em um leitor de microplacas (Thermo Scientific®, modelo

Multiskan GO). O nitrito de sódio 0.025 M foi empregado para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em μM de NO_2 (GREEN et al., 1982).

Para a determinação da superóxido dismutase (SOD), 243 μL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8.2) (1 mM de EDTA), 12 μL de MTT (1.25 mM) e 15 μL de pirogalol (10 mM) foram misturados a 30 μL do homogenato sem diluição. Para determinar o branco, 288 μL de tampão e 12 μL de MTT foram adicionados aos poços de uma placa de Elisa, e, então, incubados por 5 min a 37 °C, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm (Thermo Scientific Multiskan GO, Waltham, MA, EUA). A quantificação de SOD foi expressa como unidades de SOD/mg de proteína (MARKLUND, 1985).

A quantificação de catalase foi realizada nas amostras do homogeneizado (1:10), acrescentando-se a solução tampão fosfato com peróxido no momento da leitura. Nos tempos 0, 30 e 60 s após o início da reação, a absorbância foi determinada a 240 nm em um Espectrofotômetro UV/VIS (modelo T70) (Thermo Scientific, Multiskan GO). Os dados foram expressos em nmol.min/mg PTN. A atividade da catalase foi calculada de acordo com a lei Beer-Lambert (AEBI, 1984).

4.10. Análises morfológicas da mucosa colônica

As seções distais do intestino grosso foram submetidas ao processamento histotécnico e incluídas em parafina e, posteriormente, cortadas em espessura de 3 a 5 μm utilizando um micrótomo semiautomático (Microm, HM 315). Os cortes foram então montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina. O material foi analisado em microscópio óptico equipado com câmera (Opticam Microscopy Technology® - Lopt 14003), e as imagens foram capturadas em objetiva de 20x com o software OPTHD 3.7 (Opticam Microscopy Technology®). A altura da mucosa do cólon, profundidade e a largura das criptas intestinais e o número de células caliciformes, foram analisados utilizando o Software Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Rockville EUA).

4.11. Quantificação das proteínas claudina e ocludina no intestino grosso

A análise de imuno-histoquímica (IHQ) foi com o objetivo de identificar e quantificar as proteínas ocludina e claudina. As lâminas pré-silanizadas com solução de Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich -P8920), receberam amostras de tecidos dos animais de cada grupo experimental e foram submetidas ao protocolo de IHQ.

Inicialmente, as seções foram desparafinizadas e reidratadas com xilol e álcool, respectivamente, e enxaguadas em água destilada (3 vezes por 5 min). Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio (10 mM, 0.05% tween 20, pH 6.0) e aquecidas por 20 min em microondas em potência máxima (Philco® - modelo PMO28INOX). As seções foram resfriadas por 15 min em temperatura ambiente e posteriormente lavadas em TRIS (pH 7.4, 3 vezes por 5 min).

A peroxidase endógena foi inibida pela solução de peróxido de hidrogênio a 30% em metanol à temperatura ambiente por 40 minutos, seguida de lavagem em TRIS (pH 7.4, 4 vezes por 5 min). E o bloqueio de proteína específica foi realizado em solução de leite em pó Molico à 3% de TRIS (pH 7.4) em temperatura ambiente por 80 minutos, seguida de lavagem em TRIS (pH 7.4, 3 vezes por 5 min).

As seções foram incubadas *overnight* com os anticorpos anti-occludina (1:40, Occludin Polyclonal Antibody – Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e anti-claudina (1:75, Claudin 1 Polyclonal Antibody, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

No dia seguinte, as seções foram lavadas em TRIS (pH 7.4, 3 vezes por 5 min), e incubadas, durante 30 min à temperatura ambiente, com 20 µL de anticorpo secundário biotilado (Simple Stain MAX PO (MULTI) - N-Histofine, NICHIREI BIOSCIENCES INC). Os seccionados foram lavados em TRIS (pH 7.4, 3 vezes por 5 min) e subsequentemente aplicado 20 µL de solução DAB Chromogen (1:50, ScyTek Laboratories) e incubado em temperatura ambiente por 5 min, o que resultou em uma marcação de coloração amarronzada no sítio do antígeno.

As lâminas de tecido foram lavadas em água destilada e contrastadas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavadas em água destilada novamente e desidratadas em álcool e xilol, seguindo para a montagem com lamínula.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico equipado com câmera (Opticam Microscopy Technology® - Lopt 14003), e as imagens foram capturadas em

objetiva de 20x com o software OPTHD 3.7 (Opticam Microscopy Technology®). O grau de marcação de ocludina e claudina foi analisado utilizando o Software Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Rockville EUA) e expresso em porcentagem.

4.12. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar as médias entre os grupos CT e HF, controles negativo e positivo, respectivamente. Empregou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparar as médias entre os grupos HF, HFP e HFT. As diferenças foram consideradas significativas a um nível de probabilidade de 5%. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism®, versão 9.0. (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Composição do extrato aquoso de café verde

Entre os compostos bioativos analisados no extrato aquoso de café verde, o ácido clorogênico foi o componente presente em maior quantidade, seguido pela cafeína e trigonelina (Tabela 4).

Tabela 4 – Quantificação de compostos majoritários do extrato de café verde

Composição	Concentração
Ácido clorogênico (mg/mL)	5.53 ± 1.79
Cafeína (mg/mL)	1.84 ± 0.35
Trigonelina (mg/mL)	0.73 ± 0.09

A análise foi realizada por um *pool* de sucessivas extrações. Valores apresentados como média ± DP.

5.2. Consumo alimentar dos animais

Entre os grupos controle (CT e HF), o grupo HF apresentou consumo alimentar, em gramas, significativamente menor em relação ao grupo CT ($p < 0,05$; Fig. 2A), enquanto exibiu médias significativamente maiores para os coeficientes de eficiência alimentar ($p < 0,05$; Fig. 2B) e calórico ($p < 0,05$; Fig. 2C). Não foram observadas diferenças significativas na ingestão calórica total entre esses grupos ($p > 0,05$; Fig. 2D).

Entre os grupos tratados com dieta high-fat, a suplementação com extrato aquoso de café verde não influenciou significativamente a ingestão alimentar ($p > 0,05$; Fig. 2A), os coeficientes de eficiência alimentar ($p > 0,05$; Fig. 2B) e calórico ($p > 0,05$; Fig. 2C), ou a ingestão calórica total ($p > 0,05$; Fig. 2D) em comparação ao grupo HF. Além disso, não houve variação significativa entre os grupos HFP e HFT quanto ao consumo de ácido clorogênico ($p > 0,05$; Fig. 2E), cafeína ($p > 0,05$; Fig. 2F) e trigonelina ($p > 0,05$; Fig. 2G).

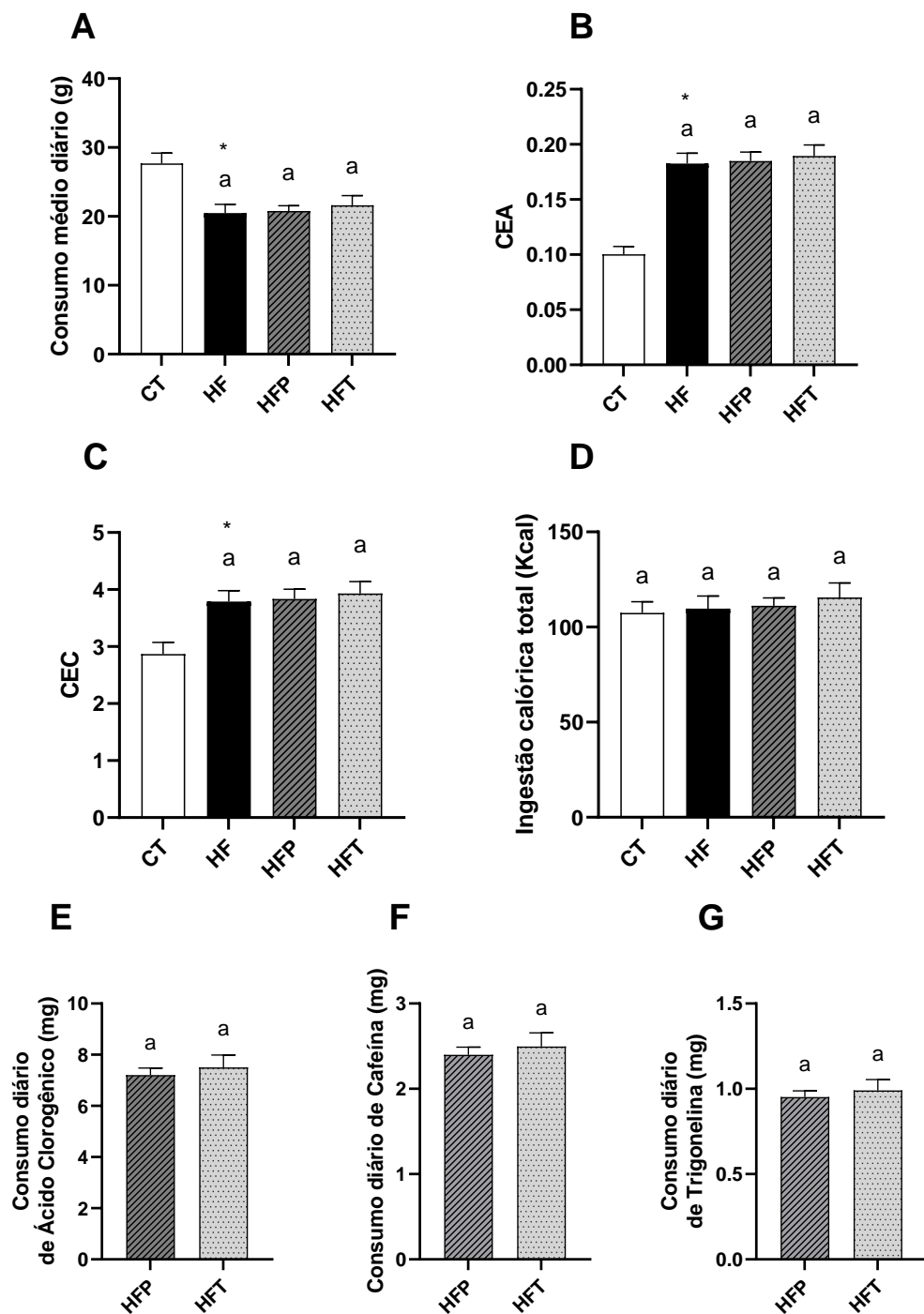


Figura 2 - Consumo alimentar dos animais. Consumo alimentar diário (A), coeficiente de eficiência alimentar (CEA) (B), coeficiente de eficiência calórica (CEC) (C), ingestão calórica total (Kcal) (D), consumo diário de ácido clorogênico (E), consumo diário de cafeína (F), consumo diário de trigonelina (G). Grupo CT: dieta controle comercial, sem suplementação de extrato de café verde; HF: com indução à obesidade e sem extrato de café verde; HFP: com indução da obesidade e suplementação com o extrato aquoso de café verde durante as 16 semanas de experimento; HFT: com indução da obesidade e adição do extrato aquoso de café verde a partir da 8ª semana até o final do experimento. Valores apresentados como média \pm DP (n=8). (*) apresenta diferença significativa entre CT e HF pelo teste *t* ($p < 0.05$). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com dieta high-fat.

5.3. Ganho de peso corporal dos animais

Em comparação ao grupo CT, o grupo HF apresentou peso corporal significativamente maior na 8^a ($p < 0,05$; Fig. 3A) e 16^a semana ($p < 0,05$; Fig. 3B) do experimento, além de maior ganho de peso corporal total ($p < 0,05$; Fig. 3C) e médias significativamente mais elevadas para o índice de Lee ($p < 0,05$; Fig. 3D) e para o peso do tecido adiposo epididimal ($p < 0,05$; Fig. 3E).

Entre os grupos tratados com dieta high-fat, consumo do extrato aquoso de café verde não resultou em alterações significativas quanto ao peso dos animais na 8^a ($p > 0,05$; Fig. 3A) e 16^a semana de intervenção ($p > 0,05$; Fig. 3B), bem como sobre o ganho de peso corporal total ($p > 0,05$; Fig. 3C) e o índice de Lee ($p > 0,05$; Fig. 3D) quando comparado ao grupo HF. No entanto, o grupo HFT apresentou valores de média significativamente maiores para o peso do tecido adiposo epididimal ($p < 0,05$; Fig. 3E) em comparação à HF e HFP, os quais não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

A Figura 3F ilustra a evolução semanal do peso dos animais durante todo o período experimental.

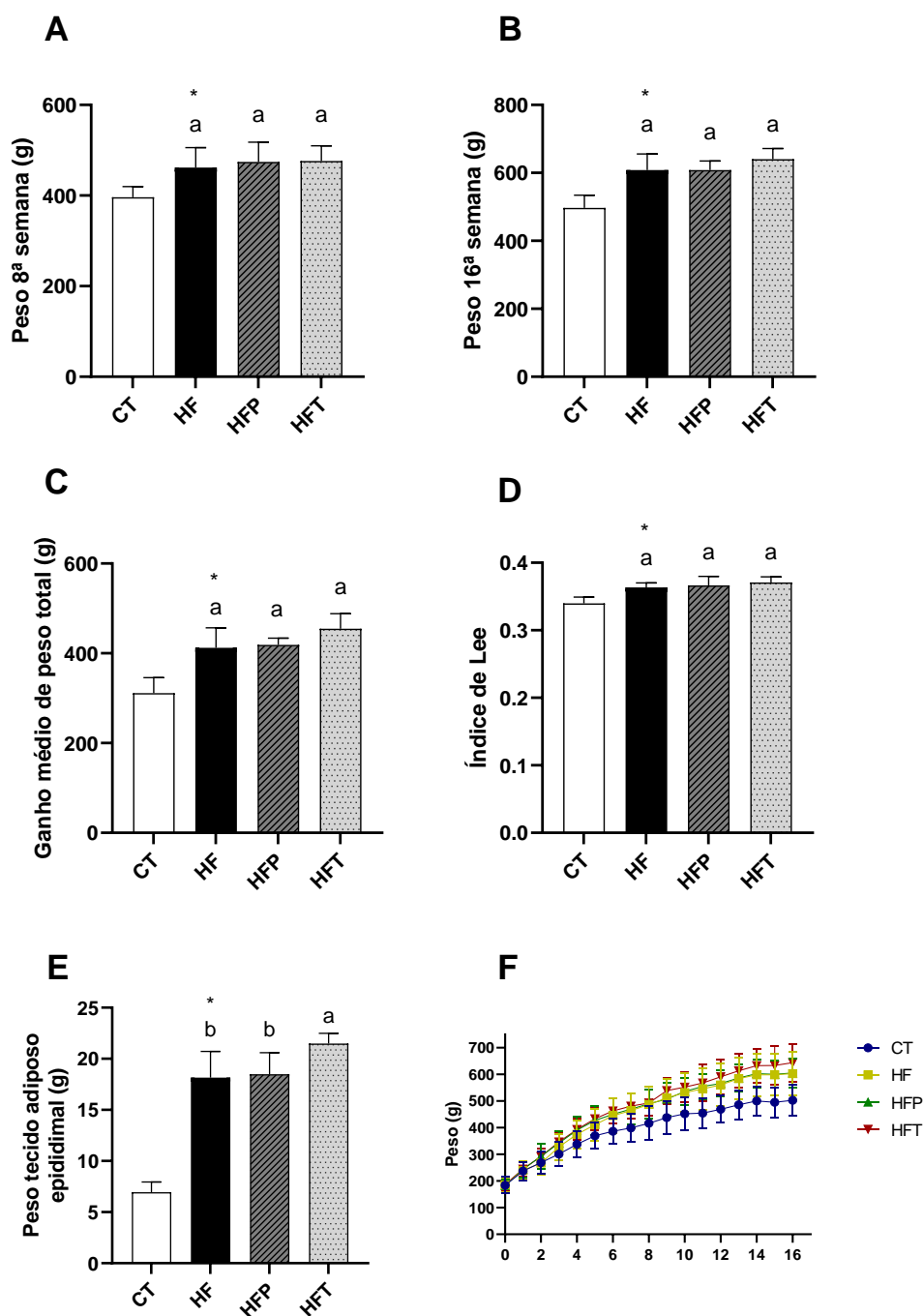


Figura 3 - Ganho de peso corporal, Índice de Lee e Tecido adiposo epididimal. Peso dos animais na 8ª semana (A), peso dos animais na 16ª semana (B), ganho de peso total após 16 semanas (C), índice de Lee (D) peso do tecido adiposo epididimal (E) e evolução do ganho de peso (F). Grupo CT: dieta controle comercial, sem suplementação de extrato de café verde; HF: com indução à obesidade e sem extrato de café verde; HFP: com indução da obesidade e suplementação com o extrato aquoso de café verde durante as 16 semanas de experimento; HFT: com indução da obesidade e adição do extrato aquoso de café verde a partir da 8ª semana até o final do experimento. Valores apresentados como média \pm DP (n=8). (*) apresenta diferença significativa entre CT e HF pelo teste *t* ($p < 0.05$). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com dieta high-fat.

5.4. pH intestinal e Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

Entre os grupos CT e HF, observou-se redução significativa nos valores médios de pH intestinal nos animais que consumiram a dieta high-fat ($p < 0,05$; Fig. 4A). Contudo, não houve diferença significativa entre esses grupos em relação à produção dos ácidos graxos de cadeia curta: acetato ($p > 0,05$; Fig. 4B), butirato ($p > 0,05$; Fig. 4C) e propionato ($p > 0,05$; Fig. 4D).

Entre os grupos tratados com dieta high-fat, o consumo do extrato aquoso de café verde no grupo HFT resultou em uma redução significativa no pH intestinal dos animais em comparação à HF e HFP ($p < 0,05$; Fig. 4A). Em relação aos AGCC, a suplementação com o extrato no grupo HFT contribuiu significativamente para o aumento da produção de acetato ($p < 0,05$; Fig. 4B) e butirato ($p < 0,05$; Fig. 4C), quando comparado aos grupos HF e HFP. Quanto ao propionato, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos HF e HFT, no entanto, observou-se uma redução significativa na produção desse AGCC no grupo HFP, em comparação aos demais ($p < 0,05$; Fig. 4D).

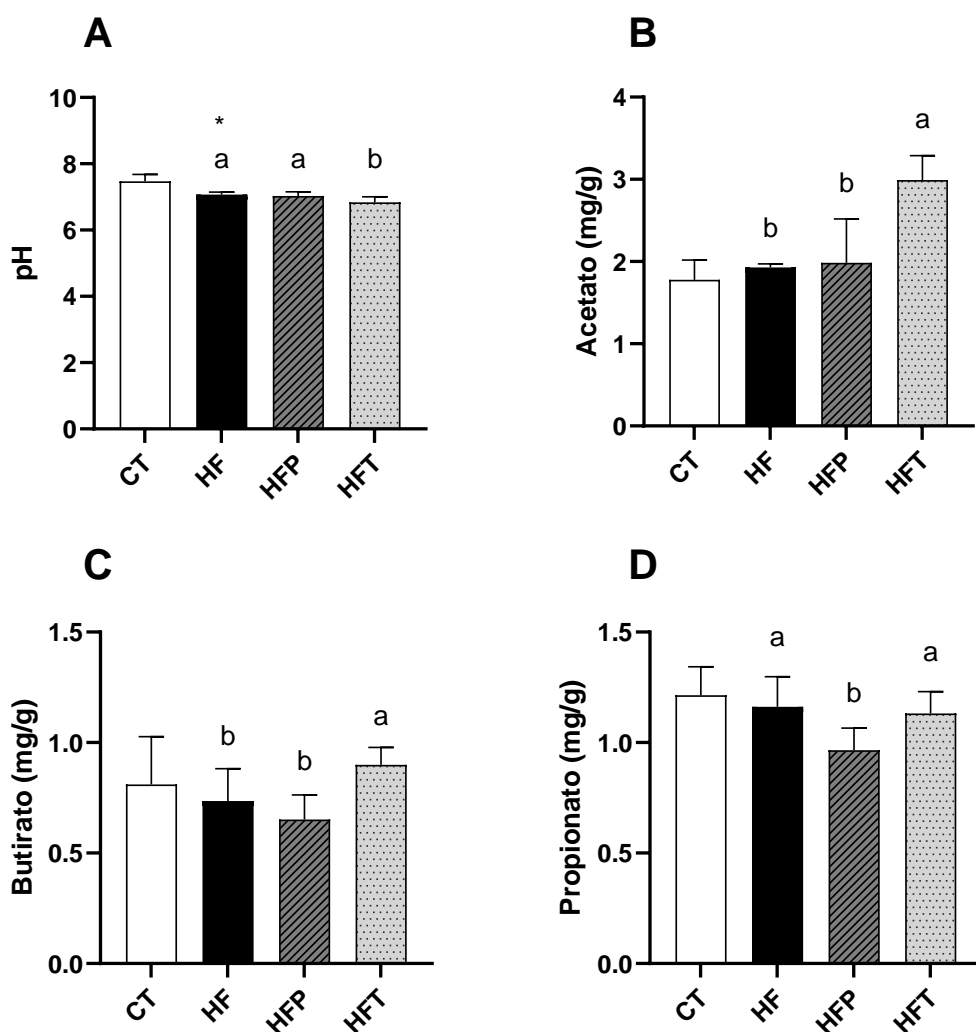


Figura 4 - Valores de pH e ácidos graxos de cadeia curta dos animais. pH cecal (A), acetato (B), butirato (C), propionato (D). Grupo CT: dieta controle comercial, sem suplementação de extrato de café verde; HF: com indução à obesidade e sem extrato de café verde; HFP: com indução da obesidade e suplementação com o extrato aquoso de café verde durante as 16 semanas de experimento; HFT: com indução da obesidade e adição do extrato aquoso de café verde a partir da 8ª semana até o final do experimento. Valores apresentados como média \pm DP (n=8). (*) apresenta diferença significativa entre CT e HF pelo teste *t* ($p < 0.05$). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com dieta high-fat.

5.5. Determinação de IgA e marcadores de estresse oxidativo

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CT e HF quanto à produção de IgA ($p > 0,05$; Fig. 5A). Em relação aos marcadores de estresse oxidativo, o grupo HF apresentou redução significativa de ON ($p < 0,05$; Fig. 5B) e SOD ($p < 0,05$; Fig. 5C) em comparação ao grupo CT, mas não houve diferença significativa para a catalase ($p > 0,05$; Fig. 5D).

Entre os grupos tratados com dieta high-fat, não foram observadas diferenças significativas quanto a concentração de IgA entre os grupos suplementados com o extrato de café verde e o grupo HF ($p>0,05$), no entanto, o grupo HFT resultou em uma redução significativa na produção dessa imunoglobulina em relação ao grupo HFP ($p<0,05$; Fig. 5A). Em contrapartida, não foram observadas diferenças significativas nos biomarcadores de estresse oxidativo: ON ($p>0,05$; Fig. 5B), SOD ($p>0,05$; Fig. 5C) e catalase ($p>0,05$; Fig. 5D), entre esses grupos.

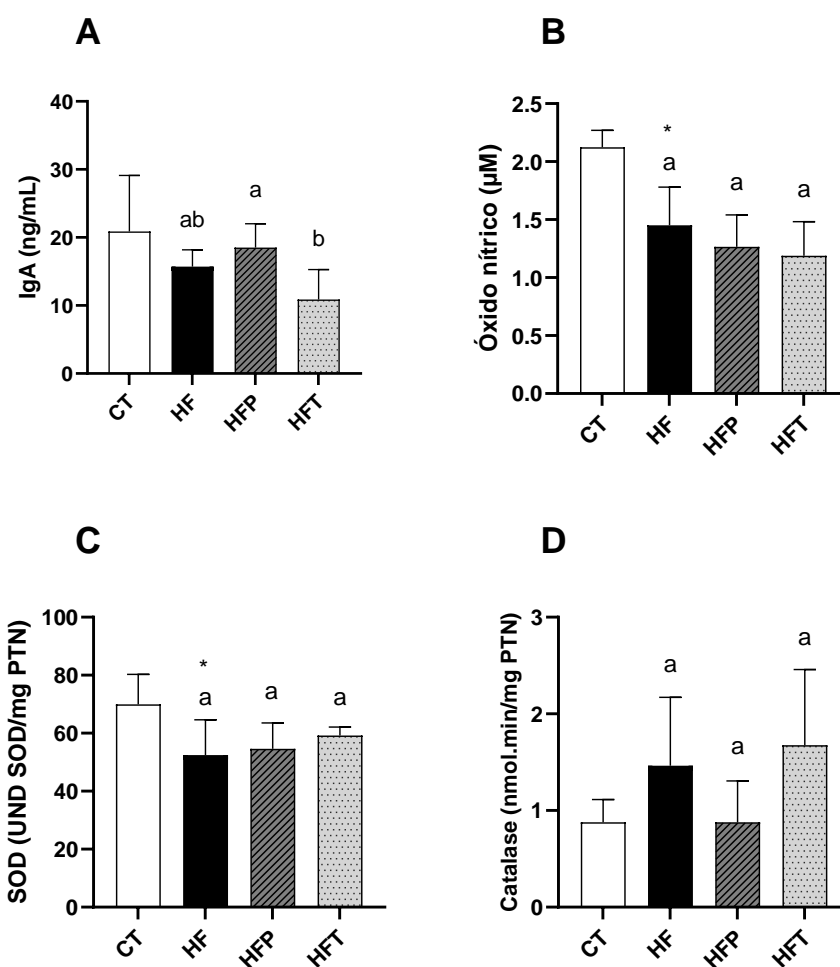


Figura 5 - Concentração de IgA e biomarcadores de estresse oxidativo. Imunoglobulina A – IgA ($n=6$) (A), óxido nítrico (B), superóxido dismutase - SOD (C) e catalase (D). Grupo CT: dieta controle comercial, sem suplementação de extrato de café verde; HF: com indução à obesidade e sem extrato de café verde; HFP: com indução da obesidade e suplementação com o extrato aquoso de café verde durante as 16 semanas de experimento; HFT: com indução da obesidade e adição do extrato aquoso de café verde a partir da 8ª semana até o final do experimento. Valores apresentados como média \pm DP ($n=8$). (*) apresenta diferença significativa entre CT e HF pelo teste t ($p<0,05$). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre os grupos tratados com dieta high-fat.

5.6. Análises morfométricas da mucosa colônica

O grupo HF apresentou redução significativa de todos os parâmetros avaliados da mucosa intestinal em comparação ao grupo CT, incluindo a altura da mucosa ($p < 0,05$; Fig. 6A), profundidade das criptas intestinais ($p < 0,05$; Fig. 6B), largura das criptas ($p < 0,05$; Fig. 6C) e número de células caliciformes ($p < 0,05$, Fig. 6D).

Entre os grupos tratados com dieta high-fat, a suplementação com extrato aquoso de café verde no grupo HFT resultou em um aumento significativo da altura do cólon em relação ao grupo HF ($p < 0,05$; Fig. 6A), embora sem diferença em comparação à HFP ($p > 0,05$; Fig. 6A). Quanto às criptas intestinais, o consumo do extrato não alterou a profundidade das mesmas em relação à HF ($p > 0,05$; Fig. 6B), porém, aumentou significativamente a largura dessas estruturas nos grupos HFP e HFT ($p < 0,05$; Fig. 6C). Quanto às células caliciformes, a suplementação com o extrato, tanto como prevenção quanto como tratamento, promoveu um aumento significativo no número dessas células em comparação ao grupo HF ($p < 0,05$; Fig. 6D).

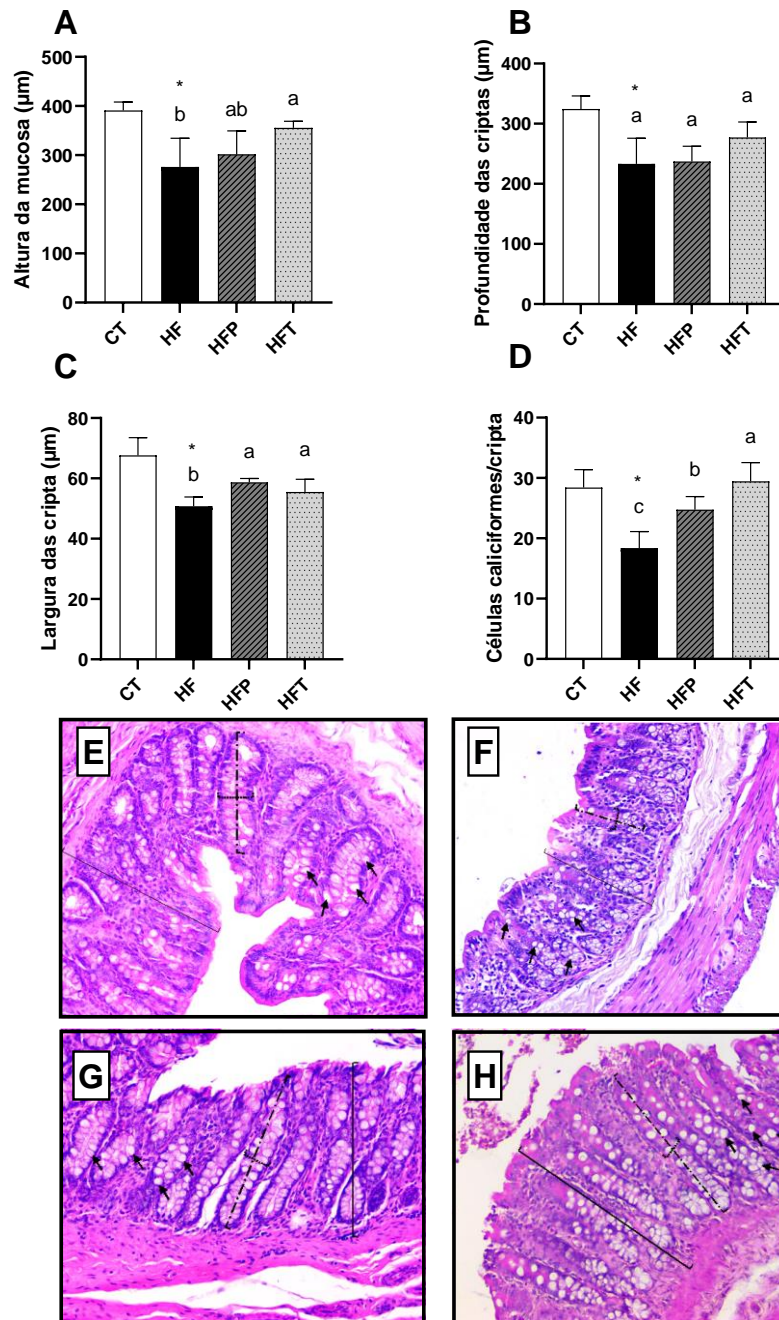


Figura 6 – Análises morfométricas da mucosa colônica dos animais experimentais. Altura da mucosa do cólon (A), profundidade das criptas (B), largura das criptas (C) e número de células caliciformes/cripta (D). Imagens representativas da mucosa intestinal do grupo CT (E), HF (F), HFP (G) e HFT (H). A linha contínua indica a mucosa do intestino grosso. A linha traço-ponto e o traçado pontilhado indicam a profundidade e a largura da cripta, respectivamente. As setas indicam as células caliciformes. Grupo CT: dieta controle comercial, sem suplementação de extrato de café verde; HF: com indução à obesidade e sem extrato de café verde; HFP: com indução da obesidade e suplementação com o extrato aquoso de café verde durante as 16 semanas de experimento; HFT: com indução da obesidade e adição do extrato aquoso de café verde a partir da 8ª semana até o final do experimento. Valores apresentados como média \pm DP (n=8). (*) apresenta diferença significativa entre CT e HF pelo teste t ($p < 0,05$). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com dieta high-fat. Objetiva: 20x. Escala: 100 μm . Corante: hematoxilina-eosina (HE).

5.7. Quantificação das proteínas claudina e ocludina no intestino grosso

Entre os grupos controle, observou-se uma redução significativa nas proteínas de junção intestinal claudina ($p < 0,05$; Fig. 7E) e ocludina ($p < 0,05$; Fig. 7J) no grupo HF.

Por outro lado, nos grupos tratados com dieta high-fat, a suplementação com o extrato aquoso de café verde, tanto como prevenção quanto como tratamento, resultou em um aumento significativo das proteínas de junção claudina ($p < 0,05$; Fig. 7E) e ocludina ($p < 0,05$; Fig. 7J) em comparação ao grupo HF.

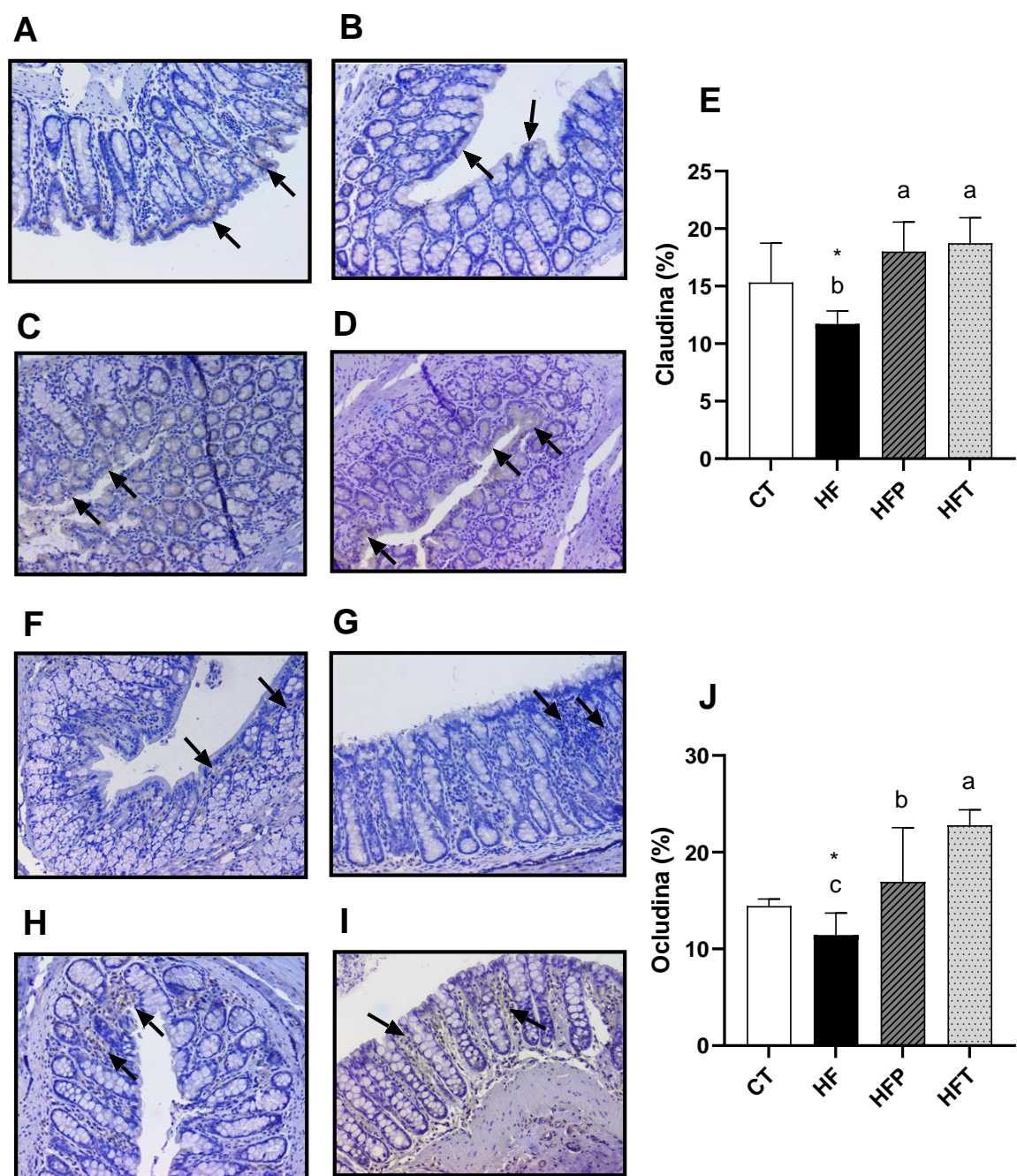


Figura 7 - Quantificação de proteínas claudina e ocludina no intestino grosso dos animais experimentais. Imagens representativas de imuno-histoquímica da mucosa do intestino grosso para a quantificação de claudina nos grupos CT (A), HF (B), HFP (C) e HFT (D) e para ocludina nos grupos CT (F), HF (G), HFP (H) e HFT (I). As setas nas imagens apontam para tonalidades amarronzadas, representativas da presença e distribuição das proteínas de junção analisadas. Gráficos da quantificação das proteínas de junção claudina (E) e ocludina (J). Grupo CT: dieta controle comercial, sem suplementação de extrato de café verde; HF: com indução à obesidade e sem extrato de café verde; HFP: com indução da obesidade e suplementação com o extrato durante as 16 semanas de experimento; HFT: com indução da obesidade e adição do extrato a partir da 8ª semana até o final do experimento. Valores apresentados como média \pm DP (n=8). (*) apresenta diferença significativa entre CT e HF pelo teste *t* ($p < 0.05$). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com dieta high-fat. Objetiva: 20x. Escala: 100 μ m.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da obesidade é fortemente relacionado à hábitos alimentares caracterizados pelo alto consumo calórico e lipídico, principalmente de gorduras saturadas (JACOB et al., 2022). Estudos com animais mostraram que esse padrão alimentar, mesmo que consumido por um curto período de tempo, já é suficiente para induzir efeitos deletérios ao intestino (BRANDT et al., 2019; HUANG et al., 2020; LEE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2023; XIE et al., 2021; YANG et al., 2019), ao passo que o consumo de café verde e seus compostos bioativos podem auxiliar na manutenção da saúde intestinal (BARANDOUZI et al., 2021; SILVA et al., 2022; YE et al., 2021; ZHENG et al., 2023).

No presente estudo, a análise da composição do extrato de café verde indicou o ácido clorogênico (5,53 mg/mL) como composto majoritário, seguido pela cafeína (1,84 mg/mL) e trigonelina (0,73 mg/mL). Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos, em que o ácido clorogênico foi o composto presente em maior concentração (ACIDRI et al., 2020; SILVA et al., 2022; SUALEH; TOLESSA; MOHAMMED, 2020). No entanto, as concentrações relatadas desses compostos apresentam variações entre os estudos, atribuídas a fatores como diferenças nas condições climáticas e geográficas, estágio de maturação dos grãos (BASTIAN et al., 2021), estocagem dos grãos, método de processamento (KRÓL et al., 2020) e variações genéticas entre as cultivares utilizadas (WONGSA et al., 2019). Esses aspectos podem influenciar diretamente a composição química do extrato, refletindo as particularidades de cada estudo.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o consumo da dieta high-fat influenciou significativamente no ganho de peso corporal total dos animais em comparação à CT. Esse efeito foi observado tanto na 8ª quanto na 16ª semana, validando o modelo experimental de indução da obesidade, que se manteve consistente até a conclusão do experimento. Ainda, o maior índice de Lee e o peso do tecido adiposo epididimal no grupo HF reforçam a caracterização do grupo HF como obeso, uma vez que esses parâmetros são indicativos de acúmulo adiposo. Em resposta a dieta high-fat ainda foram observados aumentos significativos nos coeficientes de eficiência alimentar e calórica, mesmo com uma ingestão alimentar

significativamente reduzida em comparação ao grupo CT, apesar da ingestão calórica estatisticamente igual entre esses grupos. Nesse contexto, destaca-se que a composição de macronutrientes na dieta exerce influência significativa sobre o ganho de peso e a adiposidade dos animais, com ênfase na concentração lipídica como fator determinante (HU et al., 2018). O tecido adiposo compreende um importante reservatório de gordura do corpo, particularmente em dietas hiperlipídicas. A gordura dietética, comparada aos carboidratos e proteínas, demanda menor aporte energético para sua metabolização, o que facilita seu armazenamento no tecido adiposo (SAITO et al., 2020). Ainda, em condições de excesso, essa gordura é armazenada de forma mais eficiente devido a mudanças metabólicas promovidas no tecido adiposo, incluindo alterações nos mecanismos moleculares, como a redução de NAD⁺/SIRT, que afetam a deposição de gordura, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade (RUSKOVSKA; BERNLOHR. 2023).

Por outro lado, não foram observados efeitos significativos do consumo do extrato aquoso sobre o controle do ganho peso e adipogênese nos animais suplementados. Contudo, estudos científicos anteriores mostraram o efeito positivo de compostos bioativos presentes nos grãos de café no controle do ganho de peso ao regular vias envolvidas na adipogênese, lipólise e oxidação de ácidos graxos, o que contribui para reduzir o acúmulo de gordura no tecido adiposo (CHOI et al., 2016; SONG; CHOI; PARK, 2014; SUDEEP et al., 2016). Conforme descrito por Xie et al. (2021) e Xu et al. (2020), em estudos realizados com modelos animais, a suplementação com 100 mg/kg de ácido clorogênico e 50 mg/kg de ácido cafeico, respectivamente, resultou em uma redução significativa na taxa de ganho de peso corporal e na adiposidade. Resultados semelhantes foram reportados por Caro-Gómez et al. (2019), ao suplementar camundongos com café verde contendo 220 mg/kg de ácido clorogênico. Esses achados sugerem que altas dosagens dos compostos bioativos são necessárias para promover tal efeito, contribuindo para a atenuação da obesidade, visto que no presente estudo o consumo de ACG foi de aproximadamente 15 mg/Kg.

No presente estudo, a suplementação com extrato aquoso de café verde como tratamento (HFT) reduziu significativamente o pH intestinal (6,8) em relação à HF (7,07). O pH intestinal fisiológico apresenta variação de levemente ácido a levemente

alcalino, oscilando entre 6,0 e 7,5 ao longo de suas diferentes regiões (VASS et al., 2019; YAMAMURA et al., 2023). Essa acidificação do pH, promovida pelo consumo do extrato, auxilia na manutenção das atividades de digestão e absorção de nutrientes, assim como, para a modulação de um ambiente adequado à proliferação de microrganismos benéficos (YAMAMURA et al., 2023). O resultado encontrado possivelmente se deu em resposta ao aumento da produção dos AGCC - butirato e acetato - observado no grupo HFT, isso porque o aumento desses compostos normalmente reflete a redução do pH em diferentes regiões do cólon, principalmente na porção proximal, devido a maior concentração de microrganismos presentes (DEN BESTEN et al., 2013; STEIGERT et al., 2024).

O aumento na concentração de AGCC sugere que o extrato aquoso de café verde pode ter efeito benéfico sobre a microbiota intestinal, promovendo a fermentação bacteriana a partir dos compostos bioativos presentes nos grãos, resultando no aumento da produção desses compostos. Esses achados estão de acordo com a literatura científica, uma vez que polifenóis atuam como prebióticos, aumentando a diversidade bacteriana e promovendo o aumento de bactérias produtoras de AGCC como *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Bifidobacterium* (GOWD et al., 2019) e *Ruminococcus* (XIE et al., 2021). Em um estudo *in vitro* foi observado que a fermentação do café reduziu o teor de compostos fenólicos, como ácido clorogênico, ferúlico e cafeico, indicando a metabolização desses compostos pela microbiota. Além disso, o café verde alterou a composição da microbiota intestinal, com maior estímulo a produção de propionato e butirato em comparação ao café torrado (PÉREZ-BURILLO et al., 2019). Xu et al. (2020), mostraram, ainda, que a suplementação com 50 mg/Kg/dia de ácido cafeico por gavagem, durante 12 semanas, restaurou parcialmente a microbiota, contribuindo para o aumento de microrganismo produtores de butirato (XU et al., 2020). Portanto, sugere-se o potencial do café verde como prebiótico especialmente quando utilizado como tratamento no contexto da obesidade.

O consumo do extrato aquoso de café verde tanto preveniu quanto recuperou alterações à mucosa intestinal provocadas pela dieta high-fat, como mostrado nas análises morfológicas e das proteínas de junção. Os danos ao epitélio intestinal observados no grupo HF comprometem a função de barreira física exercida pela

mucosa e pela camada de muco à passagem do conteúdo luminal através do epitélio (MARTENS; NEUMANN; DESAI, 2018; PETERSON; ARTIS, 2014; PÉREZ-REYTOR et al., 2021). Por outro lado, o consumo do extrato de café verde restaurou significativamente esses parâmetros, destacando sua capacidade sobre a manutenção e regeneração tecidual, bem como, melhorando integridade da barreira intestinal. Esse efeito pode ser atribuído ao ácido clorogênico presente no café verde e sua relação com a melhora observado em estudos anteriores à parâmetros da mucosa intestinal (ZHANG et al., 2017; ZHENG et al., 2023; ZHOU et al., 2016), reduzindo lesões no epitélio, aumentando a camada de mucina e restaurando o epitélio intestinal com a redução da permeabilidade intestinal a partir do aumento da função metabólica mitocondrial (ZHOU et al., 2016). Estudos in vitro e in vivo demonstram que polifenóis, como o ácido ferúlico e o ácido clorogênico, podem modular positivamente a integridade das junções apertadas (BERGMANN et al., 2009; RUAN et al., 2016). O ácido ferúlico, por exemplo, estimula a transcrição de proteínas como ZO-1 e claudina, enquanto o ácido clorogênico, além de aumentar a expressão dessas proteínas em condições de inflamação, atua na reorganização das junções apertadas, modulando negativamente a expressão de MLCK, prevenindo a despolimerização da F-actina, essencial para a sustentação estrutural dessas junções (BERGMANN et al., 2009; RUAN et al., 2016). Além disso, produção dos AGCC, também pode impactar nos resultados encontrados, uma vez que o butirato é utilizado como principal fonte de energia para as células intestinais, alterando o ciclo celular e auxiliando na proliferação das células da mucosa intestinal (DEN BESTEN et al., 2013; KAYAMA; OKUMURA; TAKEDA, 2020; GÜLER et al., 2024), restaurando o metabolismo celular e contribuindo para a recuperação dos parâmetros morfométricos analisados, bem como sobre o aumento das proteínas de claudina e ocludina no tecido colônico. Esses compostos, ainda, podem atuar ativando cascatas de sinalização nos colonócitos ao se ligarem a receptores acoplados à proteína G, presentes no colón, que induz a ativação da proteína quinase C beta (PKC β), que fosforila ZO-1, permitindo que essa proteína se acople à ocludina e claudina, restaurando a integridade da barreira intestinal (PÉREZ-REYTOR et al., 2021).

O consumo do extrato aquoso de café verde não exerceu um impacto significativo nos níveis dos marcadores de estresse oxidativo avaliados neste estudo.

No entanto, investigações prévias mostraram efeitos positivos do uso do extrato de café verde e do ácido clorogênico isoladamente, reestabelecendo o equilíbrio entre óxido nítrico (ON), malondealdeído (MDA), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Esses resultados foram observados tanto no intestino (ZHOU et al., 2016), quanto em contextos hepáticos (ABDEL-MOHSEN et al., 2023) e renais (ALAMRI et al., 2020). É importante destacar que, nesses estudos, o efeito antioxidante do café verde e do ácido clorogênico foi observado em cenários já marcados por estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento de marcadores pró oxidantes e redução da resposta antioxidante nos tecidos analisados. No presente estudo, a dieta high-fat, utilizada para a indução da obesidade, é associada ao aumento de marcadores oxidativos e prejuízos à capacidade de resposta antioxidante (BRANDT et al., 2019; YANG et al., 2019). Esse desequilíbrio entre marcadores do estresse oxidativo estão relacionados a alterações na barreira intestinal, intensificando os danos ao epitélio (TIAN; WANG; ZHANG, 2017; YANG et al., 2019; ZHANG et al., 2020). O ON desempenha um papel crucial na modulação da resposta imunológica e oxidativa, mas sua produção excessiva está associada a danos teciduais e ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais e câncer de cólon. Por outro lado, os marcadores antioxidantes, SOD e CAT, atuam no balanço dos processos oxidativos e recuperação da mucosa (TIAN; WANG; ZHANG, 2017; ZHANG et al., 2020).

No contexto do presente estudo, apesar dos danos à mucosa colônica provocados pela dieta high-fat, os níveis de ON no grupo HF foram significativamente reduzidos, sugerindo a ausência de estresse oxidativo no tecido. Contudo, um ponto importante a ser considerado é o impacto desse padrão de dieta utilizada sobre o metabolismo do óxido nítrico. A L-arginina, precursora na síntese de ON, tem sua biodisponibilidade reduzida em dietas hiperlipídicas devido ao aumento da atividade da enzima arginase, reduzindo a biodisponibilidade desse aminoácido, o que pode levar à diminuição da produção de ON (ERDELY et al., 2010; GRASEMANN et al., 2017). Os resultados dessa análise, quando comparados a estudos anteriores, sugerem que os compostos bioativos do café verde apresentam maior eficácia antioxidante em contextos de estresse oxidativo já presentes no tecido, o que não foi observado no presente estudo.

De maneira semelhante, a suplementação com o café verde não alterou significativamente os níveis de IgA em comparação ao grupo HF. Estudos científicos indicam que durante processos inflamatórios e oxidativos, há um aumento da secreção dessa imunoglobulina em resposta às condições do epitélio intestinal, visto que esse anticorpo realiza a captação e neutralização de antígenos, modulando a microbiota intestinal e protegendo o intestino contra microrganismos e substâncias potencialmente patogênicos (PIETRZAK et al., 2020). Nesse contexto, danos à mucosa podem intensificar o estímulo à produção de componentes imunológicos como mecanismo de defesa (PIETRZAK et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Contudo, no presente estudo, mesmo com prejuízos ao epitélio, não foram observados aumento nos níveis dessa imunoglobulina. Esse achado foi acompanhado da redução de ON, cujo aumento poderia estimular a maior produção de IgA. Por outro lado, os níveis de IgA em HFT foram estatisticamente menores em comparação à HFP. Esse resultado foi inesperado, visto que a resposta oxidativa foi semelhante em ambos os grupos, assim como a melhora no epitélio intestinal, logo, esperava-se a redução desse anticorpo em ambos os grupos suplementados com o extrato aquoso de café verde. Esses resultados podem sugerir diferentes respostas do sistema imunológico frente aos distintos momentos de início da suplementação com o extrato de café verde entre os grupos HFP e HFT e às possíveis alterações metabólicas já estabelecidas em resposta à dieta high-fat.

Os resultados obtidos neste trabalho são particularmente significativos, uma vez que evidenciam os efeitos deletérios do consumo de dieta hipercalórica e hiperlipídica para a saúde intestinal, destacando o potencial do café verde na manutenção da integridade do epitélio intestinal e possível utilização como estratégia terapêutica para o reestabelecimento da homeostase intestinal.

No presente estudo, os efeitos benéficos do consumo do extrato aquoso de café verde foram observados a partir de uma ingestão média diária de 2,45 mg de cafeína e 7,36 mg de ácido clorogênico em animais com peso corporal aproximado de 500g. Quando ajustado para um ser humano de 70 kg, utilizando o cálculo de dose equivalente para humanos (NAIR; JACOB, 2016), essas quantidades correspondem a aproximadamente 0,94 mg/kg (66 mg) de cafeína e 2,84 mg/kg (198 mg) de ácido clorogênico. Tais doses são consideradas seguras, uma vez que o consumo diário

recomendado de cafeína para adultos saudáveis é de 400 mg (DOEPKER et al., 2018).

Adicionalmente, destaca-se que as concentrações dos compostos presentes no grão de café podem sofrer variação devido à variedade do grão, as condições de plantio, manejo pós-colheita e o método de preparo. Por exemplo, uma xícara de café arábica coado (150 mL) contém cerca de 45 mg de cafeína, enquanto o café expresso (40 mL) apresenta aproximadamente 112 mg (ROCHA et al., 2022). O processo de torrefação reduz significativamente o teor de ácido clorogênico no café, resultando em concentrações entre 13 e 60 mg por 100 mL da bebida pronta (MILLS et al., 2013). Por outro lado, o consumo a partir dos grãos verdes proporciona maiores concentrações desses compostos bioativos, com 100 mL fornecendo aproximadamente 184 mg de cafeína e 553 mg de ácido clorogênico (dados baseados na Tabela 5).

É importante ressaltar que, apesar do apelo ao ácido clorogênico devido às quantidades consideráveis no extrato e aos benefícios atribuídos a esse composto, é essencial considerar a presença de outros compostos presentes no café verde que podem interagir de maneira sinérgica e contribuir para os resultados encontrados.

Dado o número limitado de estudos que investigaram o uso do café verde sobre alterações intestinais, os resultados encontrados no presente estudo reforçam a relevância do extrato de café verde na promoção da saúde intestinal, especialmente no contexto da obesidade. Esses achados destacam o potencial do café verde como uma intervenção terapêutica promissora, cuja aplicabilidade merece ser mais explorada.

7. CONCLUSÃO

A análise da composição do extrato de café verde identificou o ácido clorogênico como o principal composto bioativo. A administração da dieta hiperlipídica e hipercalórica resultou em ganho de peso corporal nos animais e induziu alterações intestinais negativas, comprometendo a integridade do cólon. Contudo, o consumo médio diário de 1,33 mL do extrato de café verde (contendo 7,36 mg/mL de ACG) demonstrou benefícios para a manutenção e recuperação da saúde intestinal.

O consumo preventivo do extrato aquoso de café verde contribuiu significativamente para a preservação de parâmetros morfométricos e das proteínas de junção claudina e ocludina no intestino grosso, comprometidos pelo consumo da dieta high-fat. Já a administração do extrato como tratamento promoveu redução do pH intestinal e aumento dos AGCC, além de recuperação da mucosa intestinal e aumento das proteínas de junção. Dessa forma, os resultados do estudo sugerem que o café verde possui um potencial terapêutico promissor no co-tratamento para a recuperação intestinal, com a suplementação do extrato como tratamento mostrando os melhores efeitos observados.

Este trabalho abre novas perspectivas para que futuras pesquisas sejam realizadas, aprofundando o entendimento sobre a relação entre o consumo de café verde e a modulação do ambiente intestinal, com foco nos mecanismos de ação envolvidos. Além disso, os achados incentivam a realização de ensaios clínicos em humanos para explorar a viabilidade do uso do extrato de café verde como coadjuvante em terapias de recuperação intestinal.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-MOHSEN, D. M. et al. Green Coffee Bean Extract Potentially Ameliorates Liver Injury due to HFD/STZ-Induced Diabetes in Rats. **Journal of Food Biochemistry**, v. 2023, 2023.

ACIDRI, R. et al. Phytochemical profile and antioxidant capacity of coffee plant organs compared to green and roasted coffee beans. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, 2020.

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 121-126, 1984.

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

AL-MEGRIN, W. A. et al. Nephroprotective effects of chlorogenic acid against sodium arsenite-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 14, p. 5162–5170, 2020.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 4, p. 205-217, 2015.

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

BABOVA, O.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. E. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. **Phytochemistry**, v. 123, p. 33–39, 2016.

BADMOS, S.; LEE, S. H.; KUHNERT, N. Comparison and quantification of chlorogenic acids for differentiation of green Robusta and Arabica coffee beans. **Food Research International**, v. 126, 2019.

BARANDOUZI, Z. A. et al. Altered gut microbiota in irritable bowel syndrome and its association with food components. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2021.

BARBOSA, M. de S. G. et al. Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. **Food Chemistry**, v. 292, p. 275–280, 2019.

BASTIAN, F. et al. From plantation to cup: Changes in bioactive compounds during coffee processing. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2827, 2021.

BERGMANN, H. et al. The Ussing type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tight-junction genes using a colonic cell line. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 10, p. 1211–1225, 2009.

BRANDT, A. et al. Consumption of decaffeinated coffee protects against the development of early non-alcoholic steatohepatitis: Role of intestinal barrier function. **Redox Biology**, v. 21, p. 101092, 2019.

CARO-GÓMEZ, E. et al. Green coffee extract improves cardiometabolic parameters and modulates gut microbiota in high-fat-diet-fed ApoE ^{-/-} mice. **Nutrients**, v. 11, n. 3, 2019.

CHOI, B. K. et al. Green coffee bean extract improves obesity by decreasing body fat in high-fat diet-induced obese mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 7, p. 635–643, 2016.

COSTA, M. C. et al. Trigonelline and curcumin alone, but not in combination, counteract oxidative stress and inflammation and increase glycation product detoxification in the liver and kidney of mice with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 76, 2020.

DAI, A. et al. The Association between Caffeine Intake and the Colonic Mucosa-Associated Gut Microbiota in Humans—A Preliminary Investigation. **Nutrients**, v. 15, n. 7, 2023.

DE VICENTE, L. G. et al. TLR4 deletion increases basal energy expenditure and attenuates heart apoptosis and ER stress but mitigates the training-induced cardiac function and performance improvement. **Life Sciences**, v. 285, p. 119988, 2021.

DEN BESTEN, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 9, p. 2325-2340, 2013.

DEPAULA, J.; FARAH, A. Caffeine consumption through coffee: Content in the beverage, metabolism, health benefits and risks. **Beverages**, v. 5, n. 2, p. 37, 2019.

DO CARMO, L. B. et al. Green coffee extract microencapsulated: Physicochemical characteristics, stability, bioaccessibility, and sensory acceptability through dairy beverage consumption. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 20, p. 13221, 2022.

DOEPKER, C. et al. Key findings and implications of a recent systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1536, 2018.

DONOHUE, D. R. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 517–526, 2011.

ERDELY, Aaron et al. Arginase activities and global arginine bioavailability in wild-type and ApoE-deficient mice: responses to high fat and high cholesterol diets. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15253, 2010.

FARAG, M. A. et al. How do green and black coffee brews and bioactive interaction with gut microbiome affect its health outcomes? Mining evidence from mechanistic studies, metagenomics and clinical trials. **Trends in Food Science and Technology**, v. 118, p. 920-937, 2021.

FILOSA, S.; DI MEO, F.; CRISPI, S. Polyphenols-gut microbiota interplay and brain neuromodulation. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 12, p. 2055-2059, 2018.

FREITAS, V. V. et al. Impact of different roasting conditions on the chemical composition, antioxidant activities, and color of *Coffea canephora* and *Coffea arabica* L. samples. **Heliyon**, v. 9, n. 9, 2023.

GAO, L. et al. Chlorogenic acid alleviates A β 25-35-induced autophagy and cognitive impairment via the mTOR/TFEB signaling pathway. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 1705–1716, 2020.

GOWD, V. et al. Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota. **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, p. 81-93, 2019.

GRANCIERI, M. et al. Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*) attenuates intestinal morbidity in rats with colon cancer. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 666-675, 2017.

GRASEMANN, C. et al. Effects of fetal exposure to high-fat diet or maternal hyperglycemia on L-arginine and nitric oxide metabolism in lung. **Nutrition & Diabetes**, v. 7, n. 2, 2017.

GREEN, L. C. et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GÜLER, Meryem Saban et al. Butyrate: A potential mediator of obesity and microbiome via different mechanisms of actions. **Food Research International**, p. 115420, 2024.

GUTIÉRREZ ORTIZ, A. L. et al. Distribution of p-coumaroylquinic acids in commercial *Coffea* spp. of different geographical origin and in other wild coffee species. **Food Chemistry**, v. 286, p. 459–466, 2019.

HALL, R. D.; TREVISAN, F.; DE VOS, R. C. H. Coffee berry and green bean chemistry – Opportunities for improving cup quality and crop circularity. **Food Research International**, v. 151, p. 110825, 2022.

HARAKEH, S. M. et al. Gut microbiota: A contributing factor to obesity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 95, 2016.

HE, X. et al. Chlorogenic acid ameliorates obesity by preventing energy balance shift in high-fat diet induced obese mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 2, p. 631–637, 2021.

HERAWATI, D. et al. Critical roasting level determines bioactive content and antioxidant activity of Robusta coffee beans. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 7–14, 2019.

HONG, C. T.; CHAN, L.; BAI, C. H. The effect of caffeine on the risk and progression of parkinson's disease: A meta-analysis. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1–12, 2020.

HU, G. et al. Effect of roasting degree of coffee beans on sensory evaluation: Research from the perspective of major chemical ingredients. **Food Chemistry**, v. 331, 2020.

HU, S. et al. Dietary fat, but not protein or carbohydrate, regulates energy intake and causes adiposity in mice. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 415-431, 2018.

HUANG, D. et al. Bile acids elevated by high-fat feeding induce endoplasmic reticulum stress in intestinal stem cells and contribute to mucosal barrier damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 529, n. 2, p. 289–295, 2020.

HUANG, L. et al. Comparative transcriptome analysis revealed the influence of sucrose on flavor and taste quality of *Coffea arabica* and *C. canephora* varieties. **Beverage Plant Research**, v. 1, 2021.

HUSSAIN, S. K. et al. Dietary protein, fiber and coffee are associated with small intestine microbiome composition and diversity in patients with liver cirrhosis. **Nutrients**, v. 12, n. 5, 2020.

IACOB, S.; IACOB, D. G.; LUMINOS, L. M. Intestinal microbiota as a host defense mechanism to infectious threats. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 3328, 2019.

ICO. International Coffee Organization. **Coffee Market Report - March 2024**. 2024.

IKRAM, M. et al. Antioxidant and neuroprotective effects of caffeine against Alzheimer's and parkinson's disease: Insight into the role of Nrf-2 and A2AR signaling. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 902, 2020.

ILBÄCK, N. G.; SILLER, M.; STÅLHANDSKE, T. Evaluation of cardiovascular effects of caffeine using telemetric monitoring in the conscious rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 834–842, 2007.

JACOB, R. et al. Dietary Mediators of the Genetic Susceptibility to Obesity - Results from the Quebec Family Study. **Journal of Nutrition**, v. 152, n. 1, p. 49–58, 2022.

JESZKA-SKOWRON, M.; FRANKOWSKI, R.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. Comparison of methylxantines, trigonelline, nicotinic acid and nicotinamide contents in

brews of green and processed Arabica and Robusta coffee beans – Influence of steaming, decaffeination and roasting processes on coffee beans. **LWT**, v. 125, 2020.

KAYAMA, H.; OKUMURA, R.; TAKEDA, K. Interaction between the microbiota, epithelia, and immune cells in the intestine. **Annual Review of Immunology**, v. 38, n. 1, p. 23-48, 2020.

KHAN, A. et al. Caffeine modulates cadmium-induced oxidative stress, neuroinflammation, and cognitive impairments by regulating Nrf-2/HO-1 in vivo and in vitro. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 5, 2019.

KILLGORE, W. D. S.; KAMIMORI, G. H. Multiple caffeine doses maintain vigilance, attention, complex motor sequence expression, and manual dexterity during 77 hours of total sleep deprivation. **Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms**, v. 9, 2020.

KRÓL, K. et al. The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 1, p. 33–39, 2020.

LARA, B. et al. Similar ergogenic effect of caffeine on anaerobic performance in men and women athletes. **European Journal of Nutrition**, v. 60, n. 7, p. 4107–4114, 2021.

LEE, J. C. et al. Obesogenic diet-induced gut barrier dysfunction and pathobiont expansion aggravate experimental colitis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 2017.

LEMOS, M. F. et al. Chemical and sensory profile of new genotypes of Brazilian *Coffea canephora*. **Food Chemistry**, v. 310, 2020.

LOBSTEIN, T.; POWIS, J.; JACKSON-LEACH, R. **Atlas Mundial da Obesidade 2024**. 2024. Disponível em: <www.worldobesity.org>. Acesso em: 5 ago. 2024.

LOWERY, L. M. et al. International society of sports nutrition position stand: coffee and sports performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 20, n. 1, 2023.

LU, H. et al. Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3130–3158, 2020.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. **Handbook of Methods for Oxygen Radical**. 1985.

MANNINO, G.; KUNZ, R.; MAFFEI, M. E. Discrimination of Green Coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of Different Geographical Origin Based on Antioxidant Activity, High-Throughput Metabolomics, and DNA RFLP Fingerprinting. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, 2023.

MARTENS, E. C.; NEUMANN, M.; DESAI, M. S. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 457-470, 2018.

MILLS, C. E. et al. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3335–3340, 2013.

MOJICA, B. E. et al. The Impact of the Roast Levels of Coffee Extracts on their Potential Anticancer Activities. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 4, p. 1125–1130, 2018.

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

NAIR, A. B.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NGUYEN, V. et al. Pharmacological Activities, Therapeutic Effects, and Mechanistic Actions of Trigonelline. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 6, p. 3385, 2024.

NOVAES, F. J. M. et al. Extraction of Diterpene-Phytochemicals in Raw and Roasted Coffee Beans and Beverage Preparations and Their Relationship. **Plants**, v. 12, n. 8, 2023.

PÉREZ-BURILLO, S. et al. Effect of in vitro digestion-fermentation on green and roasted coffee bioactivity: The role of the gut microbiota. **Food Chemistry**, v. 279, p. 252–259, 2019.

PÉREZ-REYTOR, D. et al. Use of Short-Chain Fatty Acids for the Recovery of the Intestinal Epithelial Barrier Affected by Bacterial Toxins. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 650313, 2021.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141-153, 2014.

PIETRZAK, B. et al. Secretory iga in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9254, 2020.

PINHEIRO, P. F. et al. Chemical constituents of coffee. **Quality determinants in coffee production**, p. 209-254, 2021.

POUNIS, G. et al. Reduction by coffee consumption of prostate cancer risk: Evidence from the Moli-sani cohort and cellular models. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 1, p. 72–82, 2017.

PURWOKO, T. et al. Chlorogenic acid and caffeine content of fermented robusta bean. **Biodiversitas**, v. 23, n. 2, p. 902–906, 2022.

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

RIZK, S. et al. Neuroprotective effect of green and roasted coffee bean extracts on cerebral ischemia-induced injury in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 7, p. 1943–1956, 2021.

ROCHA, P. L. de A. et al. Development of a Caffeine Content Table for Foods, Drinks, Medications and Supplements Typically Consumed by the Brazilian Population. **Nutrients**, v. 14, n. 20, 2022.

RODRIGUES, P. B. et al. The early impact of diets enriched with saturated and unsaturated fatty acids on intestinal inflammation and tight junctions. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 119, p. 109410, 2023.

ROSHAN, H. et al. Effects of green coffee extract supplementation on anthropometric indices, glycaemic control, blood pressure, lipid profile, insulin resistance and appetite in patients with the metabolic syndrome: A randomised clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 3, p. 250–258, 2018.

RUAN, Z. et al. Chlorogenic acid decreases intestinal permeability and increases expression of intestinal tight junction proteins in weaned rats challenged with LPS. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

RUAN, Z. et al. Chlorogenic acid enhances intestinal barrier by decreasing MLCK expression and promoting dynamic distribution of tight junction proteins in colitic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 698–708, 2016.

RUSKOVSKA, T.; BERNLOHR, D. A. The role of NAD⁺ in metabolic regulation of adipose tissue: Implications for obesity-induced insulin resistance. **Biomedicines**, v. 11, n. 9, p. 2560, 2023.

SAITO, M. et al. Brown adipose tissue, diet-induced thermogenesis, and thermogenic food ingredients: from mice to men. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 222, 2020.

ŞEMEN, S. et al. Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake. **Food Chemistry**, v. 215, p. 92–100, 2017.

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

SIEGFRIED, V. R. et al. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaft**, 1984.

SONG, S. J.; CHOI, S.; PARK, T. Decaffeinated green coffee bean extract attenuates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

STEIGERT, S. et al. Characterization of luminal contents from the fasted human proximal colon. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 200, 2024.

SUALEH, A.; TOLESSA, K.; MOHAMMED, A. Biochemical composition of green and roasted coffee beans and their association with coffee quality from different districts of southwest Ethiopia. **Heliyon**, v. 6, n. 12, 2020.

SUDEEP, H. V. et al. Biomechanism of chlorogenic acid complex mediated plasma free fatty acid metabolism in rat liver. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, 2016.

TANAKA, S. et al. High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 522, n. 4, p. 971–977, 2020.

TANG, W. H. W.; KITAI, T.; HAZEN, S. L. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. **Circulation Research**, v. 120, n. 7, p. 1183-1196, 2017.

TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular**, v. 2017, n. 1, p. 4535194, 2017.

VASS, P. et al. Drying technology strategies for colon-targeted oral delivery of biopharmaceuticals. **Journal of Controlled Release**, v. 296, p. 162-178, 2019.

WANG, L.; DU, H.; CHEN, P. Chlorogenic acid inhibits the proliferation of human lung cancer A549 cell lines by targeting annexin A2 in vitro and in vivo. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 131, 2020.

WONGSA, P. et al. Quality and bioactive compounds of blends of Arabica and Robusta spray-dried coffee. **Food Chemistry**, v. 283, p. 579–587, 2019.

XIE, M. G. et al. Chlorogenic Acid Alleviates Colon Mucosal Damage Induced by a High-Fat Diet via Gut Microflora Adjustment to Increase Short-Chain Fatty Acid Accumulation in Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

XU, J. et al. Caffeic acid reduces body weight by regulating gut microbiota in diet-induced-obese mice. **Journal of Functional Foods**, v. 74, 2020.

YAMAGATA, K. et al. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 441, n. 1–2, p. 9–19, 1 abr. 2018.

YAMAMURA, R. et al. Intestinal and fecal pH in human health. **Frontiers in Microbiomes**, v. 2, 2023.

YANG, Y. et al. Dietary methionine restriction improves gut microbiota and reduces intestinal permeability and inflammation in high-fat-fed mice. **Food & Function**, v. 10, n. 9, p. 5952-5968, 2019.

YE, X. et al. Chlorogenic Acid-Induced Gut Microbiota Improves Metabolic Endotoxemia. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 2021.

ZHANG, L. et al. Oral administration of green tea polyphenols (TP) improves ileal injury and intestinal flora disorder in mice with *Salmonella typhimurium* infection via resisting inflammation, enhancing antioxidant action and preserving tight junction. **Journal of Functional Foods**, v. 64, 2020.

ZHANG, Y. et al. Dietary chlorogenic acid supplementation affects gut morphology, antioxidant capacity and intestinal selected bacterial populations in weaned piglets. **Food and Function**, v. 9, n. 9, p. 4968–4978, 2018.

ZHANG, Z. et al. Chlorogenic acid ameliorates experimental colitis by promoting growth of *Akkermansia* in mice. **Nutrients**, v. 9, n. 7, 2017.

ZHENG, C. et al. Chlorogenic Acid Ameliorates Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome by Regulating Extracellular Vesicles of Gut Microbes. **Advanced Science**, v. 10, n. 28, 2023.

ZHENG, S. et al. Do short chain fatty acids and phenolic metabolites of the gut have synergistic anti-inflammatory effects? – New insights from a TNF- α -induced Caco-2 cell model. **Food Research International**, v. 139, 2021.

ZHOU, Y. et al. Chlorogenic acid decreased intestinal permeability and ameliorated intestinal injury in rats via amelioration of mitochondrial respiratory chain dysfunction. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 253–260, 2016.

ANEXO

Anexo A – Aprovaçãõ comitê de ética.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeito do extrato de café verde na microbiota, saúde intestinal e biomarcadores metabólicos de animais alimentados com dieta hiperlipídica e hipercalórica.”**, registrada sob o n.º **001/2023**, sob a responsabilidade de **André Gustavo Vasconcelos Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CAMPUS DE ALEGRE (CEUA-ALEGRE) do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes).

Vigência da autorização: 03/2023 a 06/2024

Finalidade: Pesquisa

Espécie(s): Ratos da raça Wistar

Peso: aproximadamente entre 150g e 160g

Idade: 3 semanas

Sexo: Machos

Número de animais: 48

Origem: Biotério Central da UFES, Centro de Ciências da Saúde, campus Maruípe, Vitória - ES.

Alegre-ES, 15/02/2023

Mashal Costa Leme - Coordenador da CEUA-ALEGRE

Cristiane dos Santos Vergílio – Vice-coordenadora a CEUA-ALEGRE

Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Alegre – CEUA-ALEGRE

Alto Universitário, s/n – Guararema – Alegre, ES, Brasil – CEP 29500-000 - Telefone: 028 3552.8900 – ceua.alegre@gmail.com – www.alegre.ufes.br

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.