



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EVERTON RIBEIRO

**POTENCIAL BIOATIVO DA FRAÇÃO PROTEICA DE
GRÃOS VERDES E TORRADOS E DA BORRA DE CAFÉ
(*Coffea arabica* var. IAPAR 59)**

EVERTON RIBEIRO

**POTENCIAL BIOATIVO DA FRAÇÃO PROTEICA DE
GRÃOS VERDES E TORRADOS E DA BORRA DE CAFÉ
(*Coffea arabica* var. IAPAR 59)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Helena Prudencio

Co-orientadora: Prof. Dra. Thaís de Souza Rocha

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R484p Ribeiro, Everton.
Potencial bioativo da fração proteica de grãos verdes e torrados e da borra de café (*Coffea arabica* var. IAPAR 59) / Everton Ribeiro. - Londrina, 2019.
95 f.

Orientador: Sandra Helena Prudencio.
Coorientador: Thaís de Souza Rocha.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2019.
Inclui bibliografia.

1. 1. Atividade biológica - Tese. 2. 2. Simulação da digestão gastrointestinal - Tese. 3. 3. Predição in silico - Tese. 4. 4. Café - Tese. I. Prudencio, Sandra Helena . II. Rocha, Thaís de Souza. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

EVERTON RIBEIRO

**POTENCIAL BIOATIVO DA FRAÇÃO PROTEICA DE GRÃOS
VERDES E TORRADOS E DA BORRA DE CAFÉ (*Coffea arabica* var.
IAPAR 59)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Helena
Prudencio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. André Luiz Buzzo Mori
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa.

Aos meus pais, Sandra e Jonas.

À minha irmã, Mylena.

À Prof. Dra. Sandra Helena Prudencio e à Prof. Dra. Thaís de Souza Rocha, pela orientação dispensada à pesquisa, pelos conhecimentos compartilhados e oportunidades que propiciaram meu crescimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pelo acolhimento.

À toda equipe do programa (docentes, técnicos, secretários, etc.) pela prestatividade e acessibilidade.

Aos meus amigos do lab, em especial: Bruna Yoshida, Tamiris, Ana Clara, Bárbara, Daniele, José Renato, Thiago, Thaísa e Julyene; pelos momentos compartilhados, bons ou não muito bons. Levo todo o carinho comigo para onde for.

Ao Dr. Tumoru Sera, pela amostra de café e por permitir utilizar as instalações do IAPAR para a classificação do café.

À Fazenda Escola da UEL, em especial ao Sr. Lauro, por permitir e orientar sobre a utilização do torrador a gás para a torra do café.

Ao pós-doutorando André Luiz Buzzo Mori, pelo acompanhamento e todas as orientações dadas no processo de torra do café.

Aos demais, que porventura tenha esquecido (não propositadamente).

RIBEIRO, Everton. **Potencial bioativo da fração proteica de grãos verdes e torrados e da borra de café (*Coffea arabica* var. IAPAR 59)**. 2019. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O café é uma das maiores commodities agrícolas. Com a popularidade do consumo da bebida, é crescente a quantidade de subproduto sólido gerado, o qual é conhecido como borra. Os grãos verdes de café têm cerca de 10 a 15% de proteína, e teores similares são encontrados nos grãos torrados e na borra de café (10 a 13%). O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial da fração proteica dos grãos verde e torrado e da borra de café, como fonte de peptídeos bioativos. O potencial bioativo da globulina de reserva 11S foi avaliado *in silico* pela base de dados BIOPEP. Uma parte da amostra de café verde (*Coffea arabica* var. IAPAR 59) foi torrada em grau médio (220-230 °C) e moída. A bebida de café foi preparada por percolação do café torrado e moído em água a 90 °C, e a borra obtida foi liofilizada. As proteínas dos cafés verde e torrado e da borra foram extraídas em HCl 0,1 M / NaCl 0,1 M, e precipitadas em (NH₄)₂SO₄ 66%. Os extratos proteicos obtidos foram dialisados, liofilizados e submetidos à simulação da digestão gastrointestinal com pepsina e pancreatina. Os extratos, antes e após digestão, foram avaliados quanto à concentração de proteína solúvel, melanoidinas, capacidade redutora, atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP e à inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA) avaliada pela IC₅₀ (concentração que inibe 50% da atividade da ECA). A globulina 11S apresentou frequência elevada de peptídeos inibidores da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) (A = 0,62) e da ECA (A = 0,44), que podem ser liberados pela ação digestiva. Antes da digestão, o extrato de café torrado apresentou a maior atividade antioxidante, para os métodos de ABTS e FRAP, respectivamente (496,83 e 813,98 µmol TE.g⁻¹). Correlações significativas (p < 0,05) entre melanoidinas e os valores de ABTS (r = 0,66) e FRAP (r = 0,86) indicaram que a atividade antioxidante dos extratos de café torrado e da borra resultaram da interação entre proteínas e melanoidinas. Após a digestão, a atividade antioxidante aumentou consideravelmente para os extratos de café torrado e da borra, obtendo-se, respectivamente, valores de 574,28 e 645,58 µmol TE.g⁻¹ para ABTS e de 1096,07 e 1110,90 µmol TE.g⁻¹ para FRAP. A digestão simulada não aumentou de forma expressiva a atividade antioxidante do extrato de café verde, indicando que esta não é a principal atividade biológica deste extrato. A inibição da ECA foi expressiva somente após a digestão dos extratos. Os extratos de café verde e da borra tiveram as menores IC₅₀ (0,30 e 0,27 mg.mL⁻¹) devido à menor massa molecular dos peptídeos liberados pela digestão. No extrato de café torrado, mesmo havendo menor inibição da ECA, o aumento observado após a digestão pode ser atribuído à interação com melanoidinas. Dessa forma, a simulação da digestão gastrointestinal dos extratos proteicos liberou potenciais inibidores da ECA e antioxidantes. Moléculas bioativas anti-hipertensivas e antioxidantes podem ser obtidas a partir da borra de café, um subproduto do processamento do café.

Palavras-chave: peptídeos, digestão, bioinformática, ECA, antioxidante, melanoidinas.

RIBEIRO, Everton. **Potential in green and roasted coffee beans and spent coffee ground (*Coffea arabica* var. IAPAR 59) to provide bioactive peptides**. 2019. 95 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Coffee is one of the most traded worldwide commercial food. Since the beverage is widely consumed, larger amounts of solid by-product, which is known, spent coffee ground, is generating. Green coffee beans have around 10 to 15% of protein, and similar contents have already reported for both roasted beans and spent coffees (10% to 13%). The aim of this study was to evaluate the potential of proteins obtained to green and roasted coffee beans and spent coffee as a source of bioactive peptides. The bioactivity of the 11S coffee storage globulin was assessed *in silico* using the BIOPEP database. Following, green beans (*Coffea arabica* IAPAR 59) was roasted to medium grade (220-230 °C) and grounded. Brewing was prepared by percolating the roasted beans in water at 90 °C, and the spent coffee obtained was freeze-dried. Proteins of green and roasted beans and spent coffee were extracted in 0.1 M HCl /0.1 M NaCl followed by precipitation in 66% (NH₄)₂SO₄. Protein extracts obtained were dialyzed, freeze-dried and submitted to simulated gastrointestinal digestion with pepsin and pancreatin. The extracts, before and after digestion, were evaluated as soluble protein content, melanoidins, reducing capacity, antioxidant capacity measured by ABTS and FRAP assays, and the angiotensin-converting enzyme I (ACE) inhibition measured by the IC₅₀ (concentration that inhibits 50% of ACE activity). A high frequency of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) (A = 0.62) and ACE inhibitor peptides (A = 0.42) has been found encrypted in 11S coffee globulin, which could be released by digestion. Before simulating digestion, roasted bean extract showed higher antioxidant capacity for both ABTS and FRAP (496.83 and 813.98 μmol TE.g⁻¹, respectively). Significant correlations (p < 0.05) between melanoidins and ABTS (r = 0.66) and FRAP (r = 0.86), suggests that antioxidant capacity exhibited for both roasted bean and spent coffee may be due to protein-melanoidins linkages induced by roasting. After digestion, antioxidant capacity considerably enhanced for roasted bean and spent coffee extracts, obtaining, respectively, values such as 574.28 and 645.58 for ABTS; and 1096.07 and 1110.90 for FRAP, at μmol TE.g⁻¹. Simulating digestion was not able to improve antioxidant capacity for the green bean extract, suggesting that it is not the main biological activity within the extract. ACE inhibition was significant only after digestion of the extracts. Green beans and spent coffee extracts showed the lowest IC₅₀ (0.30 and 0.27 mg SP.mL⁻¹) due to smaller peptides released by digestion. Even though the roasted bean extract showed less ACE inhibition, the increase observed after digestion can be assigned to the protein-melanoidins linkages. Thus, digestion gastrointestinal simulating of coffee proteins is able to release potential ACE inhibitors and antioxidants. Coffee proteins can be a good source of bioactive peptides and this potential could be obtained even in spent coffee, a by-product of coffee processing.

Keywords: peptides, digestion, bioinformatics, ACE, antioxidant, melanoidins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Partes constituintes do cafeeiro15
- Figura 2** – Composição química dos cafés verde e torrado (*Coffea arabica*), em %, e em base seca23
- Figura 3** – Estrutura química do radical cátion 1,4 bis [5-amino-5-carbóxi-1-pentil]-pirazino (CROSSPY)31
- Figura 4** – Esquema de funcionamento do sistema renina-angiotensina35

ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1** – Simulação *in silico* da digestão gastrointestinal da globulina 11S com as proteases pepsina, tripsina e quimotripsina71
- Figura 2** – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de extratos proteicos antes (A) e após (B) a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal80
- Figura 3** – IC50 da ECA para os extratos proteicos dos cafés verde (V) e torrado (T) e da borra de café (B), antes (barras azuis) e após (barras vermelhas) a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal84
- Figura 1S** – Sequência de aminoácidos da globulina 11S do café arábica. Número de entrada: Q9ZNY2_COFAR (número NCBI: 13443)95
- Figura 2S** – Esquema de obtenção de extratos proteicos e avaliação da atividade biológica96

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Tabela 1** – Produção regional (em mil sacas de 60 kg) do café no Brasil referente à safra de 2017/1819
- Tabela 2** – Principais compostos presentes em borras de café, em base seca.....26
- Tabela 3** – Valores de IC50 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para peptídeos obtidos de proteínas alimentares em comparação a peptídeos sintéticos comerciais utilizados para inibição da ECA.....38

ARTIGO CIENTÍFICO

- Tabela 1** – Sequências peptídicas encriptadas na globulina 11S (*Coffea arabica*) com potencial bioativo preditas por simulação *in silico*68
- Tabela 2** – Frequência de ocorrência das atividades biológicas em sequências peptídicas presentes nos peptídeos liberados pela simulação *in silico* da digestão gastrointestinal com pepsina, tripsina e quimotripsina73
- Tabela 3** – Concentração de proteína solúvel, atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP, capacidade redutora e teor de melanoidinas dos extratos proteicos de café verde, torrado e borra de café, antes e após digestão gastrointestinal *in vitro*78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Frequência de ocorrência do peptídeo bioativo na sequência de aminoácidos da proteína
ABTS	2,2' - azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ABIC	Associação Brasileira das Indústrias de Café
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CaMPDE	Fosfodiesterase dependente de calmodulina
DPP-IV	Dipeptidil Peptidase- IV
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina I
FRAP	Capacidade redutora de íons férrico
GLP-I	peptídeo semelhante ao glucagon
GIP	peptídeo insulínico dependente de glicose
HHL	N-Hipuril-Histidil-Leucina
ICO	Organização Internacional do Café
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da atividade da ECA
OS	Proteína solúvel
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS-PAGE-tricina	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de tricina
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEAC	Atividade antioxidante equivalente ao Trolox
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	CAFÉ	15
3.1.1	Características Gerais	15
3.1.2	Produção e Consumo do Café	17
3.2	TORRAÇÃO	20
3.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ.....	21
3.4	BEBIDA E BORRA DE CAFÉ	24
3.5	PROTEÍNAS DO GRÃO DE CAFÉ	28
3.5.1	Proteína 11S.....	29
3.6	MUDANÇAS NA FRAÇÃO PROTEICA.....	30
3.7	PEPTÍDEOS BIOATIVOS	33
3.7.1	Peptídeos Alimentares Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)	34
3.7.1.1	Enzima conversora de angiotensina I (ECA)	34
3.7.1.2	Mecanismo de ação de peptídeos inibidores da ECA	36
3.7.1.3	Peptídeos bioativos em proteínas alimentares	36
3.7.2	Peptídeos Alimentares com Atividade Antioxidante	39
3.7.2.1	Mecanismo	39
3.7.2.2	Peptídeos bioativos em proteínas alimentares	40
4	REFERÊNCIAS	42
5	MATERIAL E MÉTODOS	55
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	56

7	CONCLUSÕES GERAIS.....	94
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	95

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, estima-se que anualmente, as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT's) são responsáveis pela morte de 41 milhões de pessoas no mundo, o que configura um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Desse total, a maior parte das causas está associada às doenças cardiovasculares (17,9 milhões), seguido de câncer (9,0 milhões), doenças respiratórias (3,9 milhões) e diabetes mellitus tipo 2 (1,6 milhões); somando juntas mais de 80% de todas as mortes registradas (OMS, 2018).

Diversas evidências epidemiológicas têm mostrado que a dieta alimentar associada a outros hábitos como tabagismo, alcoolismo e inatividade física representam fatores que aumentam o risco de incidência das DCNT's (HERNANDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011; OMS, 2018). Nesse contexto, a mudança de hábitos alimentares tem emergido, desde o fim dos anos 1990, como uma das estratégias para a prevenção ou redução do risco de desenvolvimento dessas doenças.

Esse cenário tem impulsionado vários segmentos da pesquisa na área de alimentos, tais como as indústrias, a readequar formulações a fim de produzir alimentos que forneçam mais do que o aporte de nutrientes necessários ao organismo; mas que também sejam capazes de prevenir doenças, e com isso, proporcionar benefícios à saúde humana (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009; LAGOS et al., 2015).

Diante dessa percepção, vários compostos, denominados bioativos, têm sido identificados e/ou isolados a partir de matrizes alimentares vegetais como frutas, hortaliças, leguminosas e grãos de cereais. Estes compostos são, em sua maioria, provenientes do metabolismo secundário de plantas e incluem os alcaloides, terpenoides, vitaminas, compostos fenólicos, entre outros (PATIL et al., 2009; RECHARLA et al., 2017). Eles são capazes de atuar em alvos fisiológicos específicos, modulando, em nível celular, várias reações envolvidas na ativação de processos patológicos; podendo, conseqüentemente, exercer efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-hipertensivos, imunomodulador, regulador glicêmico, etc; reduzindo, assim, o risco de desenvolvimento das DCNT'S (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2015; SANCHÉZ; VAZQUEZ, 2017).

Estudos por simulação computacional (*in silico*) já têm demonstrado que as proteínas de reserva tanto de leguminosas como de cereais podem ser precursoras de peptídeos bioativos (CHEUNG et al., 2009; UDENIGWE; GONG; WU, 2013; MONTROYA-RODRIGUEZ et al., 2015). Estes peptídeos podem exercer atividade biológica após serem liberados da proteína nativa pela ação de enzimas digestivas, por fermentação ou por processamento térmico industrial (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

O café é a segunda maior commodity, em valor, exportada por países em desenvolvimento, dentre eles, o Brasil (PENDERGAST, 2009; ICO, 2019). Segundo dados da Organização Mundial do Café e da Associação Brasileira da Indústria de Café referentes ao ano de 2018, o Brasil é o maior exportador de café e o segundo maior consumidor do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Nos grãos de café, além da cafeína, vários outros constituintes químicos como os ácidos clorogênicos, o ácido cafeico, e as melanoidinas podem estar relacionados à prevenção de doenças como o mal de Alzheimer, o mal de Parkinson, o câncer de cólon e as doenças cardiovasculares (BIDEL; THUOMILEHTO, 2013; YENSETTI; MURALIDHARA, 2016; SCHMIT et al., 2016; FARAH; LIMA, 2019).

O preparo da bebida produz um subproduto sólido, conhecido como borra. Como a demanda comercial pelo café é grande no mundo, e o consumo da bebida é bastante popular, um grande volume desse subproduto é gerado, principalmente por indústrias do café (CRUZ et al., 2012). A estimativa é que após o preparo da bebida, cerca de 550 a 670 g de borra de café são produzidas por quilograma de grão de café. Anualmente, esse volume perfaz mais de 6 milhões de toneladas (JIMÉNEZ-ZAMORA; PASTORIZA; RUFÍÁN-HENARES, 2015; GETACHEW; CHUN, 2017).

Os grãos de café apresentam um teor de proteína que pode variar de 10 a 15% para o café verde; e em torno de 10 a 13% para o café torrado e para a borra de café, em base seca (LAGO; ANTONIASSI; FREITAS, 2001; BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014; JIMÉNEZ-ZAMORA; PASTORIZA; RUFÍÁN-HENARES, 2015). A globulina 11S representa 45% do total de proteína presente no grão verde, e tem como principal função armazenar o nitrogênio necessário para as etapas de germinação e desenvolvimento do grão (MONDEGO et al., 2011).

Durante a torração, o calor induz não somente a desnaturação das proteínas, mas também à fragmentação, e a reações de polimerização que levam à incorporação

dessa fração à estrutura das melanoidinas; resultando em mudanças no conteúdo e no perfil eletroforético (MONTAVON; MAURON; DURUZ, 2003). Até o momento, não há relatos sobre o potencial bioativo da proteína 11S; e tampouco, há estudos que relacionem o potencial bioativo predito *in silico* com o impacto induzido pela torração na atividade biológica das proteínas do grão torrado, e na borra de café; o que justifica a relevância deste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o potencial de três matrizes diferentes do café (*Coffea arabica* var. IAPAR 59): os grãos verde e torrado e a borra, como fonte de peptídeos bioativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar *in silico* o perfil de atividade biológica da sequência proteica da globulina 11S do café verde
- Predizer *in silico* os fragmentos peptídicos da globulina 11S que podem ser gerados a partir da digestão simulada com proteases
- Simular a digestão gastrointestinal *in vitro* de extratos proteicos dos grãos verde e torrado e da borra de café
- Avaliar atividade biológica *in vitro* em extratos proteicos dos grãos verde e torrado, e da borra de café; antes e após a simulação da digestão gastrointestinal
- Verificar qual o impacto da torração do café na atividade biológica da fração proteica do café

3 REVISÃO DE LITERATURA

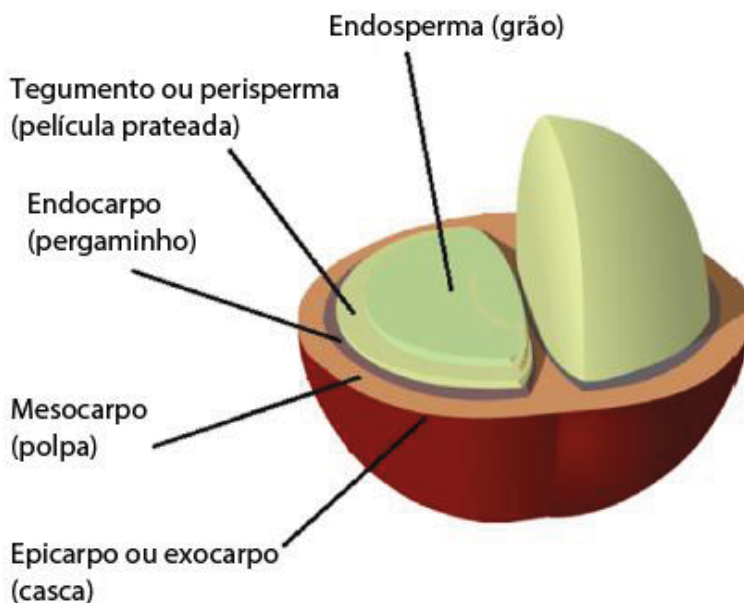
3.1 CAFÉ

3.1.1 Características Gerais

O cafeeiro é uma planta que pertence à família *Rubiaceae*, e ao gênero *Coffea*, compreendendo cerca de 90 espécies que se desenvolvem em ambientes de clima tropical e subtropical. É uma planta de porte arbóreo, perene, classificada como dicotiledônea; apresenta um caule lenhoso, folhas persistentes e inflorescências subtendidas por brácteas. Conta com um sistema radicular raso, cujas raízes podem se concentrar perto da superfície, ou se aprofundar no solo, podendo chegar a 1,5 m de profundidade, dependendo da espécie (MURTHY; NAIDU, 2012; FARAH; SANTOS, 2015).

Os frutos (Figura 1) compreendem as seguintes partes: exocarpo ou epicarpo (casca), mesocarpo (mucilagem), endocarpo (pergaminho), tegumento ou perisperma (película prateada) e endosperma (semente) que representa o grão de café.

Figura 1 - Partes constituintes do cafeeiro



Fonte: adaptado de FARAH; SANTOS (2015)

As espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* L. são notadamente as mais cultivadas, devido à importância econômica e comercial. A espécie *C. arabica*, que produz o café arábica, é originária da região tropical da Etiópia e é cultivada em regiões montanhosas com altitudes entre 1600 a 2800 m, adaptando-se melhor em clima úmido com temperaturas de cerca de 20 °C e precipitações pluviométricas anuais de 1600 a 2000 mm (DA MATTA; RAMALHO, 2006). Por apresentar um melhor equilíbrio entre acidez e compostos que conferem aroma e sabor à bebida, o que leva a características sensoriais mais marcantes, como aroma mais intenso e sabor suave, é tido como um café fino, que produz uma bebida de qualidade superior (ORMOND; DE PAULA; FILHO, 1999; BERTRAND et al., 2003).

A espécie *C. canephora*, que por sua vez produz as variedades robusta e conilon, é típica de regiões equatoriais quentes e úmidas, como Kouillou no Gabão (África), e apresenta maior resistência às variações climáticas, suportando também médias térmicas anuais mais elevadas, entre 24 a 30 °C (DA MATTA; RAMALHO, 2006). A bebida de café desta espécie não apresenta aromas e sabores marcantes, sendo caracterizada como neutra. No entanto, por apresentar maior teor de sólidos solúveis, é muito utilizada pela indústria de café solúvel (ORMOND; DE PAULA; FILHO, 1999; BERTRAND et al., 2003).

Novas cultivares têm surgido como resultado das demandas de regiões produtoras de café que buscam, dentre outros fatores, aumentar a produtividade pelo aumento da adaptação às variações climáticas de uma região, pela melhora da resistência do cafeeiro às doenças; e também pela redução do uso de defensivos agrícolas (MENDONÇA et al., 2007; KITZBERGER et al., 2013).

A espécie *Coffea arabica* var. IAPAR 59, utilizada neste estudo, é resultado do cruzamento entre o *Coffea arabica* Villa Sarchi 971/10 e o Híbrido de Timor 832/2, e apresenta resistência à ferrugem-do-cafeeiro, diminuindo dessa forma, os gastos com defensivos agrícolas para o controle da doença. Possui brotos de cor predominantemente bronze, frutos de cor vermelha com maturação levemente precoce. Os grãos, obtidos após o beneficiamento, geralmente são classificados por peneira de tamanho 16' (16/64 polegadas); o que caracteriza bom tamanho e adequado para produzir bebidas semelhantes à da cultivar Bourbon Vermelho (IAPAR, 2011).

3.1.2 Produção e Consumo do Café

De acordo com o relatório da Organização Internacional do Café, a produção mundial de café do ano de 2018, referente à safra de 2017/18, foi de cerca de 165,5 milhões de sacas de 60 kg, sendo 112,9 milhões a produção exportável pelos países produtores, o que representa um aumento de 5% na produção total, e uma queda de 1,4% na exportável, se comparado com a safra de 2016/17 (ICO, 2018a,b). Para o ano de 2019, estima-se uma produção total de 168,8 milhões de sacas de 60 kg (ICO, 2019).

Nesse cenário, o Brasil ocupa posição de liderança com um volume produzido de 61,7 milhões de sacas de 60 kg, conforme aponta o quarto levantamento da safra de 2017/18 realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). O café arábica representa 77% desse total (47,5 milhões de sacas), volume esse 38,6% maior em relação à safra 2016/17, o que é devido à bienalidade positiva nas regiões produtoras (CONAB, 2018).

O mesmo levantamento realizado pela Conab citado anteriormente também aponta a produção por estados (Tabela 1). Dessa forma, em termos de produção regional, Minas Gerais é o estado que mais se destaca. Com uma produção de 33 milhões de sacas, o estado além de representar mais de 50%, em volume, da produção de café no país, detém 69% da produção referente à espécie arábica no país, a qual é destinada prioritariamente à indústria de café torrado e moído.

O estado do Espírito Santo, por sua vez, é o principal produtor da variedade canéfora, com cerca de 9 milhões de sacas, sendo boa parte destinada à indústria de café solúvel. O aumento de 52% percebido na produção em relação à safra de 2016/17 é devido às condições climáticas favoráveis para o cultivo, como maiores índices de pluviosidade e a temperatura mais amenas.

O estado de São Paulo, terceiro maior em volume de produção de café no país (6,3 milhões de sacas de café arábica), apresentou um ganho de 42,9% em relação à safra 2016/17 devido às condições climáticas aliadas ao ciclo da bienalidade, que favoreceram o cultivo das lavouras.

Na Bahia (2,1 milhões de sacas), a regularidade das chuvas no estado beneficiou as três regiões produtoras (Atlântico, Cerrado e Planalto) proporcionando disponibilidade hídrica para a floração, formação e desenvolvimento dos frutos. Além

disso, várias lavouras na região do Planalto que foram afetadas pela estiagem na safra anterior, recuperaram o ritmo de produção, registrando-se um aumento de 100% na produção destas (CONAB, 2018).

Em Rondônia, a distribuição regular das chuvas durante o período de desenvolvimento dos frutos juntamente com a renovação do parque cafeeiro que ocorreu pela utilização de plantas mais resistentes a pragas e doenças e a entrada de tecnologias no manejo da cultura resultaram no aumento de 2,1% na produção de café canéfora (2 milhões de sacas), em relação à safra anterior.

O Paraná aparece em sexto lugar, com um volume produção de 1 milhão de sacas. A redução das áreas cultivadas, as variações climáticas e a bienalidade negativa, resultaram numa queda de 17,4% na produção do estado em relação à safra de 2016/17. Mesmo com a redução na produção, a qualidade do café é considerada satisfatória.

Para o ano de 2019, o segundo relatório da CONAB aponta uma estimativa de produção menor (50,9 milhões de sacas), e uma redução de 22,1% na produção de café arábica em relação à 2018 (CONAB, 2019). A bienalidade negativa aliada às altas temperaturas e escassez de chuvas tem impactado negativamente os principais estados produtores de café arábica, como Minas Gerais e São Paulo; e também a produção de café canéfora no estado do Espírito Santo, de modo que se esperam reduções de 20; 26 e 7% nos totais produzidos, respectivamente. Em Rondônia, no entanto, as estimativas são de aumento de 2,1% na produção de café canéfora, o que está relacionado à distribuição regular das chuvas o período de novembro de 2018 a março de 2019. No Paraná, a regularidade das chuvas também pode contribuir para um aumento na produção, de modo que se espera um aumento de 5,6% na produção em relação à 2018.

Tabela 1 - Produção regional (em mil sacas de 60 kg) do café no Brasil referente à safra de 2017/18

Estado	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>	Total
Minas Gerais	32.980	390,8	33.360
Espírito Santo	4.750	8.980	13.740
São Paulo	6.300	-	6.300
Bahia	1.880	2.670	4.550
Rondônia	-	1.980	1.980
Paraná	-	1.000	1.000

Fonte: CONAB, 2018

Cerca de 34% do volume total produzido (21 milhões de sacas) é absorvido pelo mercado interno, o que coloca o Brasil no ranking dos países que mais consomem a bebida, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (ICO, 2018b).

Conforme apontam as pesquisas realizadas pela Associação Brasileira da Indústria de Café realizadas em 2018, há um aumento da segmentação do consumo da bebida de café no mercado interno. Mesmo que o café em pó (grãos torrados e moídos) ainda represente cerca de 80% do consumo interno, a procura por cafés em grãos e em cápsulas também é crescente. O consumo do café em cápsulas, por exemplo, aumentou 50% desde a pesquisa realizada em 2015, passando de 0,6 para 0,9%. Este aumento reflete o maior conhecimento dos consumidores sobre as espécies de cafés; tipos de torra; formas de preparo, o que desperta a procura por cafés de melhor qualidade e em novas formas de apresentação (ABIC, 2018).

As pesquisas ainda estimam que deve haver um crescimento contínuo no consumo interno, de 3,5% ao ano, até 2021. No mesmo período de tempo, o aumento no volume de produção de café em grãos pode chegar a 6%, o que representa 19% do total produzido de café produzido para consumo interno. Isto pode ser atribuído tanto à procura por cafés especiais, como o espresso em estabelecimentos comerciais, bem como à procura pelas máquinas automáticas e domésticas de café, que é crescente (ABIC, 2018). Cafés de alta qualidade, como os das categorias Superior e Gourmet, também devem ganhar espaço entre consumidores que preferem aromas e sabores diferenciados.

3.2 TORRAÇÃO

A torração é um tratamento térmico que promove modificações físicas e químicas nos grãos verdes de café responsáveis por conferir os atributos sensoriais característicos da bebida tais como a cor, o aroma e o sabor (SCHENKER et al.; 2000; PEREIRA, 2003; ALESSANDRINI et al., 2008; BERTONE et al., 2016).

Durante a torração, a aplicação de calor gera nos grãos um gradiente de temperatura, e um aumento na pressão interna, o que promove a mobilização da água presente nas estruturas celulares e sua conversão em vapor. Em seguida, os grãos expandem, havendo um aumento na quantidade e no tamanho dos poros, favorecendo assim a liberação de vapor d'água e de gases como o CO₂, o que resulta na redução da densidade e perda de massa dos grãos (ROSA et al., 2016). A estrutura dos poros, além de ser um importante fator que controla a transferência de massa durante a etapa de armazenamento dos grãos e as propriedades de absorção e desgaseificação dos grãos torrados, ainda permite a migração de óleos para a superfície do grão (SCHENKER et al., 2000).

As condições empregadas na torração geralmente atingem temperaturas de 200 a 240 °C e tempos de 10 a 30 minutos, porém também podem variar de acordo com o tipo de torrador utilizado, grau de torração requerido, bem como variedade, a e a umidade do grão. (MOURA et al., 2007; NAKILCIOĞLU-TAŞ; ÖTHLES, 2019).

Vários parâmetros que podem ser utilizados para monitorar o grau de torração dos grãos, tais como: cor, perda de massa, temperatura da massa dos grãos, ou alterações na composição química que possam ser medidas através de técnicas colorimétricas ou espectrofotométricas (PERRONE et al., 2010; WANG; LIM, 2014).

Uma forma básica de controle do grau de torração é feita pelo sistema AGTRON "Roast Color Classification System" (STAUB, 1995). Nesse sistema, um conjunto de discos de cores obtidos por absorção de radiação infravermelha pelo grão ou pelo pó formam uma escala de 0 a 100. Cada número desta escala corresponde a uma cor, observando-se que a escala tende a 0 para torras mais escuras e a 100 para torras mais claras. Com isto, tem-se a seguinte classificação para o grau de torração: moderadamente clara (75), média (55), moderadamente escura (45) e escura (35) (MELO, 2004; UEJO NETO, 2008).

O grau de torração utilizado varia muito de acordo com a preferência do local que está sendo comercializado o produto. No Brasil, por exemplo, há maior preferência pelas torras média e moderadamente escura (Agtron 45-65). Em outros países, como os Estados Unidos, é comum graus de torração médio (Agtron 50-60). Já na região do sul da Itália, torras mais escuras, onde as temperaturas podem chegar a 240 - 245 °C, podem ser frequentemente utilizadas no preparo de cafés espresso. (ROSA et al., 2016; SWEET MARIA'S, 2019)

3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ

O café é uma matriz alimentar de composição química complexa. Diversas alterações nos constituintes químicos ocorrem durante as etapas de processamento do grão verde, e que conferem à bebida, o sabor e o aroma característicos (PIMENTA, 2003; ALESSANDRINI et al., 2008).

A composição pode variar de acordo com a diversidade genética da planta (espécie e a variedade do café); as características do solo e sua fertilização, o clima e a altitude do cultivo da plantação, o processamento pós-colheita dos frutos (método de secagem e armazenamento dos grãos); e o processo de torra (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006; PACETTI; LUCCI; FREGA, 2015; CAPORASO et al., 2018).

Na Figura 2 está apresentada a composição química de grãos de café (*Coffea arabica*). Em geral, os carboidratos constituem em torno de 60% do peso do grão verde, em base seca; e em torno de 45 a 50%, no grão torrado. Essa classe de compostos é representada principalmente por polissacarídeos e oligossacarídeos (BRADBURY, 2001; WEI; TANOKURA, 2015). Dentre os polissacarídeos, destacam-se as galactomananas e as arabinogalactanas; que são responsáveis por conferir viscosidade e retenção de aroma à bebida (NUNES et al., 2006; WEI; TANOKURA, 2015). A sacarose é o principal açúcar simples presente no grão de café verde, e atua como precursor de compostos de aroma e sabor que são gerados durante a torração, via reação de Maillard, tais como ácidos carboxílicos, furanos e aldeídos (BRADBURY, 2001).

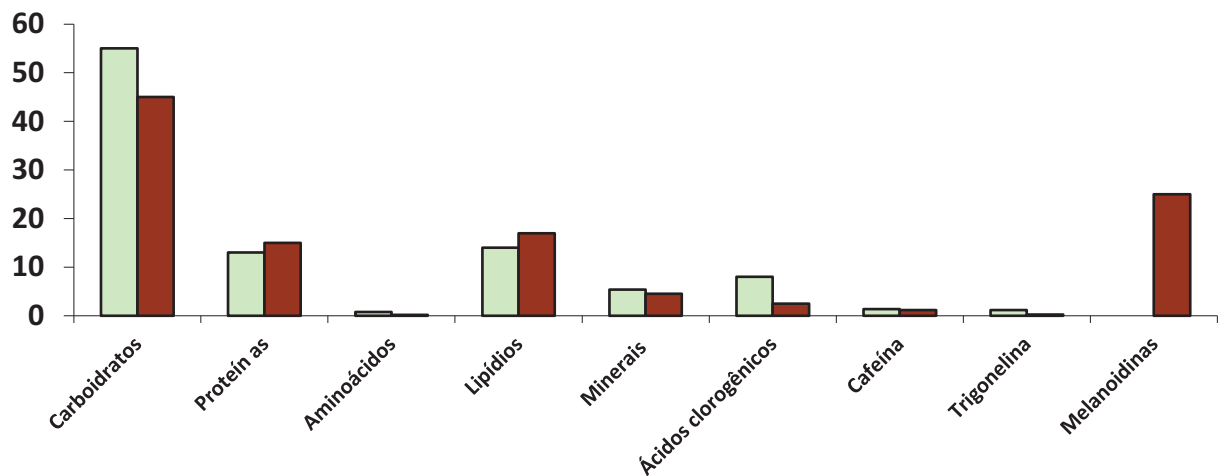
As proteínas constituem cerca de 10 a 15% do peso seco do grão verde. No grão torrado são encontrados teores que variam de 10 a 13% (WEI; TANOKURA, 2015; MAZZAFERA; SCHIMPL; KYIOTA, 2019). Têm a função de armazenar o

nitrogênio necessário para o desenvolvimento do grão verde; e são precursoras de compostos que conferem cor, aroma e sabor à bebida do café, formados principalmente na torração dos grãos (MONDEGO et al., 2011). Também tem sido verificado por alguns autores que a associação das proteínas com polissacarídeos, que ocorre via ligações covalentes, pode conferir a propriedade de estabilizar espuma da bebida de café (NUNES et al., 1997; TARZIA; SCHOLZ; PETKOWICZ, 2010)

A fração lipídica representa cerca de 13% do grão verde, sendo constituída principalmente por triacilgliceróis, esteróis e tocoferóis (GOULART et al., 2007; ZHOU et al., 2013). No grão torrado, representam em torno de 17%, mostrando que essa fração se mantém praticamente inalterada com a torração (WANG; LIM, 2015). Os lipídios podem contribuir para a qualidade da bebida, pois são capazes de reter vários compostos de aroma formados na pirólise durante a torração dos grãos (GOULART et al., 2007; RODARTE, 2008).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelo sistema de defesa da planta de café como resposta às condições ambientais adversas. No grão verde representam cerca de 4 a 6% dos constituintes químicos para a espécie *C. arabica* (FARAH; DONANGELO, 2006; FARAH; LIMA, 2019). Entre as principais classes de compostos fenólicos presentes, estão os ácidos clorogênicos. Estes são formados pela esterificação do ácido quínico com um derivado do ácido *trans*-cinâmico, que pode ser ácido cafeico, ferúlico ou *p*-cumárico, podendo ser agrupados em cinco classes principais: os ácidos cafeoilquínicos, com três isômeros principais (3,4,5); os ácidos dicafeoilquínicos (3,4; 3,5; 4,5); os ácidos feruloilquínicos (3,4,5); os ácidos cafeoilferuloilquínicos; os ácidos *p*-cumaroilquínicos (CLIFFORD, 2006; PERRONE et al., 2010). Durante a torração, os ácidos clorogênicos podem ser isomerizados; transformados em quinolactonas via reações de desidratação; hidrolisados, formando ácidos quínicos livres, ácidos fenólicos livres, e vários outros voláteis que contribuem à formação de aroma do grão torrado; e também incorporados à estrutura polimérica das melanoidinas (BEKEDAM et al., 2008; FARAH; LIMA, 2019).

Figura 2 - Composição química dos cafés verde e torrado (*Coffea arabica*), em %, e em base seca.



As barras de cor verde referem-se ao teores dos constituintes químicos no café verde; as barras de cor marrom, ao teores presentes no café torrado.

Fonte: adaptado de WEI; TANOKURA, 2015

A cafeína e a trigonelina são compostos alcaloides presentes nos grãos de café. A cafeína pode ser encontrada em teores de 1,0 a 1,5% nos grãos verdes e de 1,0 a 1,4% nos grãos torrados (KITZBERGER et al., 2013; KITZBERGER; SCHOLZ; BENASSI, 2014). É um dos compostos mais estáveis durante a torração, sendo extensivamente estudada por sua ação estimulante e também por contribuir com o amargor característico da bebida de café (CAPRIOLI et al., 2014). A trigonelina (1,0 a 1,2% no café verde), por sua vez, é muito sensível à degradação térmica durante a torração, havendo redução de 50 a 80% do seu teor no grão verde, conforme o grau de torra utilizado (WANG; LIM, 2015). Como produtos da degradação da trigonelina, tem-se a formação de niacina (vitamina do complexo B) e também pirróis e piridinas, os quais são precursores de compostos que conferem aroma à bebida (RODARTE, 2008; ASHIHARA et al., 2014).

As melanoidinas são estruturas poliméricas, de massa molecular elevada (5-100 kDa), que conferem aos grãos a cor marrom escura característica de café torrado. São formadas na torração, a partir da interação entre carboidratos, proteínas, ácidos clorogênicos e outros produtos intermediários da reação de Maillard; constituindo cerca de 25% dos grãos torrados (RUFIAN-HENARES; PASTORIZA, 2015;

TAGLIAZUCCHI, 2015). Embora não haja consenso sobre a estrutura, vários estudos apontam que a cadeia principal é constituída de carboidratos, tais como arabinogalactanas e galactomananas; e também de proteínas (NUNES; COIMBRA, 2010; MORALES; SOMOZA; FOGLIANO, 2012). Também tem sido sugerido que menos de 1% dos ácidos clorogênicos presentes no café verde são incorporados intactos à estrutura das melanoidinas durante a torração (PERRONE; FARAH; DONANGELO, 2012).

Devido à heterogeneidade dos compostos que estão ligados às melanoidinas, há várias frações com massas moleculares e composições químicas diferenciadas que podem ser isoladas (RUFÍAN-HENARES; PASTORIZA, 2015). Estudos já têm mostrado as implicações benéficas à saúde humana das melanoidinas presentes na bebida de café, destacando propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e inibição de metaloproteases como a enzima conversora de angiotensina I (ECA) (RUFIAN-HENARES; MORALES, 2007; WANG et al., 2011; VERZELLONI et al., 2011; TAGLIAZUCCHI; VERZELLONI, 2014).

3.4 BEBIDA E BORRA DE CAFÉ

A bebida de café é obtida por uma extração sólido-líquido que ocorre basicamente em duas etapas: primeiro, há a transferência dos componentes do pó de café que são solúveis na água por meio do contato entre as duas fases; e em seguida, há a separação da solução extraída da fração sólida insolúvel, que pode ser realizada por filtração, centrifugação, ou até mesmo por decantação (PETRACCO, 2001).

A borra de café é um resíduo sólido particulado obtido após as etapas de extração e filtração da bebida do café com água quente ou vapor, a partir de grãos torrados e moídos (ZUORRO; LAVECCHIA, 2012; BALLESTEROS, TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014; DURÁN et al., 2016). Dois tipos principais de borra de café podem ser distinguidos: aquelas geradas a partir da atividade industrial, como por exemplo, na fabricação de café solúvel; e também aquelas provenientes da preparação direta da bebida, em cafeterias, restaurantes e lares (CRUZ et al., 2012).

Em relação à composição química, em base seca (Tabela 2), os polissacarídeos são os componentes que estão em maior proporção. A hemicelulose é o polímero mais abundante (39,1%), e juntamente com a celulose (12,4%),

representam mais da metade do peso seco (51,5%) desse subproduto. Na estrutura da hemicelulose estão presentes manoses, galactoses, e arabinoses, que se combinam formando principalmente galactomananas e arabinogalactanas (BALESTTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014).

As borras de café apresentam um teor elevado de lipídios (13 - 20%) e um teor reduzido de cinzas em torno de 1,30%. Dentre os elementos minerais, o potássio é o que está presente em maior proporção no grão (40%) e também permanece em maior concentração no resíduo, seguido de magnésio e fósforo (BALESTTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014; CAMPOS-VEGA et al., 2015).

O teor de proteína também é significativo, sendo encontrados valores, em base seca, como 13,6% (MUSSATTO et al., 2011b), até valores como 17,4% (Tabela 2) (BALESTTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014). Durante o preparo da bebida é estimado que somente cerca de 13% da fração proteica é extraída (BEKEDAM et al., 2006), o que evidencia que a maior parte da proteína presente nos grãos torrados se concentre na borra, podendo então justificar os elevados teores encontrados.

Cafeína e ácidos clorogênicos também estão presentes em concentrações que podem variar de acordo com a espécie, cultivar e o método de preparo da bebida (Tabela 2). Como mostrado por Bravo et al. (2012), a concentração é muito menor, comparativamente àquela encontrada no grão torrado, o que indica que a maior parte destes compostos são extraídos durante o preparo da bebida.

Tabela 2 - Principais compostos presentes em borras de café, em base seca

Composto	Concentração
Carboidratos, dos quais:	51,50
Celulose (Glicose)	12,40
Hemicelulose	39,10
Arabinose	3,60
Manose	19,07
Galactose	16,43
Proteína	13,60-17,40
Lipídios	13,00-20,00
Cinzas	1,30
Ácidos clorogênicos totais	5,33-7,74
Ácido 5-cafeoilquínico	2,48-3,59
Cafeína	3,59-5,20
Minerais:	
Potássio	11,70
Magnésio	1,90
Fosforo	1,80
Enxofre	1,60
Cálcio	1,20
Alumínio	22,30
Ferro	52,00
Manganês	28,80
Cobre	18,66
Zinco	8,40

Ácidos clorogênicos totais, ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e cafeína são expressos em mg.g⁻¹. Os minerais são expressos em mg.kg⁻¹. Os teores dos demais compostos são expressos em g.100g⁻¹.

Fonte: adaptado de BRAVO et al., 2012; BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014; WANG; LIM, 2015.

Devido à popularidade do consumo da bebida, é grande o volume de subprodutos produzidos, tanto pelas indústrias de café quanto pelos lares e estabelecimentos comerciais. É estimado que cada quilograma de grãos verdes produza entre 550 g a 670 g de borra; e anualmente, esse volume de subproduto gerados pelas indústrias de café seja de cerca de 6 milhões de toneladas (JIMÉNEZ-ZAMORA; PASTORIZA; RUFÍAN-HENARES, 2015; GETACHEW; CHUN, 2017).

O descarte desse subproduto, que normalmente ocorre em aterros sanitários, tem sido visto com cautela do ponto de vista ambiental. No solo, tanto a cafeína quanto os ácidos clorogênicos são capazes de interferir no crescimento dos vegetais, reduzindo o crescimento primário, o comprimento de pelos radiculares da raiz e inibindo a germinação de sementes (JANISSEN; HUYNH, 2018). No entanto, esses compostos também apresentam alegações de benefícios a saúde humana devido à sua atividade antioxidante (CRUZ et al., 2014). Dessa forma, o reaproveitamento tem sido fomentado, e várias alternativas têm sido buscadas para reduzir o descarte.

Como os polissacarídeos representam mais de 50% do peso em base seca, as borras de café tornam-se uma interessante matéria-prima para recuperação de açúcares para indústria. Tratamentos químicos e enzimáticos têm sido estudados para obtenção de açúcares (MUSSATTO et al., 2011a; BALLESTEROS et al., 2015; WANG et al., 2016) que podem ser posteriormente biotransformados em etanol (MUSSATTO et al., 2012; BURNIOL-FIGOLS et al., 2016), bio-óleo (WANG et al., 2016) ou ingredientes funcionais para aplicação em alimentos, como é o caso da produção de mono-oligossacarídeos (CHYIANZU et al., 2014).

O teor elevado de lipídios também desperta o interesse na extração do óleo para produção de biocombustíveis. No trabalho de Vardon et al. (2013), por exemplo, tanto o óleo foi extraído para produção de biodiesel, como também a torta desengordurada resultante foi submetida à pirólise lenta para produção de bio-óleo e biocarvão; havendo portanto a utilização completa desse subproduto. Além disso, a alta capacidade calorífica ($\sim 5000 \text{ kcal.kg}^{-1}$) impulsiona a sua utilização para geração de energia como biocombustível sólido em aquecedores de pequeno porte tanto sozinho (KANG et al., 2017), como em mistura com outros materiais, como a serragem do pinho (LIMOUSY et al., 2015).

Além disso, vários estudos avaliam o uso direto na agricultura, podendo-se citar, por exemplo, a borra de café como substrato para o cultivo em estado sólido de cogumelos comestíveis (LEIFA; PANDEY; SOCCOL, 2001; MURTHY; MANONMAMI, 2008) e em mistura com terra vegetal para cultivo de alface (CRUZ et al., 2015). Santos et al. (2017) observaram uma expressiva redução nos teores de compostos fenólicos totais, taninos e relação carbono: nitrogênio; e aumento no teor de nitrogênio total de borra de café compostada em diferentes proporções (0,10, 20, 40%) com

palha de trigo e brotos de *Acacia dealbata*, o que sugere o potencial da borra de café para utilização como fertilizante.

Em relação à fração proteica, pouca informação há disponível a respeito da importância no aproveitamento. Lago, Antoniassi e Freitas (2001) realizaram caracterização físico-química de borras de café solúvel de diferentes indústrias, e encontraram que os aminoácidos predominantes foram: ácido glutâmico (0,618 a 0,987 g.100 g⁻¹) e leucina (0,484 a 0,757 g.100 g⁻¹). Valores da mesma ordem também foram encontrados para valina (0,324 a 0,488 g.100 g⁻¹) e fenilalanina (0,290 a 0,477 g.100 g⁻¹).

Campos-Vega et al. (2015) relataram que os teores médios de aminoácidos essenciais em borras de café, em base seca, tais como isoleucina (5,2%), leucina (10,8%) e valina (6,4%), são duas vezes maiores que os teores presentes na fração proteica do farelo de soja, os quais apresentaram teores médios em base seca de 2,3; 4,2 e 2,4%, para isoleucina, leucina e valina, respectivamente. Além disso, os autores estimaram uma elevada relação de Fischer (aminoácidos com cadeia lateral ramificada em relação aos aminoácidos aromáticos) para a borra de café. A relação de Fischer é um parâmetro muito utilizado para selecionar proteínas alimentares para produção de suplementos à base de hidrolisados proteicos, visando aplicações clínicas como por exemplo, os indivíduos alérgicos às proteínas do leite, e os que apresentem doenças hepáticas crônicas. Assim, os autores sugeriram que a fração proteica da borra de café poderia ser melhor investigada quanto às suas propriedades nutricionais e também à sua atividade biológica.

3.5 PROTEÍNAS DO GRÃO DE CAFÉ

Nos grãos verdes de café, as proteínas podem se encontrar compartimentalizadas em organelas denominadas corpos proteicos, abundantes no citoplasma das células vegetais; podendo também estar ligadas a arabinogalactanas na parede celular. As principais classes relatadas conforme à solubilidade compreendem as albuminas (~15%) e globulinas (~85%) (LUDWIG; RACZEK; KURROCK, 1995; MAZZAFERA; SCHIMPL; KIYOTA, 2019).

A principal proteína encontrada no grão verde de café é a globulina 11S, que representa em torno de 45% do total de proteínas presente no endosperma, o

equivalente a cerca de 5 a 7% do peso seco do grão (ACUÑA et al., 1999; HOMMA, 2001). No restante da fração proteica, também estão presentes várias enzimas, como por exemplo, aquelas responsáveis pela deterioração dos grãos de café, das quais destacam-se: a polifenoloxidase, a esterase, a isocitrato desidrogenase e a malato desidrogenase. Há também um sistema enzimático antioxidante que protege os grãos contra a ação de radicais livres, no qual estão presentes a superóxido dismutase, catalase e a peroxidase (TONIETTO et al., 2012; TAVEIRA et al., 2012). Além disso, tem-se as proteínas LEA (*late embryogenesis accumulated*), uma família de proteínas sintetizadas no fim da embriogênese, e que estão envolvidas na proteção de estruturas celulares contra danos causados pela redução nos teores de água nas sementes; tendo, dessa forma, grande importância na prevenção de danos causados às células na secagem dos grãos de café (TAVEIRA et al., 2012).

3.5.1 Proteína 11S

A proteína 11S do café é uma globulina do tipo legumina, sendo encontrada como proteína de reserva em leguminosas como a soja, o feijão-fava, o grão de bico e a ervilha; e em outros grãos de cereais como o arroz e a aveia (ROGERS et al., 1999). É sintetizada no final do desenvolvimento do grão, e o seu acúmulo no tecido do endosperma constitui fonte de nitrogênio hidrolisável durante a etapa da germinação, o que garante o desenvolvimento do embrião (KING; GIFFORD, 1997; ACUÑA et al., 1999).

Estruturalmente, é um polipeptídeo de massa molecular de 150-400 kDa, onde cada dímero (55- 60 kDa) é composto de duas subunidades: uma ácida, de 32 kDa (α); e outra básica, de 20 kDa (β), unidas por ligação dissulfeto. Devido às diferenças entre espécies de café, já foram propostos arranjos oligoméricos de 2 até 6 subunidades, não havendo uma única configuração para a sua estrutura quaternária (ROGERS et al., 1999; ACUÑA et al., 1999; BAÚ; MAZZAFERA; SANTORO, 2001). Estas proteínas apresentam elevada solubilidade em soluções salinas diluídas próximas em pH isoeletrico ($pI \sim 4,5$) da maioria das globulinas de origem vegetal; são capazes de sedimentar em gradientes de sacarose com ou sem adição de sal, e não se dissociam em ambientes de baixa força iônica, ao contrário do que ocorre com as

proteínas 11S de leguminosas como a soja (ACUÑA et al., 1999; ROGERS et al., 1999).

3.6 MUDANÇAS NA FRAÇÃO PROTEICA

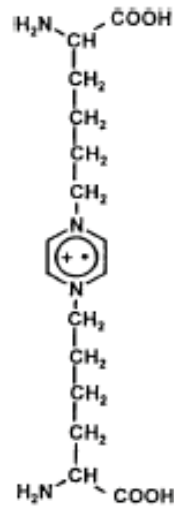
A composição química das proteínas é alterada durante o processo de torração dos grãos de café. Em termos quantitativos, há uma redução em torno de 21% do teor proteico, havendo perdas significativas de vários aminoácidos, tais como como arginina (93%), lisina (87%), serina (58%), treonina (36%), histidina (35%) e asparagina/aspartato (24%) (BEKEDAM et al., 2006).

O calor gerado no processo promove a desnaturação, com posterior fragmentação das subunidades das proteínas, seguido ou não de incorporação destas na estrutura polimérica das melanoidinas. Montavon, Mauron e Duruz (2003) verificaram, em gel de eletroforese, que no processo de torração, após 2 minutos à temperatura de 240 °C já havia sinais de polimerização da proteína 11S; porém intensa polimerização e fragmentação foram verificadas somente após cerca de 5 minutos. Como resultado, puderam ser visualizadas tanto bandas de proteína de massa molecular elevada quanto polipeptídeos de massa molecular menores do que as subunidades da globulina 11S do café verde (33 e 24 kDa), o que mostra, portanto, o envolvimento das proteínas presentes no grão de café verde na formação das melanoidinas.

Com base em reações determinadas em sistemas-modelo, sabe-se que as alterações induzidas nas proteínas pela torração provém tanto das reações de escurecimento não-enzimático, como a reação de Maillard; como também de reações autoxidativas. Na reação de Maillard, ocorre a interação direta do grupo carbonila de um açúcar redutor e um grupamento amino livre de um aminoácido, um peptídeo ou proteína, e que, após reações de condensação, formam polímeros nitrogenados escuros, as melanoidinas (HOMMA, 2001). Grupamentos ϵ -amino das cadeias laterais de proteínas ricas em arginina, lisina, histidina e asparagina; e grupos tiol e metiltiol de aminoácidos sulfurados são altamente reativos e participam de reações de escurecimento não-enzimático produzindo espécies de radicais, como o radical cátion 1,4-bis[5-amino-5-carbóxi-1-pentil]-pirazino (CROSSPY) (Figura 3), descrito por

Hofmann (1999b), e identificado na crosta de pães, e em cacau e grãos de café torrados (HOMMA, 2001).

Figura 3 - Estrutura química do radical cátion 1,4 bis [5-amino-5-carbóxi-1-pentil]-pirazino (CROSSPY).



Fonte: HOMMA, 2001

Um outro grupo de reações também responsável por alterar a fração proteica dos grãos de café são as reações autoxidativas. Essas reações ocorrem espontaneamente na presença de oxigênio, não requerem a intervenção de oxidases como a polifenoloxidase e a peroxidase, e dependem da presença de compostos com atividade redox, tais como os polifenóis e os derivados destes, os ácidos clorogênicos (MONTAVON et al., 2003).

Essas reações já se iniciam nos grãos verdes, devido à abundância de ácidos clorogênicos (cerca de 6 a 10%, b.s.), e se caracterizam pela formação de adutos entre proteínas e derivados de polifenóis oxidados, como as quinonas (MONTAVON; et al., 2003; ALI et al., 2012).

As quinonas e semiquinonas, por serem intermediários eletrofílicos reativos, são facilmente atacados por espécies nucleofílicas, tais como resíduos de lisina, metionina, cisteína e triptofano que estão ligados à molécula proteica (RAWEL; ROHN, 2010). Consequentemente, novos produtos de adição são formados, e novamente oxidados para formar novas quinonas. Na torração, devido às elevadas temperaturas, várias outras espécies reativas tais como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 e radicais hidroxil ($OH\cdot$) são formadas, o que favorece o ataque às espécies

nucleofílicas, intensificando a formação destes produtos de adição. Por meio de reações de condensação, essas estruturas vão se polimerizando e sendo incorporadas às melanoidinas (RAWEL; KROLL; HOHL, 2001; RAWEL; HOHN, 2010).

Como as melanoidinas representam um grupo heterogêneo de polímeros, dos quais podem ser isoladas várias frações contendo diferentes teores de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos ligados, e portanto, com diferentes propriedades físico-químicas; a fração proteica nos grãos torrados não apresenta uma estrutura química definida.

Devido à desnaturação e à ligação às melanoidinas, a solubilidade das proteínas é reduzida com a torração. Bekedam et al. (2006) observaram que mais da metade do total de proteína ligado a melanoidinas do café provém de frações altamente solúveis em soluções etanólicas concentradas (75-80%), o que se contrapõe ao caráter pouco solúvel geralmente demonstrado pelas albuminas e globulinas em meio etanólico. Além disso, os autores estimaram que somente 13% da fração proteica presente nos grãos torrados foi solúvel em água e capaz de ser extraída na bebida de café. Isto sugere que parte da fração proteica, após a torração, pode permanecer insolúvel e estar presente na borra de café.

De forma geral, as informações existentes sobre as mudanças das proteínas com a torração se limitam ao estudo dos impactos na qualidade sensorial da bebida, como descrito no trabalho de Hwang, Chen e Ho (2012), uma vez que as proteínas são precursoras de aminoácidos e peptídeos responsáveis pelo sabor e aroma da bebida. Mazzafera, Schimpl e Kiyota (2019) além de relatarem a escassez de estudos sobre a bioatividade das proteínas do café, também sugerem que as mudanças induzidas pela torração podem ter impacto na bioatividade dessa fração.

Vinecky (2015) já estudou peptídeos bioativos a partir do café verde e torrado, mas o foco do seu estudo foi obter sequências peptídicas com ação opioide a partir de um estudo genômico prévio acerca da expressão de proteínas desidrinas. Até o momento não há conhecimento a respeito do perfil de atividade biológica da proteína 11S do café; do impacto da torração sobre a bioatividade dessa fração; e tampouco na borra de café.

3.7 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Peptídeos com atividade biológica ou bioativos são sequências de aminoácidos encriptados na estrutura primária de uma proteína, e que, após liberação por processos proteolíticos, podem exibir além da função nutricional, diferentes funções biológicas como atividade antioxidante, antimicrobiana, imunomodulação, complexação com íons metálicos, inibição da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV), inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA), entre outras (UDENIGWE; ALUKO, 2012; CHAKHRABARTI; GUHA; MAJUMDER, 2018).

A liberação dos peptídeos da sequência da proteína pode ser realizada com enzimas proteolíticas comerciais de grau alimentício, provenientes de origem microbiana ou vegetal; com enzimas digestivas (visando simular a digestão gastrointestinal); ou por fermentação utilizando culturas starter (DALIRI; LEE; OH, 2017b). Os hidrolisados proteicos obtidos são então fracionados com base nas suas características estruturais, o que geralmente é feito por cromatografia líquida de alta eficiência. As frações separadas são testadas quanto à sua atividade biológica *in vitro*; e daquelas com maior atividade, os peptídeos são então separados e identificados (DALIRI; LEE; OH, 2017).

A ação dos peptídeos sobre moléculas-alvo e seu efeito benéfico no organismo humano dependem de características estruturais, como o comprimento da sequência peptídica; e de propriedades físico-químicas, tais como: hidrofobicidade, a presença de carga líquida na estrutura e o volume dos grupamentos presentes na cadeia lateral. Além disso, as condições de hidrólise, as etapas de purificação pós-hidrólise e o tamanho dos peptídeos obtidos também influenciam sua absorção pelos enterócitos presentes no intestino, afetando conseqüentemente, sua biodisponibilidade (UDENIGWE; ALUKO, 2012; CHAKHRABARTI; GUHA; MAJUMDER, 2018).

Diversas fontes de proteínas alimentares, tanto de origem animal como vegetal, têm sido pesquisadas para obtenção de peptídeos bioativos. Entre as fontes de proteína de origem animal utilizadas estão: as proteínas do leite, como a caseína; as proteínas do ovo; as proteínas da musculares da carne; proteínas de origem marinha em fontes como ostras, salmão, caranguejo e macroalgas. As fontes de proteínas de origem vegetal incluem as leguminosas como soja, feijão, ervilha, lentilha, grão-de-

bico; e os grãos de cereais como trigo, aveia, cânhamo, linhaça e a canola (SARMADI; ISMAIL, 2010; UDENIGWE; ALUKO, 2012), entre outras.

A complexidade das etapas envolvidas nos estudos *in vitro* tem levado à utilização de ferramentas da bioinformática como etapa prévia na prospecção de peptídeos bioativos (AGYEI; TSOPMO; UDENIGWE, 2018). Entre as ferramentas utilizadas, estão as pesquisas em bases de dados.

Por meio de estudos *in silico* é possível avaliar se uma proteína alimentar é capaz de gerar sequências peptídicas com uma determinada atividade biológica (AGYEI; TSOPMO; UDENIGWE, 2018). O BIOPEP é uma base de dados capaz de prever as sequências peptídicas com atividade biológica presentes na estrutura primária de uma proteína (MINKIEWICZ et al., 2008). Além disso, pode-se realizar uma simulação de hidrólise enzimática com até três proteases de especificidade conhecida para verificar a melhor combinação de proteases para liberar peptídeos com uma atividade requerida; qual o perfil de atividade biológica dos peptídeos liberados pela digestão gastrointestinal; e também se uma determinada sequência peptídica é capaz de resistir às condições da digestão (MINKIEWICZ et al., 2008; UDENIGWE, 2014).

Não há conhecimento sobre como o potencial bioativo da fração proteica do café pode ser alterado com a torração, e se essa bioatividade poderia também estar presente na borra de café. Logo, essas hipóteses levantadas corroboram a relevância deste estudo.

3.7.1 Peptídeos Alimentares Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)

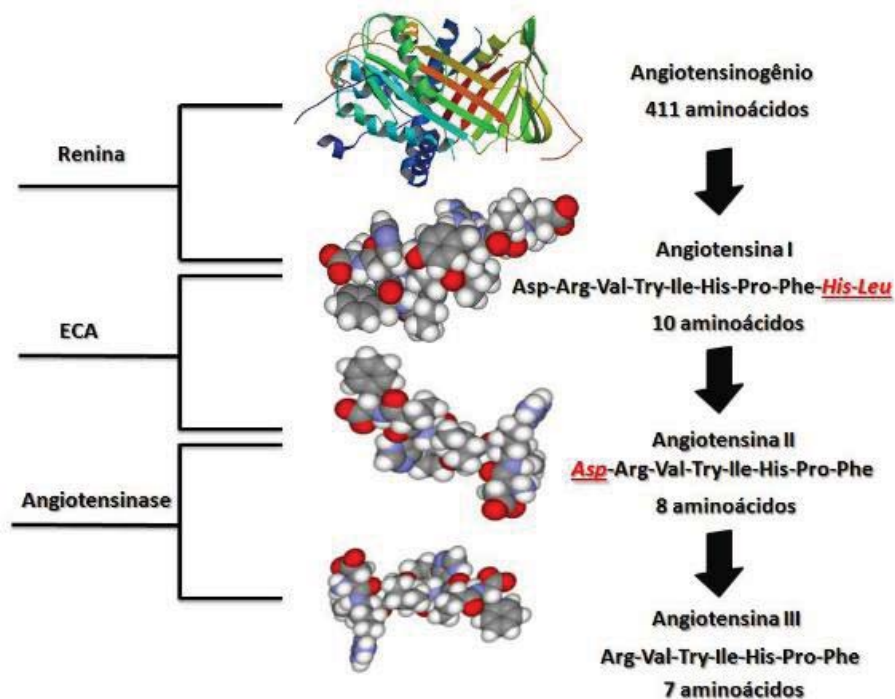
3.7.1.1 Enzima conversora de angiotensina I (ECA)

A dipeptidil carboxipeptidase (EC 3.4.15.1), comumente denominada enzima conversora de angiotensina I (ECA), é uma zinco metalopeptidase de cerca de 130 kDa, que pode atuar tanto como uma dipeptidil peptidase, removendo dipeptídeos na extremidade C-terminal do substrato; e também como uma endopeptidase em substratos que apresentam grupamentos amida em C-terminal (TSCHÖPE; SCHULTEISS; WALTER, 2002; NI et al., 2012).

Nos sistemas bioquímicos humanos de regulação cardiovascular, como o sistema renina-angiotensina (RAS), a ECA é um elemento crucial, pois catalisa a clivagem do dipeptídeo HL na extremidade C-terminal do decapeptídeo inativo angiotensina I (NRVWIHPFHL), convertendo-o ao octapeptídeo angiotensina II (NRVWIHPF) (Figura 4) (CRUZ, 2014). Sendo transportado via corrente sanguínea para órgãos como rins e as glândulas suprarrenais, a angiotensina II estimula a síntese de aldosterona, um esteroide capaz de aumentar a retenção de sal e diminuir a excreção de água pelos rins, elevando a pressão arterial, conduzindo a um quadro clínico de hipertensão (LI et al., 2004; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; SILVA, 2013; CRUZ, 2014).

A ECA também inativa a bradicinina, um nonapeptídeo com ação hipotensora; e é responsável pela degradação de neuropeptídeos como encefalinas, neurotensinas e da substância P, que pode interagir com o sistema cardiovascular (Li et al., 2004; PAN et al., 2011; CRUZ, 2014; LI; YU, 2015).

Figura 4 - Esquema de funcionamento do sistema renina-angiotensina.



Após a liberação da enzima renina pelos rins na corrente sanguínea, a proteína angiotensinogênio é convertida à angiotensina I. Ao passar pelos vasos pulmonares, angiotensina I é convertida ao octapeptídeo angiotensina II mediante hidrólise catalisada pela ECA, provocando a vasoconstrição.

3.7.1.2. Mecanismo de ação de peptídeos inibidores da ECA

A atividade de inibição dos peptídeos depende de características físico-químicas como o tamanho e a distribuição dos resíduos de aminoácidos na sequência peptídica (LI et al., 2004; LI; YU, 2015). O tamanho determina a eficiência da interação com o sítio catalítico da enzima, sendo que tripeptídeos conseguem interagir com os três subsítios (S1, S1' e S2') do sítio ativo da enzima, e também com o íon Zn^{2+} ; garantindo uma melhor estabilização via ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, e conseqüentemente a eficiência na competição pela ligação ao substrato é maior (LI et al., 2004).

A sequência dos resíduos de aminoácidos que compõem as últimas três posições da extremidade C-terminal do peptídeo também determina a atividade de inibição da ECA. Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, aromáticos ou de cadeia lateral ramificada, apresentam maior afinidade com a enzima, sendo que prolina, alanina, valina e leucina têm preferência pela ligação ao subsítio S1; isoleucina interage bem com o subsítio S1'; e prolina e leucina no último subsítio (S2'). (LI et al., 2004; JAO et al., 2012 *apud* CRUZ, 2014).

3.7.1.3 Peptídeos bioativos em proteínas alimentares

O uso de inibidores sintéticos da enzima conversora de angiotensina, tais como captopril, enalapril e o lisinopril constitui ainda a principal forma de tratamento terapêutico em casos de hipertensão. Contudo, algumas drogas podem exibir alguns efeitos adversos durante o tratamento tais como tosse seca, erupções cutâneas e alterações no paladar (CHEN et al., 2009).

Diante disso, a prospecção de novas fontes de inibidores da ECA tem dado grandes passos. Proteínas alimentares que são fonte de peptídeos (Tabela 3) inibidoras da ECA, tanto de origem animal como vegetal também têm sido identificadas como promissores inibidores, alternativas aos inibidores sintéticos, com variáveis potenciais bioativos (BOUGATEF et al., 2010; JIMSHEENA; GOWDA, 2011).

Além das características já mencionadas acima relacionadas à inibição da enzima, a inibição da ECA é dose-dependente, sendo comumente quantificada em

como IC₅₀ (concentração necessária do peptídeo para inibir a atividade enzimática em 50%). Vários valores de IC₅₀ para inibição da ECA para proteínas de origem alimentar têm sido reportados por estudos recentes (Tabela 3).

Não há estudos reportados na literatura que abordem a investigação de peptídeos inibidores da ECA em café, no entanto, vários outros estudos sobre o tema têm sido conduzidos em proteínas de origem vegetal.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ (μmol.L⁻¹) para peptídeos obtidos de proteínas alimentares em comparação a peptídeos sintéticos comerciais utilizados para inibição da ECA.

Proteína	Fonte	Peptídeo(s)	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)	Referência*
<u>caseínas</u>				
α-s1	leite bovino	RYLGY	0,71	Contreras et. al., (2013)
		AYFYPE	261	
k f(56-66)	leite de cabra	ARHPHPLSFM	4,27	Ibrahim; Ahmed; Miyata (2017)
β f(96-106)		QSLVYPFTGPI		
<u>soro</u>				
β-lactoglobulina f(113-122)	leite de cabra	PEQSLACQCL	4,45	Ibrahim; Ahmed; Miyata (2017)
isolado proteico fermentado (<i>Lactobacillus casei</i> spp. <i>Pseudoplatantum</i>)	soja	LIVTQ	0,087	Vallabha; Tiku (2014)
		LIVT	0,110	
isolado proteico	cupuaçu	LDNK	131	Cruz et al., (2016)
		FLEK	79,5	
		MEKHS	63	
		MVVDKLF	59,3	
		GSGKHVSP	3,1	
isolado proteico	semente de tomate fermentada (<i>Bacillus subtilis</i> A14h)	DGVVYY	2,0	Moayed et al., (2018)
--	sintético	captopril	0,041	Megias et al., (2004)

Fonte: *compilado de vários estudos.

Jimsheena e Gowda (2011) após isolamento e identificação de três peptídeos da proteína araquina do amendoim, verificaram que a maior atividade inibitória da ECA apresentada pelo pentapeptídeo NAQRP (IC₅₀ 32±2μmol.L⁻¹) era favorecida pela presença do resíduo de prolina em C-terminal, que se mostrou resistente à digestão

gastrointestinal simulada, melhorando a biodisponibilidade, bem como pelo pequeno comprimento da cadeia peptídica, que facilita a interação com o sítio ativo.

Connolly et al. (2015) identificaram 34 peptídeos de hidrolisados proteicos obtidos a partir do subproduto do mosto cervejeiro com várias enzimas comerciais tais como Alcalase, Corolase PP, Flavourzyme e Promod 144 MG. Os peptídeos IVY e ILDL, que são provenientes da eluição de frações mais hidrofóbicas, em RP-HPLC com acetonitrila, também apresentaram as maiores eficiências de inibição da ECA ($IC_{50} = 80,4$ e $96,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Pokora et al. (2017) observaram que a hidrólise das proteínas da clara do ovo com uma serina protease proveniente da levedura *Yarrowia lipolytica* foi capaz de liberar peptídeos com elevada inibição da ECA. Várias sequências peptídicas identificadas tais como VGS, GV, RFDKLPFGDSIEAQ, KMKILELPFASGTM, LELPAFASGTM e YQIGLFRVASMASEKM apresentaram elevadas eficiências de inibição da ECA (IC_{50} variando de 50 a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e também são provenientes da proteína ovoalbumina.

3.7.2 Peptídeos Alimentares com Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante de peptídeos vem sendo amplamente estudada no intuito de elucidar os efeitos na saúde humana, avaliando-se a capacidade antioxidante diretamente nos hidrolisados proteicos, bem como nos peptídeos purificados (SARMADI; ISMAIL, 2010).

3.7.2.1 Mecanismo

Os peptídeos podem desempenhar a atividade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica, sequestro de radicais livres e/ou quelação de íons metálicos; não havendo, necessariamente, um único mecanismo para sua atuação (DALIRI; LEE; OH, 2017; LORENZO et al., 2018). No entanto, sabe-se que as propriedades antioxidantes dos peptídeos estão relacionadas tanto com as suas características estruturais; como também às condições de sua obtenção, das quais pode-se citar: o tipo de protease utilizada para hidrólise, a fonte de proteína e a influência de tratamentos antes da hidrólise (KARAMI; ABGARI-ADERGNANI, 2019).

Várias características estruturais podem influenciar a atividade antioxidante dos peptídeos. Resíduos de aminoácidos aromáticos tais como fenilalanina, tirosina e triptofano podem atuar na quelação de íons metálicos pro-oxidantes, e no sequestro de radicais livres (KARAMI; ABGARI-ADERGNANI, 2019). Outros resíduos de aminoácidos tais como lisina, metionina e cisteína também tiveram atividade relatada por outros autores (CUMBY et al., 2008; MUNDI; ALUKO, 2014; KARAMI; ABGARI-ADERGNANI, 2019).

A distribuição dos resíduos de aminoácidos na cadeia peptídica e a configuração estrutural também são importantes na determinação da atividade antioxidante. De acordo com Chen et al. (1996), a presença de dois resíduos de histidina em C-terminal foi determinante para verificar atividade antioxidante no pentapeptídeo LLPHH obtido após hidrólise da conglucina da soja. A remoção de um resíduo de histidina, provocou redução significativa da atividade antioxidante do peptídeo. Os mesmos autores também verificaram que a substituição de L-histidina por D-histidina prejudicou o adequado posicionamento do grupo imidazol na quelação de íons metálicos, o que diminuiu, desta forma, a atividade antioxidante.

Um outro fator que influencia a atividade antioxidante, e que está estritamente relacionado à biodisponibilidade, é o tamanho da cadeia peptídica. É reportado que sequências peptídicas curtas, contendo geralmente entre 2 a 6 resíduos de aminoácidos são absorvidos mais facilmente pelo intestino do que proteínas (SARMADI; ISMAIL, 2010). Conforme a massa molecular do peptídeo aumenta, a chance de superar a barreira intestinal diminui; o que de certa forma, pode estar associado à dificuldade de permear o espaço intersticial na entrada do sistema linfático intestinal, e isto pode comprometer o seu efeito biológico (FITZGERALD; MEISEL, 2000; ALTMANN et al., 2016).

3.7.2.2 Peptídeos bioativos em proteínas alimentares

Proteínas de várias matrizes alimentares, tanto de origem animal como vegetal, têm sido utilizadas como fonte de peptídeos antioxidantes. A seguir, são descritos alguns estudos recentes.

Rocha et al. (2015) ao avaliarem o efeito combinado de germinação (0; 24; 48 e 72 h) e hidrólise por alcalase (0,1, 2, 3 e 4 h) das proteínas do feijão comum sobre

a geração de peptídeos bioativos, verificaram que germinação por 48 h e tempo de hidrólise por alcalase de 1 h foi capaz de gerar peptídeos com elevadas atividades antioxidante e de inibição da DPP-IV; sendo que o peptídeo RGPLVNPDPKPFL também é capaz de interagir diretamente com o sítio ativo da enzima DPP-IV.

Saew-Law et al. (2016) identificaram quatro peptídeos com expressiva atividade antioxidante frente ao radical ABTS⁺ (GLFGPR, GATGPQGPLGR, VLGPF e QLGPLGPV) após etapas de purificação de um hidrolisado de gelatina da pele de robalo (*Lates calcarifer*), sendo o peptídeo GLFGPR o que apresentou maior atividade antioxidante após etapa de síntese. Tanto a hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos (G, L, A, F, P, V) como a presença de arginina no resíduo C-terminal podem ter favorecido a atividade de sequestro do radical livre testado.

Shazly et al. (2017) após purificarem hidrolisados de caseína de leite bovino e de búfala obtidos com alcalase e também com tripsina, verificaram maiores valores de atividade antioxidante para frações ultrafiltradas menores que 1 kDa da caseína de búfala hidrolisada com alcalase. No entanto, os dois hidrolisados obtidos a partir da caseína do leite de búfala geraram sequências peptídicas não relatadas na literatura e com elevada atividade antioxidante (RELEE, MEDNKQ, TVA e EQL).

Montone et al. (2018) identificaram cerca de 500 sequências peptídicas em um hidrolisado proteico da microalga *Tetrademus obliquus*, após a etapa de fracionamento em RP-LC e RP-nanoLC-MS/MS. Por meio de estudo *in silico* na base de dados PeptideRanker[®] conseguiram verificar que quatro sequências peptídicas (WPRGYFL, GPDRPKFLGPF, WYGPDRPKFL e SDWDRF) tinham maior probabilidade de apresentarem a maior atividade antioxidante, e portanto, eram as mais aptas para serem sintetizadas e ter a sua bioatividade testada *in vitro*.

4 REFERÊNCIAS

ACUÑA, R; BASSÜNER, R; BEILINSONC, V.; CORTINA, H.; CADENA-GÓMEZ, G.; MONTES, V.; NIELSEN, N.C. Coffee seeds contain 11S storage proteins. **Physiologia plantarum**, Sweden, v.105, p.122–131, 1999.

AGYEI, D.; TSOPMO, A.; UDENIGWE, C. C. Bioinformatics and peptidomics approaches to the discovery and analysis of food-derived bioactive peptides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.410, p.3463–3472, 2018.

ALESSANDRINI, L; ROMANI, S; PINNAVAIA, G; DALLA ROSA, M. Near infrared spectroscopy: An analytical tool to predict coffee roasting degree. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdã, v.625, n.1, p 95-102, 2008.

ALI, M.; HOMANN, T.; KREISEL, J.; KHALIL, M.; PUHLMANN, R.; KREISEL, H.-P.; RAWEL, H. Characterization and modeling of the interactions between coffee storage proteins and phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, p.11601–11608, 2012.

ALTMANN, K.; WUTKOWSKI, A.; KLEMP, M.; CLAWIN-RÄDECKER, I.; MEISEL, H.; LORENZEN, P. C. Generation and identification of anti-inflammatory peptides from bovine β -casein using enzyme preparations from cod and hog. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.96, n.3, p.868–877, 2015.

ASHIHARA, H.; LUDWIG, J.A.; KATAHIRA, R.; YOKOTA, T.; FUJIMURA, T.; CROZIER, A. Trigonelline and related nicotinic acid metabolites: occurrence, biosynthesis, taxonomic considerations, and their roles in planta and in human health. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v.14, n.5, p. 765-798, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC). Indicadores da indústria do café (2018). Disponível em: < <http://http://abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2018/>>. Acesso em: 05 abr.2019

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC). Produção agrícola. Disponível em: < <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=48#6090>> Acesso em: 10 abr.2019

BAÚ, S.M.T.; MAZZAFERA, P.; SANTORO, L.G. Seed storage proteins in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.13, n.1, p.33-40, 2001.

BALLESTEROS, L.F.; TEIXEIRA, J.A.; MUSSATTO, S.I. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. **Food Bioprocess and Technology**, Nova York, v.7, p.3493–3503, 2014.

BALLESTEROS, L.F.; CERQUEIRA, M.A.; TEIXEIRA, J.A.; MUSSATTO, S.I. Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v.127, p.347-354, 2015.

BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v.53, n.5, p.646-656, 2009.

BERTONE, E.; VENTURELLO, A.; GIRAUDDO, A.; PELLEGRINO, G.; GEOBALDO, F. Simultaneous determination by NIR spectroscopy of the roasting degree and Arabica/Robusta ratio in roasted and ground coffee. **Food Control**, Vurrey, v.59, p.683–689, 2016.

BEKEDAM, E. K.; SCHOLS, H. A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S; SMIT, G. High molecular weight melanoidins from coffee brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, n.20, p. 7658-7666, 2006.

BEKEDAM, E. K.; SCHOLS, H. A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S; SMIT, G. Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, n.13, p. 2055–2063, 2008.

BERTRAND, B.; GUYOT, B.; ANTHONY, F.; LAHERMES, P. Impact of the *coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 107, p. 387-394, 2003.

BIDEL, S.; TUOMILEHTO, J. The emerging health benefits of coffee with an emphasis on type 2 diabetes and cardiovascular disease. **European Endocrinology**, v.9, n.2, p.99-107, 2013.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, Barking, v. 118, n.3, p.559–565, 2010.

BRADBURY, A.G.W. Chemistry I: Non-volatile compounds – Carbohydrates. *In*: CLARKE, R.J.; VITZHUM, O.G. **Coffee: recent developments**. Blackwell Science: Londres, 2001, 266p.

BRAVO, J.; JUÁNIZ, I.; MONENTE, C.; CAEMMERER, B.; KROH, L.W.; PEÑA, M.P.D.; CID, C. Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, p.12565-12573, 2012

BURNIOL-FIGOLS, A.; CENIAN, K.; SKIADAS, I.V.; GAVALA, H.N. Integration of chlorogenic acid recovery and bioethanol production from spent coffee grounds. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 116, p. 54-64, 2016.

CAMPOS-VEGA, R.; LOARCA-PIÑA, G.; VERGARA-CASTAÑEDA, H.A.; OOMAH, B.D. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.45, p.24-36, 2015.

CAPRIOLI, G.; CORTESE, M.; MAGGI, F.; MINNETTI, C.; ODELLO, L.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S. Quantification of caffeine, trigonelline and nicotinic acid in espresso coffee: the influence of espresso machines and coffee cultivars. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v.65, n.4, p.465–469, 2014.

CAPORASO, N.; WHITWORTH, M.B.; CUIC, C.; FISKA, I.D. Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. **Food Research International**, Essex, v.108, p.628–640, 2014.

CHAKRABARTI, S.; GUHA, S.; MAJUMDER, K. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities, **Nutrients**, Basel, v.10, n.11, p.1738–1754, 2018.

CHEN, H.M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, p.2619–2623, 1996.

CHEN, Z. Y.; PENG, C.; JIAO, R.; WONG, Y. M.; YANG, N.; HUANG, Y. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.57, p.4485–4499, 2009.

CHEUNG, I.W.; NAKAYAMA, S.; HSU, M.N.; SAMARANAYAKA, A.G.; LI-CHAN, E.C. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by *in silico* and *in vitro* analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.57, p.9234–9242, 2009.

CHIYANZU, I.; BRIENZO, M.; GARCÍA-APARICIO, M. P.; GÖRGENS, J. F. Application of endo- β -1,4-D-mannanase and cellulase for the release of mannoooligosaccharides from steam-pretreated spent coffee ground. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.172, n.7, p.3538–3557, 2014.

CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; SURUCU, B.; KUHNERT, N. Characterization by LC-MS/MS of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, p.1957–1969, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. Quarto levantamento. Brasília, v.3., n.4, p.1-177, dez.2018.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. Segundo levantamento. Brasília, v.5., n.2, p.1-61, mai.2019.

CONNOLLY, A.; O'KEEFFE, M.B.; NONGONIERMA, A.B.; PIGGOTT, C.O.; FITZGERALD, R.J. Generation and identification of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a novel brewer's spent grain protein isolate. **Food Chemistry**, Barking, v.76, p.64–71, 2015.

CONTRERAS, M.M.; SANCHEZ, D.; SEVILLA, M.A.; RECIO, I.; AMIGO, L. Resistance of casein-derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, Barking, v.32, n.2, 71-78, 2013.

CRUZ, J.N. **Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de inibidores da enzima conversora de angiotensina** (Tese). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014.

CRUZ, J.N.; PIMENTA, D.C.; MELO, R.L.; NASCIMENTO, J.R.O. Isolation and biochemical characterisation of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived of the enzymatic hydrolysis of cupuassu seed protein isolate. **Journal of Functional Foods**, Amsterdã, v.27, p.104-114, 2016.

CRUZ, R.; CARDOSO, M. M.; FERNANDES, L.; OLIVEIRA, M.; MENDES, E.; BAPTISTA, P. Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, n.32, p.7777-7784, 2012.

CRUZ, R.; GOMES, T.; FERREIRA, A.; MENDES, E.; BAPTISTA, P.; CUNHA, S.; PEREIRA, J.A.; RAMALHOSA, E.; CASAL, S. **Food Chemistry**, Barking, v.145, p.95–101, 2014.

CRUZ, R.; MENDES, E.; TORRINHA, A.; MORAIS, S.; PEREIRA, J.A.; BAPTISTA, P.; CASAL, S. Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach. **Food Research International**, Essex, v.73, p.190–196, 2015.

CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, Barking, v.109, p.144–148, 2008.

DALIRI, E.B-M.; LEE, D.H.; OH, B.H. Current trends and perspectives of bioactive peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, p.1-12, 2017.

DA MATTA, F.; RAMALHO, J.D.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.18, n.1, p.55–81, 2006.

DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Química Nova**, São Paulo, v.9, n.1, p.107-134, 2016.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.18, n.1, p.23-36, 2006.

FARAH, A.; LIMA, J. P. Consumption of chlorogenic acids through coffee and health implications. **Beverages**, v.5, n.11, p.1-29, 2019.

FARAH, A.; SANTOS, T.F. The plant coffee and beans: an introduction. *In*: PREDDY, V. **Coffee in health and disease prevention**. Londres: Academic Press, 2015.

FITZGERALD, R.J.; MEISEL, H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. **Brazilian Journal of Nutrition**, Porto Alegre, v. 84, S33–7, 2000.

GETACHEW, A. T.; CHUN, B. S. Influence of pretreatment and modifiers on subcritical water liquefaction of spent coffee grounds: A green waste valorization approach. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v.142, p.3719–3727, 2017.

GOULART, P.F.P.; ALVES, J.D.; CASTRO, E.M.; FRIES, D.D.; MAGALHÃES, M.M.; MELO, H.C. Aspectos histoquímicos e morfológicos de grãos de café de diferentes qualidades. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.662-666, 2007.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M.M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdã, v.165, p.23–35, 2011.

HOMMA, S. Chemistry II: Non-volatile compounds, Part II. *In*: CLARKE, R.J.; VITZHUM, O.G. **Coffee: recent developments**. Blackwell Science: Londres, 2001, 266p.

HWANG, C.-F.; CHEN, C.-C; HO, C.-T. Contribution of coffee proteins to roasted coffee volatiles in a model system. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.47, p.2117-2126, 2012.

IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná). Café IAPAR 59. Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/Cafe_IAPAR59.pdf> Acesso em: 08 e 09 mar.2019.

IBRAHIM, H.R.; AHMED, A.S.; MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v.8, n.1, p.63-71, 2017.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. World Coffee Consumption. (ICO, 2018a). Disponível em: <http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf>>. Acesso em 05 e 06 ago.2019.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Exportable production by all exporting countries. (ICO, 2018b). Disponível em: <<http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1c-exportable-production.pdf>>. Acesso em 05 ago. 2019.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION Coffee Market Report (July 2019). (ICO, 2019). Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-0719-e.pdf>>. Acesso em 05 ago. 2019.

JANISSEN, B.; HUYNH, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry byproducts: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdã, v. 128, p.110–117, 2018.

JAO, C.L.; HUANG, S.L.; HSU, K.C. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Inhibition mode, bioavailability, and antihypertensive effects. **Biomedicine**, Paris, v.2, n.4, p.130-136, 2012.

JIMENEZ-ZAMORA, A.; PASTORIZA, S.; RUFIAN-HENARES, J.A. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. **LWT – Food Science and Technology**, Londres, v.61, p12-18, 2015.

JIMSHEENA, V.K.; GOWDA, L.R. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion. **Food Chemistry**, Barking, v.125, p.561-569, 2011.

KARAMI, Z.; AKBARI-ADERGANI, B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, Karnataka, 2019.

KANG, S.B.; OH, H.Y.; KIM, J.J.; CHOI, K.S. Characteristics of spent coffee ground as a fuel and combustion test in a small boiler (6.5 kW) **Renewable Energy**, Oxford, v.113, p.1208-1214, 2017.

KING, J.E.; GIFFORD, D.J. Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth. **Plant Physiology**, Lancaster, v.113, p.1125–1135, 1997.

KITZERBERGER, C.S.G.; SCHOLZ, M.B.S.; PEREIRA, L.F.P.; BENASSI, M.T. Composição química de cafés arábica de cultivares tradicionais e modernas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.1, p. 1498-1506, 2013

KITZBERBER, C.S.G.; SCHOLZ, M.B.S.; BENASSI, M.T. 2014. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. **Food Research International**, Essex, v.61. p. 61-66, 2014.

LAGO, R. C. A.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C. Centesimal composition and amino acids of raw, roasted and spent ground of soluble coffee. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil: Vitoria, ES. Resumos (pp. 104), 2001

LAGOS, J. B.; VARGAS, F.C.; DE OLIVEIRA, T. G.; DA APARECIDA MAKISHI, G. L.; DO AMARAL SOBRAL, P. J. Recent patents on the application of bioactive compounds in food: a short review. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 1-7, 2015.

LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Production of *Flammulina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.44, p. 205–212, 2001

LI, G.H.; LE, G.W.; SHI, Y.H.; SHRESTHA, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from proteins and their physiological and pharmacological effects. **Nutrition Research**, Nova York, v.24, p.469-486, 2004.

LI, Y.; YU, J. Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v.18, n.2, p.147–156, 2015.

LIMOUSY, L.; JEGUIRIM, M.; LABBE, S.; BALAY, F.; FOSSARD, E. Performance and emissions characteristics of compressed spent coffee ground/wood chip logs in a residential stove. **Energy for Sustainable Development**, India, v.28, p.52–59, 2015.

LORENZO, J.M.; MUNEKATA, P.E.S.; GÓMEZ, B.; BARBA, F.J.; MORAD, L.; PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA, C.; TOLDRÁD, F. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.79, p.136-147, 2018

LUDWIG, E.; RACZEK, N.N.; KURROCK, T. Contribution to composition and reactivity of coffee protein. **Proceedings of the XVI International Scientific Colloquium on Coffee**: Kyoto, p. 359-365, 1995.

MAZZAFERA, P.; SCHIMPL, F.; KIYOTA, E. Proteins of coffee beans: recent advances. In: FARAH, A. **Coffee: Production, Quality and Chemistry**, Londres: Royal Society of Chemistry, 2019, 836p.

MEGÍAS, C.; YUST, M.M; PEDROCHE, J.; LQUARI, H; GIRÓN-CALLE, J.G.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, p.1928-1932, 2004.

MELO, W. L. B. A importância da informação sobre do grau de torra do café e sua influência nas características organolépticas da bebida. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpdia.embrapa.br/publicacoes>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2017.

MENDONÇA, L.M.V.L.; PEREIRA, R.G.F.A.; MENDES, A.N.G.; BORÉM, F.M.; MARQUES, E.R. Composição química de grãos crus de cultivares de *Coffea arabica* L. suscetíveis e resistentes à *Hemileia vastatrix* Berg et Br. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, p.413-419, 2007.

MINKIEWICZ P.; DZIUBA J.; IWANIAK A.; DZIUBA M.; DAREWICZ, M. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.91, p. 965-980, 2008.

MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F.; TOKUDA, E.K.; L PARIZZI, L.P.; COSTA, G.G.L.; PEREIRA, L.F.P.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G; for Brazilian Coffee Genome Project Consortium. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, Londres, v.11, n.30, p.2-22, 2011.

MONTOYA-RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ-FAVELA, M.; REYES-MORENO, C.; MILÁN-CARRILLO, J.; MEJÍA, E.G. Identification of bioactive peptide sequences from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v.14, p.139-158, 2015.

MONTAVON P.; DURUZ, E.; RUMO, G.; PRATZ, G. Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.8, p.2328–2334, 2003.

MONTAVON P; MAURON, A.F.; DURUZ, E. Changes in green coffee protein profiles during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.8, p.2335–2343, 2003.

MONTONE, C.M.; CAPRIOTTI, A.L.; CAVALIERI, C.; LA BARBERA, G.; PIOVESANA, S.; CHIOZZI, R.Z.; LAGANÀ, A. peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetrademus obliquus* microalgae. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.410, n.15, p.3573-3586, 2018.

MORALES, F.J.; SOMOZA, V.; FOGLIANO, V. Physiological relevance of dietary melanoidins. **Amino acids**, Wien, v.42, p.1097–1109, 2012

MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M.; ANJOS, V. D. A.; MORI, E. E. M.; MATTOSO, L. H. C.; FIRMINO, A. NASCIMENTO, C. J. F. Influência dos parâmetros de torração nas características físicas, químicas e sensoriais do café arábica puro. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.10, n.1, p.17-25, 2007.

MOAYEDI, A.; MORA, L.; ARISTOY, M.C.; MOHAMMAD SAFARI, M.; HASHEMIE, M.; TOLDRÁ, F. Peptidomic analysis of antioxidant and ACE-inhibitory peptides obtained from tomato waste proteins fermented using *Bacillus subtilis*. **Food Chemistry**, Barking, v.250, p.180–187, 2018.

MUNDI, S.; ALUKO, R.E. Inhibitory properties of kidney bean protein hydrolysate and its membrane fractions against renin, angiotensin converting enzyme, and free radicals. **Austin Journal of Nutrition and Food Sciences**, Jersey City, v.2, p.1–11, 2014.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, Londres, v.66, p. 45-58, 2012.

MURTHY, P.; MANONMANI, H. Bioconversion of coffee industry wastes with white rot fungus *Pleurotus florida*. **Research Journal of Environmental Sciences**, Pequim, v.2, n.2, p.145–150, 2008.

MUSSATTO, S.I; CARNEIRO, L.M.; SILVA, J.P.A.; ROBERTO, I.C; TEIXEIRA, J.A. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 83, p. 368–74, 2011a.

MUSSATTO, S.I; MACHADO, E.M.S.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J.A. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, Nova York, v.4, p. 661–72, 2011b.

MUSSATTO, S.I.; MACHADO, E.M.S.; CARNEIRO, L.M.; TEIXEIRA, J.A. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. **Applied Energy**, Oxford, v.92, p. 763–768, 2012.

NAKILCIOĞLU-TAŞ, E.; ÖTLEŞ, S. Physical characterization of Arabica ground coffee with different roasting degrees. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.91, n.2, p. 1-15, 2019.

NI, H.; LI, L.; LIU, G.; HU, S.Q. Inhibition mechanism and model of an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory hexapeptide from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Plos one**, São Francisco, v.7, n.15, 2012.

NONGONIERMA, A.B.; FITZGERALD, R.J. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. **Journal of Functional Foods**, Amsterdã, v.17, p. 640–656, 2015.

NUNES; F.M.; COIMBRA, M. A.; DUARTE, A. C.; DELGADILLO, I. Foamability, foam stability, and chemical composition of espresso coffee as affected by the degree of roast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, n.8, p.3238–3243, 1997.

NUNES, F.M.; COIMBRA, M.A. Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. **Phytochemistry Reviews**, Heidelberg, v.9, p.171–185, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Noncommunicable diseases. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 01.jul.2019.

ORMOND, J.G.P.; PAULA, S.R.L.; FILHO, P.F. **Café: (Re)conquista dos mercados**. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, 1999. 56p.

PACETTI, D.; LUCCI, P.; FREGA, N. G. Unsaponifiable matter of coffee. *In*: PREDDY, V. Coffee in health and disease prevention. Londres: Academic Press, 2015.

PAN, D.; GUO, H.; ZHAO, B.; CAO, J. The molecular mechanisms of interactions between peptides and angiotensin-converting enzyme. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.21, p.3898-3904, 2011.

PATIL, B.S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; MURTHY, K.N. C.; VIKRAM, A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p.8142–8160, 2009.

PAUL, M.; MEHR, A. P.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 86, n. 3, p. 747-803, 2006.

PENDERGRAST, MARK. Coffee second only to oil? Is coffee really the second largest commodity? Mark Pendergrast investigates and finds some startling results. The Free Library (1 Abril, 2009). Disponível em: [https://www.thefreelibrary.com/Coffee second only to oil? Is coffee really the second largest...-a0198849799](https://www.thefreelibrary.com/Coffee+second+only+to+oil+Is+coffee+really+the+second+largest...-a0198849799). Acesso em: 04 e 05. jul.2019.

PERRONE, D.; DONANGELO, R.; DONANGELO, C.M.; FARAH, A. Modeling weight loss and chlorogenic acids content in coffee during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 12238-12243, 2010

PERRONE, D.; DONANGELO, C.M.; FARAH, A. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 4265-4275, 2012.

PETRACCO, M. Technology IV: Beverage preparation: brewing trends for the millennium. *In*: CLARKE, R.J.; VITZHUM, O.G. **Coffee: recent developments**. Blackwell Science: Londres, 2001, 266p.

PIMENTA, C.J. **Qualidade do café**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003, 304p.

POKORA, M.; ZAMBROWICZ, A.; ZABŁOCKA, A.; DĄBROWSKA, A.; SZOŁTYSI, M.; BABIĆ, K.; ECKERT, E.; TRZISZKA, T.; CHRZANOWSKA, J. The use of serine protease from *Yarrowia lipolytica* yeast in the production of biopeptides from denatured egg white proteins. **Acta Biochimica Polonica**, Varsóvia, v.64, n.2, p.245-253, 2017.

RAWEL, H. M.; KROLL, J.; HOHL, U. C. Model studies on the reactions of plant phenols with whey proteins. **Nahrung/Food**, Nova Jersey, v.45, p.72-81, 2001

RAWEL, H.M.; HOHN, S. Nature of hydroxycinnamate-protein interactions. **Phytochemistry Reviews**, Heidelberg, v.9, p.93-109, 2010.

RECHARLA, N.; RIAZ, M.; KO, S.; PARK, S. Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v.39, p.63-73, 2017.

ROCHA, T.S.; HERNANDEZ, L.M.R.; MOJICA, L.; JOHNSON, M.H.; CHANG, Y.K.; MEJÍA, E.G. Germination of *Phaseolus vulgaris* and alcalase hydrolysis of its proteins produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2 diabetes *in vitro*. **Food Research International**, Essex, v.76, p.150-159, 2015.

RODARTE, M. **Análise sensorial, química e perfil de constituintes voláteis de cafés especiais**. 147p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008

ROGERS, W. J.; BÉZARD, G.; DESHAYES, A.; MEYER, I.; PÉTIARD, V.; MARRACCINI, P. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.37, n.4, p.261-272, 1999.

ROSA, J.S.; SILVA, O.F.; GODOY, R.L.O.; REZENDE, C.M. Roasting Effects on Nutritional and Antinutritional Compounds in Coffee. *In*: JAISWAL, A. K. (Ed.). **Food processing technologies: impact on product attributes**. Boca Raton: CRC Press, 2016, cap. 4, p. 47-76.

RUFÍAN-HENARES, J.A.; MORALES, F. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.55, p.1480-1485, 2007.

RUFÍAN-HENARES, J.A.; PASTORIZA, S. Biological effects of coffee melanoidins. *In*: PREDDY, V. **Coffee in health and disease prevention**. Londres: Academic Press, 2015.

SAE-LEAW, T.; KARNJANAPRATUM, S.; O'CALLAGHAN, Y.C.; O'KEEFFE, M.B.; FITZGERALD, R.J.; O'BRIEN, N.M.; BENJAKUL, S. Purification and identification of antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of seabass skin. **Journal of Biochemistry**, Toquio, v.41, n.3, p.1-11, 2016.

SANCHÉZ, A.; VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: a review. **Food Quality and Safety**, Oxford, v.1, p.29-46, 2017.

SANTOS, C.; FONSECA, J.; AIRES, A.; COUTINHO, J.; TRINDADE, H. Effect of different rates of spent coffee grounds (SCG) on composting process, gaseous emissions and quality of end-product. **Waste Management**, Oxford, v.59, p.37-47, 2017.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, Nova York, v.31, n.10, p.1949–1956, 2010.

SCHENKER, S.; HANSCHIN, S.; FREY, B.; PERREN, B.; ESCHER, F. Pore structure of coffee beans affected by roasting conditions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.3, p.452-457, 2000.

SCHMIT, S. L.; RENNERT, H. S.; RENNERT, G.; GRUBER, S. B. Coffee Consumption and the Risk of Colorectal Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Filadelfia, v.25, n.4, p.634–639, 2016.

SHAZLY, A.B.; HE, Z.; EL-AZIZ, M.A.; ZENG, M.; ZHANG, S.; QIN, F.; CHEN, J. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. **Food Chemistry**, Barking, v.232, p.753-762, 2017.

SILVA, D.G. **Modelagem racional de novos dipeptídeos modificados como inibidores da enzima conversora de angiotensina** (Dissertação). Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2013.

STAUB, C. Agron/SCAA roast classification. Color disk system. Chicago: Specialty Coffee Association of America, 1995.

SWEET MARIA'S. COFFEE LIBRARY. Using sight to determine degree of roast. Disponível em: < <https://legacy.sweetmarias.com/library/using-sight-to-determine-degree-of-roast/>>. Acesso em: 15 e 16 abr.2019.

TAGLIAZUCCHI, D. Melanoidins from coffee and lipid peroxidation. *In*: PREDDY, V. **Coffee in health and disease prevention**. Londres: Academic Press, 2015.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E. Relationship between the chemical composition and the biological activities of food melanoidins. **Food Science and Biotechnology**, Nova York, v.23, n.2, p.561–568, 2014.

TAVEIRA, J.H.S.; DELLYZETE, S.; ROSA, V.F.; BORÉM, F.M.; GIOMO, G.S.; SAATH, R. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.10, p.1511-1517, 2012.

TARZIA, A.; SCHOLZ, M.B.S.; PETKOWICZ, CL.O. Influence of the postharvest processing method on polysaccharides and coffee beverages. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, p. 2167–2175, 2010.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L.C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta, antes e após a torração. **Química nova**, São Paulo, v.29, p. 965-971, 2006.

TONIETTO, A.; SATO, J.H.; TEIXEIRA, J.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; FRANCO, O.L.; MEHTA, A. Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.30, p.1393–1399, 2012.

TSCHOPE, C.; SCHULTHEISS, H. P.; WALTHER, T. Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: Role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, New York, v. 39, n. 4, p. 478-487, 2002.

UEJO NETO, E. Sutilezas do ton-son-ton na torra do café **Jornal do café**, São Paulo, n.162, p. 58-59, 2008.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n.1, p. 11-24, 2012.

UDENIGWE, C.C; GONG, M.; WU, S. *In silico* analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. **Process Biochemistry**, Londres, v.48, n.11, p.1794–1799, 2013.

UDENIGWE, C.C. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.36, p.137-143, 2014.

VALLABHA, V.S.; TIKU, P.K. Antihypertensive peptides derived soy protein by fermentation. **International journal of peptide research and therapeutics**, Nova York, v.20, p.161–168, 2014.

VARDON, D.R.; MOSER, B.R.; ZHENG, W.; WITKIN, K.; EVANGELISTA, R.L.; STRATHMANN, T.J.; RAJAGOPALAN, K.; SHARMA, B.K. Complete utilization of

spent coffee grounds to produce biodiesel, bio-oil, and biochar. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, Washington, v.1, p.1286-1294, 2013.

VERZELLONI, E.; TAGLIAZUCCHI, D.; DEL RIO, D.; CALANI, L.; CONTE, A. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. **Food Chemistry**, Barking, v.124, n.4, p.1430–1435, 2011.

WANG, H. -Y.; QIAN, H.; YAO, W. -R. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. **Food Chemistry**, Barking, v.128, p.573–584, 2011.

WANG, H.-M.D; CHENG, Y.-S.; HUANG, C.-H.; HUANG, C.-W. Optimization of high solids dilute acid hydrolysis of spent coffee ground at mild temperature for enzymatic saccharification and microbial oil fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.180, p.753–765, 2016.

WANG, X.; LIM, L.-T. A kinetics and modeling study of coffee roasting under isothermal conditions. **Food and Bioprocess Technology**, Nova York, v.7, p.621–632, 2014.

WANG, X.; LIM, L.-T. Physicochemical characteristics of roasted coffee. In: PREDDY, V. **Coffee in health and disease prevention**. Londres: Academic Press, 2015.

WEI, F.; TANOKURA, M. Changes in components of coffee beans during roasting. In: PREDDY, V. **Coffee in health and disease prevention**. Londres: Academic Press, 2015.

ZHOU, L.; KHALIL, A.; BINDLER, F.; ZHAO, M.; MARCIC, C.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Effect of heat treatment on the content of individual phospholipids in coffee beans. **Food Chemistry**, Barking, v.141, n.4, p.3846–3850, 2013.

ZUORRO, A.; LAVECCHIA, R. Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v.34, p.49-56, 2012.

YENISETTI, S.C.; MURALIDHARA, M. Beneficial role of coffee and caffeine in neurodegenerative diseases: a minireview. **AIMS Public Health**, Springfield, v.3, n.2, p.407-422, 2016.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O material estudado e métodos empregados estão descritos no item 6, uma vez que os resultados foram redigidos na forma de um artigo científico.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão desta Dissertação foram redigidos na forma de um artigo científico, sendo intitulado “Potencial bioativo da fração proteica de grãos verdes e torrados e da borra de café (*Coffea arabica* var. IAPAR 59).

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO

POTENCIAL BIOATIVO DA FRAÇÃO PROTEICA DE GRÃOS VERDES E TORRADOS E DA BORRA DE CAFÉ (*Coffea arabica* var. IAPAR 59)

RESUMO

Neste estudo, foi avaliado o potencial de extratos proteicos obtidos dos grãos verde e torrado e da borra de café como precursores de peptídeos antioxidantes e inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA), por meio da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, e do perfil de atividade biológica da globulina 11S do café pela base de dados BIOPEP. A globulina 11S apresentou frequência elevada de peptídeos inibidores da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) (A = 0,62) e da ECA (A = 0,42), que podem ser liberados pela ação digestiva. Após a simulação da digestão gastrointestinal, os extratos de café verde e da borra apresentaram os maiores potenciais anti-hipertensivos. No entanto, o extrato de café verde apresentou pouca atividade antioxidante comparado aos extratos de café torrado e da borra, devido à torração da matriz. Peptídeos com elevados potenciais anti-hipertensivo e antioxidante podem ser obtidos a partir da borra de café.

Palavras-chave: peptídeos, digestão, bioinformática, ECA, antioxidante, melanoidinas.

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das maiores commodities agrícolas, sendo a segunda maior em valor exportada pelos países em desenvolvimento (ICO, 2019). A importância dada ao consumo da bebida não tem sido atribuída apenas ao efeito estimulante da cafeína, mas também à ação antioxidante conferida por vários outros compostos como ácidos clorogênicos, trigonelina, caveol, cafestol e melanoidinas, os quais podem conferir, em nível celular, proteção contra ativação de processos patológicos (FROST-MEYER; LOGOMARSINO, 2012; GODOS et al., 2014; ROSA et al., 2016).

Os grãos verdes de café têm cerca de 10 a 15% de proteína (MONTAVON; MAURON; DURUZ, 2003; GEROMEL et al., 2008), podendo variar conforme a espécie do café e o método empregado na análise. Para o café torrado e para a borra de café têm sido relatados teores entre 10 a 13% (NUNES; CRUZ; COIMBRA, 2012; CAETANO et al., 2014; CAETANO et al., 2017).

Durante a torração, o calor gerado induz a desnaturação das proteínas, levando posteriormente à fragmentação das subunidades em polipeptídeos menores e/ou à reações de polimerização com compostos fenólicos oxidados, formando estruturas quinoidais, que podem ser incorporadas à estrutura polimérica das melanoidinas (MONTAVON; MAURON; DURUZ, 2003).

Tem sido relatado que a presença de proteínas e do complexo proteína-arabinogalactanas ligado à matriz das melanoidinas está associado ao caráter polianiónico da estrutura, o que pode conferir a capacidade de quelar íons metálicos e sequestrar espécies reativas de oxigênio; podendo desempenhar, conseqüentemente, atividade antioxidante (BEKEDAM et al., 2007; TAGLIAZUCCHI, 2015).

A principal proteína presente no grão de café verde é a globulina de reserva 11S (ROGERS et al., 1999). Estudos evidenciam que as proteínas de reserva em leguminosas e cereais, tais como a 11S, são precursoras de peptídeos capazes de modular, a nível celular, várias reações envolvidas na ativação de processos patológicos (CHANG; ALI, 2012; CAVAZOS; MEJÍA, 2013; ESPINOZA-HERNÁNDEZ et al., 2019). Esses peptídeos, denominados bioativos, podem ser liberados da proteína nativa tanto pela ação das proteases digestivas, como por fermentação ou processamento térmico industrial (UDENIGWE; ALUKO, 2012; DALIRI; LEE; OH, 2017).

Rogers et al. (1999) mostraram que há mais de 60% de similaridade entre as sequências polipeptídicas da subunidade β da globulina 11S do café e as de outras leguminas do tipo 11S presentes no feijão-fava, soja ervilha, e no arroz. Essas evidências podem levantar a hipótese de que as globulinas 11S do café também podem atuar como precursoras de peptídeos bioativos.

O BIOPEP é uma base de dados que permite a avaliação *in silico* de uma proteína como precursora de peptídeos bioativos. Também é possível prever a atividade biológica de peptídeos gerados a partir da simulação da digestão enzimática da proteína selecionando-se até três proteases de interesse. Vinecky (2015) já estudou peptídeos bioativos a partir do café verde e torrado, mas o foco do seu estudo foi obter sequências peptídicas com ação opioide a partir de estudos genômicos realizados nas proteínas desidrinadas. Até o momento, não há relato sobre o perfil de bioatividade da proteína 11S no café.

Para o café torrado e a borra de café, esses peptídeos poderiam ainda estar ligados a outras estruturas como melanoidinas formadas no processo da torração dos grãos, o que poderia potencializar a atividade biológica. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar, *in vitro*, o potencial da fração proteica isolada de três matrizes diferentes (grãos verde e torrado e borra) do café arábica (*Coffea arabica* var. IAPAR 59) como precursora de peptídeos bioativos, a partir do potencial predito *in silico* da globulina 11S.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O material vegetal utilizado no estudo foi grãos de café verde (*Coffea arabica* var. IAPAR 59) obtidos de um mesmo lote da propriedade Sítio Serinha 2, localizada na cidade de Congonhinhas – PR (23° 33' 04" S, 50° 33' 13" W).

Os frutos de café foram colhidos em estágio maturação cereja, na segunda safra de 2016. Posteriormente, foram secos naturalmente ao sol até atingirem em torno de 11% de umidade, sendo posteriormente descascados mecanicamente. Os grãos de café verde obtidos foram então beneficiados em peneira 16/64", separando-se defeitos (grãos pretos, ardidos, malformados e quebrados).

As enzimas pepsina suína (EC 3.4.23.1), pancreatina (EC 232-468-9), a enzima conversora da angiotensina-1 EC (3.4.15.1) proveniente de pulmão de coelho (0.25 U, Sigma A-6778); a membrana de diálise (Sigma D-9652) e a albumina de soro bovino (BSA >98% pura) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes foram utilizados puros para análise.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Predição de Atividade Biológica da Globulina 11S

Foi realizado um estudo *in silico* na base de dados BIOPEP para prever todas as sequências peptídicas possíveis da globulina 11S do café verde com atividade biológica (MINKIEWICZ et al., 2008). Para este estudo foi utilizada a sequência de

aminoácidos da globulina 11S do café depositada na base de dados UNIPROT com entrada Q9ZNY2_COFAR e número de acesso NCBI 13443 (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017) (Figura 1S).

Também foi realizada a predição dos peptídeos gerados após a simulação da digestão gastrointestinal da proteína através da ferramenta “ação da enzima” do BIOPEP. As enzimas selecionadas foram pepsina, tripsina e quimotripsina, que são algumas das proteases disponíveis no banco de dados, e que estão envolvidas no processo de digestão gastrointestinal. A frequência de ocorrência dos peptídeos bioativos mapeados na sequência da proteína foi calculada de acordo com a equação 1:

$$A = \frac{a}{n} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

A = frequência de ocorrência do peptídeo com uma dada atividade biológica bioativo na proteína

a = número de repetições do (s) peptídeo (s) com uma dada atividade biológica na sequência polipeptídica

n = número de resíduos de aminoácidos da proteína (492 resíduos de aminoácidos).

2.2.2 Preparo de Amostras para Estudo *in vitro*

A partir dos resultados da predição *in silico* da atividade biológica da globulina 11S também foi realizado um estudo *in vitro*. Foram estudados os grãos verdes e torrados, além da borra de café obtida a partir do preparo da bebida. O fluxograma esquematizando o processo de obtenção das amostras também está apresentado como Material Suplementar (Figura 2S).

Amostras dos grãos verdes de café foram torrados em grau médio (220-230 °C), utilizando-se um torrador a gás (TMC10, Pinhalense, Brasil). Perda de massa (18%) e luminosidade ($L^* = 21$) foram utilizadas como parâmetro de controle (KALSCHNE et al., 2018).

Os grãos verdes e os torrados foram moídos em moinho de facas e classificados em granulometria fina (28 mesh). Para a moagem dos grãos verdes, foi utilizado nitrogênio líquido, enquanto que os grãos torrados foram moídos à temperatura ambiente. Os pós obtidos foram acondicionados em frascos de vidro, e armazenados à -20 °C até a realização das etapas posteriores do estudo.

A bebida de café foi preparada por percolação de 10 g do pó de café torrado com 100 mL de água a 90 °C em papel de filtro Whatman n° 3 (LIMA et al., 2010). Após a filtração, o material retido (borra de café) foi coletado, congelado a -80 °C, liofilizado, e armazenado a -20 °C até o momento das análises.

Amostras dos cafés verde e torrado e da borra foram caracterizadas quanto ao teor de umidade, lipídios, proteínas, cinzas e carboidratos por diferença conforme metodologia da American Official Analysts of Chemistry (AOAC, 1995). Foram obtidos os seguintes teores médios (em base seca, exceto umidade) de umidade, lipídios, proteína (N x 5,75), cinzas e carboidratos, respectivamente, para os cafés verde (10,46; 16,53; 12,71; 4,26; 56,07 g.100g⁻¹), torrado (3,50; 18,93; 13,24; 4,56; 59,77 g.100g⁻¹) e para a borra de café (6,99; 24,69; 11,35; 2,50; 54,47 g.100g⁻¹).

2.2.3 Extração de Proteínas

Extratos proteicos dos grãos verdes, torrados e da borra de café foram obtidos por meio de extração ácida seguida de precipitação com sulfato de amônio a 66%, conforme procedimento adaptado de Heimbeck (2011) e Vinecky (2015). As amostras anteriormente preparadas (item 2.2.3) foram suspensas em solução de extração a HCl 0,1 mol.L⁻¹ e NaCl 0,1 mol.L⁻¹ na proporção 1:12 (m/v), deixando-se sob agitação a 4 °C por 12 h, com posterior filtração à vácuo.

Os filtrados foram centrifugados a 10.000 g por 20 min a 4 °C, e os sobrenadantes obtidos tiveram o pH corrigido para 7,0 com solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Após nova centrifugação (10.000 g / 20 min a 4 °C), os sobrenadantes foram adicionados de sulfato de amônio 66% (m/v), incubados (4 °C/12 h, sem agitação), e então centrifugados nas mesmas condições descritas anteriormente. Os precipitados contendo cada material proteico foram suspensos em água destilada nas concentrações de 3,0 mg.mL⁻¹, e dialisados contra água destilada a 4 °C, sob agitação em câmara fria, por 72 h, em membrana de diálise com diâmetro de corte de 14 kDa.

Os extratos proteicos resultantes foram congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, e liofilizados para análises posteriores.

2.2.4 Simulação *in vitro* da Digestão Gastrointestinal

Os extratos proteicos liofilizados foram submetidos à hidrólise enzimática sequencial com pepsina suína (EC 3.4.23.1) seguida de pancreatina de pâncreas suíno (EC 232-468-9), visando simular, *in vitro*, as condições da digestão gastrointestinal proteica.

Os extratos proteicos foram suspensos em água ultrapura na proporção de 1:20 (m/m), adaptando-se o procedimento descrito por Rocha et al. (2014). Para a etapa realizada com a pepsina, uma proporção de 1:20 (m/m) de enzima:substrato foi adicionada em tubo falcon de 50 mL e incubada em pH 2,0 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Posteriormente, pancreatina foi adicionada ao meio na mesma proporção citada anteriormente, seguida por incubação em pH 7,5 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. A enzima foi inativada a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min, e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 15 min a 4°C . Os sobrenadantes foram liofilizados e congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores.

2.2.5 Caracterização dos Extratos Proteicos

2.2.5.1 Proteína solúvel

Os extratos proteicos, antes e após a digestão, foram suspensos em água destilada para uma concentração de $0,55\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em seguida, a concentração de proteína solúvel foi determinada conforme Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino para construção da curva padrão nas concentrações de 100 a $900\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($y = 0,0007x + 0,0488$; $R^2 = 0,99$, $p < 0,05$).

2.2.5.2 Estimativa de melanoidinas

O teor de melanoidinas dos extratos proteicos, antes e após a digestão, foi estimado de acordo com o método de Perez-Hernandez et al. (2012), com

modificações. Um volume de 100 μL de cada extrato ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi diluído em água destilada para um volume final de 1,0 mL, e realizada a leitura em espectrofotômetro UV-visível (Biochrom, Canbourne, Reino Unido) a 420 nm. A concentração de melanoidinas foi estimada conforme Tagliazucchi et al. (2010), que utiliza o valor de $1,1289 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ de absorvidade para o cálculo.

2.2.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas dos extratos liofilizados obtidos foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Os géis foram preparados conforme metodologia adaptada de Laemmli (1970).

Extratos proteicos de café verde na concentração de 2,5% (m/v), de café torrado a 1,0% (m/v) e da borra a 2,0% (m/v) foram preparados em água destilada, e diluídos em tampão de amostra ($62,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 6,8; SDS 10% (m/v), glicerol 20%, β -mercaptoetanol 5%, *Coomassie blue* G250 0,1% e água destilada) para uma concentração final de 0,3% para o extrato proteico de café verde; e de 0,4% para os extratos de cafés torrado e de borra.

As amostras foram então aquecidas a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, e após resfriamento, alíquotas de 10 μL foram aplicadas no gel. Acrilamida a 15% foi utilizada como gel de corrida (separação), e a 4% como gel de empilhamento.

A corrida foi feita a uma corrente elétrica de 10 mA, tensão de 140 V, por um período de 5 h. A seguir, os géis foram mantidos em solução corante *Coomassie blue* G250 durante uma noite, à temperatura ambiente, e posteriormente descorados em solução descorante composta de ácido acético, metanol e água destilada na proporção de 1:4:5, respectivamente.

Os marcadores de massa molecular continham padrões de proteína entre 10 e 250 kDa, seguindo as especificações do fabricante (Bio-Rad).

2.2.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de tricina (SDS-PAGE-tricina)

O perfil dos peptídeos presentes nos extratos liofilizados foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de tricina, adaptado do método de Schagger e von Jagow (1987).

As amostras dos extratos digeridos foram suspensas em água destilada a 1,5% (m/v), e diluídas em tampão de amostra contendo SDS 10% (m/m), tris-HCl 62,5 mmol.L⁻¹ pH 6,8, β-mercaptoetanol e água destilada para uma concentração de 0,15% para o extrato de café verde e 0,3% para os extratos de café torrado e da borra. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 37 °C por 15 min, e aplicadas no gel (5 µL em cada poço). A corrida foi realizada com corrente elétrica constante de 10 mA, voltagem variando de 30 a 120 V, por aproximadamente 4 h. Os géis foram fixados em solução contendo ácido acético, metanol e água na respectiva proporção de 1:4:5 (v/v) por 1 h; e mantidos em solução de ácido acético 10% contendo *Comassie blue* G 250 0,1% por mais 24 h. Posteriormente, os géis foram descorados em solução de ácido acético 10%.

Foram utilizados marcadores de massa molecular de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad), com padrões de proteína que variaram entre 1,423 a 26,6 kDa.

2.2.5.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos proteicos, antes e após a digestão, das amostras de café verde, torrado e da borra foi avaliada pelos seguintes métodos: FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996); ABTS (RUFINO et al., 2007) e Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

2.2.5.5.1 Capacidade redutora do íon férrico (FRAP)

Para avaliação da capacidade redutora do íon férrico, preparou-se o reagente FRAP que consiste de 2,5 mL de solução TPTZ 10 mmol.L⁻¹ em HCl 40 mmol.L⁻¹

adicionados de 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 25 mL de tampão acetato 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 3,6), seguindo-se incubação a 37 °C por 30 min.

Os extratos antes e após a digestão (5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), foram diluídos em etanol absoluto para uma concentração final de 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A um volume de 900 μL do reagente FRAP misturaram-se 30 μL de amostra e 90 μL de etanol absoluto (99%), seguindo-se a incubação a 37 °C por 30 min, com posterior leitura de absorbância a 595 nm. A curva padrão ($y = 0,0012x + 0,0199$; $R^2 = 0,99$, $p < 0,05$) foi preparada com Trolox a diferentes concentrações (50 a 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Os resultados foram expressos em μmol Trolox equivalente g^{-1} de proteína solúvel.

2.2.5.5.2 Atividade sequestradora de radicais livres 2,2' - azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico - ABTS (TEAC)

Na análise pelo método ABTS, produziu-se a solução de radicais cátions $\text{ABTS}\cdot^+$ (TEAC) pela reação da solução estoque de 7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABTS com 140 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ persulfato de potássio, seguido do armazenamento em frasco escuro à temperatura ambiente por 12 h. A solução de radicais $\text{ABTS}\cdot^+$ foi diluída com etanol absoluto (99%) para uma leitura de absorbância de $0,700 \pm 0,05$ a 734 nm.

Os extratos, antes e após a digestão (4,8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram diluídos em etanol absoluto para concentrações finais de 2,4; 1,2 e 0,6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Adicionaram-se, então, 30 μL da amostra a um volume de 3,0 mL de solução $\text{ABTS}\cdot^+$, e após 6 min de reação procedeu-se a leitura de absorbância a 734 nm. Para construção da curva padrão ($y = 0,0442x - 4,4729$; $R^2 = 0,99$, $p < 0,05$) utilizou-se Trolox em diferentes concentrações (25 a 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Os resultados foram expressos como atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC - μmol Trolox. g^{-1} de proteína solúvel).

2.2.5.5.3 Capacidade redutora (Folin-Ciocalteu)

Um volume de 250 μL dos extratos, antes e após a digestão, na concentração de 0,8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi adicionado de 1,25 mL de carbonato de sódio a 7,5% e de 1,00 mL do reagente Folin-Ciocalteu 0,9 N. Após agitação, a mistura foi mantida sob

temperatura ambiente no escuro por 2 h, realizando-se posteriormente a leitura a 749 nm.

Foi preparada uma curva padrão ($y = 10,16x - 0,144$; $R^2 = 0,99$, $p < 0,05$) utilizando-se ácido gálico em diferentes concentrações (0,02 a 0,10 mg.mL⁻¹). Os resultados foram expressos como mg EAG. g⁻¹ de proteína solúvel.

2.2.5.6 Inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA)

A inibição da ECA para os extratos antes e após a digestão, foi determinada *in vitro* pelo método de Cushman e Cheung (1971), com adaptações descritas por Cruz et al. (2016). N-hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) foi utilizado como substrato de reação, dissolvendo-o numa mistura de reação contendo: solução tampão com 0,1 mol.L⁻¹ de fosfato de potássio 0,1 mol.L⁻¹ e de NaCl 0,3 mol.L⁻¹ com pH ajustado para 8,3, para uma concentração final de 5 mmol.L⁻¹.

Uma alíquota de 250 µL da solução anteriormente preparada foi misturada a 25 µL dos extratos, antes e após a digestão, preparados em água destilada a diferentes concentrações (0,25; 1,25; 2,50 mg.mL⁻¹) e a 40 µL de enzima dissolvida em 1,0 mL de água destilada. Após incubação das amostras a 37 °C por 30 min, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 70 µL de HCl 1 mol.L⁻¹.

O ácido hipúrico formado pela ação da enzima conversora de angiotensina sobre o HHL foi extraído em 1,5 mL de acetato de etila, utilizando-se, por conseguinte, 1,0 mL da fase extraída para evaporação do solvente a 120 °C, seguido da adição de 1,0 mL de água destilada. A absorbância de cada amostra foi lida em espectrofotômetro a 228 nm.

Foram preparados também: um tubo controle contendo todos os reagentes, exceto a amostra (extrato antes e após a digestão), que foi substituída pelo tampão borato de sódio; e um tubo branco contendo o tampão borato de sódio e o substrato. Além disso, cada amostra teve o valor da absorbância descontado da leitura do branco da amostra (que consistiu de tampão borato, substrato e amostra).

A porcentagem de inibição da ECA foi determinada de acordo com a seguinte equação 2:

$$ECA_i (\%) = \frac{(C-A)}{(C-B)} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

A = absorvância da amostra descontado do branco da amostra (substrato + enzima + amostra)

C = absorvância do ácido hipúrico formado sem a presença dos extratos como inibidores (substrato + enzima + tampão)

B = absorvância do ácido hipúrico formado sem a enzima (substrato + tampão borato).

Os resultados foram expressos como IC_{50} , que corresponde à concentração dos extratos, em mg de proteína solúvel.mL⁻¹, necessária para inibir 50% da enzima ECA nas condições descritas, sendo calculado por regressão não linear da % de inibição da ECA contra o logaritmo das concentrações utilizadas dos extratos, conforme descrito por Rocha et al. (2014).

2.2.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com duas repetições e análises em triplicata. O esquema de tratamentos foi de dois fatores: matrizes e digestão. Os dados foram tratados por ANOVA e teste de Tukey entre as matrizes (verde, torrado, borra) e digestão (antes e após), considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o software R[®] v. 3.3.1 (R CORE TEAM, GNU, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Usando a base de dados BIOPEP, foram preditos vários peptídeos bioativos que estão encriptados (Tabela 1) na sequência de aminoácidos da globulina 11S do café verde (*Coffea arabica*) depositada na base de dados UNIPROT (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017) (Figura 1S). É possível identificar dois grupos de maior ocorrência: os inibidores da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) (A = 0,62) e os inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA) (A = 0,42). Estas duas atividades já foram identificadas em peptídeos provenientes de matrizes alimentares tais como o leite (NONGONIERMA et al., 2013; TAGLIAZUCCHI et al. 2017); produtos cárneos (ESCUADERO; MORA; TOLDRÁ, 2014), soja (MARGATAN et al, 2013; WANG et al., 2019), aveia (WANG et al., 2015a; WANG et al., 2015b), entre outros. Para o café, até o momento, este é o primeiro estudo.

Tabela 1. Sequências peptídicas encriptadas na globulina 11S (*Coffea arabica*) com potencial bioativo preditas por simulação *in silico*.

Atividade	Sequências ¹	Frequência ² (A)
Inibição da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV)	IPI; GP ; MA; KA; LA ; FA; AP ; LP; VP ; LL; VV; VPL ; GQ ; IP; FP ; RP ; RA ; EP; NP; QP; FL; EK ; AL; SL; GL ; WRS; WR; WN; WT; WG ; AD; ES; AE; AF ; AG ; AH ; AV ; DN; DQ; DR; EG ; ET; EV ; EY ; FN; FQ ; FR ; GF ; GG ; GH ; GV ; HR; HS; HW; HY ; II; IL ; IN; IQ; IR ; KE ; KF ; KG ; KI; KK; KR ; KT; KV; KY ; LI; LN; LT; LV; MI; NA; ND; NE; NG ; NN; NQ; NT; NV; PG ; PH ; PI; PK; PQ ; PS; QE; QG; QH; QI; QL; QQ; QS; QV; QW; QY; RH; RI; RK; RL ; RN; RR ; SF ; SK; TE ; TF ; TG ; TL; TN; TQ ; TT; TV; TY ; VD; VE ; VF ; VG ; VI; VK ; VL; VN; VQ; VT; VY ; YF; YG ; YN; YS; YV	0,6220
Inibição da enzima conversora de angiotensina -I (ECA)	RL ; IR ; GRP; LY ; VF ; FAP; RF; VY ; HY ; FP ; PR; LF; YG ; AIP; LLP; VPK; GLP; LPG; GP ; PL; VK ; FFL; IP; RP ; AF ; AP ; LA ; KR ; VP ; RA ; GF ; FR ; IF; VG ; IG; GL ; AG ; GH ; GR; KG ; FG; DA; GS; GV ; GQ ; GK; GT; WG ; HG; GG ; QG; SG; LG; GD; TG ; EG ; EA; NG ; PG ; VR; ITT; QK; DG; SF ; KY ; KF ; KL; NK; RR ; AR; KA; EY ; LLF; EV ; VE ; TE ; LQ; LN; TQ ; AH ; PQ ; EK ; KE ; PH; HK; VAF; TF ; AI; AV ; HQG; LEE; YVA; AQL; FQ ; YV ; IL ; HGP; GTG; ST; YN ; LR; GLPQE	0,4210
Estimulante	VPL ; LLL; LV; IV; IL; LI; II; LL; EE; SE	0,059
Antioxidante	IKK; LY ; AH ; EL; PHW; PHY; RHQ; VKL; KD; YVL; IR ; LK; TY ; TFE; VY ; FLPE	0,045
Neuropeptídeo	GQ	0,0122
Ativador da proteólise mediada por ubiquitina	RA ; LA	0,0122

(CONTINUAÇÃO)

Inibidor da CaMPDE	IR; KF ; EF	0,0122
Hipotensivo (inibidor da renina)	IR; KF ; EF	0,0122
Antiamnésico	VPL ; PG; GP	0,0102
Regulador	GFL; GP ; PG	0,0102
Antitrombótico	GP ; PG	0,0081
Imunomodulador	YG ; GFL; EAE	0,0061
Ligante de permease bacteriana	KK	0,0041
Antibacteriano	GLPQE ; YVL	0,0041

¹As letras em cada sequência peptídica indicam a inicial do nome do aminoácido. Nomenclatura: A = alanina, C = cisteína; H = histidina; I = isoleucina; M = metionina; S = serina; V = valina; G = glicina; L = leucina; P, prolina; T = treonina; F = fenilalanina; R = arginina; Y = tirosina; W = triptofano; D = ácido aspártico; N = asparagina; E = ácido glutâmico; Q = glutamina; K = lisina.

²A frequência de ocorrência (A) varia de 0 a 1.

As sequências marcadas com cores possuem mais de um tipo de atividade, e estão assim representadas: em amarelo (inibidor das enzimas DPP-IV e ECA); em amarelo com negrito (inibidor das enzimas DPP-IV, ECA e antioxidante); em vermelho (antioxidante e inibidor da ECA); em vermelho com negrito (inibidor das enzimas DPP-IV, ECA e CampPDE e hipotensivo); em laranja (inibidor das enzimas DPP-IV e ECA, antiamnésico, regulador e antitrombótico), em laranja com negrito (inibidor da DPP-IV e estimulante) em verde (inibidor da DPP-IV e antioxidante); em verde com negrito (inibidor da DPP-IV, ECA e antioxidante); em rosa (inibidores da DPP-IV, ECA, CampPDE, antioxidante e hipotensivo) em azul (inibidor das enzimas DPP-IV e ECA e neuropeptídeo), em roxo (inibidor da ECA e antibacteriano), em marrom (inibidor das enzimas DPP-IV e ECA e imunomodulador) e em cinza (inibidores da DPP-IV e ECA e ativador de proteólise)

A inibição destas duas enzimas é uma estratégia utilizada pela farmacoterapia na produção de medicamentos. Os inibidores da DPP-IV prolongam a ação dos hormônios incretinas como o *peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1)* e o *peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP)* sobre os receptores que estimulam a secreção de insulina, mantendo, assim, o controle da glicemia em indivíduos com diabetes tipo 2 (LACROIX; LI-CHAN, 2016). Os inibidores da ECA, por sua vez, evitam

a conversão de angiotensina I em angiotensina II, que é um vasoconstritor capaz de aumentar a absorção periférica de íons sódio, e com isso, elevar a pressão arterial (DASKAYA-DIKMEN et al., 2017). Logo, a frequência elevada dessas duas classes de inibidores na sequência da proteína do café representa uma característica muito favorável para o isolamento e aplicação de peptídeos com esses tipos de atividade biológica.

Na sequência da proteína também foram encontradas, em menor ocorrência, sequências peptídicas com as atividades estimulante ($A = 0,06$) e antioxidante ($A = 0,05$), reguladora ($A = 0,01$), neuropeptídica ($A = 0,01$), antiamnéstica ($A = 0,01$), imunomoduladora ($A = 0,006$), inibidor de renina ($A = 0,01$), inibidor da CaMPDE ($A = 0,01$) e antibacteriana ($A = 0,004$).

É interessante notar que várias sequências peptídicas da globulina 11S possuem mais de um tipo de atividade biológica. Há pelo menos 40 sequências que apresentam ao mesmo tempo atividades de inibição da DPP-IV e da ECA. Além disso, há sequências de menor ocorrência que também podem inibir a DPP-IV e/ou a ECA. Os peptídeos AH e TY, por exemplo, apresentam atividades antioxidante e de inibição da DPP-IV; logo, poderiam atuar tanto no controle glicêmico como no sequestro de radicais livres decorrentes do estresse oxidativo ocasionado pelo diabetes tipo 2. Um outro exemplo interessante é dos peptídeos IR e KF, que podem exercer efeito anti-hipertensivo ao inibirem de forma completa o sistema RAS (renina-angiotensina), ou seja, inibirem tanto a ECA quanto a renina. Esta estratégia pode ser benéfica tanto para o tratamento da hipertensão como causa primária, como também em indivíduos diabéticos que apresentem complicações renais, uma vez que a atividade residual da renina está relacionada a casos de microalbuminúria (GISMONDI; OIGMAN, 2011; NEVES et al., 2018). Essa multifuncionalidade poderia ser mais explorada tanto para prospecção de novos fármacos, quanto para produção de ingredientes para serem aplicados em matrizes alimentares.








Após a predição do potencial bioativo total da sequência proteica pela base de dados BIOPEP (Tabela 1), foi realizada a simulação da digestão gastrointestinal *in silico* para verificar se os peptídeos liberados pela ação proteolítica poderiam, de fato, exercer atividade biológica. As sequências com potencial bioativo estão identificadas na Figura 1. Houve maior ocorrência de peptídeos inibidores da DPP-IV ($A = 0,045$) e

da ECA ($A = 0,043$). Em menor ocorrência, também houve peptídeos com atividades antioxidante ($A = 0,03$) e estimulante ($A = 0,01$).

Várias das sequências peptídicas apresentaram mais de um tipo de atividade biológica, abrindo a possibilidade das sequências que foram preditas com mais de um tipo de atividade (Tabela 1) serem liberadas pela ação digestiva. No entanto, somente parte de todos os peptídeos bioativos preditos foram liberados pela digestão, os quais correspondem, em sua maioria, a di e tripeptídeos.

Figura 1. Simulação *in silico* da digestão gastrointestinal da globulina 11S com as proteases pepsina, tripsina e quimotripsina.

M - AH - SH - M - ISL - SL - Y - VL - L - F - L - GCL - AQL - GR - PQPR - L - R - GK - TQCDIQK
 - L - N - AQEPSF - R - F - PSEAGL - TEF - W - DSN - N - PEF - GCAGVEF - ER - N - TVQPK
 - GL - R - L - PH - Y - SN - VPK - F - VY - VWEGTGVQGTVIPGCAETF - ESQGESF - W -
 GGQEQPGK - GQEGQEQQSK - GGQEGR - R - QR - F - PDR - H - QK - L - R - R - F - QK -
 GDVL - IL - L - PGF - TQW - TY - N - DGDVPL - VTVAL - L - DVAN - EAN - QL - DL - QSR -
 K - F - F - L - AGN - PQQGGGK - EGH - QGQQQQH - R - N - IF - SGF - DDQL - L - ADAF -
 N - VDL - K - IIQK - L - K - GPK - DQR - GSTVR - AEK - L - QL - F - L - PEY -
 SEQVQQPQQQEQQQH - GVGR - GW - R - SN - GL - EETL - CTVK - L - SEN - IGL -
 PQEADV - N - PR - AGR - ITTVN - SQK - IPIL - SSL - QL - SAER - GF - L - Y - SN - AIF -
 APH - W - N - IN - AH - N - AL - Y - VIR - GN - AR - IQVVDH - K - GN - K - VF - DDEVK -
 QGQL - IIVPQY - F - AVIK - K - AGN - QGF - EY - VAF - K - TN - DN - AM - IN - PL - VGR - L
 - SAF - R - AIPEEVL - R - SSF - QISSEAEEL - K - Y - GR - QER - L - L - L - SEQSQQGK -
 K - R - SCL - S

	Inibidor da DPP-IV
	Inibidor da ECA
	Antioxidante, inibidores da DPP-IV e ECA
	Antioxidante, estimulante e inibidores da DPP-IV
	Antioxidante e inibidor da DPP-IV
	Estimulante e inibidor da DPP-IV
	Inibidores da ECA e DPP-IV

Os traços entre as letras (aminoácidos) representam os pontos de clivagem da ligação peptídica pelas proteases. Nomenclatura: A = alanina; C = cisteína; H = histidina; I = isoleucina; M = metionina; S = serina; V = valina; G = glicina; L = leucina; P, prolina; T = treonina; F = fenilalanina; R = arginina; Y = tirosina; W = triptofano; D = ácido aspártico; N = asparagina; E = ácido glutâmico; Q = glutamina; K = lisina.

O grau de hidrólise da cadeia polipeptídica obtido da simulação da digestão gastrointestinal foi de 37,02%, o que sugere que a especificidade de atuação das proteases utilizadas pode ter contribuído para a diferença nas frequências de ocorrência entre a predição de bioatividade total e a simulação da digestão. Cada enzima cliva a ligação peptídica a partir do reconhecimento de determinados resíduos de aminoácidos. A pepsina atua sobre fenilalanina e tirosina; a tripsina cliva após lisina e arginina; e a quimotripsina tem especificidade por aminoácidos aromáticos (NELSON; COX, 2013). Além da especificidade citada, a presença de resíduos de prolina e glutamina perto dos pontos de clivagem da ligação peptídica podem bloquear a atuação da tripsina e da quimotripsina. Dessa forma, a ação das proteases pode ter limitado a extensão da hidrólise, e isso levou à liberação de peptídeos de tamanho variável e, conseqüentemente, a resultados de bioatividade reduzida.

Os demais peptídeos liberados não têm potencial bioativo descrito no BIOPEP. No entanto, vários deles têm uma frequência elevada de sequências peptídicas encriptadas com atividade de inibição da DPP-IV e da ECA (Tabela 2). Isso mostra que estes peptídeos também poderiam atuar como inibidores enzimáticos.

(CONTINUAÇÃO)

Sequência ²	Frequência de ocorrência (A) ¹							
	Inibição da DPP-IV	Inibição da da ECA	Antiamnésico	Estimulante	Regulador	Neuropeptídeo	Hipotensivo	Inibidor CampDE
CTVK	0,50	0,25						
GSTVR	0,40	0,60						
AVIK	0,50	0,25						
DDQL	0,50							
IPIL	1,00	0,50		0,25				
PQPR	0,50	0,50						
ADAF	0,50	0,50						
EETL	0,50			0,25				
GDVL	0,25	0,25		0,25				
GVGR	0,25	0,75						
QGQL	0,50	0,50				0,25		
SAER	0,25							
IIVPQY	0,67	0,33		0,33				
PEY	0,33	0,33						
PGF	0,67	0,67	0,33	0,67	0,33			
AIF	0,67							
AGN	0,33	0,33						
APH	0,67	0,67						
DQR	0,33							
VDL	0,33							
IGL	0,33	0,67						
ISL	0,33							
GPK	0,67	0,33	0,33		0,33			

(CONCLUSÃO)

Sequência ²	Frequência de ocorrência (A) ¹							
	Inibição da DPP-IV	Inibição da ECA	Antiamnésico	Estimulante	Regulador	Neuropeptídeo	Hipotensivo	Inibidor CampDE
QSR	0,33							
QGF	0,66	0,66						
SAF	0,33	0,33						
SEN				0,33				
SGF	0,33	0,67						
SQK		0,33						
TEF	0,33	0,33					0,33	0,33
VIR	0,67	0,33				0,33	0,33	
VGR	0,33	0,67						
SSF	0,33	0,33				0,33		
IF		0,50						
GW	0,50	0,50						
QL	0,50							
SF	0,50	0,50					0,50	

¹ A frequência (A) varia de 0 a 1.

² Letras indicam o aminoácido. Nomenclatura: A = alanina; C = cisteína; H = histidina; I = isoleucina; M = metionina; S = serina; V = valina; G = glicina; L = leucina; P, prolina; T = treonina; F = fenilalanina; R = arginina; Y = tirosina; W = triptofano; D = ácido aspártico; N = asparagina; E = ácido glutâmico; Q = glutamina; K = lisina.

É interessante notar que a maior parte das sequências que foram preditas como inibidores são di e tripeptídeos. Embora sequências peptídicas curtas consigam interagir com os subsítios do sítio ativo das enzimas a inibição da DPP-IV e da ECA pode ocorrer em sítios de ligação secundários (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011; LACROIX; LI-CHAN, 2015; CRUZ et al., 2016).

Na DPP-IV, é relatado que sequências peptídicas longas (30 - 50 resíduos de aminoácidos) podem inibir a enzima de forma não-competitiva pela ligação do peptídeo na interface onde ocorre a dimerização da estrutura, o que impede o estabelecimento da conformação ativa da enzima, e conseqüentemente, a catálise do substrato (KÜHN-WACHEA et al., 2011; POWER et al., 2014).

No caso da ECA, o peptídeo pode inibir a enzima de forma não competitiva pela interação com o íon Zn^{2+} presente no sítio ativo da enzima; e também seletivamente a um dos domínios catalíticos (domínios C e N) do sítio ativo, levando à redução da velocidade de catálise do substrato devido à mudança ocasionada na conformação da enzima (ONUH et al., 2015; FU et al., 2017; SETAYESH-MEHR; ASOODEH, 2017).

Dessa forma, as características estruturais destas enzimas podem permitir que moléculas maiores, tais como várias das sequências peptídicas liberadas pela digestão simulada (VVEGTGVQGTVIPGCAET, SEQVQQPQQQQEQQQH, GQEGQEQGSK, GGQEQPGK, PQQGGGK, PQEADVF, ESQGESF, GCAGVEF, DGDVPL e IIVPQY) possam atuar como inibidores, uma vez que poderiam se ligar em sítios de ligação secundários e induzir mudanças conformacionais na enzima, dificultando a interação com o substrato, conforme proposto por outros autores (WYVRATT; PATCHETT, 1985; NELSON; COX, 2013; RUFIAN-HENARES; MORALES, 2007).

Outra característica dos peptídeos inibidores é a natureza dos resíduos de aminoácidos terminais. Para a ECA, sequências C-terminal de tripeptídeos que apresentam resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ou de cadeia lateral ramificada tais como fenilalanina, tirosina e triptofano e/ou prolina conseguem interagir efetivamente com os subsítios S1, S2 e S2' do sítio ativo da enzima. Na DPP-IV, a porção N-terminal de resíduos de aminoácidos aromáticos como triptofano e com cadeia lateral ramificada, bem como a presença de prolina na posição 2 parecem ter maior efetividade (LACROIX; LI-CHAN, 2016; NONGONIERMA et al., 2017). Dessa forma, várias das sequências que foram consideradas inativas na base BIOPEP tais como

IPIL, ADAF, ISL, PSEAGL, AQEPSF, DGDVPL, PGF, VDL também podem ser considerados potenciais inibidores da DPP-IV e/ou da ECA.

Os resultados apontam que a globulina 11S do café tem potencial para ser investigada, primariamente, como precursora de peptídeos inibidores da DPP-IV e da ECA.

3.2 PROTEÍNA SOLÚVEL

A concentração de proteína solúvel dos extratos antes da digestão variou de 51 a 63,8 % (Tabela 3). Após a simulação da digestão gastrointestinal, esses valores aumentaram significativamente ($p < 0,05$), chegando a serem maiores que 80% para os extratos de café torrado e da borra. Isto mostra que houve ação proteolítica sobre a fração proteica dos extratos. Durante o processo de digestão gastrointestinal, várias proteases tais como pepsina, tripsina e quimotripsina promovem a redução do tamanho da cadeia polipeptídica. Os peptídeos e aminoácidos livres liberados são mais solúveis que a proteína nativa (NELSON; COX, 2013). Dessa forma, a ação proteolítica ocorrida na simulação da digestão pode ter liberado peptídeos; e como foi demonstrado no estudo *in silico* (Tabelas 1 e 2), eles também podem ser bioativos.

Tabela 3. Concentração de proteína solúvel, atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP, capacidade redutora e teor de melanoidinas dos extratos proteicos de café verde, torrado e borra de café, antes e após digestão gastrointestinal *in vitro*.

Parâmetro	Proteína solúvel (g.100g ⁻¹)*	Atividade antioxidante		Capacidade redutora ($\mu\text{mol EAG.g}^{-1}$)	Melanoidinas (mg.mL ⁻¹)
		ABTS ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$)		
Antes da digestão					
Verde	63,76±3,05 ^{A,b}	66,30±7,20 ^{C,b}	100,66±8,55 ^{C,a}	383,00±6,28 ^{C,b}	1,46±0,07 ^{C,a}
Torrado	51,06±4,10 ^{C,b}	496,83±24,74 ^{A,b}	813,98±47,71 ^{A,b}	798,76±28,07 ^{B,b}	3,03±0,07 ^{A,a}
Borra	58,79±3,96 ^{B,b}	440,66±29,01 ^{B,b}	610,66±57,28 ^{B,b}	1755,76±56,67 ^{A,b}	2,02±0,11 ^{B,a}
Após a digestão					
Verde	76,92±2,42 ^{B,a}	110,53±7,87 ^{C,a}	112,02±11,14 ^{B,a}	400,29±17,66 ^{C,a}	0,53±0,04 ^{C,b}
Torrado	84,24±1,95 ^{A,a}	574,28±12,07 ^{B,a}	1096,07±70,20 ^{A,a}	985,26±24,64 ^{B,a}	2,59±0,06 ^{A,b}
Borra	85,56±2,79 ^{A,a}	645,58±18,99 ^{A,a}	1110,90±162,99 ^{A,a}	1351,27±28,91 ^{A,a}	1,56±0,06 ^{B,b}

Médias com letras maiúsculas iguais para cada parâmetro não diferem entre si ($p > 0,05$) para as matrizes (verde, torrado e borra) antes **ou** após a digestão.

Médias com letras minúsculas iguais para cada parâmetro não diferem entre si ($p > 0,05$) entre as matrizes (verde, torrado e borra) antes **e** após a digestão.

* Concentração expressa como g de proteína solúvel. 100g⁻¹ de extrato proteico

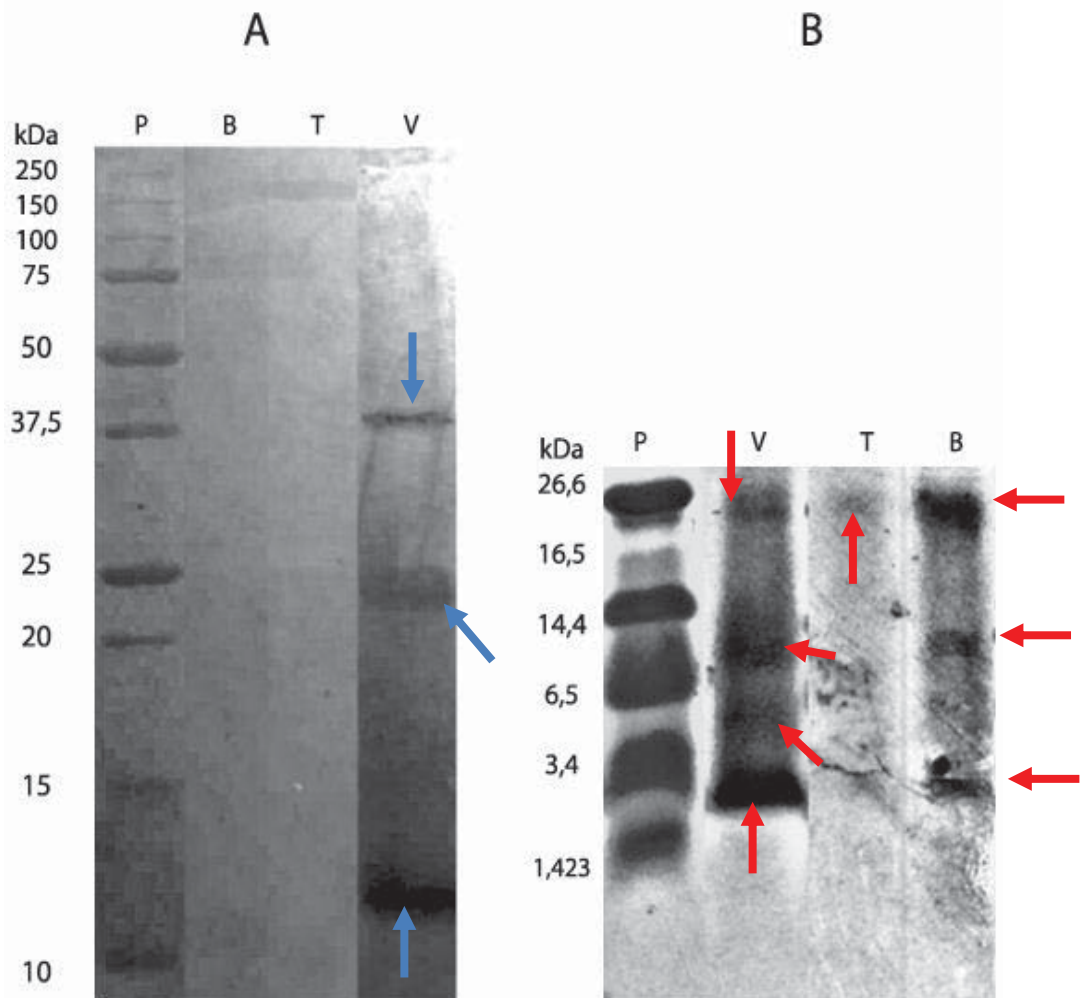
Também foram observadas diferenças nas concentrações de proteína solúvel entre os extratos antes da digestão. Elas podem ser atribuídas às alterações ocorridas nas proteínas devido às etapas de torração e preparo da bebida realizadas nas matrizes dos extratos. A formação e complexação das melanoidinas às proteínas do café durante a torração dos grãos, torna essa fração menos solúvel em água (BEKEDAM et al., 2006), o que pode ter resultado na menor concentração de proteína solúvel obtida no extrato de café torrado. Por outro lado, no extrato da borra de café, a etapa de percolação da água quente no pó de café pode ter acentuado a extensão da desnaturação da proteína, resultando na exposição de mais sítios de ligação com a água, levando a um aumento nos valores de solubilidade. Guo et al. (2015) verificaram que a solubilidade de um isolado proteico de soja aumentou após 15 min de aquecimento a 80, 90 e 100 °C, devido tanto à exposição de sítios de ligação hidrofóbicos quanto hidrofílicos. Isso portanto, poderia justificar os maiores valores obtidos em relação ao extrato de café torrado.

3.3 PERFIL ELETROFORÉTICO DOS EXTRATOS ANTES E APÓS A DIGESTÃO

Na Figura 2A (antes da simulação gastrointestinal), as bandas polipeptídicas de cerca de 25 e 37 kDa presentes no extrato de café verde podem ser atribuídas às subunidades da globulina 11S. Em grãos verdes de café arábica, esta proteína normalmente apresenta um dímero de cerca de 55-60 kDa, composto de duas subunidades: uma α (ácida), de cerca de 33 kDa; e outra β (básica), de 24 kDa, unidas por ligações dissulfeto (ROGERS et al., 1999).

Além disso, observa-se uma banda intensa de 10 kDa que pode corresponder a produtos de hidrólise da globulina 11S. As endopeptidases presentes no grão de café verde têm ação durante o armazenamento, o que pode resultar na liberação de polipeptídeos de menor massa molecular (12 – 16 kDa), conforme relatado por diversos autores (ROGERS et al., 1999; LUDWIG et al., 2000). Como a amostra de café verde utilizada no estudo ficou armazenada por cerca de um ano em condições ambientais antes da realização dos experimentos, a banda do polipeptídeo de 10 kDa pode ser oriunda da ação das endopeptidases durante o armazenamento.

Figura 2. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de extratos proteicos antes (A) e após (B) a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal



(V) extrato de café verde; (T) extrato de café torrado; (B) extrato de borra de café e (P) padrão. As setas azuis indicam as bandas de proteína antes da simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal; as setas vermelhas indicam as bandas de proteína liberadas após a simulação.

Para os extratos de café torrado e da borra não foram observadas bandas de proteína antes da digestão. A derivatização de proteínas a polifenóis oxidados que ocorre na torração dos grãos de café pode formar estruturas poliméricas maiores que 200 kDa (NUNES; COIMBRA, 2001), dificultando a permeação das proteínas no gel de eletroforese. Por outro lado, a fragmentação que pode ocorrer nas globulinas 11S durante a torração, podem liberar polipeptídeos de menor massa molecular, como o polipeptídeo de cerca de 14 kDa observado por Nunes e Coimbra (2001). Neste estudo, no entanto, durante a etapa de diálise para purificação das proteínas e eliminação do sal formado durante o processo de extração, proteínas de menor

tamanho podem ter sido perdidas para o permeado, uma vez que a membrana utilizada tinha malha de corte de 14 kDa. Considerando que o teor de proteína solúvel obtido dos extratos foi maior que 50% (Tabela 3), é provável que a faixa de massa molecular da fração proteica concentrada não tenha sido separada no gel de eletroforese; o que não significa, portanto, ausência de proteína.

Na Figura 2B é mostrado o perfil eletroforético das proteínas dos extratos após a simulação da digestão gastrointestinal. Pode-se observar que as proteínas dos extratos foram degradadas, resultando na liberação de polipeptídeos de menor massa molecular. No extrato de café verde, após a digestão, foram observadas quatro bandas de cerca de 26; 10; 5; e 3 kDa. A banda de cerca de 26 kDa, pode corresponder a hidrólise do polipeptídeo de 37 kDa, mas também pode indicar que a subunidade β resistiu à digestão.

Ali et al. (2012) notaram que a subunidade α é fortemente hidrofílica e mais acessível à ação de enzimas, como a tripsina. A subunidade β , por ser mais hidrofóbica, não apresenta grupamentos da cadeia polipeptídica tão expostos a espécies reativas. Desta forma, é possível que a banda a 26 kDa seja, parcialmente, referente à resistência da subunidade β , e esta banda e as demais sejam referentes à hidrólise da subunidade α . Essa sensibilidade diferenciada à ação proteolítica sugere que a bioatividade deste extrato pode estar mais relacionada aos polipeptídeos liberados da subunidade α e do polipeptídeo de 10 kDa (Figura 2A).

Uma banda de cerca de 26 kDa foi observada tanto para o extrato de café torrado como para o extrato da borra, e pode corresponder a frações de proteína liberadas da estrutura polimérica resultante do processo de torração.

No extrato da borra de café, além da banda de 26 kDa, outras duas bandas de menor massa molecular (3,4 e 10 kDa) também apareceram. O tratamento hidrotérmico do pó de café torrado para a extração da bebida (percolação da água a 90 °C) pode ter ocasionado alguma desnaturação proteica, com desdobramento parcial da molécula, expondo mais ligações peptídicas susceptíveis à ação das proteases utilizadas para digestão gastrointestinal *in vitro* das proteínas, resultando assim, na liberação de peptídeos de menor massa molecular.

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos proteicos, antes e após a simulação da digestão gastrointestinal, foi avaliada pelos métodos de ABTS e FRAP (Tabela 3).

Antes da digestão, o extrato de café torrado apresentou os maiores valores de atividade antioxidante pelos dois métodos empregados. Também é possível observar que os valores obtidos tanto para o extrato de café torrado como para o extrato da borra são maiores daqueles obtidos para o extrato de café verde ($p < 0,05$). Essas diferenças podem ser atribuídas à incorporação das proteínas às melanoidinas durante a torração, levando à formação de materiais de massa molecular elevada, e com mais grupamentos químicos com atividade antioxidante (MONTAVON; MAURON; DURUZ, 2003). Esta incorporação também justifica as bandas das proteínas que não foram visualizadas no gel de eletroforese (Figura 2A).

As melanoidinas são estruturas poliméricas heterogêneas que contém várias frações com diferentes teores de carboidratos, proteínas e compostos fenólicos (TAGLIAZUCCHI; BELLESIA, 2015). A determinação da capacidade redutora está relacionada tanto ao teor de compostos fenólicos quanto a outros compostos doadores de elétrons como proteínas e melanoidinas (PÉREZ-MARTÍNEZ et al., 2010). É possível que, devido à natureza da estrutura polimérica das melanoidinas, compostos fenólicos estejam complexados a elas. Assim, tanto as correlações significativas ($p < 0,05$) entre a capacidade redutora e a atividade antioxidante pelos métodos de ABTS ($r = -0,74$) e FRAP ($r = -0,91$); bem como aquelas observadas entre os teores de melanoidinas e a atividade antioxidante por ABTS ($r = 0,66$) e FRAP ($r = 0,86$) indicam que as melanoidinas podem ter sido extraídas juntamente com a fração proteica. Bekedam et al. (2008) evidenciaram que a maior parte dos compostos antioxidantes que têm formação induzida pela torração são materiais de massa molecular elevada constituídos de arabinogalactanas e proteínas, que podem estar complexadas à estrutura polimérica das melanoidinas. Isto sugere, portanto, que a atividade antioxidante dos extratos de café torrado e da borra pode ser o resultado da ligação entre proteínas e melanoidinas.

Também foi observado que a atividade antioxidante do extrato da borra de café foi menor do que a observada para o extrato de café torrado. Parte dos compostos

antioxidantes formados pela torração podem ter sido extraídos no preparo da bebida, pois também houve redução nos valores de melanoidinas.

Após a digestão, o extrato de café verde mostrou os menores valores de atividade antioxidante. Comparando-se com os valores antes da digestão, mesmo o aumento sendo significativo ($p < 0,05$) para o método ABTS, os valores obtidos pelos dois métodos ficaram muito próximos, mostrando que a atividade antioxidante dos polipeptídeos liberados pela ação proteolítica (Figura 2B) não é tão expressiva. No café verde, a globulina 11S é a principal proteína de reserva. Interessantemente, tanto o potencial total da proteína como o potencial predito após a digestão *in silico* (Tabelas 1 e 2) mostraram que peptídeos antioxidantes podem ser gerados a partir da sequência polipeptídica, tais como IKK, LY, AH, EL, PHW, PHY, RHQ, VKL, KD, YVL, IR, LK, TY, TFE, VY e FLPE. No entanto, a frequência de ocorrência destes peptídeos é baixa, pois eles estão presentes em um extrato proteico bruto, onde há também outros peptídeos com funções biológicas distintas e, portanto, o que se percebe, é que a atividade antioxidante não é a principal atividade biológica desse extrato proteico.

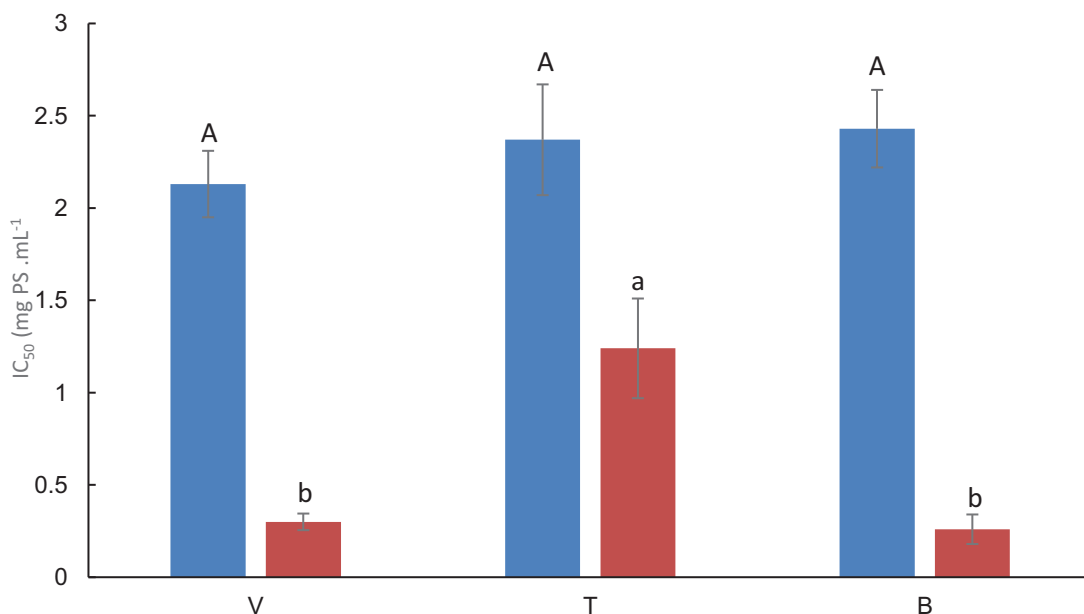
A atividade antioxidante pelo método de FRAP não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre o extrato de café torrado e da borra. No entanto, quando a atividade antioxidante foi determinada pelo método ABTS, pode-se observar que o extrato da borra apresentou maior atividade antioxidante do que o extrato de café torrado, ao contrário do que acontecia antes da digestão. A desnaturação adicional das proteínas da borra, ocorrida durante a percolação da água a 90 °C, facilitou a ação das enzimas digestivas, levando à produção de peptídeos de menor massa molecular (Figura 2B), e com diferentes atividades antioxidantes. As enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina têm especificidade de atuação e clivam as ligações peptídicas liberando peptídeos com extremidades contendo resíduos tais como tirosina, triptofano e lisina (MINKIEWICZ et al., 2008; NELSON; COX, 2013). Estes aminoácidos têm a capacidade de agirem como doadores de prótons e, portanto, podem apresentar maior atividade antioxidante pelo método ABTS devido ao mecanismo de sequestro de radicais livres (SARMADI; ISMAIL, 2010). Apesar de ter sido observado menor teor de melanoidinas no extrato da borra do que no extrato de café torrado, após a digestão, a atividade antioxidante pelo método de FRAP deste extrato se equiparou àquela do extrato de café torrado porque a atividade antioxidante também é proveniente dos segmentos de resíduos de aminoácidos que foram expostos e

liberados pela ação proteolítica, e não apenas pelo teor de melanoidinas. Isto sugere que a ação das enzimas proteolíticas permitiu a exposição de aminoácidos capazes de transferir elétrons e reduzir o íon ferro. Estes resultados mostram que tanto o café torrado quanto a borra podem ser úteis como fonte de materiais proteicos para a obtenção de moléculas bioativas antioxidantes.

3.5 INIBIÇÃO DA ECA

A IC_{50} é a concentração necessária para inibir 50% da atividade da ECA, e representa o potencial anti-hipertensivo de cada extrato. Quanto menor o valor, maior a eficiência de inibição da ECA. Na Figura 3 é mostrada a IC_{50} dos extratos proteicos, antes e após a simulação da digestão gastrointestinal.

Figura 3. IC_{50} da ECA para os extratos proteicos dos cafés verde (V) e torrado (T) e da borra de café (B), antes (barras azuis) e após (barras vermelhas) a *simulação in vitro* da digestão gastrointestinal.



• Barras com letras maiúsculas iguais não diferem entre si ($p < 0,05$)
 • Barras com letras minúsculas iguais não diferem entre si ($p < 0,05$)
 Resultados apresentados como a média \pm desvio padrão ($n = 3$)

Antes da digestão, a IC_{50} dos extratos proteicos variou de 2,13 a 2,43 mg proteína solúvel (PS).mL⁻¹. Os valores obtidos não condizem com potenciais inibidores da ECA relatados por vários autores para outras fontes proteicas (MEGÍAS et al.,

2004; MAKINEM et al., 2008; RUI et al., 2013), uma vez que a proteína nativa não apresenta características estruturais, citadas anteriormente no estudo *in silico*, para atuar como inibidor da ECA.

O processo de digestão gastrointestinal cliva moléculas de proteínas gerando cadeias polipeptídicas mais curtas. Assim, após a simulação da digestão gastrointestinal, a eficiência de inibição aumentou de forma expressiva para todos os extratos. O extrato de café verde ($IC_{50} = 0,30 \text{ mg PS.mL}^{-1}$) digerido teve uma inibição superior a sete vezes se comparado com o extrato antes da digestão ($IC_{50} = 2,13 \text{ mg PS.mL}^{-1}$). O extrato da borra ($IC_{50} = 0,27 \text{ mg PS.mL}^{-1}$) digerido, por sua vez, teve uma inibição da ECA nove vezes maior do que antes da digestão ($IC_{50} = 2,37 \text{ mg PS.mL}^{-1}$).

O extrato de café verde mostrou maior eficiência de inibição da ECA quando comparado ao extrato de café torrado. Também é perceptível que entre os extratos de café verde e da borra de café não houve diferença significativa na eficiência de inibição ($p > 0,05$). Analisando estes resultados juntamente com os perfis eletroforéticos dos extratos após a digestão (Fig.2B), percebe-se que os extratos de café verde e da borra apresentaram maior suscetibilidade à ação das proteases gastrointestinais, o que resultou na liberação de peptídeos de menor massa molecular (3,4 a 6,5 kDa, por exemplo), se comparado ao extrato de café torrado (26,6 kDa). Polipeptídeos menores podem ter melhor interação com os sítios catalíticos da enzima, o que poderia justificar, portanto, a melhor eficiência de inibição encontrada para estes extratos.

É muito provável que a atividade de inibição da ECA demonstrada pelos extratos de café verde e da borra seja devido às características estruturais dos peptídeos inibidores formados durante a digestão e que foram preditos pela base de dados BIOPEP.

No extrato de café torrado ($IC_{50} = 1,18 \text{ mg PS.mL}^{-1}$), apesar de terem sido liberados peptídeos com massas moleculares maiores, também foi possível observar uma maior eficiência de inibição da ECA após a digestão. Este aumento somente foi possível devido à hidrólise da estrutura polimérica das melanoidinas que estavam ligadas às proteínas. As melanoidinas, que são polímeros de estrutura não completamente elucidada, têm caráter aniônico e, conseqüentemente, eficiência em quelar íons metálicos (RUFIAN-HENARES; MORALES, 2007). De Marco, Fischer e Henle (2011) propuseram que grupamentos orto-hidroxil e carboxil de origem fenólica

em melanoidinas isoladas de café podem estar envolvidos na interação com íons metálicos de metalopeptidases, tais como a ECA. Como a ECA é uma peptidase que depende de Zn^{2+} para a atividade catalítica, a atividade de inibição dos extratos de café torrado pode estar relacionada, pelo menos em parte, à propriedade quelante das melanoidinas. Portanto, a redução do valor de IC_{50} , do extrato de café torrado pode ser consequência não apenas das características estruturais da fração peptídica, mas também da interação da enzima com grupamentos específicos das melanoidinas.

Desta forma, a simulação da digestão gastrointestinal dos extratos proteicos foi capaz de liberar potenciais inibidores da ECA. Atividade de inibição comparável à do extrato do café verde é possível de ser obtida a partir de peptídeos que podem ser isolados da borra de café, um subproduto do processamento do café.

4 CONCLUSÃO

A globulina 11S é precursora de uma série de peptídeos que podem atuar principalmente como inibidores de enzimas envolvidas na regulação do metabolismo do corpo humano. A digestão gastrointestinal simulada dos extratos proteicos dos cafés verde e torrado e da borra de café é capaz de liberar peptídeos inibidores da ECA, e que também são capazes de sequestrar espécies reativas e quelar íons metálicos, podendo exercer atividades anti-hipertensiva e antioxidante.

Os extratos de café verde e da borra de café apresentaram maiores eficiências de inibição da ECA e, portanto, os maiores potenciais anti-hipertensivos. Isto se deve à menor massa molecular dos peptídeos liberados após a digestão. No entanto, o extrato de café verde tem menor atividade antioxidante em comparação aos extratos de café torrado e da borra de café. Essa maior atividade antioxidante pode ser atribuída às interações formadas entre proteínas e melanoidinas durante a torração. Assim, a borra de café, que é um subproduto do processamento do café, é uma interessante matéria-prima para obtenção de substâncias bioativas anti-hipertensivas e antioxidantes.

5 REFERÊNCIAS

ALI, M.; HOMANN, T.; KREISEL, J.; KHALIL, M.; PUHLMANN, R.; KREISEL, H.-P.; RAWEL, H. Characterization and modeling of the interactions between coffee storage proteins and phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, p.11601–11608, 2012.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis; Horwitz, W., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 1995.

BAÚ, S.M.T.; MAZZAFERA, P.; SANTORO, L.G. Seed storage proteins in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.13, n.1, p.33-40, 2001.

BEKEDAM, E. K.; SCHOLS, H. A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S; SMIT, G. High molecular weight melanoidins from coffee brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, n.20, p. 7658-7666, 2006.

BEKEDAM, E.K.; LAAT, M.P.F.C.; SCHOLS, H.A.; VAN BOEKEL, M.A.J.S.; SMIT, G. Arabinogalactan proteins are incorporated in negatively charged coffee brew melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.55, p.761-768, 2007.

BEKEDAM, E. K.; SCHOLS, H. A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S; SMIT, G. Electron Spin Resonance (ESR) studies on the formation of roasting-induced antioxidative structures in coffee brews at different degrees of roast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, n.12, p. 4597–4604, 2008.

BENZIE, I. F. F; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 239, n. 292, p.70-76, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAETANO, N.S.; SILVA, V.F.M.; MELO, A.C.; MARTINS, A.A.; MATA, T.M. Spent coffee grounds for biodiesel production and other applications. **Clean Technologies and Environmental Policy**, Nova York, v.16, p.1423-1430, 2014.

CAETANO, N.S.; CALDEIRA, D.; MARTINS, A.A.; MATA, T.M. Valorisation of spent coffee grounds: production of biodiesel via enzymatic catalysis with ethanol and a Co-solvent. **Waste and Biomass Valorization**, Netherlands, v.8, n.6, p.1981-1994, 2017.

CAVAZOS, A.; GONZALEZ, E.G. Identification of bioactive peptides from cereal storage proteins and their potential role in prevention of chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v.13, p.364-380, 2013.

CHANG, Y-W.; ALLI, I. *In silico* assessment: Suggested homology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) legumin and prediction of ACE-inhibitory peptides from chickpea proteins using BLAST and BIOPEP analyses. **Food Research International**, Essex, v. 49, p.477–486, 2012.

CRUZ, J.N.; PIMENTA, D.C.; MELO, R.L.; NASCIMENTO, J.R.O. Isolation and biochemical characterisation of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived of the enzymatic hydrolysis of cupuassu seed protein isolate. **Journal of Functional Foods**, Amsterdã, v.27, p.104-114, 2016.

CUSHMAN, D.W.; CHEUNG, H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, Oxford, v.20, p.1637-1648, 1971.

DALIRI, E.B-M.; LEE, D.H.; OH, B.H. Bioactive peptides. **Foods**, Basel, v.6, n.5, p.32-52, 2017.

DASKAYA-DIKMEN, C.; YUCETEPE, A.; KARBANCIOGLU-GULER, F.; DASKAYA, H.; OZCELIK, B. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. **Nutrients**, Basel, v.9, p.316-334, 2017.

DE MARCO, L.M.; FISCHER, S.; HENLE, T. High molecular weight coffee melanoidins are inhibitors for matrix metalloproteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.59, p.11417–11423, 2011.

ESCUADERO, E.; MORA, L.; TOLDRÁ, F. Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, Barking, v.161, p.305–311, 2014.

ESPINOSA-HERNÁNDEZ, E.; MORALES-CAMACHO, J. I.; FERNÁNDEZ-VELASCO, D. A.; BENÍTEZ-CARDOZA, C. G.; ROSAS-CÁRDENAS, F. F.; LUNA-SUÁREZ, S. The insertion of bioactive peptides at the C-terminal end of an 11S globulin changes the structural stability and improves the antihypertensive activity. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.37, p.18–24, 2019.

FROST- MEYER, N.; LOGOMARSINO, J.V. Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. **Journal of Functional Foods**, Amsterdã, v.4, p.819-830, 2012.

FU, Y.; ALASHI, A.M.; YOUNGA, J.F.; THERKILDSENA, M.; ALUKO, R.E. Enzyme inhibition kinetics and molecular interactions of patatin peptides with angiotensin I-converting enzyme and renin. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdã, v. 101, p. 207–213, 2017.

GEROMEL, C.; FERREIRA, L.P.; DAVRIEUX, F.; GUYOT, B.; RIBEYRE, F.; SCHOLZ, M.B.S.; PEREIRA, L.F.P.; VAAST, P.; POT, D.; LEROY, T.; ANDROCIOLI FILHO, A.; VIEIRA, L.G.E.; MAZZAFERA, P.; MARRACCINI, P. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, p.569-579, 2008.

GISMONDI, R.A.O.; OIGMAN, W. Inibidores diretos da renina no tratamento da hipertensão arterial sistêmica. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v.10, n.3, p.81-86, 2011.

GODOS, J.; PLUCHINOTTA, F.R.; MARVENTANO, S.; BUSCEMI, S.; LI VOLTI, G.; GALVANO, F.; GROSSO, G. Coffee components and cardiovascular risk: beneficial and detrimental effects. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v.65, n.8, p.925–936, 2014.

GUO, F.; XIONG, Y.L.; QIN, F.; JIAN, H.; HUANG, X.; CHEN, J. Surface properties of heat-induced soluble soy protein aggregates of different molecular masses. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 80, n.2, p.C279-C287, 2015.

HEIMBECK, I.G.R. Desenvolvimento de metodologias para identificação de proteínas e metabólitos durante o desenvolvimento de frutos de café (*Coffea arabica* L.) (Dissertação). Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2011.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M.M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdã, v.165, p.23–35, 2011.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO, 2019). Coffee Market Report (July 2019). Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-0719-e.pdf>>. Acesso em 05 ago. 2019

KALSCHNE, D.L.; BIASUZ, T.; CONTI, A.J.; VIEGAS, M.C.; CORSO, M.P.; BENASSI, M.T. Sensory characterization and acceptance of coffee brews of *C.arabica* and *C. canephora* blended with steamed defective coffee. **Food Research International**, Essex, p.1-25 (manuscrito), 2018.

KÜHN-WACHEA, K.; BÄR, J.W.; HOFFMANN, T.; WOLF, R.; RAHFELD, J-U.; DEMUTH, H-U. Selective inhibition of dipeptidyl peptidase 4 by targeting a substrate-specific secondary binding site. **Biological Chemistry**, Berlim, v. 392, p. 223–231, 2011.

LACROIX, I.M.E.; LI-CHAN, E.C. Comparison of the susceptibility of porcine and human dipeptidyl-peptidase IV to inhibition by protein-derived peptides. **Peptides**. Nova York, v. 69 p.19–25, 2015.

LACROIX, I.; LI-CHAN, E. Food-derived dipeptidyl-peptidase IV inhibitors as a potential approach for glycemic regulation e Current knowledge and future research considerations. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.54, p1-16, 2016.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, Londres, p. 680–685, 1970.

LIMA, A.R.; PEREIRA, R.G.F.A; ABRAHÃO, S.A.; DUARTE, S.M.S; PAULA, F.B.A. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, São Paulo, v.33, n.1, p. 20-24, 2010.

LUDWIG, E.; LIPKE, U.; JÄGE, U.R.A. Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.211, p.111-116, 2000.

MÄKINEN, S.; KELLONIEMI, J.; PIHLANTO, A.; MÄKINEN, K.; KORHONEN, H.; HOPIA, A.; VALKONEN, J.P.T. Inhibition of angiotensin converting-enzyme I caused by autolysis of potato proteins by enzymatic activities confined to different parts of the potato tuber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, p.9875–9883, 2008.

MARGATAN, W.; RUUD, K.; WANG, Q.; MARKOWSKI T.; ISMAIL, B. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of soy protein subjected to selective hydrolysis and thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p.3460–3467, 2013.

MEGÍAS, C.; YUST, M.M; PEDROCHE, J.; LQUARI, H; GIRÓN-CALLE, J.G.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, p.1928-1932, 2004

MINKIEWICZ P.; DZIUBA J.; IWANIAK A.; DZIUBA M.; DAREWICZ, M. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.91, p. 965-980, 2008.

MONTAVON P; MAURON, A.F.; DURUZ, E. Changes in green coffee protein profiles during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.8, p.2335–2343, 2003.

NEVES, M.F.; CUNHA, A.R.; CUNHA, M.R.; GISMONDI, R.A.; OIGMAN, W. The role of renin–angiotensin–aldosterone system and its new components in arterial stiffness and vascular aging. **High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention**, Nova York, v.25, n.2, p.137–145, 2018.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2013, 6ª edição, 1250 p.

NONGONIERMA, A.B.; FITZGERALD, R.J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk-derived dipeptides and hydrolysates. **Peptides**, New York, v.39, p.157- 163, 2013

NONGONIERMA, A. B.; HENNEMANN, M.; PAOLELLA, S.; FITZGERALD, R.J. Generation of wheat gluten hydrolysates with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties. **Food and Function**, Cambridge, v.8, n.6, p.2249-2257, 2017.

NUNES, F.M.; COIMBRA, M.A. Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted arabica coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, p.1773-1782, 2001.

NUNES, F.M.; CRUZ, A.C.S.; COIMBRA, M.A. Insight into the mechanism of coffee melanoidin formation using modified “in bean” models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, p.8710-8719, 2012.

ONUH, J.O.; GIRGIH, A. T.; MALOMO, S. A.; ALUKO, R. E.; ALIANI, M. Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Functional Foods**, Amsterdã, v.14, p.133–143, 2015.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, L.M.; CHÁVEZ-QUIROZ, K.; MEDINA-JUÁREZ, L.A.; GÁMEZ MEZA, N. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from *coffea arabica* and *coffea canephora*. **Journal of the Mexican Chemical Society**, Cidade do México, v. 56, n.4, p.430-435, 2012.

PERÉZ-MARTINEZ, M.; CAEMMERER, B.; PEÑA, M.P.; CID, C.; KROH, L.W. Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.58, p.2958–2965, 2010.

POWER, O.; NONGONIERMA, A.B.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R.J. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. **Proceedings of the Nutrition Society**, Londres, v.73, p.34–46, 2014.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>> Acesso em: 02 a 08 set. 2018.

ROCHA, T.S.; HERNÁNDEZ, L.M.R.; CHANG, Y.K.; MEJÍA, E.G. Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. **Food Research International**, Essex, v.64, p.799–809, 2014.

ROGERS, W. J.; BÉZARD, G.; DESHAYES, A.; MEYER, I.; PÉTIARD, V.; MARRACCINI, P. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.37, n.4, p.261-272, 1999.

ROMDHANE, M.B.; KRICHEN, F.; GHAZALA, I.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; HADDAR, A. Effect of extraction methods on chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of coffee residue. **Journal of Food Processing and Preservation**, Malden, v.41, p. 1-10, 2017.

ROSA, J.S.; SILVA, O.F.; GODOY, R.L.O; REZENDE, C.M. Roasting Effects on Nutritional and Antinutritional Compounds in Coffee. In: JAISWAL, A. K. (Ed.). **Food processing technologies: impact on product attributes**. Boca Raton: CRC Press, 2016, cap. 4, p. 47-76.

RUFÍAN-HENARES, J.A.; MORALES, F. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.55, p.1480-1485, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; PÉREZ-GIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}**. Comunicado Técnico 128. Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, p.1-4, 2007.

RUI, X.; BOYEA, J.I.; SIMPSON, B.K.; PRASHERB, S.O. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (*Phaseolus vulgaris*) hydrolysates. **Food Chemistry**, Barking, v.5, p.1116-1124, 2013.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v.166, p. 368-379, 1987.

SETAYESH-MEHR, Z.; ASOODEH, A. The inhibitory activity of HL-7 and HL-10 peptide from scorpion venom (*Hemiscorpius lepturus*) on angiotensin converting enzyme: Kinetic and docking study. **Bioorganic Chemistry**, Nova York, v.75, p.30–37, 2017

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, Nova York, v.299, p. 152, 1999.

TAGLIAZUCCHI, D. Melanoidins from coffee and lipid peroxidation. In: PREDDY, V. Coffee in health and disease prevention. Londres: Academic Press, 2015.

TAGLIAZUCCHI, D.; BELLESIA, A. The gastrointestinal tract as the major site of the biological action of dietary melanoidins. **Amino acids**, Wien, v.47, n.6, p.1087-1099, 2015.

TAGLIAZUCCHI, D.; SHAMSIA, S.; HELAL, A.; CONTE, A. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion. **International Dairy Journal**, Barking, v. 71, p. 6-16, 2017.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. Effect of dietary melanoidins on lipid peroxidation during simulated gastric digestion: their possible role in the prevention of oxidative damage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.58, n.4, p.2513–2519, 2010.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, Londres, v.45, Database issue, D158-D169, 2017.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n.1, p. 11-24, 2012.

VINECKY, F. Identificação e caracterização de peptídeos opioides presentes na fração proteica de grãos de *Coffea arabica* (Tese). Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

WANG, B.; ATUNGULU, G.G.; KHIR, R.; GENG, J.; MA, H.; LI, Y.; WU, B. Ultrasonic treatment effect on enzymolysis kinetics and activities of ace-inhibitory peptides from oat-isolated protein. **Food Biophysics**, Nova York, v.10, p.244–252, 2015a.

WANG, F.; YU, G.; ZANG, Y.; ZANG, B.; FAN, J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides derived from oat (*Avena sativa* L.), buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), and highland barley (*Hordeum vulgare trifurcatum* (L.) Trofim) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.63, p.9543–9549, 2015b.

WANG, J.; CHI, Y.; CHENG, Y.; ZHAO, Y. Physicochemical properties, in vitro digestibility and antioxidant activity of dry heated egg white protein. **Food Chemistry**, Barking, v.246, p.18-25, 2018.

WANG, R.; ZHAO, H.; PAN, X.; ORFILA, C.; LU, W.; MA, Y. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of α -glucosidase inhibitory peptides from soy protein. **Food Science and Nutrition**, v.7, p.1848-1856, 2019.

WYVRATT, M. J.; PATCHET, A. Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, Nova York, v.5, p.485-521, 1985.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo mostra que há um potencial bioativo encriptado nas proteínas dos cafés verde e torrado e na borra de café. Peptídeos inibidores da ECA e antioxidantes, os quais tiveram ocorrência predita no estudo *in silico* e evidenciada no estudo *in vitro*, podem ser liberados pela ação da digestão gastrointestinal.

Na borra de café, um subproduto do processamento do café, evidencia-se tanto o potencial anti-hipertensivo quanto o antioxidante na sua fração proteica. Esse potencial pode, em estudos posteriores, ser investigado quanto a aplicações em alimentos. No entanto, estudos posteriores são necessários para identificar e avaliar a ação dos peptídeos isolados dos três extratos.

Desta forma, o café pode ser fonte de peptídeos capazes de contribuir para reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Possíveis efeitos benéficos à saúde humana podem ser obtidos tanto pela ingestão da proteína isolada do café, como dos peptídeos identificados e isolados. As proteínas isoladas podem ser utilizadas como ingredientes de alimentos funcionais, e terem sua ação biológica manifestada pela digestão. Os peptídeos, por sua vez, além de poderem ser aplicados em matrizes alimentares, podem ter aplicação farmacológica. No entanto, estudos posteriores são necessários para identificar e avaliar a ação dos peptídeos isolados dos três extratos antes de se definir quaisquer aplicações.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 1S. Sequência de aminoácidos da globulina 11S do café arábica. Número de entrada: Q9ZNY2_COFAR (número NCBI: 13443)

MAHSHMISLSLYVLLFLGCLAQLGRPQPRLRGKTQCDIQLNAQEPSFRFPSEAGLTEFWDSNNPEF
 GCAGVEFERNTVQPKGLRRLPHYSNVPKFVYVVEGTGVQGTVIPGCAETFESQGESFWGGQEQPGK
 GQEGQEQQSGKGGQEGRRQRFDRHQKLRRFQKGDVLILLPGFTQWTYNDGDVPLVTVALLDVANE
 ANQLDLQSRKFFLAGNPQQGGGKEGHQGGQQQHRNIFSGFDDQLLADAFNVDLKIQQKLGPKDQR
 GSTVRAEKLQLFLPEYSEQVQQPQQQEQQQHGVGRGWRSNGLLEETLCTVKLSENIQLPQEADVFN
 PRAGRITTVNSQKIPILSSLQLSAERGFLYSNAIFAPHWNINAHNALYVIRGNARIQVVDHKGNKVFDDDE
 VKQGQLIIVPQYFAVIKKAGNQGFYVAFKTNDNAMINPLVGRLSAFRAIPEEVLRSSFQISSEEAEEK
 YGRQERLLLSEQSQQGKKRSCLS

Cada letra da sequência representa um aminoácido. Nomenclatura: A = alanina; C = cisteína; H = histidina; I = isoleucina; M = metionina; S = serina; V = valina; G = glicina; L = leucina; P, prolina; T = treonina; F = fenilalanina; R = arginina; Y = tirosina; W = triptofano; D = ácido aspártico; N = asparagina; E = ácido glutâmico; Q = glutamina; K = lisina.

Fonte: UNIPROT CONSORTIUM, 2017.

