

LUCIANA MARQUES CARDOSO

**EFEITOS DE TINTURAS DE CAFÉ NA OSTEOPOROSE  
E NO DIABETES E DO FLAVONÓIDE HESPERIDINA NA  
OSTEOPOROSE**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

LUCIANA MARQUES CARDOSO

**EFEITOS DE TINTURAS DE CAFÉ NA OSTEOPOROSE E  
NO DIABETES E DO FLAVONÓIDE HESPERIDINA NA  
OSTEOPOROSE**

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

APROVADA: 25 de março de 2008.

---

Prof. Tanus Jorge Nagem  
(co-orientador)

---

Prof. Paulo Cesar Stringheta  
(co-orientadora)

---

Prof. Sergio Pacheco

---

Prof. Aloísio da Silva Pinto

---

Prof<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

**Seja o que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que quer.**

**Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.  
Dificuldades para fazê-la forte.  
Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.**

**As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus  
caminhos.**

**A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam.  
Para aqueles que buscam e tentam sempre.  
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam  
por suas vidas.  
“Clarice Lispector”**

*Dedico esta dissertação aos meus pais, Cyriaco (in memoriam) e Flávia. Obrigada pela dedicação, apoio, incentivo, confiança, alegria, carinho e pelo amor sempre presente em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tornar tudo possível.

À minha família: meus pais Cyriaco (*in memoriam*) e Flávia, meu irmão Rogério e minha avó Tetela, que são muito especiais em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

Agradeço de forma especial, a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira, pela confiança, atenção, apoio, amizade, palavras de consolo e por todo o ensinamento.

Aos meus co-orientadores e participantes da banca, por participar da concretização de mais uma etapa da minha formação profissional.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, pela paciência e pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

À Maria Aparecida Leão e todos que colaboraram para meu trabalho.

Ao Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves pela valiosa contribuição nas análises estatísticas.

Aos estagiários: Luis Eugênio, Daiana, Rodrigo e Rosana, pela valiosa contribuição na realização dos experimentos.

Ao José Geraldo Pinto, pela ajuda na realização das análises bioquímicas.

À Priscila, pela presença e apoio durante as dificuldades neste período.

Ao Ângelo, pelo incentivo e compreensão.

À Paula, Ana Paula e Cristiane pelo incentivo e amizade.

Às amigas de república Priscila, Simone e Luíza.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Luciana Marques Cardoso, filha de Cyriaco Cardoso Teixeira e Flávia Maria Franklin Marques Cardoso, natural de São Geraldo – MG, onde cursou o primeiro grau.

Concluiu o segundo grau em dezembro de 1997, no colégio Anglo em Viçosa – MG.

Em março de 2000 ingressou no curso de Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa (UFV), diplomando-se em julho de 2004.

Em outubro de 2006, ingressou no mestrado do Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>1) INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>2) REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1) DIABETES .....	3
2.2) FATORES DE RISCO .....	9
2.3) PREVENÇÃO E TRATAMENTO .....	10
2.4) DIABETES E ALOXANO .....	11
2.5) CAFÉ .....	12
2.6) COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ .....	13
2.7) CAFEÍNA .....	23
2.8) CAFÉ E DIABETES .....	26
2.8.1) POSSÍVEIS MECANISMOS .....	28
2.8.1.1) CAFEÍNA .....	29
2.8.1.2) ÁCIDO CLOROGÊNICO .....	30
2.8.1.3) LIGNINAS .....	33
2.8.1.4) OUTROS CONSTITUINTES DO CAFÉ .....	33
2.8.1.5) OUTROS MECANISMOS DE AÇÃO .....	36
<b>3) OBJETIVOS</b> .....	38
3.1) OBJETIVOS GERAIS .....	38
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>4) MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
4.1: Efeito das tinturas preparadas com frutos verdes, frutos cereja e cascas de frutos cereja do café catuaí vermelho em ratos diabéticos .....	41
4.2: Efeito das tinturas preparadas com folhas secas e folhas verdes do café catuaí vermelho em ratos diabéticos .....	41
4.3: Efeito das tinturas preparadas com café solúvel em ratos diabéticos ..	42

<b>5) RESULTADOS</b> .....	43
5.1) Efeito das tinturas preparadas com casca de fruto cereja, fruto verde e fruto cereja do café catuaí vermelho em ratos diabéticos .....	43
5.2) Efeito das tinturas preparadas com folha seca e folha verde do café catuaí vermelho em ratos diabéticos .....	50
5.3) Efeito das tinturas preparadas com café solúvel .....	56
<b>6) DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>7) CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	85
<b>1) INTRODUÇÃO</b> .....	86
<b>2) REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	87
2.1) TECIDO ÓSSEO .....	87
2.2) REMODELAÇÃO ÓSSEA .....	88
2.3) OSTEOPOROSE .....	90
2.4) FATORES DE RISCO PARA OSTEOPOROSE .....	92
2.5) PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE .....	94
2.6) MARCADORES BIOQUÍMICOS DA REMODELAÇÃO ÓSSEA .....	102
2.6.1) MARCADORES DE FORMAÇÃO ÓSSEA .....	103
2.6.2) MARCADORES DE RESORÇÃO ÓSSEA .....	105
2.7) OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDES.....	108
2.8) FLAVONÓIDES .....	112
2.9) FLAVONÓIDES E OSTEOPOROSE .....	114
2.10) CAFÉ E OSTEOPOROSE .....	127
<b>3) OBJETIVOS</b> .....	131
3.1) OBJETIVOS GERAIS .....	131
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	131
<b>4) MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	132
<b>5) RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	134
5.1) ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .....	
5.2) ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS .....	
<b>6) CONCLUSÃO</b> .....	
<b>7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Evolução do número de atendimentos a portadores de diabetes pela atenção básica no período de 1998 a 2004. (Sistema de Informação da Atenção Básica, SIAB, Ministério da Saúde) .....	5
Figura 2 - Estrutura química do Aloxano .....	12
Figura 3 - Estrutura Química da Cafeína.....	15
Figura 4 - Estrutura química da Trigonelina.....	17
Figura 5 - Estrutura química do Ácido Nicotínico e da N-Metilnicotinamida .....	17
Figura 6 - Estrutura química dos Ácidos Clorogênicos .....	18
Figura 7 - Estrutura química do Ácido Quínico .....	20
Figura 8 - Estrutura química do Cafestol .....	21
Figura 9 - Estrutura química do Caveol .....	21
Figura 10 - Estrutura química do 16-O-metilcafestol. ....	22
Figura 11 - Ações do GLP-1 nos tecidos periféricos .....	31
Figura 12 - Inibição da atividade da 11 $\beta$ -HSD1 por extratos de café em diferentes concentrações em células lisadas .....	37

### CAPÍTULO 2

Figura 1 - Processo de remodelação óssea .....	90
Figura 2 - Mecanismo de ação das estatinas e dos bifosfonatos na cascata da prenilação de proteínas (adaptado de Braga JR <i>et al.</i> , 2002).....	102
Figura 3 - Aspecto multifatorial da fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide (Silva, 2006) .....	112
Figura 4 - Estrutura básica dos flavonóides .....	114
Figura 5 - Estrutura molecular da $\alpha$ -glicosilhesperidina .....	120
Figura 6 - Modelo proposto da apoptose de células osteoblásticas MC3T3-E1 mediada pelo TNF- $\alpha$ e acelerada pela presença de quercetina. ....	123

## LISTA DE QUADROS

### **CAPÍTULO 1**

Quadro 1: Classificação do Diabetes Mellitus .....	6
Quadro 2 - Critérios diagnósticos para a presença de anormalidades da tolerância à glicose, segundo a ADA-2005 .....	8
Quadro 3. Fatores de risco para o diabetes tipo 2 .....	10
Quadro 4 Funções do GLP-1 .....	32
Quadro 5 Componentes do café e possíveis mecanismos no metabolismo da glicose .....	35

### **CAPÍTULO 2**

Quadro 1. Fatores de risco para a osteoporose .....	93
Quadro 2. Recomendações diárias para cálcio segundo faixa etária e condição fisiológica .....	96
Quadro 3. Ingestão diária recomendada de cálcio (em mg/dia) para mulheres em diferentes situações .....	97
Quadro 4. Fontes alimentares de cálcio na alimentação humana .....	98
Quadro 5. Relação de marcadores de remodelação e suas respectivas abreviaturas sugeridas pelo Comitê Científico da Fundação Internacional de Osteoporosis .....	108

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Composição aproximada dos grãos de café verdes e torrados, das espécies Arábica e Robusta .....	14
Tabela 2. Valores médios de colesterol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.....	43
Tabela 2A. Comparação das diferentes doses de tintura de casca cereja do café com relação ao parâmetro colesterol .....	44
Tabela 2B. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto verde do café com relação ao parâmetro colesterol .....	44
Tabela 2C. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto cereja do café com relação ao parâmetro colesterol .....	45
Tabela 3. Valores médios de triacilglicerol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	45
Tabela 3A. Comparação das diferentes doses de tintura de casca cereja do café com relação ao parâmetro triacilglicerol.....	46
Tabela 3B. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto verde do café com relação ao parâmetro triacilglicerol .....	46
Tabela 3C. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto cereja do café com relação ao parâmetro triacilglicerol .....	47
Tabela 4. Valores médios de glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	47
Tabela 4A. Comparação das diferentes doses de tintura de casca cereja do café com relação ao parâmetro glicose.....	48
Tabela 4B. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto verde do café com relação ao parâmetro glicose.....	48
Tabela 4C. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto cereja do café com relação ao parâmetro glicose .....	48
Tabela 5. Valores médios de colesterol, triacilglicerol e glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	49
Tabela 6. Valores médios de colesterol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	50

Tabela 6A. Comparação das diferentes doses de tintura de folha seca do café com relação ao parâmetro colesterol .....	51
Tabela 6B. Comparação das diferentes doses de tintura de folha in natura do café com relação ao parâmetro colesterol.....	51
Tabela 7. Valores médios de triacilglicerol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.....	51
Tabela 7A. Comparação das diferentes doses de tintura de folha seca do café com relação ao parâmetro triacilglicerol.....	52
Tabela 7B. Comparação das diferentes doses de tintura de folha verde do café com relação ao parâmetro triacilglicerol .....	52
Tabela 8. Valores médios de glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	53
Tabela 8A. Comparação das diferentes doses de tintura de folha seca do café com relação ao parâmetro glicose .....	53
Tabela 8B. Comparação das diferentes doses de tintura de folha verde do café com relação ao parâmetro glicose .....	54
Tabela 9. Valores médios de colesterol, triacilglicerol e glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	55
Tabela 10. Valores médios de colesterol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	56
Tabela 11. Valores médios de triacilglicerol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	57
Tabela 12. Valores médios de glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	57
Tabela 13. Valores médios de glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos .....	58

## **CAPÍTULO 2**

Tabela 1. Valores médios de glicose (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	136
Tabela 2. Valores médios de glicose (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	136

Tabela 3. Valores médios de colesterol (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	139
Tabela 4. Valores médios de colesterol (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	139
Tabela 5. Valores médios de triacilglicerol (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	140
Tabela 6. Valores médios de triacilglicerol (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	141
Tabela 7. Valores médios de proteínas totais (g/L) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	142
Tabela 8. Valores médios de proteínas totais (g/L) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	142
Tabela 9. Valores médios de albumina (g/L) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	143
Tabela 10. Valores médios de albumina (g/L) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	144
Tabela 11. Valores médios de gama GT (UI) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	145
Tabela 12. Valores médios de gama GT (UI) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	145
Tabela 13. Valores médios de fosfatase alcalina total (UI) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí	

vermelho.....	148
Tabela 14. Valores médios de fosfatase alcalina total (U/L) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	148
Tabela 15. Valores médios de cálcio (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	150
Tabela 16. Valores médios de cálcio (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	150
Tabela 17. Valores médios de fósforo (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	151
Tabela 18. Valores médios de fósforo (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	152
Tabela 19. Valores médios de uréia (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	153
Tabela 20. Valores médios de uréia (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	153
Tabela 21. Valores médios de creatinina (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	154
Tabela 22. Valores médios de creatinina (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	155
Tabela 23. Valores médios de leucócitos totais ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	158
Tabela 24. Valores médios de leucócitos totais ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide	

hesperidina.....	158
Tabela 25. Valores médios de linfócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	159
Tabela 26. Valores médios de linfócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	160
Tabela 27. Valores médios de mielócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	161
Tabela 28. Valores médios de mielócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	161
Tabela 29. Valores médios de granulócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	162
Tabela 30. Valores médios de granulócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	162
Tabela 31. Valores médios de contagem de eritrócitos totais ( $10^6\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	163
Tabela 32. Valores médios de contagem de eritrócitos totais ( $10^6\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	164
Tabela 33. Valores médios de hemoglobina (g/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	166
Tabela 34. Valores médios de hemoglobina (g/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	166
Tabela 35. Valores médios de hematócrito (%) em soro sanguíneo de	

coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	167
Tabela 36. Valores médios de hematócrito (%) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	168
Tabela 37. Valores médios de hematócrito (%) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	169
Tabela 38. Valores médios de volume corpuscular médio (VCM) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	169
Tabela 39. Valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	170
Tabela 40. Valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	171
Tabela 41. Valores médios de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.....	171
Tabela 42. Valores médios de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	171
Tabela 43. Valores médios de amplitude de distribuição do tamanho das hemácias (RDW) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	172
Tabela 44. Valores médios de amplitude de distribuição do tamanho das hemácias (RDW) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.....	173

## RESUMO

Cardoso, Luciana Marques, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, março de 2008. **Efeito de tinturas de café na osteoporose e no diabetes e do flavonóide hesperidina na osteoporose.** Orientador: Tânia Toledo de Oliveira. Co-orientadores: Tanus Jorge Nagem, Paulo César Stringheta e Ricardo Junqueira Del Carlo.

O consumo de café tem sido associado com um menor risco de diabetes. Entretanto, os compostos específicos e os mecanismos responsáveis por este efeito não estão claros. Foram realizados três experimentos para avaliar tinturas do café (*Coffea arabica*) catuaí vermelho em ratos com diabetes induzido pela administração de aloxano (60mg/kg de peso corporal). No primeiro experimento foram utilizadas as tinturas da casca cereja, fruto verde e fruto cereja do café. No segundo experimento os animais foram tratados com as tinturas da folha seca e folha verde do café. E no terceiro experimento foi utilizada a tintura de café solúvel torrado de uma marca comercial. Todas as tinturas foram testadas nas doses de 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL. Após 30 dias de tratamento, foram coletados amostras de sangue dos animais para dosagens séricas de glicose, colesterol e triacilglicerídeo. As tinturas de casca cereja (1,0 mL), fruto verde (0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL), fruto cereja (1,0 mL e 2,0 mL), folha verde (0,5 mL, e 1,0 mL) e café solúvel (1,0 mL e 2,0 mL) promoveram um pequeno aumento, porém significativo, nos níveis de colesterol comparado ao grupo doente não tratado. A tintura folha seca (2,0 mL) foi a única capaz de reduzir significativamente as concentrações de colesterol. Com relação aos níveis de glicose e triacilglicerol, observou-se que todas as tinturas reduziram significativamente estes parâmetros, com exceção do tratamento com a tintura de café solúvel (2,0 mL) que não reduziu o triacilglicerol. As porcentagens de redução das concentrações de glicose e triacilglicerol variaram entre 20 a 49% e 27 a 57%, respectivamente. Os benefícios das tinturas de café utilizadas neste trabalho nos níveis de glicose e triacilglicerol se sobrepõem ao possível efeito negativo sobre o parâmetro colesterol, indicando que estas tinturas podem ser promissoras para o tratamento do diabetes. Com relação a osteoporose, o consumo de cafeína, substância presente no café, tem sido

associado como um fator de risco. E o flavonóide cítrico hesperidina tem sido avaliado como um potente antiinflamatório por apresentar atividade antioxidante. Seu efeito antioxidante inibe a formação de superóxidos, compostos que estão sendo envolvidos no aumento da atividade osteoclástica. Portanto, a hesperidina pode ser benéfica na prevenção da perda óssea. O objetivo da segunda parte deste trabalho foi avaliar a influência do flavonóide hesperidina e tinturas de café em coelhos com osteoporose induzida por dexametasona (7mg/kg de peso corporal). Os animais foram distribuídos em 6 grupos: G1: ração + dexametasona (controle com osteoporose 1); G2: ração (controle); G3: ração + dexametasona + 1mL de fruto cereja , G4: ração + dexametasona + 1 mL de casca cereja , G5: ração + dexametasona (controle com osteoporose 2), G6: Ração + dexametasona + 30 mg de hesperidina. Os grupos 1 a 4 foram representados por coelhos fêmeas mais jovens (48 dias de idade). Os grupos 5 e 6 foram constituídos por animais com 140 dias de idade. Devido à diferença de idade dos animais, provavelmente eles encontravam-se em períodos de remodelação óssea distintos. Assim, o experimento foi constituído com dois grupos doentes não tratados, o grupo 1 e o grupo 5, com 48 e 140 dias de idade, respectivamente. Após 30 dias de tratamento, foram coletados amostras de sangue dos animais para determinação dos parâmetros bioquímicos do soro (uréia, creatinina, proteínas totais, cálcio, fósforo, colesterol total, triacilglicerídeo, glicose, fosfatase alcalina total, gama GT e albumina) e dos parâmetros hematológicos, tais como: leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos, hemoglobina, hematócrito, eritrócitos, volume corpuscular médio (VCM), amplitude de distribuição do tamanho das hemáceas (RDW), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM). No grupo dos animais mais jovens, observou-se que no grupo normal os níveis de uréia, fósforo, fosfatase alcalina total e albumina foram estatisticamente maiores comparados ao G1. Já os níveis de glicose, triacilglicerídeo e colesterol foram menores. Com relação à glicose, o grupo tratado com fruto cereja promoveu um aumento neste parâmetro, porém não foi significativo. Os níveis de colesterol foram estatisticamente menores no grupo tratado com fruto cereja e casca cereja com relação ao G1. A concentração de triacilglicerídeo foi significativamente maior no grupo 3 comparado ao G1. Os animais tratados com fruto cereja tiveram

concentrações de fósforo significativamente maiores comparados ao G1. Não houve diferenças significativas nos parâmetros de uréia, creatinina, proteínas totais, cálcio, fosfatase alcalina total, gama GT e albumina entre os tratamentos e ao G1. O tratamento com o flavonóide hesperidina reduziu significativamente os valores de uréia, glicose, triacilglicerídeo e colesterol comparado ao G5. Com relação aos parâmetros hematológicos, observou-se que no grupo normal os níveis de leucócitos, linfócitos, mielócitos, eritrócitos totais e hematócrito foram estatisticamente maiores comparados ao G1. As concentrações de leucócitos, mielócitos, granulócitos e VCM foram significativamente maiores no tratamento com fruto cereja, comparado à G1. No tratamento com casca cereja observou-se uma redução significativa na hemoglobina e no hematócrito, comparados à G1. Não houve diferenças significativas nos parâmetros de RDW, HCM e CHCM entre os tratamentos e o ao G1. No grupo dos animais mais adultos, observou-se que não houve diferenças significativas nos parâmetros de creatinina, proteínas totais, cálcio, fósforo, colesterol, glicose, fosfatase alcalina total, gama GT e albumina entre os tratamentos e o grupo doente não tratado dos animais com 140 dias de idade (G5). Não foi observada nenhuma diferença estatística nos parâmetros hematológicos entre o tratamento com hesperidina e o grupo que recebeu apenas dexametasona (G5).

## ABSTRACT

Cardoso, Luciana Marques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march of 2008. **Effects of coffee tinctures in osteoporosis and diabetes and of hesperidin flavonoid in osteoporosis.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisers: Tanus Jorge Nagem, Paulo César Stringheta and Ricardo Junqueira Del Carlo.

Coffee consumption has been associated with a lower risk of type 2 diabetes. However, the specific compounds and mechanisms responsible for this effect are not clear. Three experiments were carried out to evaluate catuaí red coffee (*Coffea arabica*) tincture in rats with diabetes induced by alloxan administration (60mg/kg of corporal weight). The first experiment used cherry coffee hull, green coffee and cherry coffee tincture. In the second experiment the animals were treated with coffee dryleaf and coffee green leaf tinctures. The third experiment used the tincture of a commercial soluble coffee. All the tinctures tested in the 0.5 mL, 1.0 mL and 2.0 mL doses. After 30 days of treatment, samples of blood of the animals by dosages of the glucose serum, cholesterol and tryacylglycerols were collected. The cherry coffee hull (1.0 mL), green coffee (0.5 mL, 1.0 mL and 2.0 mL), cherry coffee (1.0 mL and 2.0 mL), green leaf (0.5 mL, and 1.0 mL) and soluble coffee (1.0 mL and 2.0 mL) tinctures promoted a small increase, however significant, in the levels of cholesterol compared to the non-treated sick group. The dryleaf tincture (2.0 mL) was only one capable of reducing cholesterol concentrations significantly. In relation to the levels of glucose and tryacylglycerols, it was found that all the tinctures had significantly reduced these parameters, except the treatment with soluble coffee tincture (2.0 mL) did not result in a decrease the tryacylglycerols. The reduction percentages of the glucose and tryacylglycerols concentration varied from 20 to 49% and from 27 to 57%, respectively. The benefits of coffee tinctures used in this work in the glucose and tryacylglycerol levels overlap the possible negative effects with cholesterol, indicating that these tinctures can be promising for diabetes treatment. In relation to osteoporosis, the consumption of caffeine, a substance present in coffee, has been considered a risk factor. And hesperidin, the citrus flavonoid, has been evaluated as a powerful antiinflammatory agent,

for its apparent antioxidant activity. Its antioxidant effect inhibits the superoxide formation, composites which are involved in the increase of osteoclast activity. Therefore, the hesperidina can be beneficial in the prevention of bone loss. The objective of the second part of this study was to evaluate the influence of the hesperidin flavonoid and coffee tinctures in rabbits with osteoporosis induced by the administration of glucocorticoid (7mg/kg of corporal weight). The animals were distributed in 6 groups: G1: ration + dexametasone (control with osteoporosis 1); G2: ration (control) G3: ration + dexametasone + 1mL of cherry coffee; G4: ration + dexametasone + 1 mL of cherry coffee hull; G5: ration + dexametasone (control with osteoporosis 2); G6: ration + dexametasone + 30 mg of hesperidin. Groups 1 to 4 had younger rabbits (48 days old). Groups 5 and 6 had 140 day olds. Due to the difference in age of the animals, they were probably in distinct periods of bone remodeling. Thus, the experiment was constituted with two non-treated sick groups, groups 1 and 5, with 48 and 140 days old, respectively. After 30 days of treatment, the samples of blood were collected from the animals to determine of the serum biochemists parameters (calcium, phosphorus, glucose, total fosfatase alkaline, urea, creatinine, total proteins, total cholesterol, tryacylglycerols, gamma GT and albumin) and of hematological parameters, such as: leukocytes, linphocytes, erythrocytes, mielocyte, granulocyte, hemoglobin, hematócrito, width corpuscular volume (MCV), red cell distibution width (RDW), corpuscular hemoglobin width (MCH), corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). In the youngest animal group, it was found that in the normal group the levels of urea, phosphorus, total fosfatase alkaline and albumin were statistically higher in the non-treated sick group (G1). The levels of glucose, tryacylglycerols and cholesterol were lower. In relation to the glucose, the group treated with cherry coffee had an increase in this parameter, but not significant. The cholesterol levels had been statistically lower in the group treated with cherry coffee and cherry coffee hull in relation to G1. The concentrations of tryacylglicerides had been statistically higher in G3 compared to G1. The animals treated with cherry coffee had significantly higher concentrations of phosphorus compared to G1. There were no significant differences in the following parameters of urea, creatinine, total proteins, calcium, total fosfatase alkaline, gamma GT and albumin when comparing the treatments to G1. The treatment with the hesperidin flavonoid

significantly reduced the values of urea, glucose, tryacylglycerols and cholesterol in comparison to G5. In relation to the hematological parameters, it was found that in the normal group the total levels of leukocytes, linfphocyte, mielocyte, eritrocyte and hematocrit where statistically higher compared to the non-treated sick group (G1). The concentrations of leukocytes, mielocyte, granulocyte and MCV had been significantly higher in the treatment with cherry coffee, compared with G1. Cherry coffee hull treatment a significant reduction in the hemoglobin and hematocrit was observed, compared to G1. Significant differences in the parameters there were in (RDW), MCH and MCHC when comparing the treated and non-treated sick group (G1). In the older animal groups, no significant differences in the parameters of creatinine, total proteins, calcium, phosphorus, cholesterol, glucose, total fosfatase alkaline, gamma GT and albumin were observed among the treatments and the non-treated sick group (G5). No statistical difference was observed in the hematological parameters between the treatment with hesperidin and the group that received only dexametasone (G5).

## **CAPÍTULO 1**

**TINTURAS DE CAFÉ EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO PELA  
ADMINISTRAÇÃO DE ALOXANO.**

## 1) INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* é um problema de saúde pública mundial devido ao seu potencial de morbidade e mortalidade. Estima-se que em 2000 havia aproximadamente 150 milhões de pessoas portadoras da doença e é provável que este número alcance o dobro em 2025 (King *et al.*, 1998). Na Europa, o número deve aumentar de aproximadamente 16 milhões em 1994 para 24 milhões em 2010 (Amos *et al.*, 1997). Nos Estados Unidos, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimam que mais de 18 milhões de norte-americanos sejam portadores de diabetes, e que o diabetes tipo 2 responde por mais de 90 por cento desse total. No Brasil, esta doença pode atingir cerca de 12 milhões de indivíduos (Diabetes, 2004).

O diabetes leva a complicações micro-vasculares, predominando a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia e complicações macrovasculares, particularmente o acidente vascular cerebral e as doenças da artéria coronária. Juntas, essas doenças fazem do diabetes a sétima causa de óbitos no mundo desenvolvido (Sacks *et al.*, 2002).

Portanto, em vista do número crescente de pessoas afetadas por esta patologia e os altos índices de morbidade e mortalidade associados, terapêuticas para prevenção e tratamento do diabetes são extremamente relevantes.

A maioria das pesquisas sobre os fatores dietéticos e o risco de diabetes tipo 2 (DM2) focaliza os macronutrientes (Hu *et al.*, 2001). Entretanto, micronutrientes e fitoquímicos também podem afetar o metabolismo da glicose (van Dam, 2003).

Evidências epidemiológicas sugerem que o alto consumo de café pode reduzir o risco de DM2 (van Dam, 2006). Várias substâncias presentes no café, além da cafeína, como o ácido clorogênico (Shearer *et al.*, 2003) e o magnésio (de Valk, 1999) podem afetar o metabolismo de glicose em animais e humanos.

Diante destas evidências, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de tinturas do café (*Coffea arábica*) em ratos com diabetes induzido por aloxano.

## **2) REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1) DIABETES**

O metabolismo normal da glicose é regulado por três processos inter-relacionados: a produção de glicose no fígado, captação e utilização da glicose pelos tecidos periféricos e secreção de insulina (Contran, 2000). A insulina é um importante hormônio anabólico e sua principal função é controlar os níveis de glicose pós-prandial, sinalizando para que células sensíveis à insulina, como o músculo-esquelético, fibroblastos, fígado e células adiposas, aumentem a captação da glicose. A insulina também estimula o fígado a promover a glicogênese e a glicólise, contribuindo para a manutenção de glicose estocada para os períodos de jejum. Adicionalmente, a insulina inibe simultaneamente a secreção de glucagon pelas células alfa-pancreáticas sinalizando, assim, para que o fígado, no estado pós-prandial, interrompa a produção de glicose via glicogenólise e neoglicogênese (Sociedade Brasileira de Medicina, 2007).

Nos anos 70, vários hormônios intestinais, as incretinas, foram identificados e um deles, o GLP-1 (Glucagon like peptide-1), foi reconhecido como um importante contribuinte para a manutenção da glicemia. Assim, passou-se a entender o processo glicorregulatório como resultado da interação com outros hormônios e particularmente a relação dos hormônios pancreáticos (insulina e glucagon) com hormônios intestinais e o diabetes passou a ser visto com uma doença multi-hormonal (Sociedade Brasileira de Medicina, 2007).

O Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio crônico do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas causado por secreção inadequada de insulina e/ou diminuição da sensibilidade dos tecidos à insulina. O efeito no metabolismo da glicose decorre da tentativa de garantir o aporte adequado de glicose para as células. Conseqüentemente, há o aumento da glicemia, utilização de quantidades cada vez menores de glicose pelas células e mobilização crescente de proteínas e lipídeos (Guyton, 2000).

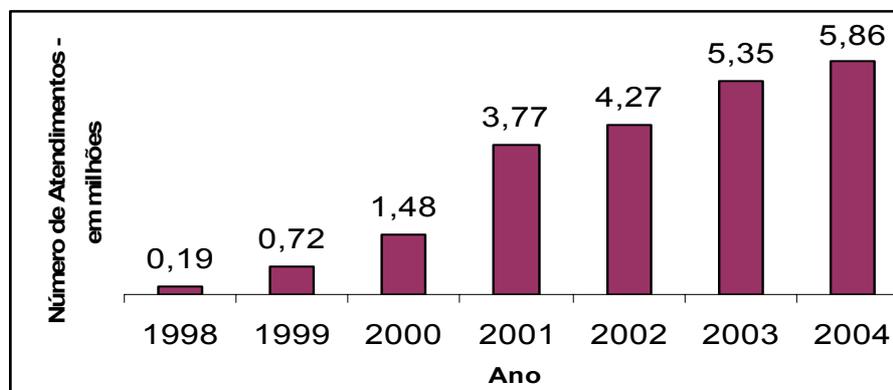
A importância do diabetes nas últimas décadas vem crescendo em decorrência de vários fatores, tais como: maior taxa de urbanização, aumento da expectativa de vida, industrialização, dietas hipercalóricas e ricas em carboidratos de absorção rápida, deslocamento da população para zonas

urbanas, mudança de estilos de vida tradicionais para modernos, inatividade física e obesidade.

Pelo impacto social e econômico que tem sofrido, tanto em termos de produtividade quanto de custos, o diabetes mellitus vem sendo reconhecido, em vários países, como problema de saúde pública com reflexos sociais importantes (Ortiz *et al.*, 2000). Em termos mundiais, cerca de 30 milhões de indivíduos apresentavam DM em 1985, passando para 135 milhões em 1995 e 240 milhões em 2005, com projeção de atingir 366 milhões em 2030, dos quais dois terços habitarão países em desenvolvimento (Wild *et al.*, 2004; Barceló *et al.*, 2003). Nos EUA, estima-se que 16 milhões de pessoas são portadoras de diabetes, das quais 1,4 milhões tem o tipo 1, 14,5 milhões o tipo 2 e apenas alguns milhares são acometidos por outros tipos específicos (American Diabetes Association – ADA, 2000).

No Brasil, dados sobre prevalência de DM, representativos da população residente em 9 capitais, datam do final da década de 80 (Malerbi e Franco, 1992). Nesta época, estimou-se que, em média, 7,6% dos brasileiros entre 30 e 69 anos de idade apresentavam DM, que incidia igualmente nos dois sexos, mas que aumentava com a idade e a adiposidade corporal. As maiores taxas foram observadas em cidades como São Paulo e Porto Alegre, sugerindo o papel da urbanização e industrialização na patogênese do DM tipo 2. Um dado relevante foi que a metade dos indivíduos diagnosticados diabéticos desconhecia sua condição. Isso significa que os serviços de saúde têm diagnosticado casos de DM tardiamente, dificultando o sucesso do tratamento em termos de prevenção das complicações crônicas. Infelizmente, as informações deste estudo multicêntrico sobre prevalência de DM no Brasil (também conhecido como Censo de Diabetes) não foram atualizadas. Dados representativos da população de Ribeirão Preto, interior de São Paulo, foram mais recentemente publicados (Torquato *et al.*, 2003). Segundo os dados do estudo de Ribeirão Preto, a prevalência do DM, na faixa dos 30 aos 69 anos, foi de 12,1%. Considerando que no Censo Nacional de Diabetes de 1988 a prevalência nessa mesma faixa etária foi de 7,6%, sugere-se que o DM deve estar se tornando mais prevalente, pelo menos nesta população.

O SUS (Sistema Único de Saúde) vem progressivamente atendendo, desde 1994, um número crescente de pessoas com DM. A figura 1 mostra a evolução destes atendimentos no período de 1998 a 2004.



**Figura 1 - Evolução do número de atendimentos a portadores de diabetes pela Atenção Básica no período de 1998 a 2004. (Sistema de Informação da Atenção Básica, SIAB, Ministério da Saúde).**

Esta patologia está associada a complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. O controle e tratamento de suas complicações exigem a mobilização de recursos onerosos (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2002).

O DM, como diagnóstico primário de internação hospitalar, aparece como a sexta causa mais freqüente e contribui de forma significativa (30% a 50%) para outras causas como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, colecistopatias, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial (Silvestre, 1997). Pacientes diabéticos representam cerca de 30% das internações em unidades coronarianas intensivas. A doença cardiovascular é a primeira causa de mortalidade de indivíduos com DM tipo 2, a retinopatia a principal causa de cegueira adquirida, a nefropatia uma das maiores responsáveis pelo ingresso a programas de diálise e o pé diabético importante causa de amputações de membros inferiores. Assim, procedimentos diagnósticos e terapêuticos, hospitalizações, absenteísmo, invalidez e morte prematura elevam substancialmente os custos diretos e indiretos da assistência à saúde da população diabética.

A classificação atualmente recomendada (World Health Organization, WHO, 1999; The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of

Diabetes Mellitus, 1997; Alberti et al., 1998) apresentada no quadro 1, incorpora o conceito de estágios clínicos do DM, desde a normalidade, passando para a tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia de jejum alterada, até o DM propriamente dito. Baseia-se na etiologia do DM, eliminando os termos diabetes melito insulino dependente (IDDM) e não-insulino dependente (NIDDM).

### **Quadro 1: Classificação do Diabetes Mellitus**

**Tipo 1:** Destruição das células beta, geralmente ocasionando deficiência absoluta de insulina, de natureza auto-imune ou idiopática.

**Tipo 2:** Varia de uma predominância de resistência insulínica com relativa deficiência de insulina a um defeito predominantemente secretório, com ou sem resistência insulínica.

**Outros tipos específicos:** Defeitos genéticos funcionais das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidos por fármacos e agentes químicos, infecções, formas incomuns de diabetes imunomediado, outras síndromes genéticas geralmente associadas ao diabetes

#### **Diabetes gestacional**

Fonte: Adaptado WHO, 1999.

O DM do tipo 1 resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas. Como resultado, as concentrações de glicose pós-prandial aumentam pela falta do estímulo insulínico, pela produção aumentada de glicose hepática e pelo excesso de ação do glucagon, sem o efeito compensatório da insulina (Sociedade Brasileira de Medicina, 2007). Inclui casos decorrentes de doença auto-imune e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta do pâncreas não é conhecida. Corresponde 5% a 10% do total de casos. A forma rapidamente progressiva é comumente

observada em crianças e adolescentes, porém pode ocorrer também em adultos. A forma lentamente progressiva ocorre geralmente em adultos e é referida como diabetes latente auto-imune do adulto (Lada)(WHO, 1999).

No diabetes tipo 2, a função da célula beta está alterada no estado pós-prandial, o que é evidenciado pela perda da resposta rápida da secreção de insulina após uma refeição. Ocorre também uma resistência periférica à ação da insulina e, assim, a patogênese do diabetes tipo 2 passou a ser caracterizada pela combinação de uma série de fatores que incluem a resistência à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, um progressivo declínio da massa e da função das células beta e um defeito na supressão dos níveis de glucagon, aumentando a produção hepática de glicose (Sociedade Brasileira de Medicina, 2007).

O diagnóstico do DM tipo 2, na maioria dos casos, é feito a partir dos 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo. Abrange 85% a 90% do total de casos. É importante ressaltar que, nos últimos anos, a incidência de diabetes do tipo 2 vem crescendo entre crianças e jovens nos Estados Unidos, em associação ao aumento da obesidade (American Diabetes Association, ADA, 2000).

A categoria outros tipos de DM contém várias formas de DM decorrentes de defeitos genéticos associados a outras doenças ou ao uso de fármacos diabetogênicos.

O DM gestacional é a diminuição da tolerância à glicose, de magnitude variável, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto. Abrange os casos de DM e de tolerância à glicose diminuída detectados na gravidez.

Os procedimentos diagnósticos empregados são a medida da glicose no soro ou plasma após jejum de oito a 12 horas e o teste padronizado de tolerância à glicose (TTG) após administração de 75 gramas de glicose anidra (ou dose equivalente, como, por exemplo, 82,5g de dextrosol) por via oral, com medidas de glicose no soro ou no plasma nos tempos 0 e 120 minutos após a ingestão (Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

A comunidade científica tem sugerido mudanças na classificação dos estados de tolerância à glicose, à medida que novos conhecimentos, oriundos

de pesquisas e da prática clínica, vêm sendo acrescentados. Com frequência ainda maior, tem revisto os critérios diagnósticos do DM, visto que as manifestações clínicas desta doença ocorrem tardiamente, quando as manobras terapêuticas são menos eficazes em preservar a qualidade de vida e longevidade (National Diabetes Data Group, 1979; Harris *et al.*, 1992; Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997; American Diabetes Association - ADA, 2005). Os critérios diagnósticos, segundo a American Diabetes Association - ADA (2005) encontram-se na tabela abaixo.

**Quadro 2 - Critérios diagnósticos para a presença de anormalidades da tolerância à glicose, segundo a ADA-2005.**

Categoria	Glicemia de jejum	Glicemia 2h pós-sobrecarga
Glicemia normal	<100 mg/dL	<140 mg/dL
Glicemia de jejum alterada	100-125 mg/dL	-
Tolerância à glicose diminuída	-	140-199 mg/dL
Diabetes*	126 mg/dL	200 mg/dL

Adaptado da American Diabetes Association, 2005.

\* O diagnóstico de diabetes requer confirmação em outra coleta.

Quando ambos os exames são realizados (glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose de 2hs), a glicemia de jejum alterada (GJA) e a tolerância à glicose diminuída (TGD) podem ser diferenciados.

Estes valores de corte de glicemia em jejum e de 2 horas após sobrecarga de glicose foram referendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Da mesma forma, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) reconhece a existência de 2 estágios intermediários entre a normalidade e o DM, o qual sinaliza para risco aumentado para se tornar diabético. O termo “pré-diabetes” tem sido empregado referindo-se, à GJA e TGD. O significado destas

condições em termos de predição de DM e de doença cardiovascular tem sido amplamente investigado (<http://www.diabetesebook.org.br>).

## 2.2) FATORES DE RISCO

O fator hereditariedade é um fator de risco de extrema importância para o Diabetes. Em relação aos fatores de risco modificáveis no diabetes tipo 2, particularmente sobrepeso e sedentarismo, o Estudo das Enfermeiras demonstrou que o incremento do índice de massa corporal (IMC) aumenta a incidência ou o risco de se desenvolver diabetes (Colditz et al., 1995). Outro dado obtido desse ensaio evidencia que quanto maior o ganho de peso na vida adulta, maior o risco de se adquirir DM, inclusive indivíduos que iniciaram o estudo com peso adequado. A distribuição central de gordura também assume um papel importante na gênese do diabetes. Hartz *et al.* (1984) mostraram que indivíduos com IMC normal, porém, relação cintura/quadril  $> 0,8$  apresenta risco aumentado de apresentar a doença. O estudo de Helmrich *et al.* (1994) chama a atenção para outro fator de risco modificável, o gasto energético através de exercícios físicos, demonstrando que quanto menor o nível de atividade física, maior o risco de se desenvolver DM. Gimero *et al.* (2002) fizeram um estudo observacional numa comunidade de origem japonesa residente no Brasil. Em um período de sete anos, a prevalência de diabetes nessa população aumentou de 21% para 36%, valores atribuídos à mudança no padrão dietético, particularmente a maior ingestão de gordura. Todos esses são pontos possíveis de intervenção para reverter o processo epidêmico no surgimento do diabetes tipo 2 (Costa et al., 2000).

A American Diabetes Association (ADA) sugere que todo indivíduo a partir dos 45 anos seja investigado para a presença de DM com base em glicemia de jejum e que o rastreamento deva ocorrer mais cedo quando houver presença de fatores de risco. Além dos incluídos no quadro 3 abaixo, acrescenta inatividade física, certos grupos raciais e portadoras de ovários policísticos.

### Quadro 3. Fatores de risco para o diabetes tipo 2

Fatores de Risco para o DM-2
<ul style="list-style-type: none"><li>• Investigar DM a cada 3-5 anos em indivíduos com mais de 45 anos</li><li>• Mais freqüente e mais precocemente na presença de:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Excesso de peso</li><li>○ Dislipidemia, principalmente na presença de HDL baixo e triglicérides elevados</li><li>○ Hipertensão arterial</li><li>○ Doença cardiovascular</li><li>○ Antecedente familiar de diabetes</li><li>○ Diabetes gestacional prévio, história de macrossomia e abortos de repetição.</li></ul></li></ul>

Fonte: Adaptado de American Diabetes Association - ADA, 2000.

### 2.3) PREVENÇÃO E TRATAMENTO

O conhecimento sobre os estágios precoces da intolerância à glicose, associado aos recentes sucessos dos estudos de intervenção, mostra claramente que o DM tipo 2 pode ser postergado ou até mesmo prevenido. Nesse sentido, estudos têm demonstrado que a modificação do estilo de vida é praticamente duas vezes mais efetiva que o tratamento farmacológico. Além disso, as políticas de prevenção do diabetes que focam modificações no estilo de vida, especialmente perda de peso e atividade física regular, apresentam benefícios adicionais para a saúde, particularmente no que tange à diminuição do risco cardiovascular. Tais modificações devem levar em conta metas realistas que possam ser incorporadas na rotina diária dos pacientes da maneira mais agradável possível. Como alvo de políticas públicas, é particularmente interessante o incentivo a modificações do estilo de vida desde a infância, em que cresce em incidência a resistência insulínica e a TGD. A diminuição da obesidade de caráter central, com modificação no perfil de gordura corporal, deve ser perseguida como alvo terapêutico, no intuito de reduzir a resistência insulínica e melhorar o perfil metabólico (Sociedade Brasileira de Diabetes, SBD, 2006). Portanto, o tratamento do DM inclui as seguintes estratégias: educação; modificações do estilo de vida, que incluem

suspensão do fumo, aumento da atividade física e reorganização dos hábitos alimentares; e, se necessário, uso de medicamentos.

A ADA (2005) recomenda o uso de medidas farmacológicas em situações especiais, como nos indivíduos que não aderem às mudanças de estilo de vida, com glicemia de jejum alterada e ou TGD, idade menor que 60 anos, IMC maior que 35, hipertensos, com história familiar de diabetes em parentesco de primeiro grau, triacilglicerídeo elevado, HDL colesterol reduzido e hemoglobina glicada maior ou igual a 6%.

#### **2.4) DIABETES E ALOXANO**

Para o desenvolvimento de um modelo experimental da diabetes melito, têm-se empregado várias substâncias, podendo-se citar entre elas, o aloxano. O aloxano (figura 2), um derivado do ácido úrico, é um dos agentes diabetogênicos mais estudado e comumente utilizado no meio científico para a indução de diabetes experimental. Possui vantagens sobre outros métodos devido seu baixo custo, facilidade na indução do diabetes e uso padronizado no meio científico (Lerco *et al.*, 2003).

O Aloxano possui citotoxicidade específica para as células beta do pâncreas, produtoras de insulina, com redução no tamanho e número das ilhotas pancreáticas. Ele causa insuficiência insulínica primária, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subseqüentes. Sua ação diabetogênica caracteriza-se pela produção de radicais livres que são tóxicos, especificamente para as células  $\beta$  do pâncreas, levando à degeneração e morte definitiva das mesmas. Essa citotoxicidade seletiva do aloxano é devido à grande capacidade da célula  $\beta$  em acumular a droga, aliada ao fato desta célula demonstrar uma maior sensibilidade aos radicais peróxidos, quando comparadas a outros tecidos (Lerco *et al.*, 2003).

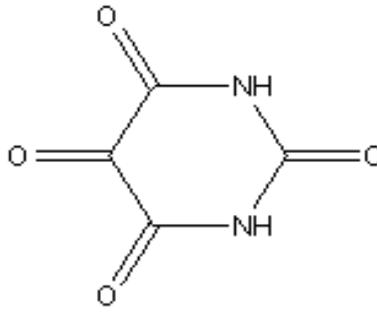


Figura 2. Estrutura química do Aloxano.

A diabetogenicidade do aloxano pode ser prevenida por diversas substâncias que diminuem a suscetibilidade das células alvo ao agente agressor. Entre elas, podem-se citar a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), enzimas que agem, profilaticamente, contra a toxicidade do aloxano sobre as células  $\beta$ , *in vivo* e *in vitro* (Mazzanti *et al.*, 2003). Outros agentes redutores como ascorbato também podem participar de sua redução (Zhang *et al.*, 1991).

Outro aspecto a considerar são as vias de administração da droga. A via endovenosa tem sido a de escolha na maioria das espécies animais, onde os efeitos do aloxano são mais evidentes. As vias subcutâneas e intraperitoneal também são satisfatórias no rato, enquanto que, no coelho, doses muito elevadas devem ser ministradas por essas vias, para que se atinja o mesmo efeito diabetogênico. Finalmente, a via oral é usualmente insatisfatória para a ação do aloxano, muito embora o diabetes possa ser produzido em ratos, coelhos e gatos, se a droga for rapidamente ingerida com comida, após um jejum prévio prolongado (Szkudelski, 2001).

## 2.5) CAFÉ

O café foi introduzido no Brasil por volta de 1730, originário de plantações na América Central e na Guiana Francesa (<http://br.geocities.com>). Ele provém de uma árvore do gênero *Coffea* e, dentre as várias espécies conhecidas, as mais comercializadas são *Coffea arábica* e *Coffea canephora*, conhecida como Robusta, sendo que *C. arabica* ocupa 74% do parque cafeeiro do Brasil, enquanto que *C. canephora* 26%. É possível que essa diferença em

volume de produção seja em parte decorrente da diferença na qualidade do café entre as espécies, sendo o café arábica considerado de melhor qualidade sensorial, além de concentrações mais elevadas de carboidratos, lipídeos e trigonelina. Já o café da espécie robusta, considerados bebida neutra, possuem maiores teores de cafeína e compostos fenólicos (Moreira *et al.*, 2000; Malta *et al.*, 2002). Das espécies cultivadas, a robusta tem plantada no Brasil apenas a variedade denominada Conillon, enquanto a arábica tem diversas variedades, como Icatu, Obatã e Catuai (Monteiro e Trugo, 2005).

Apesar de ser o maior produtor mundial de café (em 2002 produziu 45 milhões de sacas) e o segundo maior mercado consumidor, o Brasil ainda está longe de alcançar a Itália e a Alemanha, maiores exportadoras do mundo, quando se trata de café industrializado. A Alemanha também é a maior compradora de café verde (em grãos) do Brasil. Ela importa o café brasileiro, agrega valor ao produto, torrando e moendo os grãos, e vende para países da Europa, Ásia, América do Norte, etc. Em 2007, o Brasil manteve sua posição de maior exportador mundial de café verde, faturando U\$1,25 bilhões com a exportação de 27 milhões de sacas. De acordo com Nathan Herszkowicz, diretor executivo da ABIC (Associação Brasileira da Indústria do Café), “o mundo processa e reexporta o café brasileiro numa quantidade cinco vezes maior da que o Brasil exporta na forma de commodity (grãos verdes)”. A produção interna consta com apenas 5 milhões de sacas de café industrializado contra 27 milhões de sacas de café verde (<http://www.abic.com.br>).

Os resultados de pesquisas e levantamentos de 2006 realizados pela empresa InterScience e disponíveis no site da ABIC (<http://www.abic.com.br>) mostram que 94% da população brasileira consome café (em diferentes quantidades). Esta grande adesão ao consumo de café revela a importância de constantes pesquisas sobre as qualidades do café e seus benefícios à saúde.

## **2.6) COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ**

O fruto do cafeeiro é constituído de casca (exocarpo), polpa mais mucilagem ou goma (mesocarpo), pergaminho (endocarpo), película prateada (perisperma) e semente (endosperma) que se constitui no grão propriamente

dito. Cada parte tem sua composição química característica, podendo sofrer alterações nas diversas fases da produção.

De modo geral, o café é constituído por cafeína, trigonelina, minerais, ácido clorogênico, ácidos alifáticos, ácido quínico, flavonóides (caempferol, quercetol), carboidratos, aminoácidos totais, aminoácidos livres e lipídeos (Clarke, 2003). Diferenças na composição entre os grãos verdes e torrados, bem como nas espécies e nos procedimentos de extração para preparo da bebida, resultam numa grande diversidade da composição química do produto final, representado pela soma dos compostos naturalmente presentes com aqueles induzidos pelo processamento (Daglia *et al.*, 2000; Borrelli *et al.*, 2002). A Tabela 1 apresenta alguns dos principais compostos presentes nos grãos de café.

**Tabela 1 - Composição aproximada dos grãos de café verdes e torrados, das espécies Arábica e Robusta**

Componentes	Arábica		Robusta	
	Verde	Torrado	Verde	Torrado
Minerais	3,0 - 4,2	3,5 - 4,5	4,0 - 4,5	4,6 - 5,0
Cafeína	0,9 - 1,2	1,0	1,6 - 2,4	2,0
Trigonelina	1,0 - 1,2	0,5 - 1,0	0,6 - 0,75	0,3 - 0,6
Lipídeos	12,0 - 18,0	14,5 - 20,0	9,0 - 13,0	11,0 - 16,0
Ácidos clorogênicos	5,5 - 8,0	1,2 - 2,3	7,0 - 10,0	3,9 - 4,6
Ácidos alifáticos	1,5 - 2,0	1,0 - 1,5	1,5 - 2,0	1,0 - 1,5
Oligossacarídeos	6,0 - 8,0	0 - 3,5	5,0 - 7,0	0 - 3,5
Polissacarídeos totais	50,0 - 55,0	24,0 - 39,0	37,0 - 47,0	-
Aminoácidos	2,0	0	2,0	0
Proteínas	11,0 - 13,0	13,0 - 15,0	11,0 - 13,0	13,0 - 15,0

Fonte: PATARROYO, 2003.

A cafeína (1, 3, 7- trimetilxantina) é um alcalóide, farmacologicamente ativo, pertencente ao grupo das metilxantinas (Figura 3). Na natureza, é encontrada em mais de 63 espécies de plantas, associada a outros dois compostos do mesmo grupo: a teofilina e a teobromina.

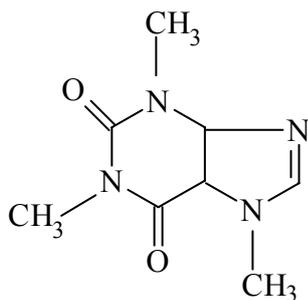


Figura 3. Estrutura Química da Cafeína.

É a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, por pessoas de todas as idades, independente do sexo e da localização geográfica. Suas fontes comuns na alimentação são o café, chá mate e chá preto, guaraná, cola, refrigerantes, cacau e chocolates.

Entre os alimentos que contém este alcalóide, o café é o que mais contribui para a sua ingestão (Arnaud, 1999). É possível encontrá-la também em alguns analgésicos e inibidores de apetite (Mckim *et al.*, 1993).

A cafeína é inodora e possui sabor amargo bastante característico, contribuindo com uma nota de amargor importante para o sabor e aroma da bebida do café (Trugo, 1984). O café, além da cafeína, pode conter ainda dimetilxantina, paraxantina, teobromina e teofilina e traços de purina (Kapeller e Braumann, 1985).

A quantidade de cafeína no café depende de uma série de fatores como a variedade da planta, método de cultivo, condições de crescimento, além de aspectos genéticos e sazonais (Barone e Robertz *et al.*, 1984).

Camargo e Toledo (1998) analisaram o conteúdo de cafeína, através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de diferentes marcas industrializadas de café em pó e instantâneo, disponíveis no comércio local da cidade de Campinas. Os teores de cafeína variaram tanto entre as diferentes marcas quanto aos tipos de café analisados e em função da técnica de preparo da bebida. Nos extratos de café obtidos a partir do pó fervido junto com a água durante 2 minutos, a quantidade de cafeína extraída foi 19 a 30 % superior à obtida do café das mesmas marcas não fervido (apenas coado, onde o pó é colocado no filtro e em seguida despeja a água). As médias de cafeína entre as marcas foram de 35,5 mg e 40,4 mg de cafeína / xícara de 60 mL para o

café sem fervura, apenas coado, e para o café fervido junto com a água, respectivamente. Estes resultados indicam que as pessoas que tem por hábito ferver o pó junto com a água estarão ingerindo mais cafeína para uma mesma quantidade de café consumido. Os teores médios de cafeína encontrados nos cafés expressos foram relativamente maiores, o que era esperado, uma vez que a quantidade de pó utilizada no seu preparo é praticamente o dobro. Dessa forma, dependendo da marca, o consumo de apenas "um café expresso" pode representar uma ingestão de mais de 70 mg de cafeína, quase duas vezes superior quando comparada com a ingestão de cafeína decorrente do consumo de uma xícara (60 mL) de café do tipo caseiro. Os teores de cafeína nas amostras de café instantâneo (36,58 a 49,21 mg/60 mL) foram, em geral, superiores aos encontrados na literatura (5,20 a 28,80 mg/60 mL) (James, 1991). Apenas um autor, citado por James (1991) relatou nível de cafeína relativamente maior no café instantâneo (59 mg de cafeína/60 mL). Segundo James (1991), as diferenças entre os teores de cafeína nos dois tipos de café (pó e instantâneo) se deve às diferentes variedades dos grãos utilizados na suas formulações. O conteúdo de cafeína nas sementes da espécie Robusta é maior do que nas sementes do Arábica e, de acordo com o mesmo autor, o primeiro é geralmente usado na fabricação de café instantâneo enquanto que o último, na obtenção de café em pó torrado.

Como ainda existem muitos resultados contraditórios quanto à segurança do consumo de cafeína, alguns estudos (Barone e Roberts, 1996; James, 1991) recomendam que sua ingestão diária seja em doses moderadas (até 300 mg/dia). No entanto, dependendo da marca, do tipo e da forma de preparo do café, o consumo de uma xícara da bebida (60 mL) pode resultar em ingestões de até 73 mg de cafeína, o que implica que o consumidor que tem o hábito de tomar mais de 8 xícaras (60 mL) de café por dia poderá estar potencialmente exposto aos efeitos adversos da cafeína (Barone e Roberts, 1996; James, 1991).

Portanto, observa-se que a quantidade de cafeína no café depende da quantidade de pó utilizada, do tipo de café (em pó, instantâneo ou expresso) e forma de preparo do mesmo (pó fervido junto com a água ou apenas coado) (Camargo e Toledo, 1998).

A trigonelina (Figura 4) é uma N-metil betaína, importante para o sabor e

aroma do café. Ela contribui para o aroma por meio da formação de produtos de degradação durante a torra e, entre esses produtos, estão as piridinas e o N-metilpirrol (Moreira e Trugo, 1999). Níveis de trigonelina encontrados na variedade Arábica (em torno de 0,6 a 1,3%) diferem dos encontrados na variedade Robusta (0,3 - 0,9%) (Vianni e Horman, 1974).

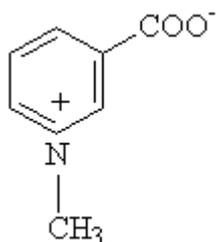


Figura 4. Estrutura química da Trigonelina.

As piridinas são importantes, após a torrefação, para o aroma do café. O mais importante produto não volátil formado é o ácido nicotínico (niacina) e N-metilnicotinamida (Figura 5) (Moreira e Trugo, 1999).

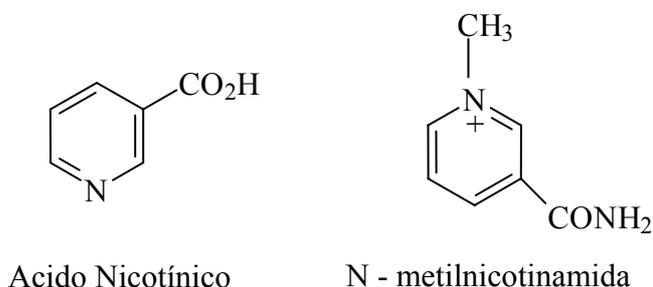


Figura 5. Estrutura química do Ácido Nicotínico e da N-Metilnicotinamida.

O ácido nicotínico constitui somente 1,5% da trigonelina degradada e está presente no café que sofreu torrefação. No café que sofreu torrefação 100g de café é uma importante fonte desta vitamina, a niacina, cujos requerimentos são em torno de 16 mg/dia para homens e 14 mg/dia para mulheres adultas (Dietary Reference Intakes, DRIs, 2000). Nesta quantidade de café pode-se ter em torno 2 - 3 mg de ácido nicotínico. (Moreira e Trugo, 1999).

Os compostos fenólicos presentes no café compreendem principalmente os ácidos clorogênicos, que compõem uma família de ésteres formados entre

ácido quínico e ácidos cinâmicos como caféico, ferúlico e *p*-cumárico (Clifford, 2000).

O conteúdo de ácido clorogênico pode aumentar com o conteúdo de cafeína. Os ácidos fenólicos são responsáveis por oxidação e escurecimento do grão durante estocagem, e seu decréscimo pode ser correlacionado com sua cor brilhante. O ácido clorogênico reage sofrendo uma oxidação alcalina produzindo produtos verdes. A cor marrom do grão do café é devido à presença de quinonas formada por oxidação dos ácidos fenólicos pela polifenol oxidase (Maier, 1993).

Os ácidos clorogênicos e compostos relacionados (Figura 6) apresentam propriedades benéficas à saúde, não só devido à sua potente atividade antioxidante, mas também como agentes hepatoprotetores, hipoglicemiantes e antivirais (Farah e Donangelo, 2006).

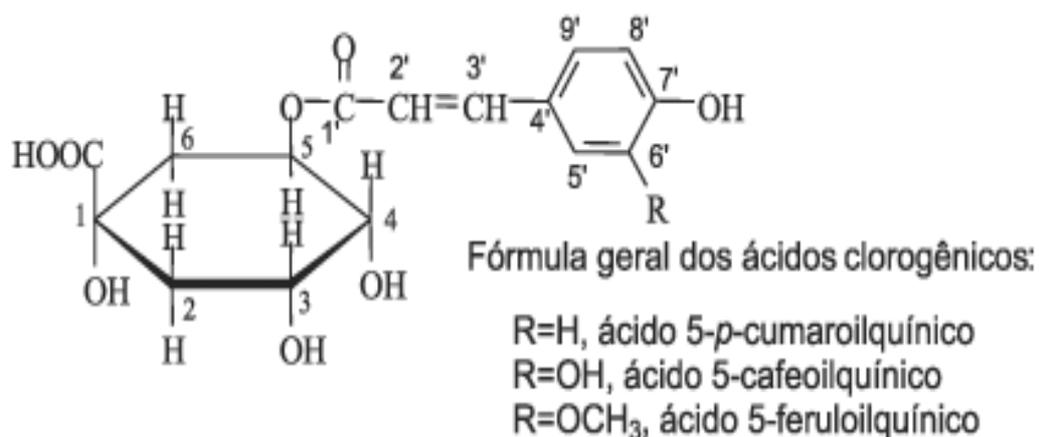


Figura 6: Fórmula geral dos ácidos clorogênicos

Durante o processo de torrefação, esses compostos fenólicos são parcialmente degradados, originando pigmentos e componentes voláteis do aroma, como fenol e vinilguaiacol (Moreira e Trugo, 2000). Embora haja uma significativa diminuição na concentração destes compostos quando os grãos são submetidos ao processo de torra, Natella et al. (2002), demonstraram em um estudo realizado com humanos, a capacidade do café torrado e preparado

na forma de infusão, de aumentar a atividade antioxidante plasmática por meio dos compostos fenólicos.

No Brasil, existem diversas marcas de café no mercado, produzidas por torrefadoras amplamente distribuídas nos diferentes estados. Entretanto, pouco se sabe sobre a composição desses produtos, principalmente tendo-se em vista que a composição da bebida, além de ser dependente da formulação dos "blends" de grãos crus, também apresenta variabilidade em função das condições de torrefação. Diferentes marcas de cafés solúveis disponíveis no mercado foram analisadas por Nogueira e Trugo (2003) mostrando que a distribuição de ácidos clorogênicos é bastante variável, indicando a forte influência de formulação da matéria prima e do processamento utilizado. Torna-se relevante, portanto, conhecer as características químicas, inclusive os teores dos compostos bioativos presentes nas marcas mais comercializadas.

Se por um lado, o tratamento térmico reduz a concentração de alguns componentes, por outro lado favorece a formação de outros compostos como os heterocíclicos e as melanoidinas, decorrentes principalmente da reação de Maillard (Daglia et al., 2004).

Os compostos heterocíclicos voláteis encontrados na infusão do café – pirróis, furanos, tiofenos, pirazinas, imidazóis - são dotados de potente atividade antioxidante, sendo atribuídas a algumas destas frações potencial semelhante aos encontrados para o  $\alpha$ -tocoferol (Fuster et al., 2000; Yanagimoto *et al.*, 2004).

As melanoidinas foram quimicamente caracterizadas em um estudo realizado por Borrelli *et al.* (2002) em grãos de café submetidos a diferentes graus de torra. Posteriormente, estes compostos foram submetidos a análise de seu potencial antioxidante, cuja eficiência diminuiu na medida em que aumentou o grau de torra, embora a capacidade fosse ainda significativa.

Diversos ácidos alifáticos têm sido identificados no café. Dentre eles, o ácido fórmico, acético, oxálico, málico, succínico, cítrico, quínico. O teor de ácido quínico (Figura 7) pode aumentar até 1,5% no grão velho. Traços de ácido fórmico, e ácido acético também têm sido detectados no grão de café velho. (Maier, 1987).

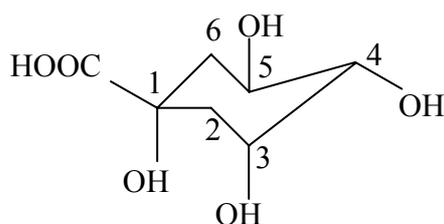


Figura 7. Estrutura química do Ácido Quínico.

Aminoácidos livres (em torno de 5%) estão presentes no café verde e também ligados a proteínas. Os aminoácidos encontrados no café verde são alanina, arginina, ácido glutâmico, ácido aspártico, asparagina, histidina, 3-metilhistidina, isoleucina, leucina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina e triptofano. Observe-se que a concentração de triptofano, treonina, glicina, tirosina, serina, alanina, lisina e arginina decrescem com o amadurecimento. (Vincent, 1987).

O conteúdo de proteínas no grão verde varia entre 8,7 e 12,2% com pequenas variações entre as espécies. Também têm sido identificadas correlações particulares entre a composição e ou quantidade de proteínas e a qualidade do café (Vianni, 1993).

Os carboidratos estão presentes no café verde como polissacarídeos solúveis e insolúveis (polímeros de manose, galactose e glicose) e alguns como arabinose (40 - 50%), oligossacarídeos (5 - 10%) e sacarose. A estrutura química do grão de café verde contendo polissacarídeos tem sido extensivamente estudada, mas somente parte dela está elucidada. A parede celular insolúvel do grão de café é composta de celulose, hemicelulose,  $\beta$ -1,4 mamano, arabinogalactano e pectina como estoque de energia. Existe certa diferença no conteúdo de celulose da parede celular do grão que sofreu torrefação, grão verde e do grão maduro (Bradbury e Halliday, 1990).

O teor de lipídeos dos grãos verdes de café pode variar de 8-18%, sendo que após a torrefação pode-se encontrar um nível médio de 16% no café Arábica e 11% no Robusta. Os lipídeos de grãos de café verde (“o óleo de café”) estão presentes, substancialmente, no endosperma e pequena quantidade de ceras encontra-se na camada externa do grão. A maior parte dos lipídeos se apresenta na forma de triacilglicerol (70-80%), porém o óleo de café também contém proporções consideráveis de outros componentes

lipídicos específicos, como ácidos graxos livres, esteróis e diterpenos (Lago, 2001).

Diferenças nos teores de ácidos graxos livres são encontradas em altos níveis e aparecem em condições de processamento e estocagem, onde pode ocorrer hidrólise, produzindo ésteres. Um aumento de ácidos graxos livres tem sido associado com longo tempo de estocagem de grãos em regiões subtropicais e podem levar a uma maior atividade enzimática com os quais produz deterioração do “flavor”. Alguns diterpenos encontrados no café verde são cafestol, caveol, 16 - 0 - metilcafestol (Figura 8, 9 e 10). Eles podem ser encontrados no café em proporção de até 20 % dos lipídeos totais e estão mais presentes no café Arábica. A torrefação não modifica os triacilgliceróis, mas libera os compostos lipídicos mais voláteis, como o cafestol (VIANNI, 1988 a).

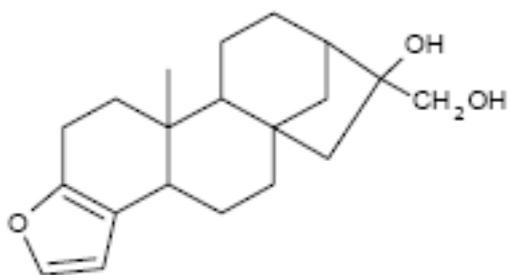


Figura 8. Estrutura química do Cafestol.

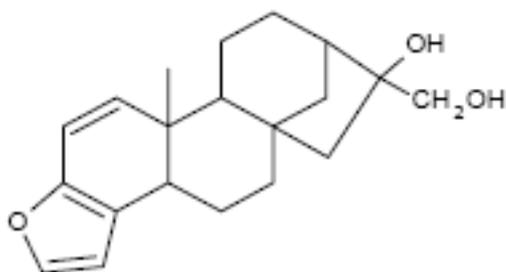


Figura 9. Estrutura química do Caveol.

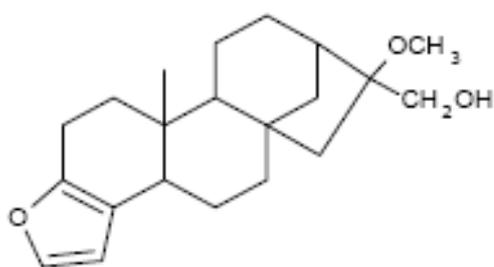


Figura 10. Estrutura química do 16-O-metilcafestol.

Os diferentes esteróides encontrados no grão verde do café, em pequenas proporções são: 24 - metileno colesterol, campesterol, campestanol, stigmasterol,  $\Delta^7$  - Campesterol,  $\Delta^5$ ,<sup>23</sup> Stigmastadienol, colesterol,  $\beta$  - Sitosterol, Sitostanol,  $\Delta^5$ . Avenasterol,  $\Delta^5$ ,<sup>24</sup> Stigmastadienol,  $\Delta^7$  - Stigmastadienol,  $\Delta^7$  - Avenasterol (Maier, 1981).

Alguns minerais essenciais para o funcionamento metabólico normal do organismo podem ser encontrados no café cru. Dentre esses, destacam-se os macrominerais Ca, K, Mg, Na, P e os microminerais Co, Cr, Cu, Fe, Mn e Zn. O café cru ainda possui Ni e elementos como Al, Ba e outros (Morgano et al., 2002).

As transformações que ocorrem com o café têm sido extensivamente estudados por Maier (1985), Vianl (1986), Plctet (1987) e Clarcke (1987b). Os teores de cafeína, trigonellina, proteínas, aminoácidos, açúcares, ácidos alifáticos, ácidos fenólicos e lipídeos variam bastante no grão verde e no grão após torrefação. O processo de torrefação provoca:

a) Apesar de termicamente estável, pequenas quantidades de cafeína vão à sublimação, uma vez que a temperatura final da torrefação pode chegar a 220°C.

b) A trigonelina é parcialmente degradada durante a torrefação e a perda é proporcional à temperatura de torrefação. À 180°C há perda de 60% e com 230°C há perda de 85%. Neste processo, diversas alquil piridinas e pirróis têm sido identificados como produtos da degradação (VIANI & HORMAN, 1974).

- c) Decomposição dos aminoácidos com perda de CO<sub>2</sub> e formação de compostos voláteis aromáticos.
- d) Transformação das proteínas em melanoidinas.
- e) Decomposição do ácido clorogênico com formação do aroma volátil, material polimérico (melanoidina) e CO<sub>2</sub>.
- f) Transformação de carboidratos em polissacarídeos solúveis, oligossacarídeos e monômeros.
- g) Decomposição da sacarose com a formação de substâncias voláteis e caramelo.
- h) Triacilgliceróis são pouco afetados pelo processo de torrefação, exceto pela hidrólise, com liberação de ácidos graxos livres e formação de compostos voláteis, possivelmente através da oxidação. O significado da degradação de produtos voláteis formados para afetar o flavor é desconhecido. A fração não saponificável, como diterpenos, são parcialmente degradados com perda de água, com exceção do 16 0 – metilcafestal, que é termicamente mais estável.

## 2.7) CAFEÍNA

A cafeína possui várias propriedades fisiológicas e farmacológicas, sendo que estas são doses dependentes. Há uma grande controvérsia sobre seus efeitos para a saúde, portanto, é necessário abordar mais o assunto.

A cafeína é um estimulante do Sistema Nervoso Central, contribuindo para a diminuição do sono e da fadiga, aumento da concentração e melhoria do humor (Nehlig, 1999).

No Sistema Nervoso Autônomo, o neurotransmissor adenosina, dentre outras funções, diminui a atividade neural e dilata os vasos sanguíneos, reduzindo a frequência cardíaca, a pressão arterial e a temperatura corporal, e também diminui a lipólise. A cafeína, por ter uma estrutura semelhante a adenosina, se liga ao receptor deste neurotransmissor, bloqueando a ação do mesmo sobre o sistema nervoso central (Yi *et al.*, 2006). O efeito vasoconstritor

cerebral da cafeína é a propriedade que justifica o seu emprego no tratamento de crises de enxaqueca, onde a vasodilatação cerebral existente é responsável pelo quadro (Barone e Roberts, 1984). Porém, os efeitos da cafeína em aumentar a vigília, promovendo uma diminuição do sono e da fadiga e a vasoconstrição cerebral diminuem após sua ingestão contínua (Robinson *et al.*, 2004).

Outro efeito da adenosina é a inibição pré-sináptica da liberação de dopamina. Então, diminuindo a ação da adenosina, a cafeína, semelhante às anfetaminas, também é capaz de aumentar a concentração da dopamina no sangue, neurotransmissor responsável pelo controle dos movimentos. Assim, alguns autores relatam que a cafeína pode reduzir o mal de Parkinson, visto que esta patologia é caracterizada por uma diminuição da dopamina disponível (Yi *et al.*, 2006).

A cafeína estimula a liberação de epinefrina, que além da sua função como neurotransmissor, também pode influenciar a taxa metabólica, estimulando a secreção de insulina, a glicogenólise e a mobilização de ácidos graxos (Graham *et al.*, 1998). Porém, o estímulo da cafeína no aumento dos níveis de epinefrina também diminuem após ingestão contínua (Robinson *et al.*, 2004).

A cafeína e outras metilxantinas aumentam a concentração intracelular de AMPc (monofosfato cíclico de 3', 5'-adenosina) e GMPc (monofosfato cíclico de 3', 5'-guanosina), por inibir a fosfodiesterase, enzima que degrada o AMPc em 5'AMP. Consequentemente, há uma ativação das proteínas quinases e posterior fosforilação protéica, estimulando diversos efeitos fisiológicos. Estes efeitos incluem a ativação de lipases, enzimas que mobilizam os depósitos de gordura do organismo para utilizá-los como fonte de energia, poupando o glicogênio muscular; estímulo da glicogenólise no músculo e no fígado e também age no sistema ósseo (Chen *et al.*, 2001).

Nehig *et al.* (1994), relataram que a cafeína age mobilizando cálcio (Ca) do retículo endoplasmático (RE), aumentando a concentração deste mineral no espaço intracelular e a sensibilidade das miofibrilas de Ca. Dois tipos de liberação de Ca operam no RE das células do músculo liso. A liberação de Ca pode ser mediada pelo receptor rianodina ou pela liberação via 1,4,5 trifosfato inositol (PIP<sub>3</sub>). A cafeína é um específico antagonista do receptor rianodina

acoplado a liberação de Ca, através do estoque de Ca intracelular do RE. Portanto, a cafeína, ao se ligar a este receptor, aumenta a sensibilidade das miofibrilas de Ca, promovendo a contração do músculo liso. Também se demonstrou que, por se ligar a receptores muscarínicos, a cafeína pode levar a uma hipercontratibilidade do músculo da bexiga (Yi *et al.*, 2006).

A possibilidade da cafeína exercer algum efeito ergogênico nos exercícios de longa duração vem sendo investigada por diversos pesquisadores desde a década de 70. No entanto, os resultados destes estudos apresentam algumas controvérsias devido à falta de padronização das metodologias (tipo de exercício; intensidade e duração dos exercícios; dosagens de cafeína; tolerância) utilizadas nos experimentos. Além disso, este tipo de estudo é complicado, uma vez que a cafeína afeta quase todos os tecidos do corpo, dificultando a observação de seus mecanismos de ação (Nehlig *et al.*, 1994). Entretanto, pesquisas não mostram efeito da cafeína sobre a força muscular máxima ou sobre as contrações musculares voluntárias. Seu efeito estaria na capacidade de retardar a fadiga, possivelmente devido à sua influência sobre a sensibilidade das miofibrilas ao íon cálcio e antagonizando os efeitos da adenosina e por estimular a ativação de lipases e conseqüente mobilização de depósitos de gordura do organismo para atuar como fonte energética, poupando o glicogênio muscular (Nehlig *et al.*, 1994).

Os diversos efeitos da cafeína são doses dependentes. Um estudo realizado por Smitch *et al.* (2002) sugere efeitos numa dose de 3,5 mg/kg para um homem de 70 kg e aproximadamente 10 mg/kg para o rato. É importante também considerar que existe a chamada “sensibilidade à cafeína”, a qual se refere à quantidade necessária dessa substância para produzir os efeitos secundários negativos, tais como perda de sono e aumento da frequência cardíaca (Silva, 2003).

Em excesso, a cafeína pode ocasionar alguns sintomas como irritabilidade, agitação, ansiedade, dor de cabeça, insônia, aumento na produção do suco gástrico, aumento da pressão arterial e taquicardia (Katzung, 2006). A quantidade de 10g de cafeína pura, tomados de uma só vez, pode ser uma dose letal para o ser humano. Isto equivale a beber aproximadamente 20 litros de café forte (82 mg de cafeína/150 mL) (Schulz *et al.*, 2002).

A absorção da cafeína no organismo é muito rápida (em torno de 1 hora), assim como a sua distribuição, passando rapidamente para o sistema nervoso central. O tempo de meia vida deste alcalóide pode variar de 5 a 7 horas. Este valor foi definido para indivíduos adultos, não fumantes (em indivíduos fumantes, o tempo de meia vida da cafeína é reduzido para cerca de metade, aproximadamente 3 horas, valor semelhante ao de um bebê). O efeito de medicação pode aumentar este período de tempo (uma mulher que ingiere contraceptivos demora cerca de 13 horas para degradar metade da dose de cafeína ingerida). Uma mulher grávida pode demorar cerca de 20 horas (Silva, 2003).

## **2.8) CAFÉ E DIABETES**

A maioria das pesquisas sobre os fatores dietéticos e o risco de diabetes tipo 2 (DM2) focaliza os macronutrientes (Hu *et al.*, 2001). Entretanto, micronutrientes e fitoquímicos também podem afetar o metabolismo da glicose (van Dam, 2003).

Evidências epidemiológicas sugerem que o alto consumo de café pode reduzir o risco de DM2 (van Dam, 2006). Em 2002, resultados de um estudo de coorte holandês sobre o consumo de café e o risco de DM2 foi reportado. Os participantes que consumiam 7 ou mais xícaras de café por dia tiveram 0,50 vezes (95% de intervalo de confiança) menos chance de desenvolver DM2 comparado com os que consumiam 2 ou menos xícaras de café por dia (van Dam, 2002). Em seguida, resultados de 15 estudos epidemiológicos foram publicados sobre o consumo habitual de café em relação à sensibilidade a insulina, hiperglicemia e risco de DM2 em vários países (van Dam, 2006).

van Dam e Hu (2005) realizaram uma sistemática revisão sobre o consumo de café e o risco de DM2. Neste trabalho foram identificados 9 estudos de coorte, incluindo 193.473 participantes e 8.394 casos de DM2. Os autores encontraram um risco relativo de 0,65 (95% de intervalo de confiança) para o maior consumo de café ( $\geq 6$  ou  $\geq 7$  xícaras por dia) e 0,72 (95% de intervalo de confiança) para o segundo maior consumo (4-6 xícaras por dia) comparado com o menor consumo do produto (0 ou  $\leq 2$  xícaras por dia). Ou seja, os participantes que consumiam 4 a 6 xícaras de café por dia ou maior ou

igual a 6 a 7 xícaras tiveram 28% e 35%, respectivamente, menor risco de desenvolverem DM2 comparados com aqueles que consumiam de 0 a 2 xícaras de café por dia. Não houve diferenças significativas por sexo, obesidade ou região (Estados Unidos ou Europa).

A distinção entre o café filtrado e o chamado em algumas regiões, como na Escandinávia, de café fervido (não é filtrado, finas partículas de pó decantam no fundo da xícara) ou o café turco/grego (em finos sobrenadantes), ou o café expresso e o instantâneo, são relevantes, visto que algumas substâncias ficam retidas na borra do café, como os diterpenos cafestol e caveol. Estes diterpenos foram associados em alguns estudos com o aumento dos níveis de colesterol sérico (Post *et al.*, 2000). Em um estudo Finlandês, os autores não encontraram associação entre o consumo de café e o risco de DM2. Porém é relevante mencionar que os pesquisadores avaliaram o consumo do café por um período curto e o café fervido foi o mais freqüente tipo de café consumido pelos participantes finlandeses (Reunanen *et al.*, 2003). Tuomilehto *et al.* (2004) encontraram que ambos os tipos de café, o fervido e o filtrado foram associados com o menor risco de DM2. Entretanto, o risco foi menor para os participantes que consumiam o café filtrado que os que consumiam o café fervido.

Diferentes possibilidades entre os efeitos do café regular e do descafeinado são também de interesse. Em um estudo europeu, não houve diferença entre o café regular e o descafeinado. Entretanto, os resultados deste estudo refletem normalmente o consumo de café regular, visto que o consumo do café descafeinado é relativamente menor (van Dam e Feskens, 2002).

Um estudo prospectivo realizado nos EUA (Salazar-Martinez *et al.*, 2004) durante um período de 12-18 anos, constatou que, entre os homens que tomavam mais de seis xícaras de café cafeinado por dia, o risco de diabetes do tipo 2 era cerca da 50% menor do que o risco existente entre os homens que não tomavam café; entre as mulheres, o risco era cerca de 30% menor. Estes efeitos também foram observados entre os que tomavam café descafeinado, mas em escala mais modesta. No caso dos homens, a redução de risco era de 25%, e no caso das mulheres, de 15%. Estes dados indicam não ser apenas a cafeína a responsável pela diminuição do risco de DM2.

Em um estudo sueco, o café ou o chá com açúcar foi associado com uma menor sensibilidade insulínica, enquanto não foi encontrada esta associação com o café ou o chá com leite (Årnlöv *et al.*, 2004). Entretanto, para a maior parte das pessoas a quantidade de açúcar e leite adicionado no café foi menor comparado a outros trabalhos (van Dam e Hu, 2005). Em um estudo holandês, foi observado uma associação inversa com a glicose pós prandial (van Dam *et al.*, 2004) e o risco de DM2 (van Dam e Feskens, 2002) para o café com ou sem açúcar e o café com ou sem leite.

O tamanho da xícara de café e a concentração de pó no café (café forte ou fraco) podem diferir substancialmente entre os países. Particularmente, o tamanho da xícara de café é maior nos Estados Unidos,  $\approx$  250 mL (Bracken *et al.*, 2002), comparado com a Europa,  $\approx$  125-150 mL (van Dam *et al.*, 2004; Årnlöv *et al.*, 2004). Entretanto, isto pode ser compensado pelo fato do café nos Estados Unidos ser geralmente mais fraco que o da Europa (Schaafsma, 1989).

Rosengren *et al.* (2004), realizaram um estudo prospectivo de 18 anos sobre a incidência de diabetes em mulheres suecas em relação ao consumo de café. A amostra foi composta por 1361 mulheres, entre 39 e 65 anos, sem problemas cardiovasculares e diabetes. O risco de desenvolvimento de diabetes foi 475 por 100.000 pessoas por ano nas mulheres que consumiam 0 - 2 xícaras de café por dia, 271 para aquelas cujo consumo era de 3 - 4 xícaras, 202 para o consumo de 5 - 6 xícaras e 267 para as que consumiam mais que 7 xícaras. Posteriores ajustes para fumo, baixa atividade física, escolaridade e índice de massa corporal não alteraram estes resultados. Houve uma elevação da concentração de colesterol sérico com o aumento do consumo de café, com uma diferença média do menor para o maior consumo da bebida de 0,34 mmol/l. Os níveis de triglicérides foram maiores nas mulheres que consumiam menos que 2 xícaras de café por dia. Não houve associação significativa entre o consumo de café e a pressão sanguínea.

### **2.8.1) POSSÍVEIS MECANISMOS**

A maior parte dos dados sobre os efeitos do consumo de café no metabolismo da glicose é baseada em estudos com animais e *in vitro*, e a

relevância para o desenvolvimento em humanos é ainda obscuro. Porém, os resultados sugerem que os efeitos do consumo de café no metabolismo da glicose é biologicamente plausível, e que os efeitos do café podem não ser equivalentes aos efeitos deletérios da cafeína (van Dam, 2006).

Várias substâncias presentes no café, além da cafeína, como o ácido clorogênico (Shearer et al., 2003) e o magnésio (de Valk, 1999) têm mostrado afetar o metabolismo de glicose em animais e em estudos metabólicos com humanos.

### **2.8.1.1) CAFEÍNA**

A ingestão de cafeína foi associada com a redução da sensibilidade à insulina em estudos metabólicos de curto período em humanos (Greer *et al.*, 2001; Bhathena *et al.*, 2002; Keijzers *et al.*, 2002). Este efeito ocorre provavelmente pelo fato da cafeína aumentar a síntese de epinefrina ou atuar como antagonista do receptor de adenosina (Keijzers *et al.*, 2002). A epinefrina, além da sua função como neurotransmissor, também pode influenciar a taxa metabólica, estimulando a secreção de insulina, a glicogenólise e a mobilização de ácidos graxos (Graham *et al.*, 1998). Já a adenosina diminui a atividade neural e possui um efeito vasodilatador nos vasos sanguíneos, reduzindo a frequência cardíaca, a pressão arterial e a temperatura corporal, e também diminui a lipólise (Yi *et al.*, 2006). Porém, os efeitos da cafeína no DM2 não podem ser extrapolados para o consumo a longo prazo de café, pois os efeitos do café na epinefrina são mais fracos que os da cafeína usada isoladamente (Graham *et al.*, 1998) e o estímulo da cafeína no aumento dos níveis de epinefrina diminuem após ingestão contínua (Robinson *et al.*, 2004). Paradoxalmente, a ingestão de cafeína em estudos de intervenção por períodos curtos indica que a cafeína aumenta a concentração de glicose pós prandial (Wachman et al., 1970; Pizziol et al., 1998; Lane et al., 2002; Robinson et al., 2004).

Baseados em estudos com animais, os efeitos da cafeína no metabolismo da glicose através do aumento da expressão de proteínas não acopladas e da oxidação lipídica também podem ser sugeridos (Yoshioka *et al.*, 2002). Entretanto, recentes descobertas de estudos observacionais indicam

que a associação inversa do consumo de café e o risco de DM2 podem não ser explicados pela cafeína, pois o consumo de café descafeinado também foi associado com o menor risco de DM2 em estudos de coorte (Salazar-Martinez *et al.*, 2004; Greenberg *et al.*, 2005).

### **2.8.1.2) ÁCIDO CLOROGÊNICO**

O ácido clorogênico (ACL) é o maior componente do café. Estima-se que a ingestão de ACL é maior nas pessoas que consomem regularmente café do que nas que não consomem a bebida (Clifford, 1999). O ACL é parcialmente absorvido no intestino delgado (Olthof *et al.*, 2001) e no grosso, após ser metabolizados por bactérias (Olthof *et al.*, 2003). Pesquisas indicam que a ingestão de ACL reduz a concentração de glicose em ratos (Andrade-Cetto *et al.*, 2001; Herling *et al.*, 1999). Além disso, a alta ingestão de ácido quínico, produto do ácido clorogênico formado após torrefação do café, aumenta a sensibilidade à insulina em ratos (Shearer *et al.*, 2003).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos benéficos do ACL no metabolismo da glicose (van Dam, 2006).

Primeiro, o ACL pode diminuir a absorção da glicose no intestino por inibir a glicose-6-fosfato translocase 1 e reduzir o gradiente de sódio, sendo que este último afeta o metabolismo de glicose, pois a absorção da glicose no intestino é dependente deste gradiente de sódio. De fato, o consumo de café descafeinado parece diminuir a absorção de glicose e estimular a secreção do hormônio incretina glucagon-like peptídeo 1 em estudo metabólico em humanos (Johnston *et al.*, 2003). As incretinas são hormônios secretados pelas células endócrinas localizadas no epitélio do intestino delgado. Existem dois hormônios principais: o GLP-1 (glucagon-like peptide-1) e o GIP (glucose-dependent insulinotropic peptide). O GLP-1 é o mais importante na patogênese do DM-2, ele estimula a síntese e a secreção de insulina dependente da glicemia; inibe a secreção de glucagon, promove o retardamento do esvaziamento gástrico e diminui o apetite. Os níveis de GLP-1 são baixos no estado de jejum e aumentam pela ingestão de uma refeição mista ou refeições ricas em gorduras e carboidratos. Sua secreção ocorre nas células L do íleo e

cólon. A diminuição do glucagon ocorre apenas no estado pós-prandial e não afeta a ação do glucagon na manutenção da glicemia no estado de jejum. Sua ação diminuindo o esvaziamento gástrico contribui para a diminuição da elevação da glicemia no estado pós-prandial (Revista Brasileira de Medicina, 2007).

Abaixo, encontra-se a figura 11 que sumariza as ações do GLP-1 nos tecidos periféricos.

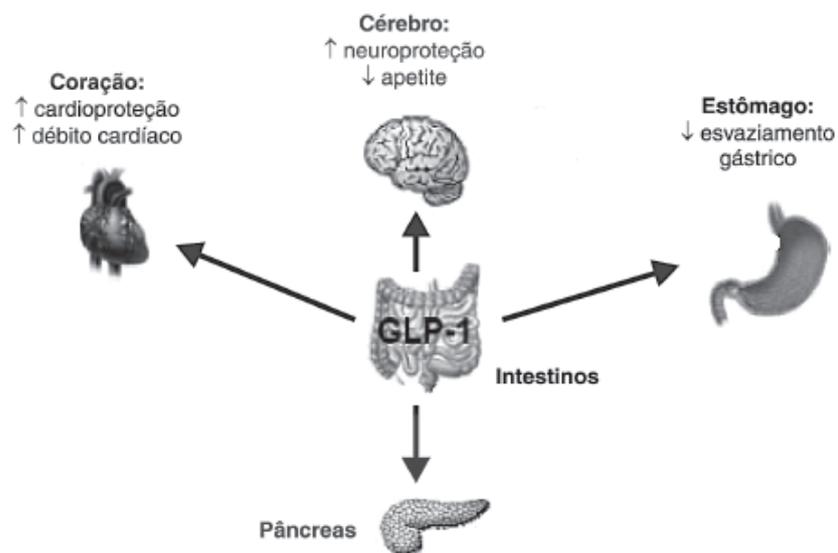


Figura 11. Ações do GLP-1 nos tecidos periféricos.

O GLP-1 diminui a secreção de glucagon pelas células alfa do pâncreas, promovendo as seguintes ações representadas no quadro 5.

#### Quadro 4. Funções do GLP-1.

FUNÇÕES DO GLP-1	
Aumenta a sensibilidade à insulina	Aumenta a captação e o armazenamento de glicose
	Diminui a produção de glicose pelo fígado
Aumenta a biossíntese de insulina	Aumenta a disponibilidade de insulina na circulação
Aumenta a proliferação e a neogênese das células beta	
Diminui a apoptose das células	

Adaptado de: Baggio & Drucker – <http://www.medscape.com/viewarticle/530215>

Efeitos do café nas incretinas podem explicar porque o consumo de café reduz a concentração de glicose no plasma após carga oral de glicose (Feinberg *et al.*, 1968), mas não após carga venosa de glicose (Jankelson *et al.*, 1967).

Segundo, estudos *in vitro* (Arion *et al.*, 1997) e com animais (Herling *et al.*, 1999) com ACL mostraram que este composto pode inibir a produção hepática de glicose por inibir a glicose-6-fosfatase. Tem sido questionado se o ACL chega intacto no fígado (Mc Carty, 2005), pois apenas os metabólicos do ACL são detectados na circulação sanguínea após o consumo de café (Johnston *et al.*, 2003). Entretanto, dados de estudos metabólicos em pacientes ileostomizados sugerem que a maior parte do ACL absorvido no intestino delgado é absorvido intacto e pode ser metabolizado extensivamente no fígado (Olthof *et al.*, 2001).

Terceiro, o café contribuiu para a capacidade antioxidante *in vitro* na dieta de populações da Europa e Noruega (Svilaas *et al.*, 2004; Pulido *et al.*, 2003), e o ACL é o componente mais responsabilizado por esta ação antioxidante do café (Clifford, 1999).

Quarto, o ACL pode atuar como um quelador de metais, mudando a composição corporal dos tecidos moles de ratos (Rodríguez e Hadley, 2002), podendo aumentar a composição de magnésio no fígado. Estes autores sugerem que a mudança na composição de minerais pode melhorar a tolerância à glicose.

Finalmente, o ACL pode inibir a formação de compostos N-nitroso no trato gastrointestinal, compostos que parecem favorecer o aparecimento do DM2 por possuírem toxicidade às células beta do pâncreas (van Dam, 2002).

### **2.8.1.3) LIGNINAS**

O café contém quantidades substanciais de várias ligninas. Estas podem ser convertidas a enterolactona ou enterodiol por bactérias intestinais e entrar na circulação sanguínea. As ligninas podem afetar o metabolismo de glicose através das suas ações antioxidantes e antiestrogênica (Bathena e Velasquez, 2002).

### **2.8.1.4) OUTROS CONSTITUINTES DO CAFÉ**

O café também contém numerosos outros compostos, incluindo quantidades substanciais de Mg, K, trigonelina e niacina (U.S. Department of Agricultura, 2004; Milder *et al.*, 2005). Mishkinisky *et al.* (1967), mostraram que a trigonelina reduziu a concentração de glicose em ratos diabéticos. A alta ingestão de Mg também foi associada com menor risco de DM2 em vários estudos de coorte (Lopez-Ridaura *et al.*, 2004), e doses farmacológicas foram associadas com uma melhor sensibilidade à insulina em outros estudos de intervenção. O magnésio é cofator de várias enzimas envolvidas nos processos de fosforilação, que são essenciais para o metabolismo da glicose (Lopez-Ridaura *et al.*, 2004). Entretanto, a ingestão regular de Mg não explicou a associação do consumo de café com a tolerância à glicose e menor risco de DM2 (Salazar-Martinez *et al.*, 2004; van Dam *et al.*, 2004).

O consumo de café também tem sido associado com menores níveis da  $\gamma$ -glutamiltransferase e outras enzimas hepáticas que favorecem o desenvolvimento do diabetes (La Vecchia, 2005; Lee *et al.*, 2004).

**Quadro 5. Componentes do café e possíveis mecanismos no metabolismo da glicose.**

<b>Componentes</b>	<b>Mecanismos de ação sugeridos</b>
CAFEÍNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reduz a glicose através do estímulo da epinefrina ou antagonizando o receptor de adenosina (Greer <i>et al.</i>, 2001; Keijzers <i>et al.</i>, 2002).</li> <li>- Aumenta a expressão de proteínas não acopladas e a oxidação de lipídeos (Yoshiok <i>et al.</i>, 2002).</li> </ul>
ÁCIDO CLOROGÊNICO E ÁCIDO QUÍNICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Potente antioxidante (Svilaas <i>et al.</i>, 2004; Pulido <i>et al.</i>, 2003).</li> <li>- Reduz a síntese de glicose hepática através da inibição da glicose-6-fosfatase (Herling <i>et al.</i>, 1999).</li> <li>- Reduz a absorção de glicose intestinal por inibir a glicose-6-fosfato translocase 1, reduzir o gradiente de sódio e aumentar os níveis de GLP-1 (Johnston <i>et al.</i>, 2003).</li> <li>- Exerce efeitos na composição mineral de tecidos por ser um quelador de metais, podendo aumentar o Mg no fígado (Rodríguez e HadLey, 2002).</li> <li>- Inibe a formação de compostos N-nitroso no trato gastrintestinal, tóxicos às células beta do pâncreas (van Dam, 2002).</li> </ul>
MAGNÉSIO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cofator de várias enzimas envolvidas nos processos de fosforilação, que são essenciais para o metabolismo da glicose (Lopez-Ridaura <i>et al.</i>, 2004).</li> <li>- Pode afetar a atividade do receptor de insulina por possuir afinidade com o receptor deste hormônio ou afetar a viscosidade da membrana (Lopez-Ridaura <i>et al.</i>, 2004).</li> </ul>
LIGNINAS	Possui ações antioxidantes e antiestrogênica (Bhathena e Velasquez, 2002).

Adaptado de van Dam, 2006.

### 2.8.1.5) OUTROS MECANISMOS DE AÇÃO

Baseados em uma série de experimentos com animais e estudos observacionais com humanos, tornou-se evidente a ação do excesso de glicocorticóide na patogênese do DM2 e na síndrome metabólica (Rosmond, 2005 e Asensio *et al.*, 2004). Em particular, a conversão local de 11-cetoglicocorticóides (cortisona, 11-dehidrocorticosterona) para 11 $\beta$ -hidroxiglicocorticóide (cortisol, corticosterona) pela 11 $\beta$ -hidroxiesteróide dehidrogenase tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1) nos tecidos metabolicamente ativos como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético têm sido implicados nestas desordens (TomLinson, 2005; Paterson *et al.*, 2005 e Wang, 2006). O cortisol, assim como o glucagon, age como um antagonista fisiológico da insulina, promovendo a quebra de moléculas de carboidratos, lipídeos e proteínas, mobilizando, desta maneira, as reservas energéticas. Isto aumenta a glicemia e a produção de glicogênio pelo fígado. Adicionalmente, o cortisol aumenta a pressão sanguínea, inibe doenças auto-imunes e a formação óssea (<http://pt.wikipedia.org>).

Camundongos específicos que possuem uma alta expressão da 11 $\beta$ -HSD1 em adipócitos apresentam todos os sintomas típicos da síndrome metabólica (Masuzaki *et al.*, 2001 e Masuzaki *et al.*, 2003). Os camundongos que possuem uma alta expressão da 11 $\beta$ -HSD1 no fígado, desenvolveram, resistência insulínica, dislipidemia e hipertensão, mesmo não sendo obesos (Paterson *et al.*, 2004). Além disso, vários estudos relatam uma elevada expressão da 11 $\beta$ -HSD1 no tecido adiposo de indivíduos obesos (TomLinson, 2005). O tratamento da obesidade e do diabetes com inibidores da 11 $\beta$ -HSD1 em determinados tipos de camundongos resultam em um significativo aumento da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina, acompanhado com uma redução de depósitos de gordura visceral (Alberts *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2003; Hermanowski-Vosatka *et al.*, 2005). Estes estudos sugerem que a inibição ou a baixa regulação da 11 $\beta$ -HSD1 resultam em efeitos benéficos para a melhoria da síndrome metabólica (Odermat *et al.*, 2005).

Schweizer *et al.* (2003), demonstraram a existência de compostos naturais que inibem a 11 $\beta$ -HSD1, como a flavonona e a 2'-hidroxiflavonona presentes em frutos vermelhos e amarelos e vegetais. Como o café é rico em

compostos biologicamente ativos, como ácido nicotínico, ácido clorogênico e a trigonelina, pesquisas indicam que ele também apresenta efeitos antidiabéticos. Atanasov *et al.* (2006), testaram compostos que continham café na atividade da 11 $\beta$ -HSD1. O preparo dos extratos do café foi correspondente ao café Espresso Italian, 10g de grãos torrados e moídos do *Café Arábica* extraído com 30 mL de água por 15 segundos a 100 °C e pressurizado a 15 bar. Após a esterilização do filtrado, alíquotas foram congeladas a -20 °C e armazenados para posterior análise. A presença de extratos de café na concentração de 1% inibiu quase por completo a conversão da cortisona a cortisol dependente da 11 $\beta$ -HSD1 em células lisadas (figura 12).

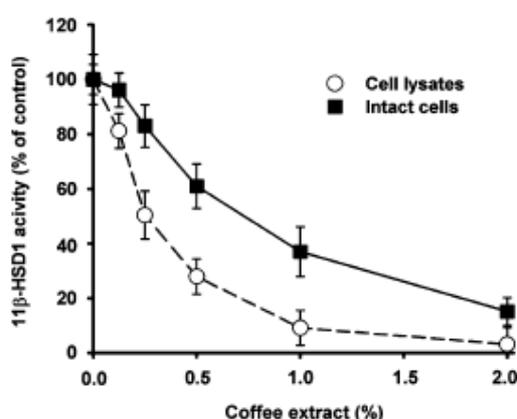


Figura 12. Inibição da atividade da 11 $\beta$ -HSD1 por extratos de café em diferentes concentrações em células lisadas.

Posteriormente, foi mensurado os efeitos de extratos de café descafeinado na atividade da 11 $\beta$ -HSD1 e foi obtido inibição semelhante comparado aos extratos de café normais. Além disso, 2mM de cafeína pura não afetou a atividade da 11 $\beta$ -HSD1. Outro dado relevante, foi que 200 $\mu$ M de ácido cafeico, ácido clorogênico ou trigonelina, três substâncias metabolicamente ativas do café, também não inibiram a atividade da 11 $\beta$ -HSD1. O componente inibitório do café foi estável ao calor com polaridade considerável. O extrato também preveniu subsequentemente a translocação nuclear do receptor de glicocorticóide e bloqueou a expressão induzida pelo glicocorticóide da enzima chave gliconeogênica, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase. Os autores sugerem que parte dos efeitos antidiabéticos do café é devido a inibição da 11 $\beta$ -HSD1, enzima responsável pela conversão da cortisona à cortisol.

### **3) OBJETIVOS**

#### **3.1) OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar os possíveis efeitos de tinturas do café (*Coffea arabica*) em ratos com diabetes induzido pela administração com aloxano.

#### **3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

a) Induzir diabetes em ratos da raça Wistar com administração intraperitoneal de aloxano.

b) Preparar tinturas de café, utilizando diversas partes desta planta, casca cereja, fruto verde, fruto cereja, folha seca, folha verde e de café solúvel de uma marca comercial.

c) Avaliar os níveis séricos de glicose, triacilglicerol e colesterol total dos animais, após tratamento com diferentes tinturas de café.

#### 4) MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos para avaliar diferentes tinturas de café em ratos com diabetes induzido pela administração de aloxano. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram utilizados ratos da raça Wistar, com 45 dias de idade, com peso entre 180 e 250 g, machos e fêmeas, oriundos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Em todos os experimentos, os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo em cada uma seis animais, em ambiente climatizado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração comercial (Labina - Purina<sup>®</sup>) e água “*ad libitum*”.

Os cinco primeiros dias foram reservados para a adaptação dos animais ao novo local do experimento. Após este período, os animais permaneceram em jejum de 16 horas para a indução do diabetes, que consistiu na administração de aloxano (Alloxan Monohydrate Sigma<sup>R</sup>), também conhecido como 2,3,5,6-tetraoxoexaidropirimidina monoidratada a 15% p/v diluído em solução de NaCl a 0,9% na dose de 60mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal. Optou-se pela utilização de aloxano como droga diabetogênica, devido às características apresentadas serem semelhantes às encontradas na síndrome diabética em humanos: glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, entre outras (Carvalho, 2002). Em seguida, para evitar a morte dos animais por hipoglicemia, os ratos receberam uma solução hipersaturada de glicose a 90% por 2 dias.

Sete dias após a aplicação do aloxano, parte dos animais que receberam esta droga, após jejum de 12 horas, foram eutanasiados para a determinação dos níveis séricos de glicose. Verificou-se que todos os animais que receberam o aloxano ficaram diabéticos (glicose acima de 180 mg/dL).

Foram utilizadas tinturas do café *Coffea arábica* da variedade catuaí vermelho da fazenda de propriedade de Sebastião Lopes da Silva, localizada na cidade de Coimbra-Mg. Estas tinturas foram preparadas com 30g do material diluído em 70mL de água e 30mL de álcool de cereal. A solução foi armazenada em vidro âmbar e agitada 2 vezes ao dia por aproximadamente 7 dias. Após este período, foi filtrada com filtro de papel, armazenada novamente

em vidro âmbar e administrada por via oral (gavagem) aos animais, com exceção do do grupo diabético (grupo 1) e do grupo controle (grupo 2).

Em todos os ensaios biológicos, o tratamento foi realizado durante 30 dias. Em seguida, todos os animais foram eutanasiados, devidamente anestesiados por via intraperitoneal de Ketamina (180 mg/Kg) e Xilasina (10 mg/Kg). As amostras de sangue (cerca de 5 mL por animal) foram coletadas por punção cardíaca, colocadas em tubos de ensaio e centrifugadas a 7100 x g por 15 minutos para obtenção do soro. Foram analisados os níveis séricos de glicose, colesterol e triacilglicerol, utilizando kits da marca BIOCLIN e o equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé).

Na análise estatística, cada tratamento foi comparado ao grupo doente não tratado pelo teste de Dunnett, considerando 5% de significância.

#### **4.1: Efeito das tinturas preparadas com frutos verdes, frutos cereja e cascas de frutos cereja do café catuaí vermelho em ratos diabéticos.**

Para a realização desse experimento foram utilizados 132 ratos. Sete dias após a indução do diabetes, 66 animais que receberam o aloxano, após jejum de 12 horas, foram sacrificados para a confirmação do diabetes. Os grupos foram constituídos conforme descrição abaixo:

GRUPO	TRATAMENTO	DOSE(mL)
G1	RAÇÃO + ALOXANO	-
G2	RAÇÃO (CONTROLE)	-
G3	RAÇÃO + ALOXANO + CASCA CEREJA	0,5
G4	RAÇÃO + ALOXANO + CASCA CEREJA	1,0
G5	RAÇÃO + ALOXANO + CASCA CEREJA	2,0
G6	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO VERDE	0,5
G7	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO VERDE	1,0
G8	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO VERDE	2,0
G9	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO CEREJA	0,5
G10	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO CEREJA	1,0
G11	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO CEREJA	2,0

#### **4.2: Efeito das tinturas preparadas com folhas secas e folhas verdes do café catuaí vermelho em ratos diabéticos.**

Para a realização desse experimento foram utilizados 96 ratos. Sete dias após a indução do diabetes, 46 animais que receberam o aloxano, após jejum de 12 horas, foram sacrificados para a confirmação do diabetes. Para a obtenção da tintura dos grupos de 3 a 5 (folha seca), as folhas in natura foram previamente secas em estufa na temperatura de 40 °C. Os grupos foram constituídos conforme descrição abaixo:

GRUPO	TRATAMENTO	DOSE(mL)
G1	RAÇÃO + ALOXANO	-
G2	RAÇÃO (CONTROLE)	-
G3	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA SECA	0,5
G4	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA SECA	1,0
G5	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA SECA	2,0
G6	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA VERDE	0,5
G7	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA VERDE	1,0
G8	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA VERDE	2,0

#### **4.3: Efeito das tinturas preparadas com café solúvel em ratos diabéticos.**

Para a realização desse experimento foram utilizados 60 ratos. Sete dias após a indução do diabetes, 30 animais que receberam o aloxano, após jejum de 12 horas, foram sacrificados para a confirmação do diabetes. A tintura utilizada neste ensaio biológico foi o café solúvel torrado e moído de uma marca comercial. Os grupos foram constituídos conforme descrição abaixo:

GRUPO	TRATAMENTO	DOSE(mL)
G1	RAÇÃO + ALOXANO	-
G2	RAÇÃO (CONTROLE)	-
G3	RAÇÃO + ALOXANO + CAFÉ SOLÚVEL	0,5
G4	RAÇÃO + ALOXANO + CAFÉ SOLÚVEL	1,0
G5	RAÇÃO + ALOXANO + CAFÉ SOLÚVEL	2,0

## 5) RESULTADOS

### 5.1) Efeito das tinturas preparadas com casca de fruto cereja, fruto verde e fruto cereja do café catuaí vermelho em ratos diabéticos.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 2, o grupo controle e todos os tratamentos, com exceção do G9, aumentaram levemente as concentrações de colesterol no soro sanguíneo. O grupo 9 (Aloxano + Fruto Cereja 0,5 mL) reduziu em 5% este parâmetro, porém não foi estatisticamente significativo. Os grupos 2 (controle), 4, 6, 7, 8, 10 e 11 foram diferentes estatisticamente comparados ao grupo doente não tratado. Entretanto, com relação ao significado clínico destas pequenas variações, observou-se que os tratamentos com as tinturas de café não aumentaram as concentrações de colesterol ao ponto de desenvolverem uma hipercolesterolemia. Portanto, analisando o parâmetro colesterol, observou-se que as tinturas de café não provocaram nem uma hipocolesterolemia nem uma hipercolesterolemia nos animais.

**Tabela 2. Valores médios de colesterol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Colesterol (mg / dL)</b>	<b>% Variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)</b>
G1 = Aloxano + Ração	93,40 A	-
G2 = Ração	103,68 B	+11
G3 = Aloxano + Casca cereja (0,5 mL)	96,21 A	+3
G4 = Aloxano + Casca cereja (1,0 mL)	107,77 B	+15
G5 = Aloxano + Casca cereja (2,0 mL)	98,36 A	+5
G6 = Aloxano + Fruto verde (0,5 mL)	107,24 B	+15
G7 = Aloxano + Fruto verde (1,0 mL)	99,06 B	+6
G8 = Aloxano + Fruto verde (2,0 mL)	108,88 B	+17
G9 = Aloxano + Fruto cereja (0,5 mL)	88,62 A	-5
G10 = Aloxano + Fruto cereja (1,0 mL)	115,12 B	+23
G11 = Aloxano + Fruto cereja (2,0 mL)	106,15 B	+14

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

As tabelas 2A, 2B e 2C comparam as diferentes doses (0,5 mL, 1mL e 2 mL) da tintura de casca cereja, fruto verde e fruto cereja do café, respectivamente, com relação ao parâmetro colesterol. É importante ressaltar que nestas tabelas foram comparados apenas os animais doentes tratados, com o objetivo de verificar qual a dose seria mais benéfica à saúde, segundo o parâmetro colesterol.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 2A, observou-se que a dose de 1,0 mL da tintura de casca cereja do café resultou em uma concentração de colesterol significativamente maior comparado às doses de 0,5 mL e 2,0 mL. Assim, as doses de 0,5 mL e 2,0 mL da tintura de casca cereja do café seriam menos prejudiciais com relação ao aumento dos níveis de colesterol sanguíneos .

Na tabela 2B, não houve diferenças significativas entre as três doses de tintura de fruto verde do café com relação aos níveis de colesterol.

Na tabela 2C, a dose de 0,5 mL da tintura de fruto cereja do café promoveu um aumento significativamente menor comparado às outras doses (1,0 e 2,0 mL). Portanto, a dose de 0,5 mL desta tintura parece ser menos prejudicial em aumentar as concentrações de colesterol.

**Tabela 2A. Comparação das diferentes doses de tintura de casca cereja do café com relação ao parâmetro colesterol.**

Dose de Casca Cereja	Colesterol (mg / dL)
0,5 mL	96,21 B
1,0 mL	107,77 A
2,0 mL	98,36 B

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

**Tabela 2B. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto verde do café com relação ao parâmetro colesterol.**

Dose de Fruto Verde	Colesterol (mg / dL)
0,5 mL	107,24 A
1,0 mL	99,06 A
2,0 mL	108,88 A

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

**Tabela 2C. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto cereja do café com relação ao parâmetro colesterol.**

Dose de Fruto Cereja	Colesterol (mg / dL)
0,5 mL	88,62 B
1,0 mL	115,12 A
2,0 mL	106,15 A

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

Com relação ao parâmetro triacilglicerol (tabela 3), todos os tratamentos (grupos 3 a 11) apresentaram reduções (-27% a -47%) estatisticamente significantes. Sendo que os maiores decréscimos, 47%, 46% e 45%, foram observados no grupo 7 (Aloxano + Fruto verde 1,0 mL), grupo 3 (Aloxano + Casca cereja 0,5 mL) e no grupo 11 (Aloxano + Fruto cereja 2,0 mL), respectivamente. E a menor redução (-27%) ocorreu com o grupo 6 (Aloxano + Fruto verde 0,5 mL). É importante ressaltar, que o grupo 9 (Aloxano + Fruto cereja 0,5 mL), o único que não aumentou os níveis de colesterol segundo a tabela 2 vista anteriormente, promoveu uma diminuição de 43% dos níveis de triacilgliceróis. Pode-se, então, observar que todos os tratamentos, seja com tinturas de casca cereja, fruto verde ou fruto cereja do café, foram benéficos na redução dos parâmetros de triacilgliceróis.

**Tabela 3. Valores médios de triacilglicerol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

Tratamentos	Triglicerídeos (mg / dL)	% Variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)
G1 = Aloxano + Ração	104,03 A	-
G2 = Ração	102,61 A	-1
G3 = Aloxano + Casca cereja (0,5 mL)	56,33 B	-46
G4 = Aloxano + Casca cereja (1,0 mL)	70,68 B	-32
G5 = Aloxano + Casca cereja (2,0 mL)	64,78 B	-38
G6 = Aloxano + Fruto verde (0,5 mL)	75,76 B	-27
G7 = Aloxano + Fruto verde (1,0 mL)	54,69 B	-47
G8 = Aloxano + Fruto verde (2,0 mL)	58,71 B	-44
G9 = Aloxano + Fruto cereja (0,5 mL)	59,47 B	-43
G10 = Aloxano + Fruto cereja (1,0 ML)	60,95 B	-41
G11 = Aloxano + Fruto cereja (2,0 mL)	57,42 B	-45

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

As tabelas 3A, 3B e 3C comparam as diferentes doses (0,5 mL, 1mL e 2 mL) da tintura de casca cereja, fruto verde e fruto cereja do café, respectivamente, com relação ao parâmetro triacilglicerol.

Na tabela 3A e 3C , não houve diferenças significativas entre as três doses de tintura de casca cereja e fruto cereja do café, respectivamente, com relação aos níveis de triacilglicerol. E, como ocorreu com o parâmetro colesterol, a dose de 1,0 mL da tintura de casca cereja do café (tabela 2A) foi a que apresentou o maior nível de triacilglicerol comparado aos tratamentos com a mesma tintura, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

A dose de 0,5 mL da tintura de fruto verde do café (tabela 3B) resultou em uma diminuição significativamente menor dos níveis de triacilglicerol comparado as doses de 1,0 mL e 2,0 mL da mesma tintura. Estes dados sugerem que estas duas últimas doses são mais eficazes no controle do triacilglicerol.

**Tabela 3A. Comparação das diferentes doses de tintura de casca cereja do café com relação ao parâmetro triacilglicerol.**

Dose de Casca Cereja	Triacilglicerol (mg / dL)
0,5 mL	56,33 A
1,0 mL	70,68 A
2,0 mL	64,78 A

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

**Tabela 3B. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto verde do café com relação ao parâmetro triacilglicerol.**

Dose de Fruto Verde	Triacilglicerol (mg / dL)
0,5 mL	75,76 A
1,0 mL	54,69 B
2,0 mL	58,71 B

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

**Tabela 3C. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto cereja do café com relação ao parâmetro triacilglicerol.**

Dose de Fruto Cereja	Triacilglicerol (mg / dL)
0,5 mL	59,47 A
1,0 mL	60,95 A
2,0 mL	57,42 A

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

Na tabela 4, observou-se que todos os tratamentos foram significativamente eficazes na redução da glicose comparado com o grupo de animais doentes não tratados. Sendo que o grupo 6 (Aloxano + Fruto verde 0,5 mL) foi o tratamento que mais influenciou na diminuição dos níveis glicose, reduzindo em 49% este parâmetro.

**Tabela 4. Valores médios de glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

Tratamentos	Glicose (mg / dL)	% Variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)
G1 = Aloxano + Ração	343,37 A	-
G2 = Ração	112,83 B	-67
G3 = Aloxano + Casca cereja (0,5 mL)	229,05 B	-33
G4 = Aloxano + Casca cereja (1,0 mL)	241,82 B	-30
G5 = Aloxano + Casca cereja (2,0 mL)	218,27 B	-36
G6 = Aloxano + Fruto verde (0,5 mL)	176,38 B	-49
G7 = Aloxano + Fruto verde (1,0 mL)	246,02 B	-28
G8 = Aloxano + Fruto verde (2,0 mL)	245,39 B	-29
G9 = Aloxano + Fruto cereja (0,5 mL)	228,99 B	-33
G10 = Aloxano + Fruto cereja (1,0 mL)	241,54 B	-30
G11 = Aloxano + Fruto cereja (2,0 mL)	207,50 B	-40

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

Segundo as tabelas 4A e 4C, que representam a comparação das doses das tinturas casca cereja e fruto cereja, respectivamente, não houve diferença entre as três doses de uma mesma tintura.

A dose de 0,5 mL da tintura de fruto verde do café (tabela 4B) resultou em uma redução significativa da glicose comparado às outras doses.

**Tabela 4A. Comparação das diferentes doses de tintura de casca cereja do café com relação ao parâmetro glicose.**

Dose de Casca Cereja	Glicose (mg / dL)
0,5 mL	229,05 A
1,0 mL	241,82 A
2,0 mL	218,27 A

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

**Tabela 4B. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto verde do café com relação ao parâmetro glicose.**

Dose de Fruto Verde	Glicose (mg / dL)
0,5 mL	176,38 B
1,0 mL	246,02 A
2,0 mL	245,39 A

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

**Tabela 4C. Comparação das diferentes doses de tintura de fruto cereja do café com relação ao parâmetro glicose.**

Dose de Fruto Cereja	Glicose (mg / dL)
0,5 mL	228,99 A
1,0 mL	241,54 A
2,0 mL	207,50 A

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

Para melhor visualização de todos os parâmetros, na tabela 5 encontra-se o resultado dos níveis de colesterol, triacilglicerol e glicose obtidos através dos tratamentos com tinturas de casca cereja, fruto verde e fruto cereja do café catuaí vermelho.

**Tabela 5. Valores médios de colesterol, triacilglicerol e glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

Tratamentos	CONTEÚDO		% VARIAÇÃO		CONTEÚDO		% VARIAÇÃO		CONTEÚDO		% VARIAÇÃO	
	COLESTEROL				TRIGLICERÍDEOS				GLICOSE			
G1 = Aloxano + Ração	93,40	A	-		104,03	A	-		343,37	A	-	
G2 = Ração	103,68	B	+11		102,61	A	-1		112,83	B	-67	
G3 = Aloxano + Casca cereja (0,5 mL)	96,21	A	+3		56,33	B	-46		229,05	B	-33	
G4 = Aloxano + Casca cereja (1,0 mL)	107,77	B	+15		70,68	B	-32		241,82	B	-30	
G5 = Aloxano + Casca cereja (2,0 mL)	98,36	A	+5		64,78	B	-38		218,27	B	-36	
G6 = Aloxano + Fruto verde (0,5 mL)	107,24	B	+15		75,76	B	-27		176,38	B	-49	
G7 = Aloxano + Fruto verde (1,0 mL)	99,06	B	+6		54,69	B	-47		246,02	B	-28	
G8 = Aloxano + Fruto verde (2,0 mL)	108,88	B	+17		58,71	B	-44		245,39	B	-29	
G9 = Aloxano + Fruto cereja (0,5 mL)	88,62	A	-5		59,47	B	-43		228,99	B	-33	
G10 = Aloxano + Fruto cereja (1,0 mL)	115,12	B	+23		60,95	B	-41		241,54	B	-30	
G11 = Aloxano + Fruto cereja (2,0 mL)	106,15	B	+14		57,42	B	-45		207,50	B	-40	

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

## 5.2) Efeito das tinturas preparadas com folha seca e folha verde do café catuaí vermelho em ratos diabéticos.

Na tabela 6, houve uma redução significativa do parâmetro colesterol apenas no grupo 5, Aloxano + Folha seca (2,0 mL), de 26%. Os grupos 2 (normal), 6 (Aloxano + Folha verde 0,5 mL) e 8 (Aloxano + Folha verde 1,0 mL) aumentaram significativamente os níveis de colesterol comparado ao grupo dos animais doentes não tratados (grupo 1). Porém, do ponto de vista clínico, este aumento pode não ser relevante para o desenvolvimento de uma patologia, como a hipercolesterolemia.

**Tabela 6. Valores médios de colesterol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Colesterol (mg / dL)</b>	<b>% Variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)</b>
G1 = Aloxano + Ração	93,40 A	-
G2 = Ração	103,68 B	+11
G3 = Aloxano + Folha seca (0,5 mL)	92,87 A	-1
G4 = Aloxano + Folha seca (1,0 mL)	92,36 A	-1
G5 = Aloxano + Folha seca (2,0 mL)	68,67 B	-26
G6 = Aloxano + Folha verde (0,5 mL)	108,34 B	+16
G7 = Aloxano + Folha verde (1,0 mL)	114,26 B	+22
G8 = Aloxano + Folha verde (2,0 mL)	92,91 A	-1

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

Segundo a tabela 6A, a dose de 2,0 mL da tintura de folha seca do café promoveu uma maior redução do colesterol sérico comparado com as doses de 0,5 mL e 1,0 mL da mesma tintura, sendo este foi o único decréscimo estatisticamente significativo.

A dose de 1,0 mL da tintura de folha verde do café foi a que obteve a maior concentração de colesterol entre as outras doses da mesma tintura e entre todos os tratamentos, sendo estatisticamente significativa.

**Tabela 6A. Comparação das diferentes doses de tintura de folha seca do café com relação ao parâmetro colesterol.**

Dose de Folha Seca	Colesterol (mg / dL)
0,5 mL	92,87 A
1,0 mL	92,36 A
2,0 mL	68,67 B

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

**Tabela 6B. Comparação das diferentes doses de tintura de folha in natura do café com relação ao parâmetro colesterol.**

Dose de Folha Verde	Colesterol (mg / dL)
0,5 mL	108,34 A
1,0 mL	114,26 A
2,0 mL	92,91 B

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 7, todos os tratamentos (grupos 3 a 8) reduziram significativamente os níveis de triacilglicerol (30 a 48%), sendo que os grupos que obtiveram as maiores reduções foram os grupos 4 (Aloxano + Folha Seca 1,0 mL) e 5 (Aloxano + Folha Seca 2,0 mL), 48% e 46%, respectivamente.

**Tabela 7. Valores médios de triacilglicerol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

Tratamentos	Triacilglicerol (mg / dL)	% Variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)
G1 = Aloxano + Ração	104,03 A	-
G2 = Ração	102,62 A	-1
G3 = Aloxano + Folha seca (0,5 mL)	73,27 B	-30
G4 = Aloxano + Folha seca (1,0 mL)	54,31 B	-48
G5 = Aloxano + Folha seca (2,0 mL)	55,73 B	-46
G6 = Aloxano + Folha verde (0,5 mL)	63,37 B	-39
G7 = Aloxano + Folha verde (1,0 mL)	62,44 B	-40
G8 = Aloxano + Folha verde (2,0 mL)	70,73 B	-32

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

Na tabela 7A, as doses de 1,0 mL e 2,0 mL da tintura de folha seca do café foram significativamente menores com relação ao parâmetro triacilglicerol comparado a dose de 0,5 mL da mesma tintura. Este dado indica que o tratamento da tintura de folha seca na dose de 1,0 mL e 2,0 mL são mais eficazes para o controle do triacilglicerol.

Comparando as três doses das tinturas de folha verde, não houve diferenças estatísticas entre elas (tabela 7B).

**Tabela 7A. Comparação das diferentes doses de tintura de folha seca do café com relação ao parâmetro triacilglicerol.**

Dose de Folha Seca	Triacilglicerol (mg / dL)
0,5 mL	73,27 A
1,0 mL	54,31 B
2,0 mL	55,73 B

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

**Tabela 7B. Comparação das diferentes doses de tintura de folha in natura do café com relação ao parâmetro triacilglicerol.**

Dose de Folha in Natura	Triacilglicerol (mg / dL)
0,5 mL	63,37 A
1,0 mL	62,44 A
2,0 mL	70,73 A

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

Todos os tratamentos (grupos 3 a 8) reduziram significativamente os níveis de glicose (22 a 47%), segundo a tabela 8, sendo que a maior porcentagem de redução deste parâmetro, 47%, foi encontrada com o tratamento com Alozano + Folha Seca 2,0 mL (grupo 5).

**Tabela 8. Valores médios de glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Glicose (mg / dL)</b>	<b>% Variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)</b>
G1 = Aloxano + Ração	343,37 A	-
G2 = Ração	112,83 B	-67
G3 = Aloxano + Folha seca (0,5 mL)	262,82 B	-23
G4 = Aloxano + Folha seca (1,0 mL)	234,83 B	-32
G5 = Aloxano + Folha seca (2,0 mL)	180,97 B	-47
G6 = Aloxano + Folha in natura (0,5 mL)	241,18 B	-30
G7 = Aloxano + Folha in natura (1,0 mL)	193,25 B	-44
G8 = Aloxano + Folha in natura (2,0 mL)	267,61 B	-22

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

Na tabela 8A, as doses de 1,0 mL e 2,0 mL da tintura de folha seca do café foram significativamente menores com relação ao parâmetro glicose comparado a dose de 0,5 mL da mesma tintura. Este dado indica que o tratamento da tintura de folha seca na dose de 1,0 mL e 2,0 mL são mais eficazes para o controle do diabetes.

Não houve diferenças estatísticas com relação ao parâmetro de glicose entre as doses de 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL da tintura de folha verde do café (tabela 8B).

**Tabela 8A. Comparação das diferentes doses de tintura de folha seca do café com relação ao parâmetro glicose.**

<b>Dose de Folha Seca</b>	<b>Glicose (mg / dL)</b>
0,5 mL	262,82 A
1,0 mL	234,83 B
2,0 mL	180,97 B

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

**Tabela 8B. Comparação das diferentes doses de tintura de folha in natura do café com relação ao parâmetro glicose.**

Dose de Folha Verde	Glicose (mg / dL)
0,5 mL	241,18 A
1,0 mL	193,25 A
2,0 mL	267,61 A

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

Para melhor visualização de todos os parâmetros, na tabela 9 encontra-se o resultado dos níveis de colesterol, triacilglicerol e glicose obtidos através dos tratamentos com folha seca e folha verde do café catuaí vermelho.

**Tabela 9. Valores médios de colesterol, triacilglicerol e glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

Tratamentos	CONTEÚDO		% VARIAÇÃO		CONTEÚDO		% VARIAÇÃO		CONTEÚDO		% VARIAÇÃO	
	COLESTEROL				TRIGLICERÍDEOS				GLICOSE			
G1 = Aloxano + Ração	93,40	A	-		104,03	A	-		343,37	A	-	
G2 = Ração	103,68	B	+11		102,61	A	-1		112,83	B	-67	
G3 = Aloxano + Folha seca (0,5 mL)	92,87	A	-1		73,27	B	-30		262,82	B	-23	
G4 = Aloxano + Folha seca (1,0 mL)	92,36	A	-1		54,31	B	-48		234,83	B	-32	
G5 = Aloxano + Folha seca (2,0 mL)	68,67	B	-26		55,73	B	-46		180,97	B	-47	
G6 = Aloxano + Folha verde (0,5 mL)	108,34	B	+16		63,37	B	-39		241,18	B	-30	
G7 = Aloxano + Folha verde (1,0 mL)	114,26	B	+22		62,44	B	-40		193,25	B	-44	
G8 = Aloxano + Folha verde (2,0 mL)	92,91	A	-1		70,73	B	-32		267,61	B	-22	

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

### 5.3) Efeito das tinturas preparadas com café solúvel.

Os tratamentos com café solúvel aumentaram os níveis de colesterol, sendo que apenas no grupo 3, Aloxano + Café solúvel (0,5 mL), este resultado não foi estatisticamente significativo. Entretanto, o aumento das concentrações de colesterol também deve ser avaliado com relação ao significado clínico dos resultados, e estes não foram tão altos ao ponto de desenvolver uma hipercolesterolemia.

**Tabela 10. Valores médios de colesterol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Colesterol (mg / dL)</b>	<b>% Variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)</b>
G1 = Aloxano + Ração	93,40 A	-
G2 = Ração	103,68 B	+11
G3 = Aloxano + Café solúvel (0,5 mL)	96,92 A	+4
G4 = Aloxano + Café solúvel (1,0 mL)	105,17 B	+13
G5 = Aloxano + Café solúvel (2,0 mL)	115,70 B	+24

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

Em relação ao triacilglicerol, observou que o grupo 3 (Aloxano + Café solúvel 0,5 mL) reduziu em 51% e o grupo 4 (Aloxano + Café solúvel 1,0 mL) em 57% o parâmetro triacilglicerol (tabela 11), sendo estes resultados estatisticamente significativos. O grupo 5 (Aloxano + Café solúvel 2,0 mL) promoveu um pequeno aumento nos níveis de triacilglicerol, porém não foi significativo.

**Tabela 11. Valores médios de triacilglicerol em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Triacilglicerol (mg / dL)</b>	<b>% Variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)</b>
G1 = Aloxano + Ração	104,03 A	-
G2 = Ração	102,61 A	-1
G3 = Aloxano + Café solúvel (0,5 mL)	51,27 B	-51
G4 = Aloxano + Café solúvel (1,0 mL)	45,22 B	-57
G5 = Aloxano + Café solúvel (2,0 mL)	109, 14 A	+5

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

Para o parâmetro glicose, os grupos 3 (Aloxano + Café solúvel 0,5 mL), 4 (Aloxano + Café solúvel 1,0 mL) e o 5 (Aloxano + Café solúvel 2,0 mL) apresentaram percentagens de redução de 20%, 20% e 24%, respectivamente (tabela 12). Novamente, observa-se uma tendência na diminuição dos níveis de triacilglicerol e de glicose com tinturas de café.

É importante ressaltar que os animais receberam os tratamentos com café solúvel em diferentes doses sem a adição de carboidratos na tintura, portanto, estariam presentes apenas os carboidratos pertencentes ao café.

**Tabela 12. Valores médios de glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Glicose (mg / dL)</b>	<b>% Variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)</b>
G1 = Aloxano + Ração	343,36 A	-
G2 = Ração	112,83 B	-67
G3 = Aloxano + Café solúvel (0,5 mL)	276,38 B	-20
G4 = Aloxano + Café solúvel (1,0 mL)	275,15 B	-20
G5 = Aloxano + Café solúvel (2,0 mL)	260,99 B	-24

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

Para melhor visualização de todos os parâmetros, na tabela 13 encontra-se o resultado dos níveis de colesterol, triacilglicerol e glicose obtidos através dos tratamentos com café solúvel.

**Tabela 13. Valores médios de colesterol, triacilglicerol e glicose em mg/dL de ratos submetidos a diferentes tratamentos.**

Tratamentos	CONTEÚDO		% VARIAÇÃO		CONTEÚDO		% VARIAÇÃO	
	COLESTEROL		TRIGLICERÍDEOS		GLICOSE			
Aloxano + Ração	93,40	A	-		104,03	A	-	
Ração	103,68	B	+11		102,61	A	-1	
Aloxano +Café solúvel (0,5 mL)	96,92	A	+4		51,27	B	-51	
Aloxano +Café solúvel (1,0 mL)	105,17	B	+13		45,22	B	-57	
Aloxano +Café solúvel (2,0 mL)	115,70	B	+24		109,14	A	+5	

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

## 6) DISCUSSÃO

Como visto anteriormente, nos três ensaios biológicos, os níveis de glicose sanguínea e triacilglicerol, após 30 dias, foram maiores nos grupos dos animais diabéticos não tratados em relação ao grupo normal. Este resultado já era esperado, visto que a droga utilizada para a indução do diabetes, o aloxano, promove o aumento dos níveis de glicose sanguínea em animais experimentais, como observado em diversos trabalhos (Cavalli *et al.*, 2007; Lerco *et al.*, 2003; Mazzanti *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2002). Conseqüentemente, há uma elevação do triacilglicerol, pois o excesso de glicose pode ser metabolizada no tecido adiposo para a síntese deste parâmetro.

Com relação ao colesterol, existem controvérsias sobre os efeitos do café neste parâmetro. Alguns trabalhos demonstraram que o café pode influenciar fatores de risco cardiovascular, incluindo colesterol (Thelle *et al.*, 1983; Urgert e Katan, 1997) e homocisteína séricos (El-Khairy *et al.*, 1999; De Bree *et al.*, 2002). Além disso, o alto consumo de café é frequentemente associado ao hábito de fumar, baixa atividade física e hábitos alimentares não saudáveis (Puccio *et al.*, 1990).

Vários estudos prospectivos mostram um aumento do risco de doença coronariana em pessoas que consomem alta quantidade de café (Klag *et al.*, 1994), mas outros trabalhos não encontraram esta relação (Myers e Basinski, 1992; Greenland, 1993; Kawach *et al.*, 1994).

Thelle *et al.* (1983) demonstraram significativa correlação positiva entre o consumo de café e os níveis séricos de colesterol numa população do norte da Noruega composta por 7213 mulheres e 7368 homens com idades entre 20 e 54 anos. A relação café-colesterol foi altamente significativa ( $p < 0,0001$ ) depois de ajustados a idade, o índice de massa corporal (IMC), atividade física, tabagismo e consumo de álcool, sendo que o nível de colesterol foi de  $5.56 \pm 0.05$  mmol/L (média  $\pm$  erro padrão) em homens que consumiam menos de um copo de café/dia comparado com  $6.23 \pm 0.03$  mmol/L naqueles que consumiam mais de nove copos/dia. Para as mulheres, na mesma base de comparação, os valores encontrados foram  $5.32 \pm 0.05$  e  $5.92 \pm 0.04$  mmol/L respectivamente.

Resultados semelhantes foram confirmados em diferentes estudos subsequentes (Aro *et al.*, 1990; van Dusseldorp *et al.*, 1998).

Estudo realizado por Rosengren *et al.* (2004) encontraram, através de um estudo prospectivo com mulheres suecas, uma elevação da concentração de colesterol sérico com o aumento do consumo de café, com uma diferença média do menor para o maior consumo da bebida de 0,34 mmol/L. Correlação inversa foi encontrada com relação às concentrações de triacilglicerol e glicose, mostrando que quanto maior o consumo de café, menor os níveis destes parâmetros sanguíneos. Não foi encontrada associação significativa entre o consumo de café e a pressão sanguínea.

Weusten-Van Der Wouw *et al.* (1994) em extenso estudo clínico, usando frações purificadas de cafestol e caveol, misturas de ésteres dos diterpenos e triacilgliceróis purificados do óleo de café, afirmaram que o cafestol e, possivelmente, o caveol são responsáveis pela elevação de taxa de colesterol no organismo humano. O mecanismo desta ação é desconhecido, porém acompanhado por alterações na função enzimática do fígado, que provocam aumento da produção de VLDL, LDL e apoproteína B (De Roos *et al.*, 2001).

Todavia, a forma que a bebida de café é ingerida é fundamental para que haja esse efeito, uma vez que se filtrada, o cafestol e o caveol ficam retidos na borra de filtração. Assim, tais conseqüências ficam restritas aos países cujos habitantes têm por hábito ingerir o que se conhece como café fervido, como na Escandinávia (café à moda escandinava) e aqueles que consomem o café tipo turco/grego (em finos sobrenadantes), expresso ou instantâneo. Post *et al.* (2000) constataram que para cada 10 mg de cafestol ingeridos por dia ocorre acréscimo do colesterol no soro em 0,13 mmol/L em modelos animais. Em humanos, aproximadamente 80% deste aumento se encontra principalmente na forma de LDL colesterol e o restante em VLDL colesterol (Urgert *et al.*, 1996).

Ratnayake *et al.*, (1993) estabeleceram que na infusão de café filtrada a quantidade de lipídeos é menor que 7 mg/150 mL, mas aquela preparada por fervura, não-filtrada, e o café expresso atingiam níveis de 60-160 mg/150 mL, indicando que, na primeira, ocorre retenção dos lipídeos pelo filtro de papel. Lipídeos em bebidas feitas com café solúvel, tanto normal quanto

descafeinado, variaram ligeiramente de uma marca para a outra, na faixa de 1,8 a 6,6 mg/150 mL.

Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que mesmo a infusão de café filtrado em filtro de papel pode aumentar os níveis de colesterol (Christensen *et al.*, 2001; Strandhagen *et al.*, 2004), uma vez que a retenção da fração lipídica não é totalmente eficiente, permitindo que pequena quantidade da mesma permaneça na infusão, mesmo após a passagem pelo filtro (Ratnayake *et al.*, 1995).

Porém, cabe ressaltar que alguns estudos não identificam esta propriedade hipercolesterolêmica do café, ou seja, o desenvolvimento de doenças cardiovasculares não se associa ao consumo desta bebida (Beynen, 1996; Mennen *et al.*, 2002). Adicionalmente, o café contém substâncias antioxidantes que diminuem a oxidação do LDL, minimizando problemas cardiovasculares, como o ácido clorogênico e o ácido cafeico (De Roos *et al.*, 2001).

Happonen *et al.* (2004), num estudo realizado com 1971 indivíduos, mostraram que o consumo de café em volumes maiores que 800 mL/dia associa-se ao aumento na incidência de doença cardiovascular, mas, em contrapartida, o consumo moderado (400-800 mL/dia) confere efeito protetor para a mesma patologia.

Callahan *et al.* (1979) estudaram o efeito do consumo de café em macacos e verificaram que embora a dieta aterogênica consumida pelos animais induziu o desenvolvimento de estrias gordurosas, o consumo de café não modificou a evolução do processo aterosclerótico em relação aos animais que receberam água.

Num estudo epidemiológico com 45.589 indivíduos, Grobbee *et al.* (1990) não encontraram relação entre o consumo de café, a cafeína e as doenças cardiovasculares naqueles que consumiam quatro ou mais xícaras de café ao dia. Frente a estas divergências, Thelle (1995) atribuiu à forma de preparo da bebida, um dos principais motivos discordantes dos estudos.

Apesar do presente trabalho não ter utilizado o preparo convencional da bebida café, pois o objetivo foi avaliar diversas partes da planta do café (*Coffea arábica*) no diabetes para o uso em fitoterapia e não a bebida em si, foi

observado que os resultados fortalecem a controvérsia sobre o efeito do café nas doenças cardiovasculares.

Como visto anteriormente, a maioria dos tratamentos dos três ensaios biológicos *in vivo* com tinturas de café de casca cereja, fruto verde, fruto cereja, folha seca, folha verde e o café torrado solúvel, promoveram um pequeno aumento significativo, em diferentes proporções, nas concentrações de colesterol em ratos diabéticos induzido por aloxano, apesar de, com relação ao significado clínico, este aumento não foi capaz de provocar hipercolesterolemia. Em contrapartida, o tratamento com folha seca (2,0 mL), no segundo ensaio biológico, promoveu uma redução (26%) significativa dos níveis de colesterol. É importante lembrar que, após o preparo, todas as tinturas de café foram filtradas em filtro de papel, fato que pode ter contribuído para a diminuição dos dipertenos, cavestol e caveol, nestas tinturas.

Além das frações lipídicas, estudos têm relacionado um possível efeito hipercolesterolêmico decorrente da ação da cafeína presente no café, assim como a capacidade do mesmo de aumentar os níveis de homocisteína (Chou e Benowitz, 1994). Estudo sobre os efeitos de beber 1 litro/dia de café não-filtrado, acusou aumento significativo de 10% no nível de homocisteína no plasma (Coffee e CVD, 2000). Entretanto, as limitações quanto a concordância dos resultados são as mesmas encontradas para as frações lipídicas, de forma que existem evidências positivas e negativas destes compostos sobre as doenças cardiovasculares, não permitindo resultados conclusivos (Dórea e Costa, 2005; Mursu *et al.*, 2005).

Além das considerações até o momento apresentadas, discute-se o padrão de resposta das diferentes espécies frente ao consumo de café e/ou de seus componentes, de forma que ainda não se chegou a um modelo animal ideal no qual se possa estudar o efeito deste grão nas doenças cardiovasculares (Beynen, 1996). Em decorrência do consumo mundialmente difundido do café, estudos investigando suas propriedades biológicas ainda constituem campo a ser explorado (Mizubuti, 2006).

A respeito da glicose, como visto anteriormente, todos os tratamentos dos três ensaios biológicos *in vivo* com tinturas de café, seja da casca cereja, fruto verde, fruto cereja, folha seca, folha verde e o café torrado solúvel, reduziram significativamente, em diferentes proporções, este parâmetro em

ratos diabéticos induzido por aloxano. Os tratamentos não foram capazes de reduzir os níveis de glicose sanguínea ao ponto de levar os animais à normalidade. Porém, o período da intervenção foi apenas de 30 dias, o que pode não ter sido suficiente para que os animais atingissem níveis de glicose semelhantes ao grupo normal. Com relação ao triacilglicerol, todas as tinturas de café (com exceção da tintura de café solúvel 2,0 mL no terceiro ensaio biológico) reduziram significativamente este parâmetro, resultando em valores abaixo do apresentado pelo grupo normal.

No primeiro ensaio biológico *in vivo*, onde foram utilizados tinturas de casca cereja, fruto verde e fruto cereja do café nas doses de 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL, foi encontrado reduções das concentrações de glicose de 28 a 49%, comparado com os animais doentes, sendo que o maior decréscimo foi obtido com o tratamento de fruto verde (0,5 mL). Com relação aos níveis de triacilglicerol, as reduções foram de 27 a 47%, e o tratamento com fruto verde (1,0 mL) foi o que mais reduziu este parâmetro.

No segundo ensaio, os tratamentos com folha seca e folha verde diminuíram os níveis de glicose e triacilglicerol em 22 a 47% e 30 a 48%, respectivamente. O maior decréscimo dos níveis de glicose, 47%, foi encontrado com o grupo tratado com folha seca (2,0 mL). Com relação ao parâmetro triacilglicerol, a maior redução (48%) foi obtida com o tratamento com folha seca (1,0 mL).

No terceiro ensaio biológico, a redução dos níveis de glicose foi de 20 a 24%, sendo que esta última foi obtida com o tratamento com café solúvel (2,0 mL). Com relação aos níveis de triacilglicerol foram encontradas com os tratamentos decréscimos de 5 a 57%, sendo que o café solúvel 0,5 mL promoveu o maior decréscimo.

A redução dos níveis de triacilglicerol pode ser explicada pelo metabolismo normal de um indivíduo, onde parte da glicose é metabolizada para o tecido adiposo e, sobre a influência da insulina, para a síntese de triacilglicerol. Portanto, havendo uma redução de glicose, possivelmente, as concentrações de triacilglicerol também decrescem.

Estes resultados indicam que substâncias presentes no café podem ser úteis no tratamento e na prevenção do diabetes e são coerentes com vários trabalhos que analisaram a associação do café com o DM2.

Diversas pesquisas sugerem que o alto consumo de café pode reduzir o risco do tipo mais comum do diabetes, o tipo 2 (Van Dam, 2006). Em vista do número crescente de pessoas afetadas por esta patologia, estas constatações são extremamente relevantes.

Estudo realizado na Finlândia (Tuomilehto *et al.*, 2004), envolvendo mais de 14.000 pessoas, reportou que o alto consumo de café pode reduzir o risco de DM2. Como a Finlândia tem o índice mais alto de consumo de café do mundo, foi possível determinar o risco de diabetes com altos níveis de consumo. Neste trabalho, pessoas que tomavam grandes quantidades de café, isto é, dez ou mais xícaras por dia, tiveram menos probabilidade de desenvolver esta patologia. Um consumo de tal magnitude reduziu o risco em 79% no caso das mulheres e em 55% no caso dos homens em desenvolver o DM2. A constatação também foi positiva para as pessoas que tomavam quantidades moderadas, três a quatro xícaras por dia, para quem o risco de diabetes foi 29% menor nas mulheres e 27% nos homens.

Resultados de um estudo de coorte holandês sobre o consumo de café e o risco de DM2 encontraram que os participantes que consumiam 7 ou mais xícaras de café por dia tiveram 0,50 vezes (95% de intervalo de confiança) menos chance de desenvolver DM2 comparado com os que consumiam 2 ou menos xícaras de café por dia (van Dam, 2002).

Rosengren *et al.* (2004), demonstraram em um estudo prospectivo que o risco de desenvolvimento de diabetes foi 475 por 100.000 pessoas por ano nas mulheres que consumiam 0 - 2 xícaras de café por dia, 271 para aquelas cujo consumo era de 3 - 4 xícaras, 202 para o consumo de 5 - 6 xícaras e 267 para as que consumiam mais que 7 xícaras. Os níveis de triglicerídeos foram maiores nas mulheres que consumiam menos que 2 xícaras de café por dia. Não houve associação significativa entre o consumo de café e a pressão sanguínea. Posteriores ajustes para fumo, baixa atividade física, escolaridade e índice de massa corporal não alteraram estes resultados.

Possivelmente, a redução dos níveis de glicose pode ser atribuída às substâncias presentes no café, como o ácido clorogênico (ACL), trigonelina, cafeína, lignina e minerais.

Pesquisas realizadas por Shearen *et al.* (2003) tem demonstrado que o ácido clorogênico pode afetar o metabolismo de glicose em animais e em

humanos. A alta ingestão de ácido quínico, produto do ácido clorogênico formado após torrefação do café, também pode ser capaz em aumentar a sensibilidade à insulina em ratos.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos benéficos do ACL no metabolismo da glicose. Primeiro, o ACL pode diminuir a absorção da glicose no intestino por inibir a glicose-6-fosfato traanslocase 1, reduzir o gradiente de sódio e aumentar os níveis de GLP-1 (van Dam, 2006). O GLP-1, hormônio da classe das incretinas, estimula a síntese e a secreção de insulina dependente da glicemia; inibe a secreção de glucagon, promove o retardamento do esvaziamento gástrico e diminui o apetite (Revista Brasileira de Medicina, 2007).

Segundo, estudos *in vitro* (Arion *et al.*, 1997) e com animais (Herling *et al.*, 1999) com ACL mostraram que este composto pode também inibir a produção hepática de glicose por inibir a glicose-6-fosfatase. Terceiro mecanismo seria relacionado ao fato do ACL possuir uma ação antioxidante. Trabalhos *in vitro* com café na dieta de populações da Europa e Noruega indicaram que o ACL foi o componente responsável pela ação antioxidante da bebida (Svilaas *et al.*, 2004; Pulido *et al.*, 2003). Quarto mecanismo, o ACL pode atuar como um quelador de metais, mudando a composição corporal dos tecidos moles de ratos, podendo aumentar a composição de magnésio (Mg) no fígado. (Rodríguez e Hadley, 2002). A alta ingestão de Mg foi associada com menor risco de DM2 em vários estudos de coorte (Lopez-Ridaura *et al.*, 2004), e doses farmacológicas foram associadas com uma melhor sensibilidade à insulina em outros estudos de intervenção. O Mg é cofator de várias enzimas envolvidas nos processos de fosforilação, que são essenciais para o metabolismo da glicose (Lopez-Ridaura *et al.*, 2004). Entretanto, a ingestão regular de Mg não explicou a associação do consumo de café com a tolerância à glicose e menor risco de DM2 (Salazar-Martinez *et al.*, 2004; van Dam *et al.*, 2004). Finalmente, o ACL pode inibir a formação de compostos N-nitroso no trato gastrointestinal, compostos que parecem favorecer o aparecimento do DM2 por possuírem toxicidade às células beta do pâncreas (van Dam, 2002).

Trabalhos, por curtos períodos, sobre os efeitos da cafeína no DM em reduzir a sensibilidade à insulina têm sido relatados por vários pesquisadores (Greer *et al.*, 2001; Bhathena *et al.*, 2002; Keijzers *et al.*, 2002). Segundo estes

autores, este efeito pode ser atribuído ao fato da cafeína aumentar a síntese de epinefrina, neurotransmissor que estimula a secreção de insulina, a glicogenólise e a mobilização de ácidos graxos (Graham *et al.*, 1998). Porém, o estímulo da cafeína no aumento dos níveis de epinefrina pode diminuir após ingestão contínua, é a chamada sensibilidade à cafeína (Robinson *et al.*, 2004).

Outro mecanismo sugerido, baseados em estudos com animais, sobre os efeitos da cafeína no metabolismo da glicose, seria através do aumento da expressão de proteínas não acopladas e da oxidação lipídica por esta metilxantina (Yoshioka *et al.*, 2002). Entretanto, existem muitas controvérsias sobre os efeitos da cafeína no DM. Entre estas está o fato de que o consumo de café descafeinado, em menores proporções, também foi associado com o menor risco de DM2 em estudos de coorte, indicando que a associação inversa do consumo de café e o risco de DM2 podem não ser explicados apenas pela cafeína (Salazar-Martinez *et al.*, 2004; Greenberg *et al.*, 2005).

Em adição, pesquisas, através de estudos experimentais, têm demonstrado que a cafeína não exerce efeito protetor aparente sobre o DM. Alguns autores encontraram um aumento na concentração de glicose pós prandial em animais após ingestão de cafeína (Lane *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2004). Também é necessário considerar os efeitos deletérios da cafeína, apesar de também existirem controvérsias. Trabalhos têm demonstrado que a cafeína, em excesso, pode aumentar a pressão sanguínea em torno de 4/3 mmHg (James, 1997), ocasionar alguns sintomas como irritabilidade, agitação, ansiedade, dor de cabeça, insônia, aumento na produção do suco gástrico, e taquicardia (Katzung, 2006), sendo que seus efeitos são doses dependentes.

Assim, o consumo de café descafeinado seria uma estratégia interessante, visto que pode promover efeitos benéficos na redução do risco de DM2 sem os efeitos deletérios da cafeína.

O café também contém quantidades substanciais de várias ligninas. Estas podem afetar o metabolismo de glicose através das suas ações antioxidantes e antiestrogênica (Bhathena e Velasquez, 2002).

O consumo de café também tem sido associado com menores níveis da  $\gamma$ -glutamiltransferase e outras enzimas hepáticas que favorecem o desenvolvimento do diabetes (La Vecchia, 2005; Lee *et al.*, 2004).

Outro mecanismo do efeito do café no DM2 foi proposto por Atanasov *et al.*, (2006). Estes autores sugerem que parte dos efeitos do café, tanto o cafeinado como o descafeinado, é devido a inibição da 11 $\beta$ -HSD1, enzima responsável pela conversão do cortisona à cortisol. No metabolismo animal, o nível de cortisol aumenta consideravelmente pela manhã, e o seu excesso pode favorecer o desenvolvimento do DM2 e da síndrome metabólica (Rosmond, 2005 e Asensio *et al.*, 2004). O cortisol, assim como o glucagon, age como um antagonista fisiológico da insulina, promovendo a quebra de moléculas de carboidratos, lipídeos e proteínas, mobilizando, desta maneira, as reservas energéticas. Isto aumenta a glicemia e a produção de glicogênio pelo fígado. Adicionalmente, o cortisol aumenta a pressão sanguínea, inibe doenças auto-imunes e a formação óssea (<http://pt.wikipedia.org>).

É importante ressaltar que os constituintes do café podem variar dependendo da parte da planta que é utilizada e pelo processo de torrefação do grão. Muitas substâncias são formadas e degradadas durante o processo de torrefação do café e que não estão presentes no café in natura.

Dependendo da temperatura final de torrefação do café, que pode alcançar 230 °C, ocorre decréscimo de algumas substâncias candidatas a serem responsáveis pelo efeito hipoglicemiante do café, como a trigonelina e o ácido clorogênico. E, apesar de termicamente estável, também pode ocorrer pequenos decréscimos de cafeína. A trigonelina é parcialmente degradada no processo de torrefação do café e ocorre a decomposição do ácido clorogênico com formação do aroma volátil, material polimérico (melanoidina) e CO<sub>2</sub> (Maier, 1985; Viani, 1986; Plctet, 1987).

Assim, os efeitos benéficos da planta café podem ser superiores ao da bebida no tratemtno e prevenção do diabetes, visto que esta última é submetida ao processo de torrefação.

## 7) CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que as tinturas do café (*Coffea arabica*), casca cereja, fruto verde, fruto cereja, folha seca, folha verde e o café torrado solúvel, possuem efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos induzido por aloxano, e provavelmente desenvolve efeito semelhante em humanos. Estes dados sustentam a hipótese que o café está associado com um menor risco de diabetes.

A maioria dos tratamentos promoveu um pequeno aumento nos níveis de colesterol, no entanto, do ponto de vista clínico, estes não foram capazes de causar hipercolesterolemia. Em contrapartida, o tratamento com folha seca (2,0 mL) no segundo ensaio biológico promoveu uma redução significativa de 26% dos níveis de colesterol. Estes resultados fortalecem a controvérsia sobre o efeito do café nas doenças cardiovasculares.

Os benefícios das tinturas de café utilizadas neste trabalho nos níveis de glicose e triacilglicerol se sobrepõem ao possível efeito negativo sobre o parâmetro colesterol, indicando que estas tinturas podem ser promissoras para o tratamento do diabetes. Porém, é importante que seja analisado a composição química destas tinturas para facilitar a compreensão dos mecanismos do café no metabolismo de glicose. Em adição, trabalhos de intervenção por períodos maiores e ensaios biológicos de toxicologia são necessários para garantir a segurança e reforçar os dados encontrados neste trabalho.

## 8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberti, K.G.M.M.; Zimmet, P.Z.; Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Med*, v.15, p.539-53, 1998.

Alberts, P.; Engblom, L.; Edling, N.; Forsgren, M.; Klingstrom, G.; Larsson, C.; Ronquist-Nii, Y.; Ohman, B.; Abrahmsen, L. Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice. *Diabetologia*. v. 45, p.1528-1532, 2002.

Alberts, P.; Nilsson, C.; Selen, G.; Engblom, L.O.; Edling, N.H.; Norling, S.; Klingstrom, G.; Larsson, C.; Forsgren, M.; Ashkzari, M.; Nilsson, C.E.; Fiedler, M.; Bergqvist, E.; Ohman, B.; Bjorkstrand, E.; Abrahmsen, L.B. Selective inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains. *Endocrinology*. v. 144, p.4755-4762, 2003.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*,v.28:suplemento 1, janeiro,2005.

American Diabetes Association: type 2 diabetes in children and adolescents – consensus statement. *Diabetes Care*, v.23, p.381-9, 2000.

Amos, A.F.; McCarty, D.J.; Zimmet, P. The rising global burden of diabetes and its complications: Estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med*, v.14, p. 7-85, 1997.

Arion, W.J.; Canfield, W.K.; Ramos, F.C.; Schindler, P.W.; Burger, H.J.; Hemmerle, H. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. *Arch Biochem Biophys*, v. 339, p. 315-322, 1997.

Årnlöv, J.,; Vessby, B.; Riserus, U. Coffee consumption and insulin sensitivity. **JAMA**. v. 291, p. 1199-1201, 2004.

Aro, A.; Teirila, J.; Gref, C.G. Dose-dependent effect on serum cholesterol and apoprotein B concentrations by consumption of boiled, non-filtered coffee. **Atherosclerosis**, v. 83, p. 257-261, 1990.

Asensio, C.; Muzzin, P.; Rohner-Jeanrenaud, F. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord**,v.28 (Suppl. 4), p.45-52, 2004.

Atanasov, A.G.; Dzyakanchuk, A.A.; Schweizer, R.A.S.; Nashev, L. G.; Maurer, E. M.; Odermatt, A. Coffee inhibits the reactivation of glucocorticoids by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: A glucocorticoid connection in the anti-diabetic action of coffee? **FEBS Letters**, v. 580, p.4081-4085, 2006.

Barone, J.J.; Roberts, H. Human consumption of caffeine. In: DEWS, P.B. Caffeine: Perspectives from recent research. **Ed. Berlin: Springer- Verlag**, 1984. seção II, cap. 4, p. 59-73.

Bártholo, G.F.; Guimarães, P.T.G. Cuidados na colheita e preparo do café. **Informe Agropecuário**, v.18, n.187, p. 33-42, 1997.

Baumann, T.; Mosli, S.S.; Schuthess, B.H.; Aerts, R.J. Interdependence of caffeine and chlorogenic acid metabolism in coffee. **Proc 15th ASIC Coll**, p. 134-140, 1993.

Beynen, A.C. Boiled coffee fails to raise cholesterol in hamsters and rats. **Br. J. Nutr.**, v. 76, p.755-764, 1996.

Bhathena, S.J.; Velasquez, M.T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. **Am J Clin Nutr**, v. 76, p. 1191-1201, 2002.

Booth, N. H.; McDonald, L. E. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. Ed. Guanabara, 6ª edição, Rio de Janeiro, 1992.

Borrelli, R.C.; Visconti, A.; Mennela, M.A.; Fogliano, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.6527-6533, 2002.

Callahan, M.M.; Rohovsky, M.W.; Robertson, R.S.; Yesair, D.W. The effect of coffee consumption on plasma lipids, lipoproteins, and the development of aortic atherosclerosis in rhesus monkeys fed an atherogenic diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 32, p. 834-845, 1979.

Camargo, M.C.R., Toledo, M.C.F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.18, n. 4, Campinas Oct./Dec. 1998.

Chao-ran, Y.I.; Zhong-qing, W.E.I.; Xiang-lei, D.E.N.G.; Ze-yu, S.U.N.; Xing-rong, L.I.; Cheng-gong, T.I.A.N. Effects of coffee and caffeine on bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.27 (8), p. 1037–1043, 2006.

Chen, J.F.; Xu, K.; Petzer, J.P.; Staal, R.; Xu, YH.; Beilstein, M.; Neuroprotection by caffeine and A (2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson disease. **The Journal of Neuroscience**, 21:RC143: 1–6, 2001.

Chou, T.M.; Benowitz, N.L. Caffeine and coffee effects on health and cardiovascular disease. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.109, p.173-189, 1994.

Christensen, B.; Mosdol, A.; Retterstol, L.; Landaas, S.; Thelle, D.S. Abstention from filtered coffee reduces the concentrations of plasma homocysteine and serum cholesterol - a randomized controlled trial. **Am. J. Clin. Nutr**, v.74, p.302-307, 2001.

Clifford, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J. Sci. Food Agric.**, v.80, p.1033-1043, 2000.

Colditz, G.A.; Willett, W.C.; Rotnitzky, A.; Manson, J.A.E. Weight Gain as a Risk Factor for Clinical Diabetes Mellitus in Women. ***Annals of Internal Medicine***, v.122 (7), p.481-486, 1995.

Contran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. O pâncreas endócrino. ***In: Robbins: patologia estrutural e funcional***. 6ªed., Guanabara Koogan, 20:809-833, 2000.

Costa, M.B.; Ferreira, S.R.; Franco, L.J.; Gimeno, S.G.; Lunes, M. Dietary patterns in a high-risk population for glucose intolerance. ***J Epidemiol.***; 10, p.111-7, 2000.

Daglia, M.; Papeti, A.; Gregotti, C.; Berté, F.; Gazzani, G. *In vitro* antioxidant and *in vivo* protective activities of green and roasted coffee. ***J. Agric. Food Chem.***, v.48, p.1449-1454, 2000.

Daglia, M.; Racchi, M.; Papeti, A.; Lanni, C.; Govoni, S.; Gazzani G. *In vitro* and *in vivo* antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. ***J. Agric. Food Chem.***, v.52, p.1700-1704, 2004.

De Bree, A.; Verschuren, W.M.; Kromhout, D.; Kluijtmans, L.A.; Blom, H.J. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. ***Pharmacol Rev***; 54; p.599–618, 2002.

De Roos, B.; Caslake, M.J.; Stalenhoef, A.F.H.; Bedford, D.; Demacker, P.N.M.; Katan, M.B. The coffee diterpene cafestol increases plasma triacylglycerol by increasing the production rate of large VLDL apolipoprotein B in healthy normolipidemic subjects. ***Am. J. Clin. Nutr.***, v.73, p.45-52, 2001.

Diabetes 2007. Disponível em: <[www.diabetes.org.br](http://www.diabetes.org.br)>. Acessada em: dezembro de 2007.

Dórea, J.G.; Costa, T.H.M. Is coffee a functional food? *Br. J. Nutr.*, v.93, p.773-782, 2005.

El-Khairi, L.; Ueland, P.M.; Nygard, O.; Refsum, H.; Vollset, S.E. Lifestyle and cardiovascular disease risk factors as determinants of total cysteine in plasma: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr*, 70, p.1016–24, 1990.

Farah, A.; Donangelo, C.M. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, v.18(1), p.23-36, 2006.

Fuster, M.D.; Mitchell, A.E.; Ochi, H.; Shibamoto, T. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v.48, p.5600-5603, 2000.

Gimeno, S.G.; Ferreira, S.R.; Franco, L.J.; Hirai, A.T.; Matsumura, L.; Moises, R.S. Prevalence and 7-year incidence of Type II diabetes mellitus in a Japanese-Brazilian population: an alarming public health problem. *Diabetologia*. Dec; 45(12), p.1635-8, 2002.

Graham, T.E.; Hibbert, E.; Sathasivam, P. Metabolic and exercise endurance effects of coffee and caffeine ingestion. *J Appl Physiol*, v. 85, p. 883-889, 1998.

Greenberg, J.A.; Axen, K.V.; Schnoll, R.; Boozer, C.N. Coffee, tea and diabetes: the role of weight loss and caffeine. *Int J Obes*, v. 29, p. 1121-1129, 2005.

Greenland, S. A meta-analysis of coffee, myocardial infarction, and coronary death. *Epidemiology*, v.4, p.366–74, 1993.

Greer, F.; Hudson, R.; Ross, R.; Graham, T. Caffeine ingestion decreases glucose disposal during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp in sedentary humans. ***Diabetes***, v. 50, p. 2349-2354, 2001.

Grobbée, D.E.; Rimm, E.B.; Giovannucci, E.; Colditz, G.; Stampfer, M.; Willett, W. Coffee, caffeine and cardiovascular disease in men. ***N. Engl. J. Med.***, v.323, p. 1026-1032, 1990.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. Insulin, glucagon, and diabetes mellitus. ***In: Textbook of medical physiology***. 10a ed., Elsevier Science, 78: 884-897, 2000.

Happonen, P.; Voutilainen, S.; Salonen, J.T. Coffee drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. ***J. Nutr.***, v.134, p.2381-2386, 2004.

Harris, M.I.; Klein, R.; Welborn, T.A.; Knudman, M.W. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis. ***Diabetes Care***, v.15(7), p.815-817, 1992.

Hartz, A.J.; Rupley, D.C.; Rimm A.A. The association of girth measurements with disease in 32,856 women. ***Am J Epidemiol.*** Jan; 119(1), p. 71 – 80, 1984.

Helmrich, S.P.; Ragland, D.R.; Paffenbarger, R.S. Prevention of noninsulin-Hermanowski-Vosatka, A.; Balkovec, J.M.; Cheng, K.; Chen, H.Y.; Hernandez, M.; Koo, G.C.; Le Grand, C.B.; Li, Z.; Metzger, J.M.; Mundt, S.S.; Noonan, H.; Nunes, C.N.; Olson, S.H.; Pikounis, B.; Ren, N.; Robertson, N.; Schaeffer, J.M.; Shah, K.; Springer, M.S.; Strack, A.M.; Strowski, M.; Wu, K.; Wu, T.; Xiao, J.; Zhang, B.B.; Wright, S.D.; Thieringer, R. 11β-HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. ***J. Exp. Med.*** v. 202, p.517-527, 2005.

Herling, A.W.; Burger, H.; Schubert, G.; Hemmerle, H.; Schaefer, H.; Kramer, W. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. ***Eur J Pharmacol***, v. 386, p. 75-82, 1999.

Hodgson, J.M.; Chan, S.Y.; Puddey, I.B.; Devine, A.; Wattanapenpaiboon, N.; Wahqvist, M.L.; Lukito, W.; Burke, V.; Ward, N.C.; Prince, R.L.; Croft, K.D. Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea and coffee derived polyphenol exposure in humans subjects. *Br. J. Nutr.*, v.91, p.301-305, 2004.

<http://br.geocities.com/vinicrashbr/historia/brasil/ciclodocafe.htm>. Enciclopédia Brasileira - História do Brasil. Ciclo do Café. Acesso em 6 de fevereiro de 2008.

<http://pt.wikipedia.org>. Acesso em 02 de janeiro de 2007.

<http://www.abic.com.br>. Associação Brasileira da Indústria do Café. Acesso em 02 de fevereiro de 2008.

<http://www.coffeekick.com.br>. Acesso em 19/12/2007.

<http://www.diabetesebook.org.br>. Acesso em 12/01/2008.

Hugget, A.C.; Marchesini, M.; Perrin, I. Effects of coffee oil on plasma cholesterol in rat. In: Scientific Symposium on Coffee. *Lausanne: ASIC*, v.15, p.497-503, 1993.

Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Intakes for Individuals, Vitamins and Minerals. *National Academy Press*, 2000.

James, D.; Lane, P.H.D.; Christina, E.; Barkauskas, A.B.; Richard, S.; Surwit, P.H.D.; Mark, N.; Feinglos, M.D. Caffeine Impairs Glucose Metabolism in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 27, p. 2047-2048, 2004.

James, J. E. Caffeine and Health. London : *Academic Press*, 432 p, 1991.

James, JE. Is habitual caffeine use a preventable cardiovascular risk factor? *Lancet*, v.349, p.279-281, 1997.

Kapeller, A.W.; Baumann, T.W. Purine alkaloid pattern in coffee beans. *Proc 11th ASIC Coll*, p.173-279, 1985.

Katung, B. Farmacologia básica e clínica. **Editora Guanabara Koogan S/A**, 992 pag., 2006.

Kawachi, I., Colditz, G.A.; Stone, C.B. Does coffee drinking increase the risk of coronary heart disease? Results from a meta-analysis. **Br Heart J**, v.72, p.269-75, 1994.

King, H.; Aubert, R.E.; Herman, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimate, and projections. **Diabetes care**, v.21, p.1414-31, 1998.

Klag, M.J.; Mead, L.A.; LaCroix, A.Z. Coffee intake and coronary heart disease. **Ann Epidemiol**,v.4, p.425-33, 1994.

La Vecchia, C. Coffee, liver enzymes, cirrhosis and liver cancer. **J Hepatol**, v. 42, p. 444-446, 2005.

Lago, R.C.A., Lipídios em grãos de café. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 319-340, jul./dez. 2001.

Lane, J.D.; Pieper, C.F.; Phillips-Bute, B.G.; Bryant, J.E.; Kuhn, C.M. Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home. **Psychosom Med**, v. 64, p. 595-603, 2002.

Lee, D.H.; Silventoinen, K.; Jacobs, Jr. D.R.; Jousilahti, P.; Tuomileto, J. Gamma-Glutamyltransferase, obesity, and the risk of type 2 diabetes: observational cohort study among 20,158 middle-aged men and women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, p. 5410-5414, 2004.

Lerco, M.M.; Spadella, C.D.; Machado, J.L.M.; Schellini, A.S.; Padovani, C.R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Brás.**, v. 18, p.132-142, 2003.

Lopez-Ridaura, R.; Willett, W.C.; Rimm, E.B.; Liu, S.; Stampfer, M.J.; Manson, J.E. Magnesium intake and risk of type 2 diabetes in men and women. **Diabetes Care**, v. 27, p. 134-140, 2004.

Maier, H.G. Status of research in the field of non-volatile coffee components. **Proc 15th ASIC Coll**, 567-576, 1993.

Maier, H.G. The acids of coffee. **Proc 12th Asic Coll**, p. 229-237, 1987.

Malerbi, D.; Franco, L.J. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter Study of the Prevalence of *diabetes mellitus* and Impaired Glucose Tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 years: **Diabetes Care**, 15(11), p.1509-16, 1992.

Malta, M.R.; Santos, M.L.; Silva, F.A.M. Qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum Maringá**, v. 24, n. 5, p. 1385-1390, 2002.

Masuzaki, H.; Paterson, J.; Shinyama, H.; Morton, N.M.; Mullins, J.J.; Seckl, J.R.; Flier, J.S. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. **Science**, v.294, p.2166-2170, 2001.

Masuzaki, H.; Yamamoto, H.; Kenyon, C.J.; Elmquist, J.K.; Morton, N.M.; Paterson, J.M.; Shinyama, H.; Sharp, M.G.; Fleming, S.; Mullins, J.J.; Seckl, J.R.; Flier, J.S. Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. **J. Clin. Invest**, v.112, p.83-90, 2003.

Mckim, E.M.; Mckim, W.A. Caffeine : How much is too much? **The Canadian Nurse**, Ottawa, v. 89, n.11, p. 19-22, 1993.

Mennen, L.I.; De Courcy, G.P.; Guillard, J.C.; Ducros, V.; Bertrais, S.; Nicolas, J.P.; Maurel, M.; Zarebska, M.; Favier, A.; Franchisseur, C.; Hercberg, S.; Galan, P. Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet

in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 1279 – 1289, 2002.

Mizubuti, Y.G.G. Efeito do consumo de café sobre o sistema antioxidante e os níveis séricos de lípidos em camundongos *ldlr knockout* e *c57bl/6j*. **Dissertação de Mestrado. UFMG**. 2006.

Monteiro, M.C.; Trugo, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Quim. Nova.**, vol. 28, nº 4 , 637-641, 2005.

Moreira, R.F.A. ; Maria, C. A. B. ; Trugo, L. C. Componentes voláteis do café torrado-II:Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, S. Paulo, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.

Moreira, R.F.A. ; Maria, C.A.B. ; Trugo, L. C. Componentes voláteis do café torrado-I. **Química Nova**, Brasil, v. 22, n. 2, p. 209-217, 1999.

Morgano, M.A.; Pauluci, L.F.; Mantovani, D.M.B.; Mory, E.E.M. Determinação de minerais em café cru. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 22 (1): 19-23, jan-abr. 2002.

Mursu, J.; Voutilainen, S.; Nurmi, T.; Alfthan, G.; Virtanen, J.K.; Rissanen, T.H.; Happonen P.; Nyssönen, K.; Kaikkonen, J.; Salonen, R.; Salonen, J.T. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. **Free Radic. Biol. Med.**, v.38, n.4, p.527-534, 2005.

Myers, M.G.; Basinski A. Coffee and coronary heart disease. **Arch Intern Med** v.152, p.1767–72, 1992.

Naish, M.; Clifford, M.N.; Birch, G.G. Sensory astringency of 5-O-caffeoylquinic acid, tannic acid and galloylated tannin a time-intensity procedure, **J Sci Food Agric**, v. 61, p. 57-64, 1993.

Natella, F.; Nardini, M.; Giannetti, I.; Dattilo, C.; Scaccini, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.6211-6216, 2002.

National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of *diabetes mellitus* and other categories of glucose intolerance. **Diabetes**, v.28, p.10-39, 1979.

Nehlig, A.; Debry, G. Caffeine and sports activity: a review. *Int J Sports Med.* 15, p. 215–23, 1994.

Odermatt, A. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a potential therapeutic target for the control of local glucocorticoid concentrations. **Curr. Enzyme Inhib.** v.1, p.97-105, 2005.

Ortiz, M.C.A.; Zanetti, M.L. Diabetes mellitus: fatores de risco em uma instituição de ensino da área da saúde. **Rev.latino-am.enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 6, p. 128-132, dezembro 2000.

Paterson, J.M.; Morton, N.M.; Fievet, C.; Kenyon, C.J.; Holmes, M.C.; Staels, B.; Seckl, J.R.; Mullins, J.J. Metabolic syndrome without obesity: hepatic overexpression of 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, p.7088-7093, 2004.

Paterson, J.M.; Seckl, J.R.; Mullins, J.J. Genetic manipulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in mice. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 289, p.642-652, 2005.

Post, S.M.; Ross, B.; Vermeulen, M.; Afman, L.; Jong, M.C.; Dahlmans, V.E.H.; Havekes, L.M.; Stellaard, F.; Katan, M.B.; Princen, H.M.G. Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E\*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 1551-1556, 2000.

Puccio, E.M.; McPhillips, J.B.; Barrett-Connor, E.; Ganiats, T.G. Clustering of atherogenic behaviors in coffee drinkers. **Am J Public Health**, v.80, p.1310–3, 1990.

Pulido, R.; Hernandez-Garcia, M.; Saura-Calixto, F. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. **Eur J Clin Nutr**, v. 57, p. 1275-1282, 2003.

Ratnayake, W. M. N.; Pelletier, G.; Hollywood, R.; Malcom, S.; Stavric, B. Investigation of the effect of coffee lipids on serum cholesterol in hamsters. **Food Chem. Toxicol.**, v.33, n.3, p.195-201,1995.

Ratnayake, W.M.N.; Hollywood, R.; O'grady, E.; Stavric, B. Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. **Food and Chem. Toxicol.**, New York, v.31, n.4, p.263-269, 1993.

Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of *diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v.20, p.11-83, 1997.

Robinson, L.E.; Savani, S.; Battram, D.S.; McLaren, D.H.; Sathasivam, P.; Graham; T.E. Caffeine ingestion before an oral glucose tolerance test impairs blood glucose management in men with type 2 diabetes. **J Nutr**, v. 134, p. 2528-2533, 2004.

Rodriguez de Sotillo, D.V.; Hadley, M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. **J Nutr Biochem**, v. 13, p. 717-726, 2002.

Rosengren, A.; Dotevall, A.; Wilhelmsen, L.; Thelle, D.; Johansson, S. Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up study. **J Intern Med**,v. 255, p. 89-95, 2004.

Rosmond, R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.1-10, 2005.

Sacks, D.B.; Bruns, D.E.; Goldstein, D.E.; Maclaren, N.K.; McDonald, J.M.; Parrott, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of *Diabetes mellitus*. **Clin Chem**, v. 48, p.436-472, 2002.

Salazar-Martinez, E.; Willett, W.C.; Ascherio, A.; Manson, J.E.; Leitzmann, M.F.; Stampfer, M.J. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. **Ann Intern Med**, v. 140, p. 1-8, 2004.

Schweizer, R.A.; Atanasov, A.G.; Frey, B.M.; Odermatt, A.A. Rapid screening assay for inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases (11beta-HSD): flavanone selectively inhibits 11beta-HSD1 reductase activity. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.212, p.41–49, 2003.

Shearer, J.; Farah, A.; de Paulis, T.; Bracy, D.P.; Pencek, R.R.; Graham, T.E. Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. **J Nutr**, v. 133, p. 3529-3532, 2003.

Silva, M. S. Os efeitos da cafeína relacionados à atividade física: uma revisão. **Revista Digital - Buenos Aires**, <http://www.efdeportes.com/>, ano 9 - N° 66 - Noviembre de 2003.

Silvestre, J.A. Hospitalizações SUS 1997. Coordenadoria da Atenção à Saúde do Idoso. **Ministério da Saúde**.

Smith, P.F.; Smith, A.; Miners, J.; McNeil, J.; Proudfoot, A . Report from the expert working group on the safety aspects of dietary caffeine. **Austral New Zealand Food Author**, 20–3, 2000.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Atualização Brasileira sobre Diabetes, Rio de Janeiro, 2006.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. Rio de Janeiro: **Diagraphic**, 2003.

Sociedade Brasileira de Diabetes. *Novas perspectivas para o tratamento do diabetes tipo 2: incretinomiméticos e inibidores da DPP-IV*. **Revista Brasileira de Medicina**, suplemento especial, n° 3, 2007.

Speer, K.; Kölling-Speer I. The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1):201-216, 2006.

Strandhagen, E.; Zeterbeg, H.; Aires, N.; Plamér, M.; Rymo, L.; Blennow, K.; Thelle, D.S. The apolipoprotein E polymorphism and the cholesterol-raising effect of coffee. ***Lipids in Health and Disease***, v.3, n.26, 2004.

Svilaas, A.; Sakhi, A.K.; Andersen, L.F.; Svilaas, T.; Strom, E.C.; Jacobs, D.R.J. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. ***J Nutr***, v. 134, p. 562567, 2004.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. ***Diabetes Care***, v. 20, p.11-83, 1997.

Thelle, D.S. Coffee, tea and coronary heart disease. ***Curr Opin Lipidol***. Feb; 6(1), p. 25–27, 1995.

Thelle, D.S.; Arnesen, E.; Forde, O.H. The Tromso heart study. Does coffee raise serum cholesterol? ***N. Engl. J. Med.***, v.308, n.24, p. 1454-1457, 1983.

Tomlinson, J.W. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human disease: a novel therapeutic target. ***Minerva Endocrinol***,v.30, p.37-46 ,2005.

Torquato, M.T.C.G.; Montenegro, Jr. R.N.; Viana, L.A.L; Souza, R.A.H.G; Lanna, C.M.M.; Lucas, J.C.B. Prevalence of *diabetes mellitus* and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirao Preto (São Paulo), Brazil: ***Sao Paulo Med J***. 121(6), p.224-30, 2003.

Trugo, L.C.; Macrae, R. Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffee. **The Analyst**, v. 109, p. 263-270, 1984.

Tuomilehto, J.; Hu, G.; Bidel, S.; Lindstrom, J.; Jousilahti, P. Coffee consumption and risk of Type 2 diabetes mellitus among middle-aged Finnish men and women. **JAMA**, v.291, p.1213-19, 2004.

Urgert R, Meyboom, S.; Kuilman, M.; Rexwinkel, H.; Vissers, M.N.; Klerk, M.; Katan, M.B. Comparison of effect of cafetiere and filtered coffee on serum concentrations of liver aminotransferases and lipids: six month randomized controlled trial. **BMJ**, v. 313, p.1362-1366, 1996.

Urgert, R.; Katan, M.B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annu Rev Nutr** ;17, p.305–24, 1997.

van Dam RM, Pasman WJ, Verhoef P. Effects of Coffee Consumption on Fasting Blood Glucose and Insulin Concentrations: randomized controlled trials in healthy volunteers. **Diabetes Care**, v. 27, p. 2990-2, 2004.

van Dam, R.M.,; Feskens, E.J. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v. 360, p. 1477- 1488, 2002.

van Dam, R.M. Coffee and type 2 diabetes: From beans to beta-cells. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.16, p. 69 - 77, 2006.

van Dam, R.M.; Dekker, J.M.; Nijpels, G.; Stehouwer, C.D.; Bouter, L.M.; Heine, R.J. Coffee consumption and incidence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes: the Hoorn Study. **Diabetologia**, v. 47, p. 2152-2159, 2004.

van Dam, R.M.; Hu, F.B. Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes. **JAMA**, v. 294, No. 1, 2005.

van Dusseldorp, M.; Katan, M.B.; van Vliet, T.; Demacker, P.N.; Stalenhoef, A.F. Cholesterol-raising factor from boiled coffee does not pass a paper filter. **Arterioscler Thromb**, v. 11, p. 586- 593, 1991.

Vannucchi, H.; Moreira, E.A.M.; Cunha, D.F., Junqueira-Franco, M.V.M.; Bernardes, M.M.; Jordão-Jr, A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, v.31, p.31-34, 1998.

Viani, R., Horman, I. Thermal behavior of trigonelline. **J Food Sci**, v. 39, p.1216-1217, 1974.

Wang, M. Inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 for the treatment of metabolic syndrome. **Curr. Opin. Invest. Drugs**,v.7, p.319-323, 2006.

Weusten-Van Der Wouw, M.P.M.E.; Katan, M.B.; Viani, R.; Huggett, A.C.; Liardon, R.; Lund-Larsen, P.G.; Thelle, D.S.; Ahola, I.; Aro, A.; Meyboom, S.; Beynen, A.C. Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effects on liver function enzymes. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.35, n.4, p.721-733, 1994.

World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. 1999.

Yanagimoto, K.; Ochi, H.; Lee, K.G.; Shibamoto, T. Antioxidant activities of fractions obtained from brewed coffee. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.592-596, 2004.

## **CAPÍTULO 2**

### **FLAVONÓIDE HESPERIDINA E TINTURAS DE CAFÉ EM COELHOS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDE.**

## 1) INTRODUÇÃO

A osteoporose é definida como uma doença caracterizada por baixa massa óssea e deteriorização da microarquitetura do tecido ósseo, causando fragilidade óssea e aumento no risco de fraturas (Organização Mundial da Saúde, 1994). Esta patologia se desenvolve como decorrência de uma desordem do processo de remodelação óssea, que é essencial para a manutenção da integridade do esqueleto (NIH, 1995).

O pico de massa óssea é atingido logo após o término do crescimento linear do indivíduo, o qual é geneticamente determinado, porém os fatores ambientais também influenciam a massa óssea final do indivíduo (Radominski *et al.*, 2002). Após atingir o pico de massa óssea, os indivíduos iniciam uma perda que varia de 0,3% a 0,5% de sua massa óssea a cada ano. Mulheres na pós-menopausa apresentam uma diminuição acelerada da massa óssea após a última menstruação, a qual pode ser até 10 vezes maior do que a observada no período da pré-menopausa, sendo que nos primeiros 5 a 10 anos que seguem a última menstruação essa perda pode ser de 2% a 4% ao ano para osso trabecular e de 1% ao ano para osso cortical (Riggs e Melton, 1995).

Nos Estados Unidos observou-se que uma em cada quatro mulheres e um em cada dez homens acima de cinqüenta anos de idade apresentam osteoporose e 1,5 milhão de pessoas por ano sofrem por fraturas osteoporóticas (WHO, 1994). Atualmente já são 10 milhões de americanos com osteoporose e outros 18 milhões apresentam uma perda de massa óssea (NIH, 2001). No Brasil esta patologia atinge 25 a 30% das mulheres brancas durante a pós-menopausa e 40 a 60% dos indivíduos com mais de 60 anos de idade (Carneiro, 2001).

Os fatores de risco para baixa massa óssea incluem o sexo feminino, a idade, deficiência estrogênica, raça branca ou asiática, baixo peso e baixo índice de massa corporal, história familiar de osteoporose, tabagismo, sedentarismo, baixo consumo de cálcio, excesso de cafeína, uso de determinados fármacos e história prévia de fratura (Cummins *et al.*, 1995).

Os flavonóides, metabólitos secundários de plantas, têm sido investigados no tratamento da osteoporose. Evidências indicam que os

flavonóides se ligam a receptores  $\beta$  do estrogênio, estimulando *in vitro* a síntese protéica de células osteoplásticas (Moreira, 2004).

Em contrapartida, vários estudos sugerem que o consumo de café é associado com um aumento significativo do risco de fratura, osteoporose e doença periodontal. A hipótese para explicar esta associação está centrada no conteúdo de cafeína do café. Porém, os efeitos deletérios da cafeína são bem contraditórios (Sakamoto *et al.*, 2001).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do flavonóide cítrico hesperidina e de diferentes tinturas de café em coelhos com osteoporose induzida por glicocorticóide.

## **2) REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1) TECIDO ÓSSEO**

O osso é um tipo de tecido conjuntivo, sendo um dos poucos que se mineralizam (Cotran *et al.*, 2000). Além do seu papel estrutural primário, o osso desempenha várias funções importantes, ele protege os tecidos delicados, fornece um meio de sustentação para as articulações e atua como reservatório de íons como cálcio, fosfato, sódio e magnésio (Smith *et al.*, 1988).

Existem dois tipos de osso: trabecular e cortical. O osso trabecular está presente principalmente nas vértebras, crânio, pélvis e porção ultradistal do rádio; já o osso cortical predomina nos ossos longos, colo femoral e rádio distal. O osso trabecular apresenta um maior metabolismo, sendo, portanto, mais susceptível às alterações da massa óssea (Vandersluis *et al.*, 2001; Cassidy, 1999).

O tecido ósseo é composto por uma matriz inorgânica e outra orgânica. A matriz inorgânica é composta basicamente por cálcio e fosfato formando os cristais de hidroxiapatita, cuja fórmula é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Íons magnésio, sódio, potássio e carbonato também estão conjugados a estes cristais (Guyton e Hall, 1997). Cerca de 90% da matriz orgânica do osso é composta por fibras colágenas e os 10% restantes compreendem proteoglicanos de baixo peso molecular e proteínas não colagenosas (Vargas *et al.*, 1997). As fibras de colágeno na matriz óssea são do tipo I, encontrado também no tendão e na

pele. São estas fibras que conferem ao osso sua poderosa força tênsil. Embora a estrutura primária do colágeno do osso seja essencialmente idêntica à da pele ou tendão, possui propriedades que lhe são peculiares. Por exemplo, o colágeno do osso tem maior grau de força mecânica, sendo mais denso e menos solúvel (Smith *et al.*, 1988). Entre as proteínas não colagenosas estão a osteocalcina, específica do tecido ósseo e sintetizadas pelos osteoblastos, a osteopontina, uma sialoproteína envolvida na mediação da aderência celular e a osteonectina (Einhorn, 1995).

O tecido ósseo contém três tipos de células, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos são células com intensa capacidade secretora, responsáveis pela produção de cadeias protéicas precursores de colágeno. Também secretam fatores de crescimento locais sob influência do hormônio de crescimento e fosfatase alcalina óssea. Os osteócitos são considerados células de “repouso”, podendo ser estimulados a exercer atividade de formação ou reabsorção óssea. (Motta, 2003). Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas relacionadas com a reabsorção óssea. Juntas, estas células participam do processo contínuo de remodelação óssea (Smith *et al.*, 1988).

O tecido ósseo está sujeito a fraturas quando sua resistência sofre colapso frente a uma força maior. As fraturas são passíveis de acontecer em qualquer pessoa, entretanto existem situações patológicas em que esta fragilidade está aumentada, como ocorre na osteoporose, na osteomalácia, no hiperparatiroidismo, na osteogênese imperfeita, entre outras. Dentre estas, é a osteoporose a de maior prevalência na população mundial e, portanto, a que recebe maior atenção na literatura científica (Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002).

## **2.2) REMODELAÇÃO ÓSSEA**

O esqueleto adulto não é uma estrutura inativa como à primeira vista pode parecer. Ele sofre um contínuo processo de remodelagem no qual a reabsorção está acoplada à formação óssea. A remodelação óssea é um fenômeno que nos acompanha ao longo da vida, sendo fundamental para renovação do esqueleto e preservação de sua qualidade. Neste processo, a reabsorção é seguida da formação óssea em ciclos constantes orquestrados

pelas células do tecido ósseo. Em situações fisiológicas os processos de reabsorção e formação óssea são fenômenos acoplados e dependentes. O predomínio de um sobre o outro resulta em ganho ou perda de massa óssea (Hanley, 2000).

A remodelação óssea ocorre em pequenas unidades de células, que são observadas em vários sítios das superfícies ósseas (Silva, 2006). Em cada unidade de remodelação óssea ocorre uma seqüência determinada de eventos. Compreende etapas sucessivas de repouso, ativação, reabsorção, fase reversa, formação (síntese de matriz e sua mineralização), com retorno à fase de repouso para iniciar novo ciclo após determinado estímulo, figura 1 (Parfitt, 1984).

Um estímulo inicial ativa o ciclo de remodelação. Os osteoclastos promovem erosão óssea formando uma cavidade, ao longo de duas ou três semanas, conhecidas no osso trabecular como uma lacuna de Howship, reabsorvendo um volume de osso aparentemente predeterminado. Tendo completado a tarefa, essas células multinucleadas desaparecem, sendo o seu destino incerto. São substituídos pelos osteoblastos que depositam células osteóides, reabastecendo a cavidade formada. A mineralização do osteóide, que se inicia cinco a dez dias mais tarde, completa o processo de reparo (Parfitt, 1984).

Muitos dos fatores que controlam a reabsorção óssea não são bem compreendidos. A ativação é um processo que parece ser controlado por fatores locais (bioquímicos e físicos) e sistêmicos, como hormônio paratireóideo, 1,25 diidroxivitamina D, calcitonina e hormônios sexuais (Fernandes et al., 1996).

As células que participam da remodelação óssea possuem origens distintas. Os osteoblastos, sistema de células fixas, derivam da linhagem das células de revestimento (células da matriz mesenquimal – fibroblastos e osteoblastos), enquanto os osteoclastos, sistema de células móveis, provêm de unidades formadoras comuns de granulócitos e macrófagos da medula óssea denominadas de UFC-GM (linhagem linfócito-monócito-macrófago-osteoclasto). Assim, pode-se dizer que o processo de formação óssea é formado por células próprias do tecido ósseo, que preenchem a lacuna de reabsorção com a síntese de matriz colagenosa. Já a reabsorção óssea é

formada por células que não são próprias do tecido ósseo. São células de linhagem sangüínea que são atraídas à superfície óssea para dar início ao processo reabsortivo. Estes dados sugerem que a hematopoiese e a osteoclastogênese podem estar sobre as mesmas influências, sofrendo interferência de substâncias localmente produzidas, como as citocinas. Estas possibilitam o recrutamento das células progenitoras e a ativação ou depressão do processo de remodelação, tanto em relação à formação quanto à reabsorção óssea. Existe uma lista de substâncias referidas como citocinas. Entre essas, relacionam-se as interleucinas 1, 3 e 6 (IL-1, IL-3, IL-6), as prostaglandinas, o fatores de crescimento "insulin-like" (IGF), o fator de necrose tumoral (TNF), o fator-b de transformação de crescimento, entre outras (Fernandes et al., 1996).



Figura 1. Processo de remodelação óssea (<http://www.cortrel.com.br>)

### 2.3) OSTEOPOROSE

Com o aumento da expectativa de vida da população, as doenças crônicas não transmissíveis destacam-se como fator limitante de sua qualidade. Dentre essas doenças, a osteoporose, com sua elevada freqüência,

têm fundamental importância em saúde pública (Hillard e Stevenson, 1991; Jerome, 1999).

A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com subsequente aumento na fragilidade esquelética e maior susceptibilidade a fraturas (Organização Mundial da Saúde, 1994). Esta patologia é classificada como primária ou secundária, sendo que a osteoporose primária pode ser do tipo I, relacionada com a deficiência de estrógenos no período pós-menopausa, ou tipo II ou senil, que envolve a perda óssea em decorrência do processo de envelhecimento. A osteoporose secundária está associada a processos inflamatórios, alterações endócrinas, patologias e uso de determinadas drogas (Motta, 2003).

A osteoporose é clinicamente relevante, uma vez que uma fratura tenha ocorrido. A fratura de quadril causa incapacidade funcional e inatividade, enquanto fraturas vertebrais reduzem as capacidades pulmonar, cardíaca, gástrica e vesical (Galsworthy e Wilson, 1996). Ademais, pacientes com osteoporose têm seqüelas psicológicas, como ansiedade, depressão, perda de auto-estima e até isolamento social (Dixon, 1992).

Nos Estados Unidos, a prevalência da osteoporose entre mulheres brancas na faixa dos 50 anos é de 5 a 10%; aos 80 anos, 70% da população feminina é atingida (Seeman, 1997). A incidência de fraturas ósseas de quadril em decorrência da osteoporose cresce em proporções geométricas e são as que impõem maior morbidade e mortalidade (Dourador, 1999).

No Brasil, em virtude do alto custo, ainda dispomos de escassos dados e informações sobre a ocorrência de fraturas osteoporóticas (Bandeira e Carvalho, 2007). Estudos realizados em serviço de densitometria óssea na cidade de Recife (Torres et al., 1998; Bandeira et al., 2002), identificaram uma elevada prevalência de osteoporose em mulheres acima de 50 anos. Na avaliação de mais de 1.400 pacientes, a prevalência foi de 40% de acordo com os critérios da OMS. Bandeira e Carvalho (2002), avaliaram 627 mulheres com idade acima de 50 anos. A prevalência de osteoporose foi de 28,8% na coluna lombar e de 18,8% no colo do fêmur. Esta foi maior nas pacientes que apresentaram história de fraturas quando jovens. Considerando-se os diversos grupos etários, a prevalência de fraturas vertebrais foi de 20% entre 50 e 59

anos, 25,6% entre 60 e 69 anos, 58,3% entre 70 e 79 anos, e 81,8% entre 80 e 89 anos.

## 2.4) FATORES DE RISCO PARA OSTEOPOROSE

O risco de osteoporose depende tanto da massa óssea máxima alcançada nos anos da idade adulta jovem quanto do índice de perda da massa óssea nas épocas posteriores. O pico de massa óssea geralmente é alcançado até os 30 anos e o estilo de vida é um importante determinante da probabilidade de desenvolver posteriormente uma osteoporose (Hallberg *et al.*, 1992).

Dentre os fatores de risco para a osteoporose a idade exerce um efeito marcante (Riggs e Melton, 1986). Além da idade, o sexo e a raça estão entre os principais determinantes da massa óssea e do risco de fraturas. Mulheres são mais suscetíveis à osteoporose do que homens, pois apresentam uma diminuição dos níveis de estrógenos na pós-menopausa e por possuírem uma menor densidade mineral óssea que os homens. Indivíduos da raça negra possuem maior pico de massa óssea e, portanto, são menos predispostos a apresentarem osteoporose que brancos e asiáticos (Radominsk *et al.*, 2002).

Sabe-se que o fator genético é um agente importante na predisposição à osteoporose. Khoury (1998), através de meta-análise, encontrou evidências fortes sugerindo que a interação entre genes e ambiente desempenha um papel na densidade mineral óssea. Em dezembro de 1997 foram listados no Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) 67 genes associados com a osteoporose, incluindo a Vitamin D receptor gene (VDR). No entanto, não está claro como eles interagem com o cálcio (Khoury 1998). Revisão realizada por Zmuda *et al.* (2000) aponta a relação entre o fator genético e a osteoporose. Assim, a Vitamina D regula a homeostase do cálcio e a mineralização óssea e sua ação é mediada através do VDR gene localizado no cromossoma 12q, o qual tem variantes alélicas conhecidas. O VDR pertence à família de receptores de hormônios tireóides e esteróides e medeia os efeitos da 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] na expressão gênica. Os autores ainda revelaram que há indícios de associação entre a perda óssea em mulheres na pós-menopausa e o VDR gene. O componente hereditário é um fator difícil de

ser analisado, mas a história familiar de osteoporose pode ser considerada um indicador adequado para sua avaliação.

Fatores ambientais como hábitos nutricionais, sedentarismo e tabagismo, excesso de cafeína, além de algumas patologias e do uso prolongado de determinados medicamentos, como os corticóides, também estão associados à redução da massa óssea (Holm *et al.*, 2002; Brown e Josse, 2002).

O quadro (1) abaixo mostra os principais fatores de riscos reconhecidos para a osteoporose.

Quadro 1. Fatores de risco para a osteoporose.

<b>Fatores de risco para osteoporose</b>	
<b>Potencialmente modificáveis</b>	<b>Não modificáveis</b>
<p>Tabagismo</p> <p>Baixo peso corporal (&lt;57,8Kg)</p> <p>Hipoestrogenismo devido a:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menopausa precoce (&lt; 45a)</li> <li>• Ovariectomia bilateral</li> <li>• Amenorréia prolongada na pré-menopausa</li> </ul> <p>Baixa ingestão de cálcio</p> <p>Uso de glicocorticóides (prednisona &gt;7,5mg/dia &gt; 3 m) ou hipercortisolismo endógeno</p> <p>Alcoolismo</p> <p>Cafeína em excesso</p> <p>Distúrbios da visão</p> <p>Queda recorrente</p> <p>Atividade física inadequada</p> <p>Saúde comprometida</p>	<p>História de fratura após 40 anos</p> <p>Idade avançada</p> <p>História de fraturas de colo do fêmur, punho ou vértebra (1º grau)</p> <p>Branças ou asiáticas</p> <p>Sexo feminino</p> <p>Demência com risco de quedas</p> <p>Má saúde geral</p>

Adaptado de Yuen *et al.*, 2000.

## 2.5) PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE

A prevenção é a forma mais importante para evitar o aparecimento da osteoporose. Esta se baseia em maximizar o pico de massa óssea e reduzir a perda óssea associada à pós-menopausa e à idade. As medidas de prevenção consistem em: ingestão adequada de cálcio e outros micronutrientes, prática de exercícios físicos regulares, evitar o tabagismo, o excesso de álcool e cafeína, terapia de reposição hormonal na pós-menopausa, ou quando houver contra-indicações à esta terapia, usar outras opções terapêuticas (Coronho *et al.*, 2001).

O tratamento da osteoporose estabelecida tem como objetivo proteger o patrimônio ósseo residual e se possível aumentar a sua massa óssea, visando melhorar a qualidade e resistência óssea e minimizar dessa forma o risco de novas fraturas, que é elevado nessas circunstâncias. Ao lado da preservação da massa óssea, programas de fisioterapia reabilitadora, visando à melhoria da qualidade de vida no período pós-fratura são aconselháveis (Fernandes, 1996).

Os fármacos usados no tratamento da osteoporose são classificados como agentes anti-reabsortivos ou agentes estimulantes da formação óssea. Os medicamentos anti-reabsortivos, que reduzem a atividade osteoclástica, são os mais utilizados na osteoporose, incluem o cálcio, estrogênios/progestogênios, calcitonina, bifosfonatos, vitamina D (secundário à absorção de cálcio) e os diuréticos tiazídicos (Russo, 2001). Os agentes estimulantes da formação óssea compreendem o fluoreto de sódio, esteróides anabólicos, PTH, possivelmente 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D e exercícios físicos (Fernandes, 1996).

Após a menopausa, os ovários tornam-se inativos e ocorre mínima ou nenhuma liberação de estrogênio, coincidindo com a redução da absorção de cálcio pelo intestino e maior eliminação deste mineral pelos rins, devido à baixa produção de calcitonina, hormônio que inibe a desmineralização óssea (Ulrich *et al.*, 1996; Nieves *et al.*, 1998). Adicionalmente, alguns trabalhos mostram que a ingestão de cálcio em mulheres na pós-menopausa está aquém dos requerimentos nutricionais exigidos nesse período (Lanzillotti *et al.*, 2003), que é cerca de 1.000 mg diários (Dietary Reference Intake, DRI, 2000). Assim,

ocorre uma maior mobilização do cálcio do tecido ósseo para manter as concentrações deste mineral no sangue.

O cálcio deve fazer parte de qualquer esquema preventivo ou terapêutico que se faça para a osteoporose. Não se tem no entanto dados conclusivos sobre as necessidades reais de cálcio e sua eficácia na prevenção da perda óssea peri e pós-menopáusia, visto que esta pode ser influenciada por vários fatores, em particular pelo hipoestrogenismo, seu principal determinante (Lanzillotti *et al.*, 2003).

Na osteoporose do tipo senil, ocorre redução da vitamina D e da absorção de cálcio, possivelmente devido à diminuição da capacidade da pele e do rim para sintetizar e hidroxilar a forma ativa da vitamina D. Há também um decréscimo de absorção intestinal da vitamina D de fontes alimentares em indivíduos idosos. Atualmente, reconhece-se a necessidade de adicionar-se vitamina D à suplementação de cálcio em indivíduos acima dos 70 anos de idade, havendo experiências comprovadas de aumento de densidade óssea e redução de fraturas com essa associação nessa faixa etária. As doses de 600-800 UI/dia têm mostrado melhora no balanço de cálcio e redução nas taxas de fratura em indivíduos idosos (NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake, Optimal calcium intake, 1994).

As necessidades de cálcio possuem variações individuais e com a idade. O estado hormonal, a condição fisiológica, os constituintes da dieta e fármacos, além dos fatores genéticos, também influenciam nos requerimentos de cálcio, fazendo com que algumas pessoas necessitem de especial atenção com relação à ingestão do mineral (quadro 2).

Quadro 2. Recomendações diárias para cálcio segundo faixa etária e condição fisiológica.

	Idade	*DRI (mg/dia)
<b>Bebês</b>	0 a 6 meses	210
	7 a 12 meses	270
<b>Crianças</b>	1 a 3 anos	500
	4 a 8 anos	800
<b>Homens</b>	9 a 18 anos	1300
	19 a 50 anos	1000
	≥ 51 anos	1200
<b>Mulheres</b>	9 a 18 anos	1300
	19 a 50 anos	1000
	≥ 51 anos	1200
<b>Grávidas</b>	até 18 anos	1300
	19 a 50 anos	1000
<b>Lactantes</b>	até 18 anos	1300
	19 a 50 anos	1000

\* Ingestão diária recomendada (Dietary Reference Intake, DRI, 2000).

Fonte: Food and Nutrition Information Center. Dietary Reference Intakes: Elements. Disponível em: <http://www.iom.edu/Object.File/Master/7/294/0.pdf>. Acesso em 27/09/07.

O Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano, em uma reunião de especialistas (NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake, Optimal calcium intake, 1994) estabeleceu, com base nas informações disponíveis, a ingestão diária de cálcio para mulheres em diferentes situações (Quadro 3).

Quadro 3. Ingestão diária recomendada de cálcio (em mg/dia) para mulheres em diferentes situações.

Períodos	Cálcio (mg/dia)
Entre 25 e 50 anos	1.000
Grávidas ou lactantes	1.200-1.500
Na pós-menopausa (com TRH)	1.000
Na pós-menopausa (sem TRH)	1.500
Acima dos 65 anos*	1.500

\*necessidades estimadas também para homens (futuras pesquisas são necessárias para este grupo etário). Modificado do National Institutes of Health Consensus Development Conference on Optimal Calcium Intake, 1994.

Os alimentos fontes de cálcio são o leite e seus derivados (queijos, iogurte, coalhada etc), exceto a manteiga. Outras fontes menores de cálcio, mas que também podem ser utilizadas são os cereais e grãos integrais e verduras de folhas verde-escuras (Quadro 4).

Quadro 4. Fontes alimentares de cálcio na alimentação humana.

<b>Alimento</b>	<b>Porção</b>	<b>Quantidade de cálcio (mg / porção)</b>
leite integral	1 xícara (200 mL)	246
ou desnatado	1 litro	1.230
queijo tipo minas	1 fatia grossa (30 g)	205
queijo tipo prato	1 fatia grossa (30 g)	252
queijo tipo parmesão	1 colher de sopa (15 g)	171
requeijão	1 colher de sopa (30 g)	169
iogurte	1 copo (200 g)	240
sardinha	1 unidade média (70 g)	281
ostra	1 porção (240 g)	235
couve cozida	3 colheres sopa (36 g)	73
brócolis cozido	3 colheres sopa (36 g)	37
folha de beterraba	3 colheres sopa (36 g)	33
repolho cozido	3 colheres sopa (66 g)	28
espinafre cozido	2 colheres sopa (60 g)	47

Fonte: [www.nutritotal.com.br](http://www.nutritotal.com.br)

O estrogênio, usado na terapia de reposição hormonal (TRH) possui a capacidade de aumentar a densidade mineral óssea como demonstrado por vários estudos (Pardini, 1999). Eles atuam sobre a remodelação óssea inibindo a reabsorção, não parecendo estimular a formação de osso. Entretanto, recentemente, também foram descritos receptores de estrogênios nos osteoblastos (Pardini, 1999).

Os estrogênios também podem reduzir a perda óssea inibindo a síntese de prostaglandinas, principalmente as da série E. Estudos *in vitro* têm demonstrado um aumento de cerca de duas vezes de prostaglandinas E2, liberada de culturas de ossos parietais obtidos de ratas ovariectomizadas. Sendo que o tratamento *in vivo* com baixas doses de estradiol reverteu este processo. Os estrógenos também são capazes de reduzir cerca de 50% a produção do fator de necrose tumoral (TNF) e das interleucinas, potentes estimuladores da reabsorção óssea. Adicionalmente aumentam os fatores de crescimento "insulin-like", poderoso inibidor dos osteoclastos e estimulador dos osteoblastos (Melton e Riggs, 1989). Os estrogênios também podem antagonizar o efeito do hormônio paratireóideo (PTH), promovendo, assim, um

incremento da reabsorção tubular de cálcio, aumento do número de receptores para o hormônio da vitamina D em osteoblastos humanos, bem como aumento dos níveis deste hormônio. Outra função do estrogênio é em estimular a secreção endógena de calcitonina pelas células medulares da tireóide e, desse modo, inibir da atividade osteoclástica (Stevenson *et al.*, 1981).

Não está claro o mecanismo pelo qual o estrogênio modula a atividade osteoblástica. Com base em estudos *in vivo*, os estrogênios parecem exercer seus efeitos diminuindo a atividade osteoclástica. Admite-se assim que os estrogênios atuam nos osteoblastos estimulando ou inibindo a produção de substâncias que controlariam a função osteoclástica. Por esse mecanismo os estrogênios controlam, de maneira indireta, a função osteoclástica via atuação direta no osteoblasto, estimulando ou inibindo determinados fatores. Esses fatores derivados dos osteoblastos podem ser fatores estimuladores ou inibidores da atividade osteoclástica, denominados respectivamente de OB-OCSF (fatores derivados dos osteoblastos que estimulam a atividade osteoclástica) e OB-OCIF (fatores derivados dos osteoblastos que inibem a atividade osteoclástica). Os OB-OCSF poderiam ser inibidos pela ação estrogênica, enquanto os OB-OCIF seriam estimulados na presença desse hormônio. As interleucinas IL-1 e IL-6 podem ser as substâncias que atuam como OB-OCSF, visto que apresentam uma potente ação como estimuladora da atividade osteoclástica. Essas interleucinas poderiam ser derivadas dos osteoblastos ou seus precursores na medula óssea ou em células adjacentes. Observa-se diminuição dessas interleucinas *in vitro* na presença de 17 $\beta$ -estradiol (Girasole *et al.*, 1992).

O OB-OCIF pode ser, entre outros, o TGF- $\beta$ , que é liberado pelos osteoblastos em resposta à estimulação estrogênica. Essa citocina exerce potente ação mitogênica *in vitro* sobre células precursoras dos osteoblastos. Por outro lado, também diminui diretamente a reabsorção osteoclástica e inibe o recrutamento de células precursoras dos osteoclastos da medula óssea. Dessa forma, os estrogênios poderiam atuar aumentando a produção de TGF- $\beta$ , inibindo assim a atividade osteoclástica. Tem-se demonstrado também ação direta *in vitro* dos estrogênios reduzindo a atividade dos osteoclastos, inclusive a produção de enzimas lisossômicas (Pottratz *et al.*, 1994).

Porém, apesar dos benefícios que propicia para a manutenção óssea e conseqüentemente da qualidade de vida das mulheres, a TRH é muito questionável, pois pode acarretar riscos e um dos mais importantes é o aumento na incidência de casos de câncer de mama e tromboembolismo (Torgenton e Bell-Syer, 2001).

Inúmeros outros fármacos têm sido empregados na terapêutica da osteoporose estabelecida, normalmente quando há contra-indicações ou resultados insatisfatórios da terapêutica de reposição hormonal.

Os bisfosfonatos são inibidores potentes da atividade osteoclástica, eles reduzem o *turnover* ósseo e restabelecem o balanço entre a reabsorção e a formação óssea. Em estudos clínicos, vários bisfosfonatos previnem a perda óssea, preservam sua estrutura, melhoram sua força e substancialmente reduzem o risco de fraturas em pacientes com osteoporose. Eles são efetivos em várias situações clínicas, incluindo a osteoporose pós-menopáusia, a reduzida massa óssea em homens e perda óssea induzida por drogas. É geralmente a opção terapêutica preferida para a maioria dos pacientes com osteoporose (McClung, 2006). Os bisfosfonatos são análogos aos pirofosfatos e exercem sua ação anti-reabsortiva, não só na diferenciação e na replicação de pré-osteoclastos, como na requisição e na atividade dos osteoclastos, mas provocam também a apoptose dos mesmos, diminuindo o seu tempo de ação. Os bisfosfonatos, portanto, agem não só na atividade como no número dos osteoclastos. Os primeiros bisfosfonatos empregados - etidronatos - tinham a desvantagem de que a dose anti-reabsortiva era muito próxima da dose que alterava a mineralização e não podiam ser usados, de modo contínuo, porque poderiam provocar osteomalácia. Os bisfosfonatos de 3ª geração, como alendronato e pamidronato, além do seu efeito anti-reabsortivo mais potente que os primeiros, podem ser usados de forma contínua, pois a dose anti-reabsortiva é muito inferior, o que provoca alterações de mineralização. Os bisfosfonatos são pouco absorvidos pelo intestino e daí a necessidade de usá-los em jejum, acompanhados apenas de água, e de fazer um intervalo de 40 a 60 minutos entre sua ingestão e a primeira refeição. Após a absorção, depositam-se rapidamente nos ossos ou são eliminados pela urina (Leite, 1999).

A calcitonina é um hormônio peptídeo, de 32 aminoácidos, secretado pelas células parafoliculares "C" da tireóide. O mecanismo de ação da calcitonina é a redução da atividade do osteoclasto, portanto, não altera o seu número. A sua ação se faz através de um receptor específico no osteoclasto. Várias espécies de calcitonina foram utilizadas na clínica (porcina, humana, de enguia, de salmão) e verificou-se que a calcitonina de salmão apresenta potencial terapêutico mais elevado do que as demais. A via de administração pode ser parenteral ou por *spray* nasal. A bioatividade da calcitonina de salmão, utilizada por *spray* nasal é de 40% quando comparada à administração parenteral. Os efeitos adversos são geralmente leves: náusea, vômito, diarreia, *flash* da face e mãos, reação inflamatória no local da injeção e, mais raramente, poliúria. A intensidade desses efeitos é dose dependente e a administração por *spray* nasal é muito melhor tolerada do que a parenteral. Um efeito interessante da calcitonina é sua ação analgésica, que a coloca como boa opção no tratamento do quadro doloroso agudo de fratura vertebral osteoporótica (Leite, 1999).

Agentes anabólicos, que agem aumentando a deposição de matrix osteóide pelos osteoblastos em cada ciclo de remodelação, como os fluoretos, hormônio de crescimento (GH), IGF-1 e o paratormônio (PTH), também são utilizados. Mas, ainda existem muitas lacunas no uso destes medicamentos (Russo, 2001).

Recentemente, as estatinas estão sendo relacionadas aos efeitos protetores da perda óssea. Os mecanismos pelos quais as estatinas podem afetar o metabolismo ósseo são poucos conhecidos (Silva, 2006). Sabe-se que as estatinas atuam numa etapa da síntese do colesterol, bloqueando a conversão de HMG-Coa em ácido mevalônico. A partir disso, acredita-se que a formação dos metabólitos posteriores a cascata de reações enzimáticas ficariam deficientes, inibindo, assim, a prenilação de proteínas (inclusão de um grupo prenil lipídico na proteína) (figura 2). A prenilação proteica é fundamental na regulação do metabolismo dos osteoclastos e sua inibição resulta em maior apoptose destas células. Esta hipótese foi levantada baseando na ação dos bifosfonatos sobre o metabolismo do colesterol, que agem inibindo a síntese de farnesil pirofosfato, impedindo a prenilação proteica e, conseqüentemente,

reduzindo a absorção óssea (Cummings e Bauer, 2000; Rogers, 2004; Silva, 2006).

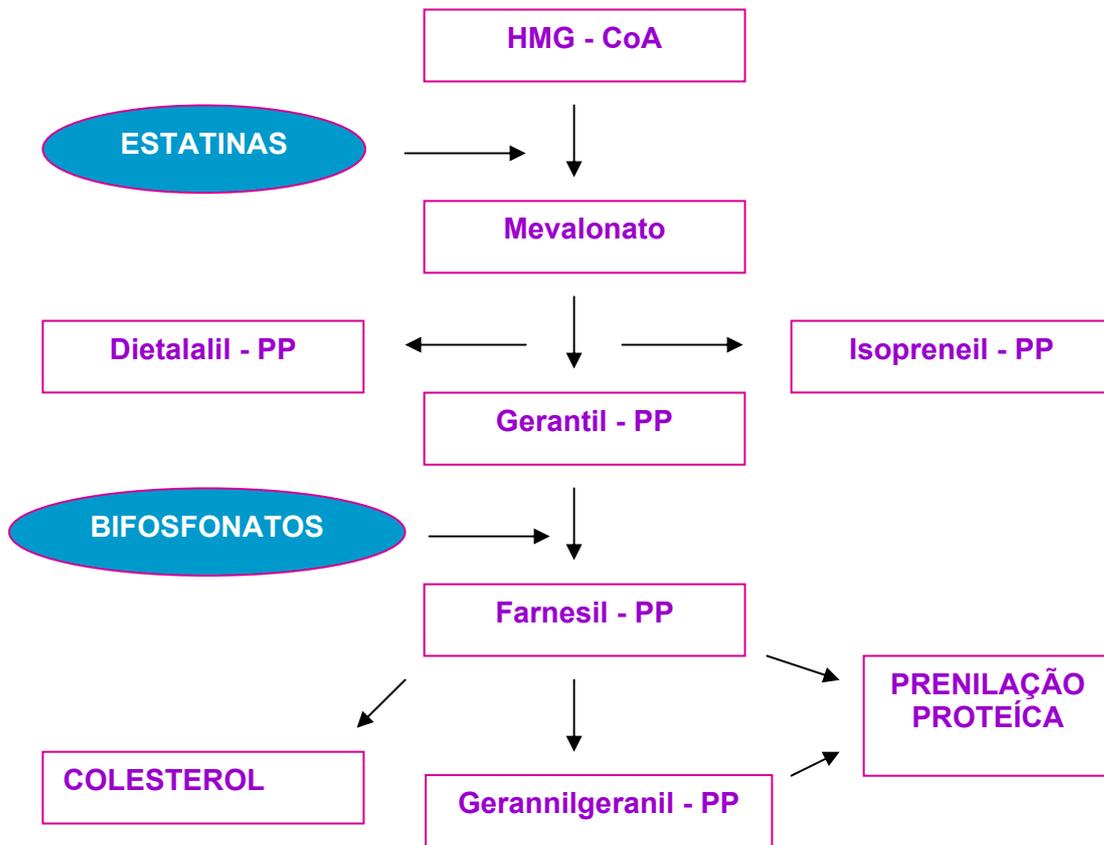


Figura 2. Mecanismo de ação das estatinas e dos bifosfonatos na cascata da prenilação de proteínas (adaptado de Braga JR *et al.*, 2002).

## 2.6) MARCADORES BIOQUÍMICOS DA REMODELAÇÃO ÓSSEA

A medida da densidade óssea tem sido o método mais utilizado para diagnóstico da osteoporose, pois trabalhos populacionais demonstraram elevada correlação entre resistência óssea e quantidade de matriz mineralizada, característica medida por este exame (Kanis *et al.*, 1994). Entretanto sabemos que a densidade mineral óssea (DMO) é uma medida pontual estática e, portanto, não reflete as alterações dinâmicas que este tecido ósseo está sofrendo na ocasião do exame. Relevante também é o seu elevado custo, o que inviabiliza seu uso a nível populacional. Para suprir esta limitação e, desta forma, melhorar a sensibilidade e especificidade na avaliação do risco

de fratura, marcadores bioquímicos de remodelação óssea vêm sendo desenvolvidos. Assim, espera-se que estes marcadores sejam capazes de avaliar a dinâmica do fenômeno de remodelação óssea para o monitoramento de pacientes sob tratamento com fármacos que atuam no metabolismo ósseo e para a identificação precoce dos indivíduos com risco de desenvolver a osteoporose (Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002).

### **2.6.1) MARCADORES DE FORMAÇÃO ÓSSEA**

Os marcadores bioquímicos de formação óssea são representados pela atividade de fosfatase alcalina total, fosfatase alcalina óssea, osteocalcina, pró-peptídeo do colágeno tipo I (Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002).

A fosfatase alcalina total (FA ou Total ALP) é medida através de sua atividade e corresponde à soma das diversas isoformas presentes no soro. Mais de 90% do seu valor corresponde às isoformas hepática e óssea. A forma óssea, secretada pelos osteoblastos, predomina na infância até o fim do crescimento longitudinal, quando então a hepática passa a ser a forma circulante mais abundante (Vieira, 1999 e Bikle, 1997). Entretanto, quando se busca maior sensibilidade e especificidade, a fosfatase alcalina óssea (FAO ou Bone ALP) é a mais indicada. A medida da isoforma óssea-específica tem vantagens sobre a total uma vez que, além de não sofrer influências hepáticas, é mais sensível a pequenas variações no *pool*/circulante. Apesar de ser um marcador de formação, também está aumentada nos distúrbios onde a reabsorção óssea predomina (Garnero e Delmas, 1998) devido ao fenômeno já referido de acoplamento entre os dois processos. A fosfatase alcalina sérica total, por sua vez, é relativamente estável, fácil e barata de medir, mas não é específica para o osso, pois um único gene produz a mesma enzima no fígado, rim e intestino, além do osso. Entretanto, na exclusão de doenças hepáticas a dosagem da fosfatase alcalina total apresenta boa correlação com a fosfatase alcalina óssea. Mas, havendo possibilidades, a dosagem desta última deve ser priorizada, devido a vantagem de ser relativamente independente de interferência de outras doenças que intervêm com outras fontes de fosfatase alcalina e apresentar boa correlação com a dosagem de osteocalcina,

parecendo no entanto que essas duas substâncias possam expressar aspectos diferentes da remodelação óssea (Fernandes, 1996).

A Osteocalcina (OC) é a proteína não colágena mais abundante no osso e dentina, possui 49aa e, embora sua função específica não seja conhecida, sabe-se que é sintetizada predominantemente pelos osteoblastos diferenciados, incorporada à matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteóide. Seu gene, codificado no cromossoma 1 (1q25-q31) sofre influência direta da 1,25 dihidroxivitamina D, que estimula sua síntese. A Vitamina K1 é um co-fator essencial para que ocorra g-carboxilação pós-traducional do resíduo glutamyl, originando os resíduos g-carboxiglutamyl (Gla). Possui em sua estrutura três ácidos glutâmicos que lhe conferem a capacidade de ligar-se ao cálcio e isto pode ser importante no processo de mineralização da matriz óssea já formada (Lee, 2000). Uma vez sintetizada é incorporada na matriz óssea e liberada na circulação sanguínea, possuindo uma meia vida curta pois é rapidamente hidrolisada no fígado e rim por metaloproteases. Sua identificação no plasma pode ser realizada por técnicas de radioimunoensaio. Costuma estar alta em situações de elevada remodelação óssea (exemplo: hiperparatireoidismo e doença óssea de Paget) e diminuída em situações de comprometimento da remodelação óssea (hipotireoidismo mixedematoso). De outra parte observa-se seu aumento no período pós-menopáusico e diminuição nas pacientes neste período em terapêutica de reposição hormonal (Fernandes, 1996).

Os fragmentos de pró-colágeno produzidos durante o processo de maturação do colágeno são liberados para a circulação e também podem ser dosados por ensaios específicos, representando a formação óssea. Apesar de promissor por ser um marcador bastante específico da atividade osteoblástica, os ensaios para dosagem dos fragmentos carboxi-terminais do prócolágeno tipo I (PICP) mostraram até o momento baixa sensibilidade. Os fragmentos amino-terminais (PINP) apresentam diferentes formas circulantes com origens não necessariamente na formação óssea, e os ensaios iniciais mostraram resultados ainda menos específicos que o PICP. Um novo método desenvolvido especificamente contra a forma intacta do PINP mostrou-se mais

sensível na avaliação do metabolismo ósseo, mas resultados mais consistentes ainda são necessários (Garnero e Delmas, 1998, citado por Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002).

### **2.6.2) MARCADORES DE REABSORÇÃO ÓSSEA**

Entre os marcadores bioquímicos da reabsorção óssea, estão o cálcio urinário, a relação cálcio/creatinina na urina, a fosfatase ácida târtaro-resistente e moléculas interligadoreas de colágeno tipo 1.

A relação cálcio/creatinina em urina de jejum é marcador utilizado para avaliar a reabsorção óssea e deve ser colhido em jejum pela manhã e corrigido pela excreção de creatinina na mesma amostra. É um marcador barato porém pouco específico, pois seu diagnóstico pode ser comprometido pela presença de hipercalcúria renal (Hanley, 2000).

A dosagem de cálcio em urina de 24 horas é utilizada para avaliação da excreção renal de cálcio. Os limites da normalidade estão estipulados em 4mg/kg peso/24h. As medidas de excreção urinária de cálcio sofrem grande influência da dieta, função renal e dos hormônios reguladores do cálcio. Devido a estes interferentes, embora muito utilizada, sua interpretação exige cautela pois as variações individuais são muito elevadas (Hanley, 2000).

A hidroxiprolina, que representa 13% da molécula do colágeno, não é específica do tecido ósseo, sendo sua excreção influenciada pela ingestão de alimentos que contenham gelatina. Quando comparada a estudos histomorfométricos, sua excreção correlaciona-se fracamente com a reabsorção óssea. Por esses motivos e pelo surgimento de produtos mais específicos da reabsorção óssea, seu uso como marcador de reabsorção óssea vem sendo abandonado (Bkile, 1997).

A fosfatase ácida é uma enzima lisossômica presente em vários tecidos (próstata, baço, eritrócitos, plaquetas, etc.), incluindo o tecido ósseo. Trata-se de diferentes isoenzimas, que podem ser separadas pelos métodos eletroforéticos. A fosfatase ácida do osso, por sua vez, é resistente ao L(+)-tártaro, enquanto a isoenzima prostática da fosfatase ácida é inibida. A fosfatase ácida târtaro-resistente corresponde, no plasma normal, à fração identificada eletroforeticamente vinda do osso, refletindo dessa forma a

atividade osteoclástica. Apresenta, no entanto, dificuldades metodológicas na sua determinação (instabilidade em amostras congeladas e baixa especificidade), necessitando de ensaios de melhor qualidade para permitir o seu uso na clínica diária (Garnero e Delmas 1998).

As moléculas interligadoras do colágeno tipo I são atualmente os melhores marcadores bioquímicos da reabsorção óssea e, portanto, são os mais utilizados mostrando boa correlação com estudos histomorfométricos.

A piridolina (PYD) e a deoxipiridolina, que fazem a ligação (cross-links) entre as moléculas do colágeno, parecem ser específicas para o colágeno do osso e da cartilagem. Em consequência de o tecido ósseo ser a fonte mais abundante de colágeno e de apresentar maiores taxas de remodelação comparada a outros tecidos conjuntivos tais como a cartilagem, a dosagem da piridinolina e, em especial, da deoxipiridinolina na urina expressam potencialmente a reabsorção óssea. Seus níveis são elevados em doenças que se caracterizam por alta remodelação óssea, estando também aumentados após a menopausa (Rosen *et al.*, 1994).

A PYD difere da DPD apenas pela presença de um grupo hidroxila, sendo que a primeira tem distribuição tecidual ampla, enquanto a segunda é mais específica do tecido ósseo e correlaciona-se melhor com a cinética do cálcio e histomorfometria óssea. Ao contrário das PYD livres, a avaliação dos telopeptídeos do colágeno tipo I parecem mostrar maior correlação com a dinâmica do osso (Delmas *et al.*, 2000). Podem ser dosados no sangue e na urina, sendo que uma série de ensaios diferentes existem, o que muitas vezes dificulta sua solicitação e interpretação pelo clínico. Na urina podem ser dosadas as formas livres de PYD e DPD, e as formas ainda ligadas a telopeptídeos aminoterminais e carboxiterminais do colágeno tipo I (NTX e CTX, respectivamente) (Garnero e Delmas, 1998).

Como a osteocalcina, os marcadores de reabsorção presentes na urina também mostram um ritmo circadiano com pico pela manhã e decresce ao entardecer, mostrando a importância da padronização de coleta (pela manhã). Não sofrem, entretanto, influência da dieta (Hanley, 2000).

O fragmento aminoterminal do final da molécula do colágeno humano (NTX) contém 60% de deoxipiridinolina. Esse marcador reflete as mudanças de

remodelação óssea da transição menopáusicas e responde como se espera aos tratamentos com medicações anti-reabsortivas (Ebeling, 1996).

O fragmento carboxiterminal piridinolina do telopeptídeo do colágeno tipo I (CTX) é liberado no fluido extracelular pela quebra do colágeno na reabsorção óssea. Com a melhora de sensibilidade dos ensaios poderá ser usado no futuro para identificar variações no processo reabsortivo ósseo (Fernandes, 1996).

A interpretação dos resultados dos marcadores de remodelação óssea ainda é difícil para profissionais, havendo por parte deles uma predileção em acompanhar a evolução da massa óssea pelos exames densitométricos seriados. É possível, no entanto, que a análise dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea possa ganhar a aceitação desses especialistas à medida que forem melhorando o erro de precisão, tornando-se menos onerosos, com interpretação mais fácil de seus resultados e possibilitando uma monitoração mais rápida dos resultados terapêuticos (Fernandes, 1996).

Quadro 5. Relação de marcadores de remodelação e suas respectivas abreviaturas sugeridas pelo Comitê Científico da Fundação Internacional de Osteoporosis (Delmas, 2000).

<p align="center"><b>Marcadores de formação</b></p> <p align="center"><b>SANGUE</b></p>	<p align="center"><b>Marcadores de reabsorção</b></p> <p align="center"><b>SANGUE</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Osteocalcina (bone Gla-protein) (OC)</li> <li>- Fosfatase alcalina total (Total ALP)</li> <li>- Fosfatase alcalina óssea (Bone ALP)</li> <li>- Peptídeo carboxi-terminal do procolágeno I (PICP)</li> <li>- Peptídeo amino-terminal do procolágeno Urina I (PINP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fosfatase ácida tartarato resistente (TRACP)</li> <li>- Porção carboxi-terminal do procolágeno I (S-CTX)</li> </ul> <p align="center"><b>URINA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Piridinolina e Deoxipiridinolina (U-PYD e U-DPD)</li> <li>- Porção amino-terminal do procolágeno I (U-NTX)</li> <li>- Hidroxiprolina (U-Hyp)</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002.

## 2.7) OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDES

Os glicocorticóides são hormônios esteróides, sintetizados no córtex da glândula adrenal, que afetam o metabolismo dos carboidratos e reduzem a resposta inflamatória (Goodman e Gilman, 2003). A sua síntese e liberação ocorre naturalmente pelo organismo, de acordo com sua necessidade, sob influência do hormônio adrenocorticotrófico, o ACTH. A concentração de corticosteróides endógenos (cortisol, cortisona e corticosterona) na corrente

circulatória apresenta-se elevada, pela manhã, e baixa, à noite, sendo que fatores psicológicos e certos estímulos, como excesso de calor ou frio, lesões ou infecções, podem afetar a liberação destes glicocorticóides (Bavaresco *et al.*, 2005).

Os glicocorticóides sintéticos, desenvolvidos pela indústria farmacêutica, são muito semelhantes aos naturais, se considerada a sua estrutura química. A diferença básica deve-se ao fato de que todos os glicocorticóides sintéticos apresentam duas ligações duplas no anel “A” do ciclopentanoperhidrofenatreno, núcleo básico dos hormônios glicocorticóides (Bavaresco *et al.*, 2005).

Esta classe de medicamentos é amplamente utilizada para tratamento de uma grande variedade de doenças devido às suas propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras (Ziger *et al.*, 2003). Porém, a terapia com glicocorticóides promove uma perda óssea, podendo acarretar a osteoporose (Rang *et al.*, 2003).

A osteoporose induzida por glicocorticóides é a causa mais freqüente de osteoporose secundária. Os glicocorticóides causam uma perda óssea bifásica, existindo uma fase de perda rápida nos primeiros meses de até 12% seguida de uma perda posterior mais lenta de 2 a 5% ao ano (Lukert, 1996; Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

Os pacientes em uso de glicocorticóides perdem mais osso trabecular que osso cortical; em conseqüência, as fraturas são mais freqüentes na coluna que no quadril. O risco de fraturas com a administração de glicocorticóides é dose dependente, entretanto, mesmo em doses baixas este fármaco pode provocar uma considerável perda óssea (Gregório, 2006).

Os glicocorticóides exercem múltiplos efeitos sistêmicos e locais, que podem levar a uma rápida perda óssea. Podemos dividi-los didaticamente em efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos estão relacionados à ação desta droga sobre as células ósseas e suas funções. Os indiretos se devem à ação dos glicocorticóides sobre o metabolismo do cálcio e vitamina D, secreção dos hormônios sexuais e efeito sobre a produção de prostaglandinas, citocinas e fatores de crescimento (Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

Com relação aos efeitos diretos dos glicocorticóides, estudos em camundongos e em seres humanos têm demonstrado que a diminuição da

formação óssea e ósteo-necrose ocorrem devido à diminuição da osteoblastogênese, bem como pela promoção de apoptose dos osteoblastos e osteócitos, sendo esta última mais proeminente (Manolagas e Weinstein, 1999; Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

Os glicocorticóides têm ações complexas sobre a expressão gênica das células esqueléticas dependendo do estágio de diferenciação e crescimento dos osteoblastos. Estes agentes têm efeitos paradoxais, ao mesmo tempo em que induzem a diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos, inibem aspectos específicos da diferenciação osteoblástica como a transcrição de osteocalcina, a proteína não colagenosa mais abundante no osso, e a expressão do colágeno tipo I. Além de diminuir a síntese, os glicocorticóides aumentam a degradação do colágeno por aumentarem a expressão das collagenases e inibirem a expressão do inibidor tecidual das metaloproteinases. (Eastell e, Compston, 1998; Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

Os glicocorticóides também atuam na reabsorção óssea, promovendo um efeito bifásico nos osteoclastos, ou seja, concentrações fisiológicas são necessárias para o estágio final de diferenciação e função, porém altas doses e exposição prolongada podem inibir a replicação celular. A reabsorção óssea observada *in vivo* ocorre pelo aumento da atividade osteoclástica nas unidades de remodelação, com aumento da quantidade de osso reabsorvido em cada sítio. Os glicocorticóides também podem aumentar a aderência dos macrófagos ao osso por alterarem a superfície dos oligossacárides (Eastell e, Compston, 1998; Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

Sobre os efeitos indiretos dos glicocorticóides no tecido ósseo, em doses farmacológicas, eles levam a uma diminuição do transporte intestinal transcelular de cálcio por mecanismo independente da vitamina D e inibem a reabsorção tubular deste mineral. Assim, contribuem para o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário (Lukert, 1996; Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

Os glicocorticóides também promovem a elevação dos níveis séricos do hormônio paratireóideo (PTH), porém dentro da variação normal; o aumento da expressão dos receptores do PTH nos osteoblastos, inibição mediada pelo PTH da fosfatase alcalina, síntese de colágeno, descarboxilação do citrato e

aumento da sensibilidade tubular renal ao PTH (Lukert, 1996; Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

A deficiência dos esteróides sexuais é uma causa estabelecida de osteoporose, e na osteoporose induzida por glicocorticóides é um fator associado que pode agravar a perda óssea, somado a tantos outros fatores. Os glicocorticóides inibem a secreção hipofisária das gonadotrofinas, a secreção ovariana e testicular de estrógenos e testosterona e a secreção adrenal de androstenidiona e dehidroepiandrosterona (Canalis, 1996; Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

Outro efeito dos glicocorticóides é a diminuição da produção de prostaglandina E2 no osso, cujo efeito principal é estimular a síntese de proteínas colágenas e não colágenas (Canalis, 1996; Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

Os corticoesteróides possuem efeitos opostos aos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) sobre a formação óssea. Como estes fatores de crescimento são importantes na manutenção da matriz óssea, mudanças no seu eixo são importantes na osteoporose induzida por glicocorticóides tanto *in vitro* como *in vivo* (Canalis, 1996; Borba e Lazaretti-Castro, 1999).

As citocinas, principalmente as interleucinas 1e 6 (IL-1 e IL-6), parecem não ter participação na ação dos glicocorticóides sobre o osso já que, na presença destes esteróides, ocorre uma inibição da produção destas citocinas pelos linfócitos T e inibição parcial da atividade reabsortiva das mesmas. O fator de transformação do crescimento beta (TGFb) estimula a síntese do colágeno, os índices de deposição de matriz e modifica a replicação celular pelos osteoblastos. Na presença dos glicocorticóides, existe uma diminuição da ligação TGF-b ao seu receptor, pois a síntese aumentada de um proteínoglicano induzida pelo glicocorticóide desvia a ligação do TGF-b de seu receptor (Russell, 1993).

Além disso, os glicocorticóides são capazes de reduzir a captação e utilização da glicose e aumentar a gliconeogênese, desencadeando glicemia de rebote, com conseqüente glicosúria, além de aumentar o catabolismo e reduzir o anabolismo protéico. Estes fármacos, também, alteram o metabolismo e a redistribuição das gorduras (Rang *et al.*, 2003).

Apesar dos efeitos deletérios dos glicocorticóides sobre o osso serem bastante conhecidos, poucos pacientes são orientados ou recebem tratamento preventivo associado à terapia com glicocorticóides (Gregório, 2006).

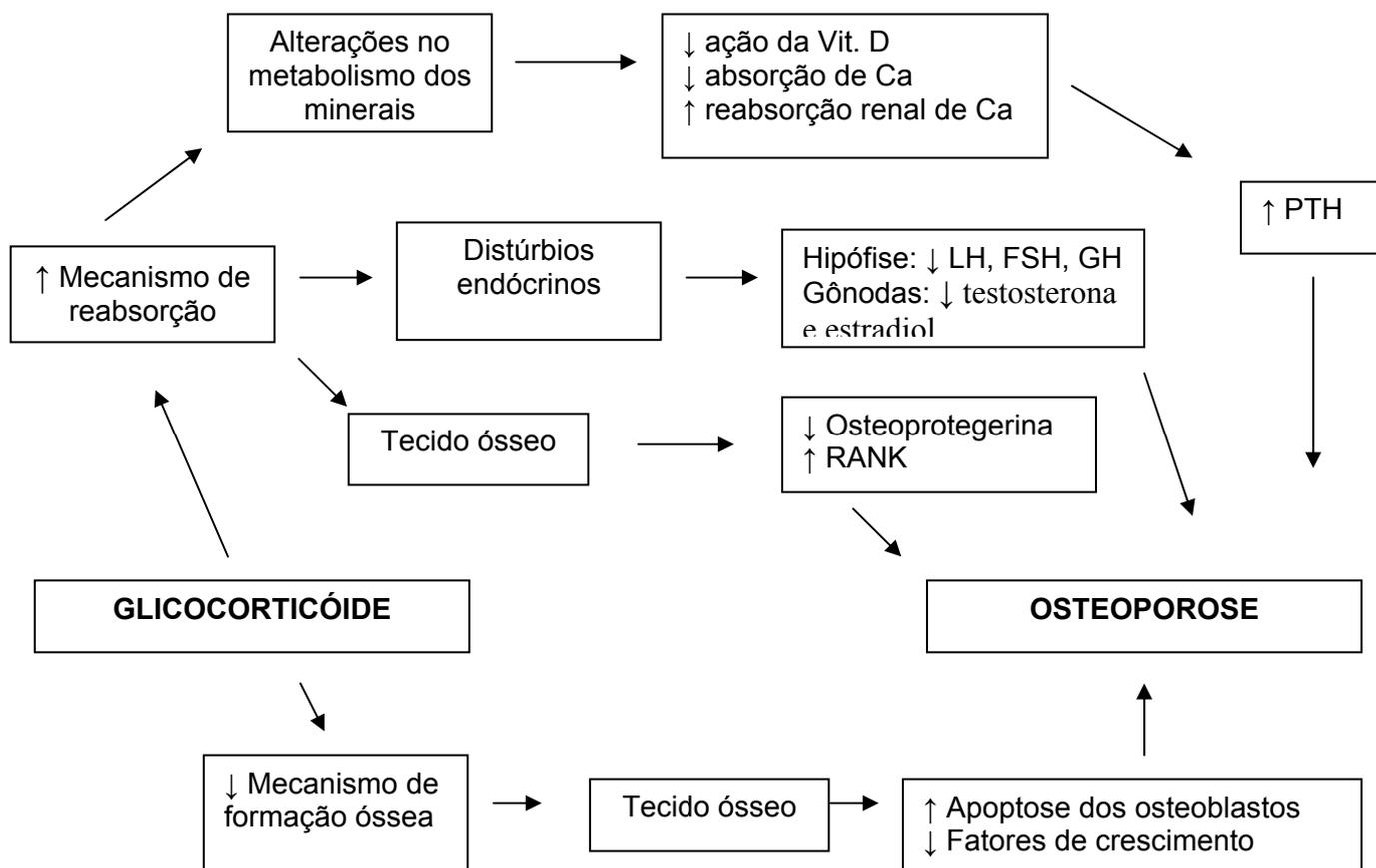


Figura 3. Aspecto multifatorial da fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide (Silva, 2006).

## 2.8) FLAVONÓIDES

Os flavonóides constituem uma classe de compostos polifenólicos de ampla distribuição no reino vegetal, cuja síntese não ocorre na espécie humana. São importantes para o crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas. Atuam como atrativos visuais favorecendo a polinização, como um mecanismo de defesa diante ao ataque de insetos e microorganismos e como protetores da radiação ultravioleta por suas propriedades antioxidantes (Musciatti e Martino, 2007).

Os flavonóides são consumidos regularmente na dieta humana, e, apesar de não serem nutrientes, desempenham um importante papel na saúde humana (Havsteen, 2002). São encontrados em uma grande variedade de vegetais, bebidas como o chá e o vinho tinto, e em frutas, especialmente as cítricas. A ingestão diária aportados pela dieta é de 50 a 800mg/dia (Pietta, 1999). Porém, alguns autores estimam que a ingestão de flavonóides em uma dieta normal pode ser até de 1 a 2g/dia (Havsteen, 2002).

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular, derivados de fenilbenzopironas. Seu esqueleto básico possui 15 átomos de carbono formados pela união de três anéis (A, B, C), sendo dois aromáticos (Figura 1). Possuem uma grande diversidade estrutural, explicada pelas modificações que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (Koes *et al.*, 1994, citado por Lopes *et al.*, 2000). Na natureza, os flavonóides estão normalmente ligados a vários açúcares, em complexos chamados glicosídeos. Sua forma livre, sem o carboidrato, é chamada de aglicona ou genina (Zuanazzi, 2002).

Mais de 6000 flavonóides são descritos e classificados em categorias como flavonóis, flavonas, catequinas, flavononas, antocianidinas e isoflavonas (Silva *et al.*, 2002).

Os flavonóides estão presentes, também, em muitas plantas medicinais e em medicamentos usados em todo o mundo (Muscuetti e Martino, 2007). O estudo das suas atividades biológicas tem sido muito enfatizado, devido ao ressurgimento do interesse na Medicina Tradicional e uma maior necessidade de entender a interação que estes compostos apresentam com as células e tecidos nos mamíferos. Atividade antiinflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antidiabetogênica, antitrombica, antiviral e anticarcinogênica dos flavonóides já foram encontradas em diversos estudos experimentais (Middleton *et al.*, 2000).

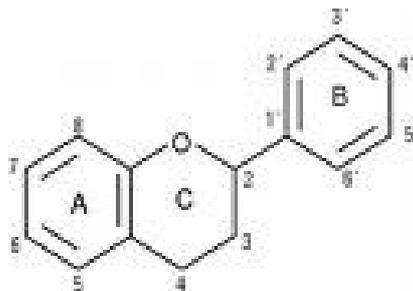


Figura 4: Esqueleto básico dos flavonóides

## 2.9) FLAVONÓIDES E OSTEOPOROSE

A terapia de reposição hormonal (TRH) é recomendada para o alívio dos sintomas vasomotores, tratamento da atrofia vaginal e prevenção da osteoporose (Glazier e Bowman, 2001). Apesar das conhecidas vantagens, aproximadamente 70% das mulheres cessam o tratamento após o primeiro ano (Elkind-Hirsch, 2001). Uma das principais causas da baixa aderência à TRH é o sangramento irregular, mastalgia, náusea, cefaléia, ganho de peso e retenção hídrica, aumento do risco de tromboembolismo pulmonar e de câncer de mama (Glazier e Bowman, 2001). Assim, muitas mulheres têm optado por formas naturais de tratamento. Além disso, existem mulheres em que a TRH está contra-indicada, havendo pouco a se oferecer para o alívio dos sintomas climatéricos (Albertazzi, 1998).

Nos últimos anos têm-se propagado que constituintes de plantas com uma estrutura fenólica similar aos estrogênios, conhecidos como fitoestrogênios, seriam alternativas naturais à terapia de reposição hormonal da menopausa. Conseqüentemente têm-se incentivado o consumo de alimentos ricos em fitoestrogênios e de comprimidos de extratos concentrados de isoflavonas. Os fitoestrogênios têm ações estrogênicas e antiestrogênicas, com potência estrogênica muito inferior à do estradiol. Os principais fitoestrogênios são os encontrados na soja: as isoflavonas genisteína e daidzeína. O conteúdo de fitoestrogênios nas suas fontes vegetais é variável, dependendo da forma de cultivo, safra, armazenamento e industrialização. Também a conversão dos precursores em fitohormônios ativos no organismo humano tem grande variabilidade individual (Clapauch *et al.*, 2002).

As primeiras evidências do efeito benéfico dos fitoestrogênios nos ossos vêm da observação de que populações que tinham altos teores de soja em sua dieta natural apresentavam menores índices de fratura do colo do fêmur que outras populações que não tinham esse hábito. A partir daí, vários estudos epidemiológicos observacionais sugeriram que, em mulheres na pós-menopausa, haveria correlação positiva entre a ingestão de maiores quantidade de soja, quer na dieta natural, quer como suplementação dietética, e o ganho de massa óssea, além de uma possível prevenção contra fraturas (Moreira, 2005).

Os estudos observacionais mais recentes, apesar de sugerirem o mesmo, fazem a observação cautelosa de que, antes de serem recomendados como alternativa terapêutica válida, inclusive em relação à terapia de reposição hormonal (TRH), na prevenção da osteoporose, deveriam ser realizados estudos mais amplos e controlados (Moreira, 2005).

A maior parte das pesquisas com fitoestrogênios é realizada *in vitro* ou com animais de laboratório, nem sempre podendo ser extrapoladas para humanos. Embora alguns estudos de curta duração sugiram aumento da densidade mineral óssea com uso de isoflavonas, não há demonstração de redução de fraturas (Clapauch *et al.*, 2002).

Alguns flavonóides, dentre eles as isoflavonas, têm sido investigados no tratamento da osteoporose. Evidências indicam que os flavonóides se ligam a receptores  $\beta$  do estrogênio, estimulam *in vitro* a síntese protéica de células osteoblásticas e seu uso por mulheres na pós-menopausa aumenta a concentração de osteocalcina, marcador de formação óssea que reflete um aumento da atividade osteoblástica (Moreira, 2004).

Possíveis mecanismos têm sido sugeridos para explicar os efeitos benéficos das isoflavonas de soja no tecido ósseo (Esteves e Monteiro, 2001). Tem-se sugerido que os osteoblastos e os osteoclastos são as células alvo para a ação da genisteína e da daidzeína. Estudos em cultura de células semelhantes a osteoblastos sugerem que a genisteína combina com receptores de estrógenos e exerce seus efeitos pelo mesmo mecanismo que este hormônio. Por outro lado, ela pode também exercer efeitos por outros mecanismos, independentes de receptores para estrógenos (Williams *et al.*, 1998; Esteves e Monteiro, 2001). Alguns autores sugerem que a genisteína

inibe a topoisomerase II, interferindo assim, com a progressão do ciclo celular, enquanto que outros sugerem que a genisteína ativa receptores peptídicos ligados à membrana, iniciando outros efeitos independentes de estrógenos. Por exemplo, os osteoclastos são dependentes da atividade de receptores tirosina quinase (PTK), então os inibidores de PTK são candidatos à prevenção da osteoporose. A genisteína e a daidzeína, isoflavonas naturais, são inibidoras de PTK e poderiam agir por este mecanismo (Williams *et al.*, 1998; Esteves e Monteiro, 2001).

A daidzeína, a maior isoflavona encontrada na soja, é metabolizada em equol na microflora intestinal, e este metabólico possui maior atividade estrogênica que a daidzeína. Sathyamoorthy *et al.* (1997) observaram, através da expressão do mRNA pS2, que a atividade estrogênica do equol é cerca de 100 vezes maior que a da daidzeína. Pesquisas sugerem que os efeitos clínicos das isoflavonas dependem da produção de equol no intestino. Entretanto, apenas 30-50% da população são capazes de produzir o equol pela microflora intestinal (Setchell *et al.*, 2002). Uehara *et al.* (2001) e Ohta *et al.* (2002) afirmam que frutooligossacarídeos, açúcares não digeríveis, podem aumentar a biodisponibilidade da genisteína, daidzeína e do equol em humanos por estimular a microflora intestinal. Os dados sugerem que estes açúcares não digeríveis aumentam a atividade de bactérias responsáveis pela produção de equol no cólon.

A ingestão adequada de isoflavonas é positivamente associada com a densidade mineral óssea (DMO) (Greendale *et al.*, 2002 e Mei *et al.*, 2001) e atenuação da perda óssea (Alekel *et al.*, 2000). Em particular o equol pode ter um efeito indireto na perda óssea de camundongos OVX. Entretanto, os efeitos diretos do equol no metabolismo ósseo não estão bem esclarecidos (Fujioka *et al.*, 2004). Fujioka *et al.*, (2004) avaliou o efeito do equol na inibição da perda óssea em camundongos ovariectomizados (OVX). A DMO da vértebra lombar no grupo que recebeu administração de 0,5mg/dia de equol foi significativamente maior que no grupo OVX. Esta mesma administração de equol também inibiu a perda óssea no fêmur destes animais OVX e diminuiu o número de osteoclastos. A concentração de equol no plasma teve um aumento significativo, porém, a administração de equol não afetou o peso uterino dos animais OVX. Portanto, o equol inibiu a perda óssea sem afetar os órgãos

reprodutivos dos animais OVX. Estes resultados sugerem que o equol pode contribuir para a eficácia da daidzeína na inibição da perda óssea quando há uma deficiência de estrogênio.

Li e Yu (2003) avaliaram o efeito da genisteína no metabolismo ósseo de ratas OVX *in vitro* e *in vivo*. Os osteoclastos foram expostos a várias concentrações de genisteína (0M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M e  $10^{-5}$ M). Após 12 semanas, verificou-se que o número de osteoclastos diminuiu dependendo da concentração de genisteína, bem como a área de reabsorção óssea. *In vivo*, após o tratamento com 45 mg de genisteína / kg de peso corporal, a DMO do fêmur dos animais OVX e os níveis séricos de fosfatase alcalina (ALP), fosfatase ácida e osteocalcina aumentaram significativamente, enquanto que os de interleucina 1 e do fator de necrose tumoral, citocinas inflamatórias, diminuíram. Sendo que o aumento da fosfatase alcalina e da osteocalcina no grupo que recebeu genisteína foi maior do que no grupo tratado com estradiol. A osteocalcina é uma proteína secretada por osteoblastos maduros e seu aumento é diretamente relacionado com a atividade de formação óssea. A fosfatase alcalina é uma enzima expressa pelos osteoblastos e é conhecida como outro marcador da atividade osteoblástica. Portanto, o aumento significativo da ALP e da osteocalcina no grupo tratado com genisteína indica uma estimulação da formação óssea por este flavonóide. Adicionalmente, os animais que receberam genisteína apresentaram um peso uterino e níveis de estradiol sérico significativamente menores que os OVX com administração de estradiol. Pesquisas têm sugerido que a genisteína, por possuir uma estrutura similar ao 17  $\beta$ -estradiol, pode se ligar ao receptor de estrogênio nos osteoclastos, regulando a atividade destas células e aos receptores de estrogênio nos osteoblastos, estimulando estas células a secretar colagenases, acelerando, assim, a formação óssea (Kuiper *et al.*, 1997). Neste estudo, a genisteína foi capaz de promover a formação óssea e prevenir a reabsorção óssea. Porém, com ligeiro efeito no útero e nos níveis de estradiol comparado com a terapia de reposição hormonal (Kuiper *et al.*, 1997).

Lee *et al.* (2004), avaliaram o efeito preventivo de extratos de isoflavona na perda óssea de ratas OVX. A suplementação com isoflavona (6,25g/kg) preveniu significativamente a perda óssea e do conteúdo de minerais, com resultados similares à do 17  $\beta$ -estradiol (4mg/kg). Porém, o efeito da isoflavona

não foi o mesmo do 17  $\beta$ -estradiol nos níveis séricos de fosfatase alcalina, fosfatase ácida, no aumento do peso corporal e na mudança do peso uterino. O aumento significativo dos níveis séricos de fosfatase ácida e fosfatase alcalina e a supressão do aumento do peso e a da atrofia do útero nos animais OVX foram apenas observados com a administração de 17  $\beta$ -estradiol. Os autores concluem que a suplementação com isoflavonas de soja pode prevenir a perda óssea na pós-menopausa via diferentes mecanismos estrogênicos em ratas OVX, mas com resultados inferiores ao da TRH.

Os efeitos biológicos das isoflavonas daidzeína e genisteína no metabolismo ósseo ainda não está totalmente esclarecido. Vários estudos mostram que a genisteína inibe a atividade osteoblástica e pode reduzir a perda óssea em ratos OVX (Ishimi *et al.*, 1999 e Anderson *et al.*, 1998). Além disso, a genisteína tem mostrado possuir um efeito anabólico na formação e mineralização de células ósseas em cultura. Gao e Yamaguchi (1995), relatam que a daidzeína também possui um efeito anabólico no metabolismo ósseo de células ósseas *in vitro*, similar ao da genisteína.

Por outro lado, estudos de massa óssea em modelos-animais demonstram um efeito bifásico das isoflavonas, ou seja, doses mais baixas de genisteína agem similarmente a estrógenos com um efeito benéfico ao tecido ósseo, mas em doses elevadas, podem ser tóxicos às células ósseas (Molteni *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1998; Esteves e Monteiro, 2001).

As melhores evidências do efeito benéfico dos fitoestrogênios em ossos humanos vêm de ensaios com o derivado sintético ipriflavona. A ipriflavona é um flavonóide sintético obtido a partir da daidzeína e vem sendo pesquisado como um grande promissor na prevenção e no tratamento da osteoporose e de outras doenças do metabolismo ósseo. O tratamento com ipriflavona já vem sendo utilizado como uma alternativa de reposição hormonal, por possuir efeito estrogênico. Estudos demonstram que ela é eficaz na prevenção da perda óssea associada ao uso de esteróides, imobilização, ovariectomia e osteodistrofia renal (Head, 1999).

Pinto (2004) realizou dois ensaios biológicos para avaliar o efeito do bifosfonato alendronato de sódio, da estatina atorvastatina cálcica e do flavonóide ipriflavona isoladamente e em associação na osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona em ratas da raça Wistar. No primeiro ensaio

biológico foram utilizadas as substâncias isoladamente (0,2 mg/kg de alendronato de sódio, 1,2 mg/kg de atorvastatina cálcica e 100 mg/kg de ipriflavona) e foi observado que todas as substâncias avaliadas apresentaram resultados significativos no aumento da densidade trabecular óssea, comparados com o grupo controle com osteoporose (grupo doente não tratado). Destaca-se que o alendronato de sódio apresentou o melhor resultado, sendo alcançados níveis de densidade trabecular óssea semelhante aos animais normais. No segundo ensaio, as substâncias foram analisadas em associação (alendronato de sódio a 0,1 mg/kg + atorvastatina cálcica a 0,6 mg/kg, alendronato de sódio a 0,1 mg/kg + ipriflavona a 50 mg/kg e atorvastatina cálcica a 0,6 mg/kg + ipriflavona a 50 mg/kg) e estas resultaram em maior eficácia na restauração do tecido trabecular ósseo, particularmente, aquelas com alendronato. Destaca-se que o grupo tratado com alendronato + o flavonóide ipriflavona mostrou valores significativos, acima dos apresentados pelo grupo com animais normais. Considerando que as doses das substâncias usadas em associação foram reduzidas à metade daquelas administradas isoladamente, e os resultados das primeiras foram superiores, pode-se concluir que houve um efeito sinérgico de supradicação ou potenciação farmacológica entre as substâncias, incluindo a ipriflavona.

Silva (2006) realizou três ensaios biológicos para avaliar a influência do alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e dos flavonóides ipriflavona e rutina isoladamente e em associação na osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona em ratas da raça Wistar. As dosagens de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica, ipriflavona e rutina utilizadas nos experimentos foram de 0,02 mg, 0,3 mg, 50 mg e 25 mg, respectivamente. Diante dos resultados obtidos em todos os ensaios, o autor concluiu que a rutina, a ipriflavona e o alendronato isoladamente e em associações foram eficazes em aumentar o número de trabéculas ósseas e que o alendronato, a atorvastatina e a ipriflavona, quando administrados isoladamente, e a associação de alendronato com atorvastatina aumentaram os níveis de proteínas colagenosas. Além disso, a rutina e a ipriflavona isoladamente e a ipriflavona utilizada em associação ao alendronato e a rutina foram eficazes em reduzir a glicemia induzida pela dexametasona. Portanto, estas substâncias

usadas isoladamente ou em associações podem ser promissoras no tratamento da osteoporose induzida por glicocorticóide.

Chiba *et al.* (2003) testaram o efeito do flavonóide cítrico hesperidina na inibição da perda óssea e diminuição dos lipídios séricos e hepáticos em camundongos OVX. A hesperidina natural (HesA) foi hidrolisada pela  $\beta$ -glicosidase para aumentar sua solubilidade no meio aquoso. Esta modificação enzimática originou um composto, a  $\alpha$ -glicosilhesperidina (HesB), dez mil vezes mais solúvel na água que a hesperidina natural.

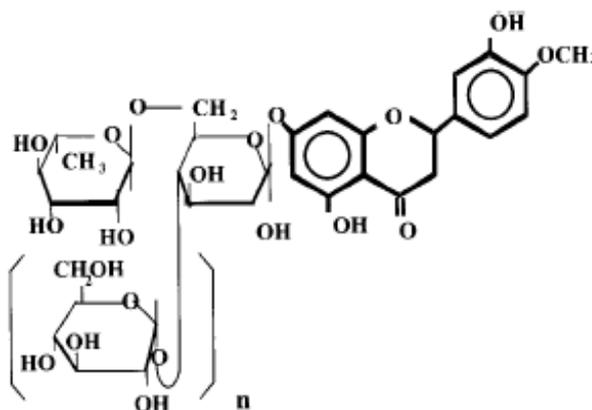


Figura 5. Estrutura molecular da  $\alpha$ -glicosilhesperidina.

Um dos grupos teste recebeu 5g HesA / Kg de dieta e outro grupo 7g HesB / Kg de dieta por 4 semanas. Nos animais OVX, a DMO do fêmur foi menor que o do grupo controle não OVX. A perda óssea foi significativamente reduzida nos grupos que receberam hesperidina e  $\alpha$ -glicosilhesperidina. As análises histomorfométricas mostraram que o volume e a espessura do osso trabecular na metáfise distal do fêmur estavam reduzidas nos camundongos OVX, sendo que a  $\alpha$ -glicosilhesperidina preveniu significativamente esta perda óssea. Além disso, a hesperidina e o 17  $\beta$ -estradiol reduziram o número de osteoclastos na metáfise femural nos animais OVX. As concentrações de cálcio, fósforo e zinco do fêmur foram significativamente maiores nos grupos que receberam hesperidina e 17  $\beta$ -estradiol quando comparados ao grupo OVX. Estes dados indicam que a hesperidina não reduziu apenas a reabsorção óssea, mas também aumentou o conteúdo de minerais no fêmur dos animais OVX. A hesperidina também reduziu os níveis de colesterol total e triglicerídeos no soro e no fígado, quando comparados ao grupo OVX.

O mecanismo molecular do efeito da hesperidina na reabsorção óssea não está claro. A hesperidina tem sido avaliada farmacologicamente como um potente anti-câncer e antiinflamatório por possuir atividade antioxidante (Emim *et al.*, 1994). Esta atividade antioxidante inibe a formação de superóxidos, compostos que estão sendo envolvidos no aumento da atividade osteoclástica (Key *et al.*, 1994). Logo, inibindo a produção de superóxidos a atividade dos osteoclastos e a reabsorção óssea diminuem.

Outra possibilidade que poderia explicar a ação da hesperidina nas células ósseas seria através da ligação deste flavonóide com o receptor de estrogênio (Arts *et al.*, 1997). Porém, a afinidade da hesperidina com o receptor de estrogênio pode ser menor que outros flavonóides pelo fato de apresentar apenas um grupo flavona (Kuiper *et al.*, 1998).

Recentemente, têm se dado atenção ao efeito das estatinas em estimular a formação óssea e suprimir a reabsorção óssea em animais e humanos com hiperlipidemia. Acredita-se que as estatinas estimulam a formação óssea por aumentar a síntese de proteínas morfogênicas no osso (Mundy *et al.*, 1999). Neste estudo, como a hesperidina foi capaz de diminuir os níveis de lipídeos sanguíneos e hepáticos, outra hipótese do mecanismo de ação deste flavonóide no tecido ósseo poderia ser pelo mecanismo semelhante das estatinas. Porém, novas pesquisas são necessárias para determinar claramente o mecanismo de ação da hesperidina nas células ósseas.

As células ósseas são sensíveis a fatores de crescimento, hormônios e citocinas (Katagiri eTakahashi, 2002). Especificamente, o fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que é produzido principalmente por macrófagos ativado, células da medula óssea e monócitos, possui um papel central no metabolismo ósseo. O TNF- $\alpha$  estimula os osteoblastos a secretar outras interleucinas inflamatórias, tais como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), bem como prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e o próprio TNF- $\alpha$ , os quais agem diretamente nos osteoclastos promovendo a reabsorção óssea (Glantschnig *et al.*, 2003). O TNF- $\alpha$  também induz a apoptose dos osteoblastos (Suh *et al.*, 2003). Acredita-se que um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e um decréscimo do número de osteoblastos podem ser responsáveis por uma perda óssea *in vivo* (Son *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos mostram que a quercetina inibe a perda óssea por afetar a osteoclastogênese e regular vários fatores locais e sistêmicos, como hormônios e citocinas inflamatórias (Gallagher *et al.*, 2004). Mas, os efeitos deste flavonóide no metabolismo dos osteoblastos são desconhecidos, principalmente na presença de citocinas inflamatórias (Woo *et al.*, 2004). Entretanto, pesquisas recentes indicam que a quercetina não inibe a citotoxicidade induzida pelo TNF- $\alpha$  e a apoptose de células osteoblásticas MC3T3-E1, mas aceleram este processo (Son *et al.*, 2006a). O efeito da quercetina nas células ósseas pode diferir de acordo com as linhagens das células estudadas e as condições dos modelos experimentais, *in vivo* ou *in vitro* (Horcajada-Molteni *et al.*, 2000).

Son *et al.* (2007) mostraram que a quercetina acelera a apoptose de linhagens de células osteoblásticas MC3T3-E1 induzidas pelo TNF- $\alpha$  através da rota caspase dependente ou mediada pelo JNK (c-Jun NH<sub>2</sub> terminal quinase), como indica a figura (6).

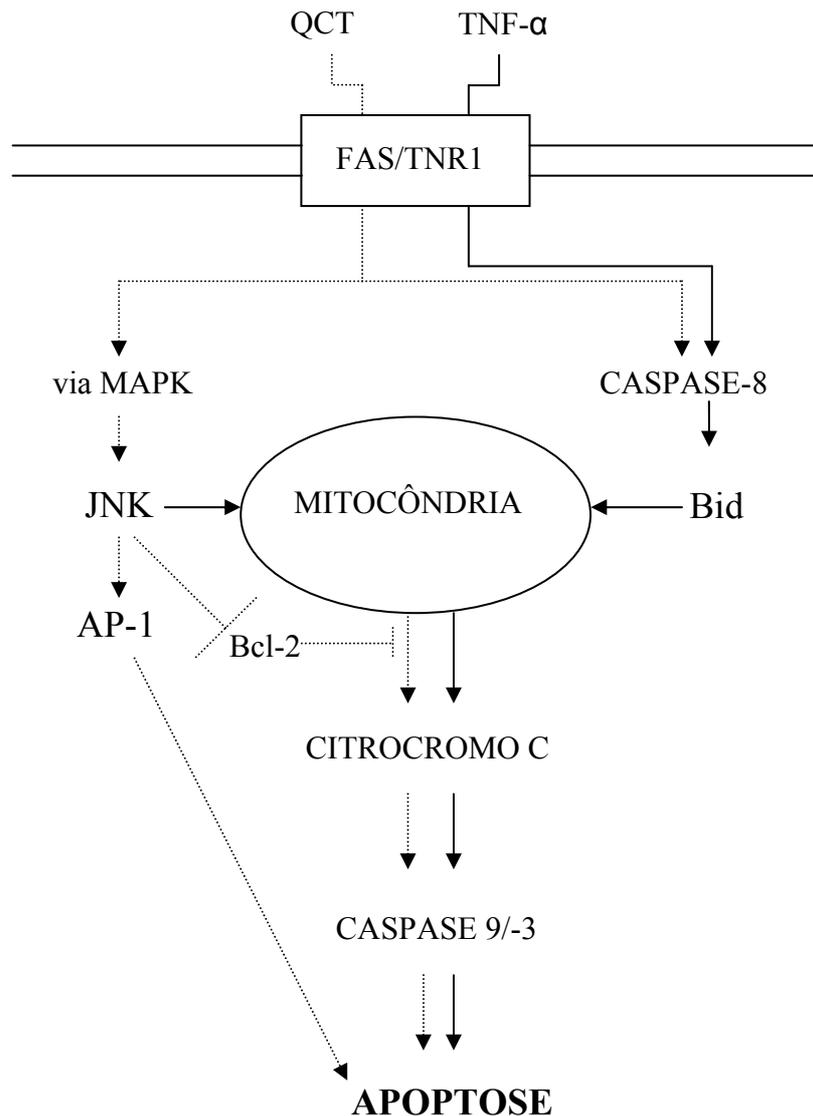


Figura 6. Modelo proposto da apoptose de células osteoblásticas MC3T3-E1 mediada pelo TNF- $\alpha$  e acelerada pela presença de quercetina. O TNF- $\alpha$  induz apoptose nas células pela via de enzimas caspases dependentes, enquanto a quercetina acelera a apoptose por dois mecanismos, um pela mesma via do TNF- $\alpha$  caspases dependentes e a outra pela via de ativação da JNK.

Notoya *et al.* (2004) relataram o efeito da quercetina inibindo a proliferação, diferenciação e mineralização dos osteoblastos *in vitro*. Neste estudo foi investigado o efeito da quercetina no metabolismo de células semelhantes aos osteoblastos (células ROB) calvariais de ratos em cultura. A proliferação destas células foi inibida quando expostas à quercetina  $5 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M, bem como sua diferenciação e mineralização. A concentração de quercetina  $1 \times 10^{-5}$  M não induziu apoptose nas células ROB, mas bloqueou a fase G1 do seu ciclo celular. Em adição, a quercetina estimulou a expressão do

mRNA p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, que recentemente vem sendo implicado no bloqueio da diferenciação dos osteoblastos (Bellosta *et al.*, 2003). O efeito inibitório da quercetina na diferenciação e mineralização das células ROB foi atribuído à inibição da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de osteocalcina e da deposição de Ca<sup>+2</sup>. A quercetina também tem sido pesquisada por reduzir os níveis basais dos receptores fator de crescimento ligado à insulina (IGF- 1) e fosfatidil-inositol-3-quinase em fibroblastos quilóides (Phang *et al.*, 2003). O IGF-1 possui um papel importante na diferenciação dos osteoblastos e a quercetina pode influenciar a diferenciação destas células via supressão da rota do IGF- 1 (Thomas *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000).

Alternativamente, a quercetina pode agir inibindo a ativação de proteínas AP-1 (fator de transcrição dimérico). A AP-1 é um conjunto de proteínas c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2 e  $\Delta$ FosB e a proteína Jun (JunB, c-Jun, or JunD). Um aumento na formação óssea tem sido observado em camundongos que possuem uma alta expressão de fatores de transcrição Fra-1 (Jochum *et al.*, 2000) e  $\Delta$ FosB (Sabatakos *et al.*, 2000). Estes dados indicam que a quercetina inibe a proliferação, diferenciação e mineralização dos osteoclastos. O autor também sugere que a quercetina pode inibir o metabolismo de células em cultura de osteoblastos e osteoclastos e que novos trabalhos devem ser realizados para elucidar a contribuição da quercetina no metabolismo ósseo in vivo.

Os osteoclastos são derivados de precursores hemopoiéticos da linha dos monócitosmacrófagos. A família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) e seus ligantes são fatores proeminentes e importantes na osteoclastogênese (Kwan *et al.*, 2004; Suda *et al.*, 1999). A formação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos requerem a interação dos ativadores do receptor Kappa B (RANK), membro de receptores TNF, e ligantes do RANK (RANKL), que é pertencente à família de ligantes TNF (Suda *et al.*, 1999). Os membros da família TNF, juntamente com o RANK, representam as mais potentes citocinas osteoclastogênicas, regulam a remodelação óssea fisiológica e têm sido implicados na patogênese de numerosas desordens ósseas, incluindo a osteoporose (Kwan *et al.*, 2004; Suda *et al.*, 1999).

Pang *et al.* (2006) investigaram a atividade diferencial do kaempferol e quercetina em atenuar a sinalização de receptores TNF em células ósseas. O

kaempferol a 10  $\mu$ M inibiu a produção de interleucinas osteoclastogênicas, como o TNF- $\alpha$ , interleucina 6 e monócitos quimioatraentes de proteínas (MCP-1 e CCL2) em células calvariais dos osteoclastos de camundongos. O kaempferol também bloqueou a translocação, induzida pelo TNF- $\alpha$ , do fator kappa B (NF- $\kappa$ B) subunidade p65 do citoplasma para o núcleo. O Kaempferol e a quercetina a 10  $\mu$ M inibiram o ativador do receptor ligante NF- $\kappa$ B (RANKL) e a expressão do oncogênese c-fos, que é requerido para a diferenciação dos osteoclastos. Os flavonóis também inibiram a expressão de marcadores de diferenciação osteoclásticas, receptores RANK e de calcitonina. Entretanto, o Kaempferol foi mais potente que a quercetina em inibir os efeitos estimulados pelo RANKL nas células RAW264.7. Outros dados indicam que o kaempferol é um potente agente antiosteoclastogênico *in vivo*, agindo especificamente antagonizando a ação da família de receptores TNF nas células ósseas em dois níveis distintos, inibindo a produção de citocinas osteoclastogênicas pelos osteoblastos e atenuando a diferenciação de células precursoras de osteoclastos.

O flavonoíde apigenina (4',5,7-trihydroxyflavona) é classificado como um fitoestrogênio. Entretanto, o próprio estrogênio não inibe a síntese de IL-6 induzida pelo TNF $\alpha$  em osteoblastos (Garcia-Moreno *et al.*, 2004). Dados sugerem que a apigenina inibe a secreção de IL-6 e MCP-1 (monócito quimioatrente de proteína 1) estimulados pelo TNF $\alpha$  em osteoblastos. E que estas ações seriam independentes do receptor de estrógeno (Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Verbeck *et al.*, 2004 (56), relataram que a apigenina (3,5MM) e a luteolina (35,0 MM) inibem a síntese *in vitro* do interferon gama (IFN $\gamma$ ), produzido por células T autoimunes de ratos e humanos. Sabe-se que a perda óssea na osteoporose e na artrite reumatóide ocorre pela produção do IFN $\gamma$  e vários ativadores de linfócitos T. O IFN $\gamma$  estimula a produção de monoquinas CXCL-9 e CXCL-10 nos osteoblastos, que modulam a proliferação e o recrutamento de linfócitos T por se ligarem ao receptor CXCR3 (receptor ligado à proteína G) e por aumentar a reabsorção óssea durante a deficiência de estrogênio (Takayanagi *et al.*, 2005).

Os adipócitos podem fornecer derivados solúveis e fatores essenciais para a diferenciação dos osteoclastos *in vitro* (Kelly *et al.*, 1998). Dados recentes indicam que o alto conteúdo de adipócitos na medula óssea está

diretamente relacionado com a perda óssea (Botolin *et al.*, 2005 e Nuttall *et al.*, 2004). Os adipócitos também produzem citocinas inflamatórias, tais como a IL-6 e MCP-1, que podem contribuir significativamente para a perda óssea (Nuttall *et al.*, 2004 e Wang *et al.*, 2005).

Bandyopadhyay *et al.* (2006), estudaram o efeito da apigenina em osteoblastos, preadipócitos e osteoclastos, células envolvidas no processo de remodelação óssea. Nos osteoblastos de células da linhagem MC3T3-E1 *in vitro* de ossos longos de coelhos e camundongos, a apigenina (20  $\mu$ M) inibiu a secreção de citocinas osteoclastogênicas estimuladas pelo TNF $\alpha$ , tais como a IL-6 e monócitos quimioatrantes de proteínas 1 e 3, MCP-1 e MCP-3, sem afetar a viabilidade destas células. Nestas mesmas células, a apigenina também inibiu a secreção de monoquinas estimuladas pelo IFN $\gamma$ , a CXCL-9 e a CXCL-10. Este flavonóide inibiu a expressão de marcadores de diferenciação osteoclásticas, TRAP (fosfatase ácida tartarato resistente), RANK e c-Fms em células precursoras de osteoclastos obtidos da medula óssea de camundongos tratados com RANKL e fator estimulador da colônia de macrófagos (MCSF). Houve também a indução da apoptose de osteoclastos maduros de ossos longos de coelhos, inibindo, assim, a reabsorção óssea. Nos preadipócitos, a apigenina inibiu a diferenciação dos adipócitos e a produção de citocinas osteoclastogênicas por estas células. Na medula óssea, osteoblastos e adipócitos são derivados de células mesenquimais comuns ou células do estroma. Estes dados sugerem que a apigenina age tanto nos osteoclastos, como nos osteoblastos e adipócitos, podendo prevenir a perda óssea *in vivo*.

O *Epimedium koreanum Nakai* é uma planta usada tradicionalmente na China para o tratamento da impotência e da osteoporose. Zhang *et al.*, (2007), analisaram o efeito do total de flavonóides e de oito flavonóides glicosilados isolados do *Epimedium koreanum Nakai* na proliferação e diferenciação de células calvariais semelhantes aos osteoblastos (osteoblastos like) de ratos. Partes aéreas liofilizadas e o extrato seco do *Epimedium koreanum Nakai* foram refluxados por 2 horas com água. Após, os extratos foram concentrados a 0%, 30%, 50% e 95% em álcool (v/v), o que representa 5,5%, 1,7%, 1,2% e 0,2%, respectivamente. Oito flavonóides foram identificados na planta, o icariin (I, 1.5 g), baohuosideo-I (II, 44.2mg), sagittatosideo B (III, 31.4mg), baohuosideo-II (IV, 7.9mg), astragalina (V, 7.0mg), 3,5,7-trihydroxy-40-

methoxy-8-prenylflavona-3-O-a-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-a-L-amnopyranoside (VI, 34.8mg), epimedin C (VII, 23.7mg) e epimedin B (VIII, 85.8 mg).

O total de flavonóides ( $1,2 \times 10^{-2}$  a  $6,0 \times 10^{-7}$  mg/mL) e os flavonóides glicosilados ( $2,0 \times 10^{-5}$  a  $1,0 \times 10^{-9}$  mol/l) exibiram uma forte inibição da proliferação de osteoblastos primários. Entretanto, o total de flavonóides e o icariin, principal flavonóide desta planta, promoveram a diferenciação dos osteoblastos primários e aumentaram significativamente a atividade da fosfatase alcalina. Visto que a diferenciação dos osteoblastos é um ponto crucial na formação e remodelagem óssea, estes resultados sugerem que os flavonóides do *Epimedium koreanum Nakai* podem melhorar o metabolismo ósseo. Mas, como a relação entre a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos ainda é obscura, novos trabalhos devem ser realizados para a melhor compreensão deste mecanismo.

## 2.10) CAFÉ E OSTEOPOROSE

Vários estudos sugerem que o consumo de café é associado com um aumento significativo do risco de fratura, osteoporose e doença periodontal. A hipótese para explicar esta associação está centrada no conteúdo de cafeína do café. De fato, a cafeína exerce várias ações farmacológicas e respostas celulares no metabolismo ósseo, resultando em um aumento da excreção de cálcio na urina e fezes e inibindo a proliferação de células osteoblastos-like *in vitro* (Sakamoto *et al.*, 2001).

O consumo de cafeína tem sido pesquisado por diminuir a densidade mineral óssea (DMO) e aumentar o risco de fraturas de quadril. Em estudos com animais, a cafeína alterou as propriedades mecânicas do osso e a DMO de ratas jovens OVX (Ohta *et al.*, 2002). Pesquisadores demonstraram que a quantidade de cafeína acima de 300 mg/dia (mais de 3 xícaras de 150 mL de café) acelerou a perda óssea da espinha de mulheres idosas (Rapuri *et al.*, 2001). Paradoxalmente, outros estudos sugerem que não há associação entre a cafeína e a DMO e o metabolismo de cálcio (Barger-Lux e Heaney, 1995).

O hormônio da vitamina D,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , é um dos mais bem conhecidos reguladores primários da homeostase de cálcio no organismo e regulador da formação e reabsorção óssea, mediados pelo osteoblastos e

osteoclastos, respectivamente. Pesquisas demonstraram que mulheres com uma particular variação do receptor da vitamina D (VDR) possuem um maior risco dos efeitos deletérios da cafeína no metabolismo ósseo. Estes trabalhos mostram que polimorfismos no terminal 3' do gene VDR está relacionado com a DMO, turnover e perda óssea (Gong *et al.*, 1999 e Wood e Fleet, 1998).

Rapuri *et al.* (2006) relataram que a cafeína reduz a expressão da proteína receptora da vitamina D e a atividade da fosfatase alcalina, estimulada pelo 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> em células de osteoblastos de humanos. Neste trabalho foi observado que o efeito da cafeína é dose dependente. Na concentração de 0,5 mM, a cafeína não afetou a atividade da fosfatase alcalina (ALP). Entretanto, a concentração de 1,0 mM de cafeína diminuiu a atividade da ALP estimulada pelo 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> em aproximadamente 50%. Na concentração de 1,0 mM e 10mM, a cafeína reduziu a expressão do receptor de vitamina D em 50% e 70%, respectivamente.

É bem estabelecido que níveis excessivos de glicocorticóides na circulação provocados por estresse crônico, hipersecreção, como na síndrome de Cushing ou a terapia utilizando glicocorticóides sintéticos podem favorecer o desenvolvimento de condições patológicas como a osteoporose (Compston, 2003).

O efeito dos glicocorticóides é mediado pela ligação com o seu receptor e os mecanismos pelo qual este hormônio induz a osteoporose são múltiplos, como visto anteriormente. Os glicocorticóides induzem o decréscimo da proliferação e síntese de proteínas essenciais ao tecido ósseo, como a osteocalcina, osteoprogesterina, osteopontina, fibronectina. Os agonistas do receptor do glicocorticóide também influenciam o metabolismo ósseo, diminuindo o número de ação dos osteoblastos (Weinstein *et al.*, 1998).

Focking *et al.* (2005), demonstraram que a cafeína aumenta a atividade do receptor do glicocorticóide em células osteoblásticas humanas. A cafeína aumenta a concentração do AMP cíclico por inibir a fosfodiesterase, enzima que degrada o AMP (Shafer *et al.*, 1998). Esta elevação dos níveis de AMP cíclico aumenta a expressão do gene que regula a síntese de glicocorticóides, sendo este efeito dose dependente. Assim, pode-se dizer que a cafeína potencializa a ação dos glicocorticóides e por isso os autores concluem que os efeitos deletérios da cafeína como fator de risco para a osteoporose depende

fortemente dos níveis de glicocorticóides nos indivíduos. Portanto, os efeitos negativos da cafeína na massa óssea podem ser completamente diferentes nos indivíduos que possuem baixos níveis de glicocorticóides na circulação comparado com os que possuem altos níveis deste hormônio ou aqueles que fazem tratamento utilizando glicocorticóides.

Sakamoto *et al.* (2001) investigaram a relação entre o café e o metabolismo ósseo em ratos da raça Wistar. Os animais foram alimentados com dieta livres de café (grupo controle), suplementadas com baixo conteúdo de cafeína (6,2g/kg de dieta = 0,62%) e com alto valor de cafeína (1,36g/kg de dieta (1,36%). Os autores não encontraram diferença significativa na mudança de peso corporal, marcadores bioquímicos séricos e urinários do metabolismo ósseo e na histomorfometria do osso entre o grupo controle e os grupos que ingeriram café, exceto para a excreção de fósforo de 24 hs, que foi significativamente maior nos grupos que possuía café na dieta comparado ao grupo que não continha a bebida. Em adição, não houve associação com os grupos que bebiam café e diferenças no fator de necrose tumoral  $\alpha$  e IL-6, citocinas implicados na patogênese da perda óssea. Este trabalho indicou que o consumo de café não estimulou a perda óssea de ratos.

Entretanto, Ohta *et al.* (1999) encontraram uma pequena, mas significante redução da massa óssea de ratos adultos OVX que consumiam altas doses de cafeína (20 mg/kg de peso corporal).

Tassinari *et al* (1991), mostraram que a cafeína inibe a formação da matriz extracelular durante a diferenciação dos osteoblastos, levando à alterações na ossificação *in vitro*.

Segundo Harris e Dawson-Hughes (1994), uma ingestão adequada de cálcio por mulheres na menopausa poderia proteger contra os efeitos deletérios da cafeína no osso. Neste trabalho o aumento do consumo de café foi relacionado com a redução da DMO apenas nas mulheres que consumiam menos que 744 mg de Ca por dia.

De acordo com Weaver *et al.* (1999), um copo de 240 mL de café reduz, em média, a retenção de cálcio em 2-3 mg, o que não conduziria ao comprometimento da massa óssea.

Um estudo duplo cego randomizado investigou o efeito da cafeína na perda de cálcio urinário de 24 hs. Os participantes consumiam apenas café

descafeinado, mas com cápsulas de cafeína ou placebo. Os pesquisadores não acharam diferença significativa na perda de Ca urinário de 24 hs entre o grupo que consumia o placebo e os que ingeriam 400 mg/dia de cafeína, que corresponde aproximadamente a mais de 3 xícaras de 150 mL de café/dia. Entretanto o tamanho da amostra foi pequeno (Barguer-Lux *et al.*, 1990).

Similar conclusão foi reportada em um grupo de mulheres envolvidas em três períodos diferentes de consumo de cafeína (Heaney e Recker, 1994). Entretanto, posteriores análises mostraram que há uma perda de 4 mg de Ca por xícara de café, indicando uma leve, mas significativa diminuição da eficiência de absorção de cálcio.

A associação negativa entre o consumo de cafeína e a DMO tem sido reportada em mulheres na pré-menopausa, em particular para aquelas que possuem uma baixa ingestão de cálcio. Conlish *et al.* (2000) avaliou a associação entre o consumo de cafeína e a DMO em um estudo com 177 mulheres saudáveis na pré-menopausa, com idade entre 19 e 26 anos. A ingestão de cafeína em mg/dia foi calculada através de relatos de consumo de café regular, café descafeinado, chá, produtos de chocolate, produtos de cola e medicamentos. A média de ingestão de cafeína entre as mulheres foi de 99,9 mg/dia. Após o ajuste dos fatores de confusão, que incluíram peso, índice de massa corporal, idade, ingestão de cálcio, consumo de proteína e álcool e uso de tabaco, o consumo de 100mg de cafeína não foi associado com o decréscimo da DMO. Os autores concluíram que o consumo de cafeína pelas mulheres adultas jovens não foi um importante fator de risco para uma baixa DMO.

Quatro estudos de coorte sobre fraturas ósseas em mulheres na pós-menopausa encontraram um pequeno, mas significativo aumento no risco de fraturas com o aumento do consumo de café (Hernandez-Avila *et al.*, 1991; Kiel *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1997; Cummings *et al.*, 1995). Enquanto que 1 estudo de coorte (Johansson *et al.*, 1992) e 2 casos controles (Cumming *et al.*, 1994; Tavani *et al.*, 1995) não encontraram relação entre o consumo de cafeína e fraturas ósseas.

### **3) OBJETIVOS**

#### **3.1) OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar os possíveis efeitos do flavonóide cítrico hesperidina e de tinturas de café em coelhos com osteoporose induzida por glicocorticóide.

#### **3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Induzir osteoporose nos coelhos com administração intramuscular de dexametasona.
- b) Preparar tinturas de café, utilizando a casca e o fruto cereja desta planta.
- c) Avaliar parâmetros bioquímicos e hematológicos nos animais, após tratamento com o flavonóide hesperidina e diferentes tinturas de café.

#### 4) MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram utilizados 36 coelhos (*Oryctolagus cuniculatos*), da raça Nova Zelândia oriundos da Cunicultura da UFV.

Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais em temperatura ambiente com água “*ad libitum*” e receberam cerca de 120 g/dia de ração da marca Soma<sup>®</sup>. A ração tinha como composição básica calcário calcítico, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, milho integral moído, cloreto de sódio premix vitamínico mineral, cálcio (máx.) 2,20%, extrato etéreo (mín.) 2,00%, fósforo (mín.) 0,4%, matéria fibrosa (máx.) 15,00%, matéria mineral (máx) 11,0%, proteína bruta (mín.) 13,00%, umidade (máx.) 13,00%, podendo apresentar eventuais substitutos, como casca de soja moída, farelo de algodão, farelo de arroz, farelo de arroz desengordurado, farelo de gérmen de milho, farelo de soja integral (grãos tostados), farelo de trigo, óleo de soja desengordurado, triguilho, caulim, sorgo integral moído e glúten de milho. A ração era enriquecida por kg de produto pelos seguintes constituintes: ácido fólico 1,40 mg, ácido pantotênico 15,00 mg, coccidiostático 30,00 mg, colina 350,00 mg, cobre 5,00 mg, cobalto 10 mg, ferro 35,00 mg, B.H.T 0,01 mg, iodo 0,30 mg, manganês 10,00 mg, vitamina A 6000,00 UI / kg, vitamina E 30,00 UI / kg, zinco 60,00 mg, niacina 35,00 mg, tiamina 1,50 mg, riboflavina 3,00 mg.

Os cinco primeiros dias foram reservados para a adaptação dos animais ao novo local de experimento. A seguir, foi induzida a osteoporose nos coelhos, que consistiu na administração de dexametasona (DECADRON<sup>®</sup>, fosfato dissódico de dexametasona - forma de apresentação: frasco-ampola de 2,5 mL, 4mg/mL), por via intramuscular, na dose de 7mg/kg de peso corporal, uma vez por semana, durante cinco semanas em todos os animais à exceção do grupo controle que continuou recebendo água “*ad libitum*” e ração durante todo o período experimental.

Após o período de indução da osteoporose, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos contendo seis animais cada, recebendo os seguintes tratamentos:

- G1 = Ração + Dexametasona (Controle com osteoporose 1)
- G2 = Ração (controle)
- G3 = Ração + Dexametasona + 1mL de Fruto cereja
- G4 = Ração + Dexametasona + 1 mL de Casca cereja
- G5 = Ração + Dexametasona (Controle com osteoporose 2)
- G6 = Ração + Dexametasona + 30 mg do Flavonóide Hesperidina

Os grupos 1 a 4 foram representados por coelhos mais jovens, que tinham 48 dias de idade, fêmeas, e pesavam em média 1500 gramas. Os grupos 5 e 6 por animais com 140 dias de idade, fêmeas, pesavam em média 3000g. Devido à diferença de idade dos animais, provavelmente eles estavam em períodos de remodelação óssea distintos. Assim, o experimento foi constituído com dois grupos doentes não tratados, o grupo 1 e o grupo 5, com 48 e 140 dias de idade, respectivamente.

O tratamento foi realizado durante 30 dias e as substâncias utilizadas foram administradas diariamente por via oral.

### **Coleta de material para análises**

Após 30 dias a partir da data de início do tratamento, todos os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica de ketamina (180 mg/Kg) e xilasina (10mg/Kg) via intramuscular. A seguir, foram coletadas amostras de sangue dos animais, por punção cardíaca, para determinação de parâmetros bioquímicos do soro (uréia, creatinina, proteínas totais, cálcio, fósforo, colesterol total, triacilglicero, glicose, fosfatase alcalina total, gama GT e albumina) e para os parâmetros hematológicos, tais como: leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos, hemoglobina, volume corpuscular médio, distribuição de células vermelhas, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média.

### **Análise dos constituintes sanguíneos**

Após a coleta, parte do sangue foi acondicionado em tubos de ensaio com EDTA para análise hematológica e a outra parte em tubos sem EDTA

para determinação dos parâmetros bioquímicos. Sendo que as amostras de sangue para análise bioquímica foram centrifugadas a 7100 x g por 15 minutos à temperatura ambiente, para obtenção do soro.

As análises hematológicas foram realizadas por um analisador hematológico automático (Humacout®). Este equipamento utiliza 25 µl de amostra de sangue para análise dos parâmetros hematológicos. O princípio de operação deste analisador hematológico é pelo método de impedância, ele conta e classifica as células detectando e medindo a impedância elétrica quando a partícula em um líquido com condutividade passa através de uma pequena abertura. É uma maneira eletrônica de contagem das células sanguíneas.

Para determinação dos parâmetros bioquímicos no soro foram utilizados o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica (Alizé) e “kits” da marca Bioclin.

### **Análise estatística**

Os experimentos foram realizados em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos em seis repetições.

Cada tratamento foi comparado com os grupos osteoporóticos pelo teste de Dunnett, considerando 5% de significância.

Como no ensaio biológico foram utilizados coelhos com duas idades distintas, as análises estatísticas foram realizadas separadamente, visto que devido a diferença de idade, estes animais poderiam estar em períodos de remodelação óssea diferenciados.

Os coelhos dos tratamentos com as tinturas de fruto cereja e casca cereja do café, que tinham 48 dias de idade, foram comparados ao grupo osteoporótico dos animais mais jovens (G1) pelo teste de Dunnett, considerando 5% de significância. E os coelhos do tratamento com o flavonóide hesperidina, que possuíam 140 dias de idade, foram comparados ao grupo osteoporótico dos animais mais adultos (G5) pelo teste de Dunnett, considerando 5% de significância.

## 5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1) ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Nas tabelas 1 e 2 encontram-se os valores médios de glicose e suas porcentagens de variação, do soro de coelhos mais jovens (48 dias de idade) e coelhos mais adultos (140 dias de idade), respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 1, o grupo tratado com a tintura de casca cereja (G4) do café promoveu uma redução de 11% no parâmetro glicose, e, apesar de não ter sido significativo do ponto de vista estatístico, deve-se considerar o significado clínico desta redução.

No entanto, o G3, representado pela tintura de fruto cereja do café, aumentou significativamente em 48% a glicose dos animais comparados ao G1, grupo doente não tratado. Este dado contraria os resultados encontrados em diversos trabalhos que mostraram que o consumo de café pode reduzir a glicemia em animais e em humanos (van Dam, 2006; van Dam e Hu, 2005; Årnlöv *et al.*, 2004; van Dam e Feskens, 2002).

Entretanto, trabalhos indicam que a cafeína potencializa a função deletéria do glicocorticóide (GC) no metabolismo da glicose e no metabolismo ósseo em indivíduos que possuem altos níveis deste esteróide na circulação, aumentando os níveis de cortisol e glicose sanguíneos e reduzindo a densidade mineral óssea (Focking *et al.* 2005).

O excesso de glicocorticóides tem sido associado com a síndrome metabólica. O aumento na secreção de GC devido a um adenoma pituitário, como na Síndrome de Cushing, e a administração clínica destes esteróides no tratamento crônico e agudo de doenças inflamatórias promovem efeitos metabólicos adversos tais como pressão sistólica elevada, obesidade central, níveis aumentados de lipídeos circulantes e resistência à insulina, como observado na síndrome metabólica. Com relação ao metabolismo da glicose, a dexametasona, fármaco do grupo dos glicocorticóides, é capaz de reduzir a captação e utilização da glicose e aumentar a gliconeogênese, desencadeando glicemia de rebote (Rang *et al.*, 2003).

Porém, apenas a tintura fruto cereja promoveu o aumento dos níveis de glicose. Assim, é necessário avaliar a composição destas tinturas, pois,

provavelmente, o conteúdo de carboidrato e de cafeína da tintura fruto cereja é superior ao da casca cereja.

O aumento da glicemia com o uso de dexametasona pode ser observado na tabela 1, onde os animais que receberam dexametasona e não foram tratados (G1) tiveram uma média de glicemia de 205,366 mg/dL e o grupo normal (G2) 125,900 mg/dL.

Na tabela 2, observou-se que o tratamento com o flavonóide hesperidina reduziu em 5 % a glicose, não sendo estatisticamente significativa.

**Tabela 1. Valores médios de glicose (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Glicose (mg / dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	205,366 A	-
G2- Ração	125,900 B	-39
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	304,581 B	+48
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	182,346 A	-11

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 2. Valores médios de glicose (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Glicose (mg / dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	194,666 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	185,116 A	-5

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado)

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 3 e 4 encontram-se os valores médios de colesterol, com suas respectivas porcentagens de variação do soro de coelhos jovens e adultos, respectivamente.

Na tabela 3, observou-se que o G3, tratamento com fruto cereja, apresentou uma redução significativa (27%) do colesterol, comparado ao grupo osteoporótico. O tratamento com casca cereja reduziu 13% este mesmo parâmetro, mas não foi estatisticamente significativo, porém deve ser considerado o benefício do valor clínico deste dado.

Alguns trabalhos demonstraram significativa correlação positiva entre o consumo de café e os níveis séricos de colesterol (Rosengren *et al.*, 2004 Urgert e Katan, 1997; Thelle *et al.*, 1983). Porém, outros estudos não encontraram esta correlação (Beynen, 1996; Mennen *et al.*, 2002).

O efeito do café no aumento dos níveis de colesterol sérico tem sido atribuído à presença de diterpenos, o cafestol e o caveol. Pesquisadores constataram que para cada 10 mg de cafestol ingeridos por dia ocorre acréscimo do colesterol no soro em 0,13 mmol/L em modelos animais (Post *et al.*, 2000). Todavia, a forma que a bebida de café é ingerida é fundamental para que haja esse efeito, uma vez que se filtrada, como aconteceu no preparo das tinturas utilizadas neste trabalho, o cafestol e o caveol podem ficar retidos na borra de filtração.

Como ocorreu no presente trabalho, alguns estudos não identificam propriedade hipercolesterolêmica do café, ou seja, o desenvolvimento de doenças cardiovasculares não se associou ao consumo desta bebida (Beynen, 1996; Mennen *et al.*, 2002). Adicionalmente, o café contém substâncias antioxidantes, como o ácido clorogênico e o ácido cafeico, que diminuem a oxidação do LDL, minimizando problemas cardiovasculares (de Ross *et al.*, 2001).

Happonen *et al.* (2004), num estudo realizado com 1971 indivíduos, mostraram que o consumo de café em volumes maiores que 800 mL/dia associam-se ao aumento na incidência de doença cardiovascular, mas, em contrapartida, o consumo moderado (400-800 mL/dia) confere efeito protetor para a mesma patologia.

As matérias primas do café utilizadas neste trabalho não foram preparadas como a bebida café, e sim, na forma de tinturas, portanto, não

sofreram o processo de torrefação. Na torrefação, parte dos diterpenos são degradados, com exceção do 16-O-metilcafetal que é termicamente mais estável (Speer *et al.*, 1991). Assim, pode-se dizer que o conteúdo de diterpenos nas tinturas são maiores do que na bebida café, entretanto, as tinturas de fruto cereja e casca cereja desta pesquisa não foram capazes de aumentar o conteúdo de colesterol do soro dos animais. Pelo contrário, a tintura de fruto cereja reduziu significativamente o teor de colesterol nos animais com osteoporose. Ademais, considerando que a dexametasona é um fármaco capaz de aumentar os níveis de lipídeos séricos por estimular a lipogênese e inibir a lipólise no tecido adiposo, o efeito da tintura casca cereja foi ainda mais efetivo.

Segundo dados da tabela 4, o flavonóide hesperidina reduziu em 3% os valores de colesterol, porém não foi significativo.

O flavonóide cítrico hesperidina tem se destacado pela sua ação antioxidante, reduzindo a oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade) e aumentando os níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade) séricos. O HDL, ao contrário do LDL, tem um papel protetor contra o desenvolvimento da aterosclerose, impedindo a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (Oliveira *et al.*, 2002). O fato da hesperidina não ter promovido uma redução significativa no parâmetro colesterol dos animais com osteoporose, pode ter sido decorrente do efeito, mencionado anteriormente, da dexametasona em induzir um aumento dos níveis de lipídeos na circulação sanguínea. Entretanto, a hesperidina pode ter promovido um efeito protetor impedindo uma hipercolesterolemia, sugerindo que o uso de substâncias que contenham este flavonóide, como as frutas cítricas, são benéficas na proteção de doenças cardiovasculares em pacientes que fazem uso de glicocorticóides.

**Tabela 3. Valores médios de colesterol (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Colesterol (mg / dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	124,728 A	-
G2- Ração	59,785 B	-52
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	91,636 B	-27
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	108,200 A	-13

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 4. Valores médios de colesterol (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Colesterol (mg / dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	66,533 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	64,775 A	-3

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

As tabelas 5 e 6 representam os valores médios de triacilglicerol, com as porcentagens de variação, do soro de coelhos jovens e adultos, respectivamente.

Observou-se, na tabela 5, que o grupo 4 (tintura casca cereja) diminuiu em 3% os níveis de triacilglicerol, sendo este resultado não estatisticamente significativo. Já o grupo 3 (tintura fruto cereja) aumentou significativamente em 53% o triacilglicerol.

Devido o fato dos glicocorticóides serem substâncias capazes de aumentar os níveis de glicose sanguínea e conseqüentemente a produção de

insulina, ele favorece a entrada de glicose nos tecidos hepáticos e adiposos, o que pode favorecer o aumento dos triacilglicerídeos na circulação (Santos *et al.*, 2007). Diversos autores têm proposto papel modulador dos glicocorticóides sobre os lipídios circulantes, com aumento dos níveis plasmáticos de triacilglicerídeos por inibição da atividade da lipoproteína-lipase (Bagdade *et al.*, 1976, Franco-Colin *et al.*, 2000) e aumento dos níveis de ácidos graxos não esterificados pela ativação da lipase sensível a hormônio (Slavin *et al.*, 1994).

Em adição, como visto anteriormente no resultado da tintura fruto cereja para o parâmetro glicose, a cafeína presente no café pode potencializar o efeito da dexametasona em aumentar os níveis de glicose séricos, e conseqüentemente, os triacilglicerídeos.

Na tabela 6, o grupo tratado com hesperidina promoveu uma redução significativa de 37% do parâmetro triacilglicerol comparado ao grupo que recebeu dexametasona e não foi tratado (G5).

Chiba *et al.* (2003) testaram o efeito do flavonóide cítrico hesperidina na inibição da perda óssea e diminuição dos lipídios séricos e hepáticos em camundongos OVX. A hesperidina foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total e triglicerídeos no soro e no fígado, quando comparados ao grupo OVX.

Estes dados indicam que o efeito deste flavonóide cítrico pode ser útil na redução dos triacilglicerídeos na terapia com glicocórticóides.

**Tabela 5. Valores médios de triacilglicerol (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

Tratamentos	Triacilglicerol (mg / dL)	% Variação*
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	117,02 A	-
G2- Ração	83,950 B	-28
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	179,50 B	+54
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	113,90 A	-3

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 6. Valores médios de triacilglicerol (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

Tratamentos	Triacilglicerol (mg / dL)	% Variação*
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	154,941 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	97,928 B	-37

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

As tabelas 7 e 8 representam os valores médios de proteínas totais, com as porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 e 140 dias de idade, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 7, os grupos 3 e 4 aumentaram 3% e 5%, respectivamente, as concentrações de proteínas totais. Porém estas variações não foram estatisticamente significantes quando comparado ao G1.

Na tabela 8, o grupo tratado com hesperidina apresentou uma redução de 8% na concentração de proteínas totais, que também não foi significativo.

Portanto, os tratamentos com tintura de café e com hesperidina não influenciaram os níveis de proteínas totais nos animais que receberam dexametasona.

Os GCs atuam normalmente sobre o metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras e são secretados em maiores quantidades em situações traumáticas e estressantes. Aumento nas concentrações plasmáticas de proteínas e albumina foi observado por Santos *et al.*, (2007) em ratos submetidos a administração de dexametasona. Entretanto, considerando os resultados da tabela 7, as concentrações de proteínas foram significativamente maiores no grupo controle, indicando que o Gc não aumentou este parâmetro.

**Tabela 7. Valores médios de proteínas totais (g/L) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Proteínas totais (g/L)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	55,200 A	-
G2- Ração	64,566 B	+17
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	56,750 A	+3
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	57,660 A	+5

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 8. Valores médios de proteínas totais (g/L) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Proteínas totais (g/L)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	63,883 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	58,250 A	-8

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 9 e 10, encontram-se os valores médios de albumina, com suas respectivas porcentagens de variação do soro de coelhos jovens e adultos, respectivamente.

Na tabela 9, observou-se que o grupo tratado com a tintura casca cereja de café aumentou 3% as concentrações de albumina no soro, porém este resultado não foi estatisticamente significativo.

O tratamento com hesperidina, na tabela 10, reduziu em 7% os níveis de albumina no soro dos coelhos, entretanto, este valor não foi significativo.

Portanto, nenhum tratamento afetou significativamente os níveis de albumina no soro.

A albumina é uma proteína produzida pelo fígado. Ela transporta nutrientes, medicamentos e fitoterápicos no plasma sanguíneo. A excreção da albumina pela urina (proteinúria) indica uma importante alteração pela qual as doenças renais se manifestam. Isto mostra a importância da conservação das proteínas no sangue pelo rim. Quando a albumina encontra-se baixo no sangue, o transporte de nutrientes, e sua conseqüente absorção, ficam comprometidos. Assim, a quantidade de nutrientes importantes para o tecido ósseo, como minerais (Ca, F, P), vitaminas (vitamina C, que participa da síntese do colágeno) e proteínas torna-se menos disponíveis para este tecido. Em adição, o transporte de medicamentos e fitoterápicos úteis para o tratamento de diversas patologias, dentre elas a osteoporose, também podem ficar comprometidos.

**Tabela 9. Valores médios de albumina (g/L) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Albumina (g/L)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	3,475 A	-
G2- Ração	3,886 B	+12
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	3,478 A	0
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	3,580 A	+3

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 10. Valores médios de albumina (g/L) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Albumina (g/L)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	3,798 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	3,536 A	-7

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

As tabelas 11 e 12 representam os valores médios de gama GT, com suas respectivas porcentagens de variação, do soro de coelhos jovens e adultos, respectivamente.

Observou-se, nas tabelas 11 e 12, que os tratamentos com fruto cereja, casca cereja e hesperidina reduziram as concentrações de gama GT em 5%, 20% e 15%, respectivamente, embora não tenha sido significativo.

A gama glutamil transferase (gama-GT) catalisa a transferência do ácido glutâmico de um peptídeo para outro, ligando-o sempre ao grupo gama-carboxílico. Essa enzima parece também, facilitar a transferência transmembrana do ácido glutâmico. A determinação da atividade da gama-GT é útil na avaliação das hepatopatias agudas e crônicas, estando a atividade enzimática elevada nos quadros de colestase intra ou extra-hepática. Os níveis de gama-GT também se elevam na doença hepática alcoólica aguda ou crônica e nas neoplasias primárias ou metastáticas. Eventualmente, a dosagem da atividade de gama-GT pode ser utilizada na comprovação do uso de álcool pelo paciente.

**Tabela 11. Valores médios de gama GT (UI) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Gama GT (UI)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	20,148 A	-
G2- Ração	14,186 A	-30
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	19,438 A	-5
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	16,120 A	-20

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 12. Valores médios de gama GT (UI) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Gama GT (UI)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	10,671 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	9,305 A	-13

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

As tabelas 13 e 14 representam os valores médios de fosfatase alcalina totais, com suas respectivas porcentagens de variação, do soro de coelhos jovens e adultos, respectivamente.

Observou-se, nas tabela 13 e 14, que os tratamentos com fruto cereja, casca cereja e hesperidina reduziram as concentrações de fosfatase alcalina total em 8%, 6% e 19%, respectivamente, porém estes resultados não foram estatisticamente significativos.

É importante ressaltar que o grupo controle, que recebeu apenas ração, apresentou valores significativamente maiores de fosfatase alcalina total

comparado ao grupo doente não tratado. Nos animais mais jovens, com 48 dias de idade, este aumento foi de 29%. Como a fosfatase alcalina total é um biomarcador de formação óssea, estes resultados sugerem que a densidade óssea dos animais com dexametasona não tratados foram menores comparados ao grupo controle.

A fosfatase alcalina total é um biomarcador de formação óssea, que é medida através de sua atividade e corresponde à soma das diversas isoformas presentes no soro. Mais de 90% do seu valor corresponde às isoformas hepática e óssea. Entretanto, quando se busca uma maior sensibilidade e especificidade para avaliar o tecido ósseo, é mais indicado avaliar a fosfatase alcalina óssea. A medida da isoforma óssea-específica tem vantagens sobre a total uma vez que, além de não sofrer influências hepáticas, é mais sensível a pequenas variações no *pool* circulante. A fosfatase alcalina sérica total, por sua vez, é relativamente estável, fácil e menos onerosa de medir, mas não é específica para o osso, pois um único gene produz a mesma enzima no fígado, rim e intestino, além do osso. Entretanto, na exclusão de doenças hepáticas, a dosagem da fosfatase alcalina total apresenta boa correlação com a fosfatase alcalina óssea (Fernandes, 1996).

Os tratamentos com tinturas de café não influenciaram os níveis de fosfatase alcalina total quando comparados ao grupo doente não tratado. Entretanto, os efeitos do café, em particular da cafeína, no metabolismo ósseo são controversos.

O hormônio da vitamina D,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , é um dos mais bem conhecidos reguladores primários da homeostase de cálcio no organismo e regulador da formação e reabsorção óssea, mediados pelo osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. Pesquisas demonstraram que mulheres com uma particular variação do receptor da vitamina D (VDR) possuem um maior risco dos efeitos deletérios da cafeína no metabolismo ósseo. Estes trabalhos mostram que polimorfismos no terminal 3' do gene VDR está relacionado com a DMO, turnover e perda óssea (Gong *et al.*, 1999 e Wood e Fleet, 1998).

Entretanto, pesquisas de Raturi *et al.* (2006) relataram que a cafeína reduz a expressão da proteína receptora da vitamina D e a atividade da fosfatase alcalina, estimulada pelo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  em células de osteoblastos de humanos. Segundo estes autores, o consumo de cafeína é um fator de risco

para a osteoporose e provoca um decréscimo da densidade mineral óssea. O efeito da cafeína é dose dependente. Na concentração de 0,5 mM, a cafeína não afetou a atividade da fosfatase alcalina total. Entretanto, a concentração de 1,0 mM de cafeína diminuiu a atividade da ALP estimulada pelo 1,25(OH)2D3 em aproximadamente 50%. Na concentração de 1,0 mM e 10mM, a cafeína reduziu a expressão do receptor de vitamina D em 50% e 70%, respectivamente.

Pesquisadores demonstraram que a quantidade de cafeína acima de 300 mg/dia (mais de 3 xícaras de 150 mL de café) acelerou a perda óssea da espinha de mulheres idosas (Rapuri *et al.*, 2001).

Alguns flavonóides, têm sido investigados no tratamento da osteoporose. Evidências indicam que os flavonóides se ligam a receptores  $\beta$  do estrogênio, estimulam *in vitro* a síntese protéica de células osteoblásticas e seu uso por mulheres na pós-menopausa aumenta a concentração de osteocalcina, marcador de formação óssea que reflete um aumento da atividade osteoblástica (Moreira, 2004).

O tratamento, *in vivo*, com a isoflavona genisteína, aumentou a DMO e os níveis séricos de fosfatase alcalina óssea, fosfatase ácida e osteocalcina do fêmur de camundongos OVX. Enquanto que os de interleucina 1 e do fator de necrose tumoral, citocinas inflamatórias, diminuíram. Sendo que o aumento da fosfatase alcalina óssea e da osteocalcina no grupo que recebeu genisteína foi maior do que no grupo tratado com estradiol (Li e Yu, 2003).

Son *et al.* (2007) mostraram que a quercetina acelera a apoptose de linhagens de células osteoblásticas MC3T3-E1 induzidas pelo TNF- $\alpha$ .

Pesquisas indicam que o kaempferol é um potente agente antiosteoclastogênicos *in vivo*, agindo especificamente antagonizando a ação da família de receptores TNF nas células ósseas em dois níveis distintos, inibindo a produção de citocinas osteoclastogênicas pelos osteoblastos e atenuando a diferenciação de células precursoras de osteoclastos (Pang *et al.* 2006).

**Tabela 13. Valores médios de fosfatase alcalina total (UI) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

Tratamentos	Fosfatase alcalina total (UI)	% Variação*
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	189,750 A	-
G2- Ração	242,975 B	+29
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	173,388 A	-8
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	177,750 A	-6

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 14. Valores médios de fosfatase alcalina total (U/l) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

Tratamentos	Fosfatase alcalina total (U/l)	% Variação*
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	119,486 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	97,166 A	-19

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

As tabelas 15 e 16 representam os valores médios de cálcio, com as porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 e 140 dias de idade, respectivamente.

Os tratamentos com as tinturas de fruto cereja e casca cereja do café, na tabela 15, demonstrou reduções de 3 e 2%, respectivamente, nos teores de cálcio no soro, sendo que estes valores não foram estatisticamente significativos.

Na tabela 16, o tratamento com hesperidina resultou em uma redução de 3% das concentrações de cálcio no soro dos animais, embora não tenha sido significativo.

As concentrações de cálcio nos fluidos intra e extracelular estão sob um preciso controle homeostático. A concentração deste mineral no plasma é regulada, principalmente, pelo sistema vitamina D – paratormônio (PTH). Quando a concentração de cálcio no plasma abaixa, a glândula da paratireóide é estimulada a secretar PTH, que por sua vez, estimula a conversão de 25-OH-D<sub>3</sub> a 1,25-(OH)-D<sub>3</sub> nos rins (forma ativa da vitamina D). Esta, estimula a absorção de cálcio no intestino e, juntamente com o paratormônio, aumenta a mobilização de cálcio dos ossos, por ativar os osteoclastos, e aumenta a reabsorção de cálcio nos túbulos renais.

Quando a concentração de cálcio no sangue se eleva em resposta a uma absorção de cálcio aumentada, reabsorção renal aumentada ou mobilização óssea, o limiar renal de excreção é alterado e o cálcio extra é excretado na urina.

Portanto, a medida do cálcio sérico não é muito útil para avaliar a quantidade deste mineral no osso, pois o processo de regulação deste mineral prioriza a manutenção de níveis adequados de cálcio no plasma.

Pinto (2004), analisando o efeito do bifosfonato alendronato de sódio, da estatina atorvastatina cálcica e do flavonóide ipriflavona isoladamente e em associação na osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona em ratas da raça Wistar, não obteve resultados estatisticamente diferentes entre o grupo osteoporótico, o normal e os tratados com relação aos valores séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea.

Silva (2006) não encontrou diferenças significativas nos níveis de cálcio, fósforo e magnésio entre o grupo de ratos osteoporóticos e os normais avaliando o efeito do alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e dos flavonóides ipriflavona e rutina na osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona em ratas da raça Wistar.

**Tabela 15. Valores médios de cálcio (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Cálcio (mg/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	10,700 A	-
G2- Ração	11,150 A	+4
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	10,420 A	-3
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	10,572 A	-2

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 16. Valores médios de cálcio (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Cálcio (mg/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	10,833 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	10,750 A	-1

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 16 e 17 estão representados os valores médios de fósforo, com as porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 e 140 dias de idade, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos para fósforo, observou-se, na tabela 16, que o tratamento com a tintura casca cereja reduziu em 2% as concentrações deste parâmetro no soro, porém não foi estatisticamente significativa. E que o tratamento com fruto cereja aumentou significativamente, em 37% as concentrações do fósforo no soro. Este resultado sugere que o tratamento com a tintura fruto cereja do café pode aumentar as concentrações

de fósforo na circulação sanguínea. A cafeína, que provavelmente, está mais presente na tintura de fruto cereja do que na casca cereja, aumenta a produção de AMPc, assim, pode estimular a hidrólise do ATP, liberando o grupo fosfato. Porém, assim, como o cálcio, o fósforo também possui uma homeostase muito precisa, assim, os níveis de fósforo plasmáticos não são representativos do conteúdo deste mineral no osso.

O grupo controle obteve um nível significativamente maior de fósforo no soro quando comparado ao grupo doente não tratado.

O grupo tratado com hesperidina, na tabela 17, resultou em uma redução de 10% do fósforo no soro, porém, este valor não foi estatisticamente significante.

**Tabela 17. Valores médios de fósforo (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Fósforo (mg/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	7,270 A	-
G2- Ração	8,998 B	+24
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	9,950 B	+37
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	7,160 A	-2

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 18. Valores médios de fósforo (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Fósforo (mg/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	7,116 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	6,453 A	-10

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 19 e 20 estão representados os valores médios de uréia, com as porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 e 140 dias de idade, respectivamente.

Para o parâmetro uréia, os tratamentos com fruto cereja e casca cereja reduziram em 13 e 8%, respectivamente, embora não tenha sido significativo em termos estatísticos.

O grupo tratado com hesperidina obteve uma redução significativa de 24% nos níveis de uréia no soro dos animais.

A uréia é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas. Gerada no fígado, é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo. É difundida através da maioria das membranas celulares, e a sua maior parte é excretada pela urina, sendo que pequenas quantidades podem ser excretadas pelo suor e degradadas por bactérias intestinais. É livremente filtrada pelos glomérulos e é dependente da velocidade do fluxo urinário, ligado diretamente ao grau de hidratação. Grande parte da uréia filtrada é reabsorvida passivamente nos túbulos proximais. No indivíduo saudável, sua concentração varia de acordo com diferentes fatores tais como o conteúdo protéico da dieta e a hidratação.

Apesar de ser um marcador da função renal, é considerada menos eficiente do que a creatinina pelos diferentes fatores não-renais que podem afetar sua concentração. No entanto, sua elevação é mais precoce, e não sofre

com a variação da massa muscular. A avaliação conjunta com a creatinina é útil no diagnóstico diferencial das causas de lesão renal.

**Tabela 19. Valores médios de uréia (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Uréia (mg/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	33,383 A	-
G2- Ração	48,933 B	+47
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	29,200 A	-13
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	30,888 A	-8

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 20. Valores médios de uréia (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Uréia (mg/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	35,450 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	26,808 B	-24

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 21 e 22 estão representados os valores médios de creatinina, com as porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 e 140 dias de idade, respectivamente.

Com relação a creatinina, observou-se que os grupos 3 e 4 na tabela 20, tratados com tinturas de café, apresentaram um aumento de 6% e 16%, respectivamente, embora não tenham sido significativos estatisticamente.

O tratamento com hesperidina promoveu uma diminuição de 3% dos valores de creatinina no soro dos animais, porém, não foi estatisticamente significativo.

A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina (creatina fosforilada) no músculo, e é geralmente produzida em uma taxa praticamente constante pelo organismo, dependendo da massa muscular do indivíduo. A medida da concentração de creatinina no soro sanguíneo é um teste mais preciso que a uréia como indicador da função renal. Entretanto, um aumento nos níveis de creatinina no sangue é observado somente quando há um dano aos néfrons funcionantes. Logo este teste não é adequado para detectar uma doença renal em seu estágio inicial. Uma estimativa melhor da função renal é dada pelo teste de depuração de creatinina. A depuração (*clearance*) de creatinina pode ser calculada precisamente usando a concentração de creatinina no soro sanguíneo e alguns variáveis, como, sexo, idade, peso e raça.

**Tabela 21. Valores médios de creatinina (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

Tratamentos	Creatinina (mg/dL)	% Variação*
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	1,421 A	-
G2- Ração	1,630 A	+15
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	1,510 A	+6
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	1,654 A	+16

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 22. Valores médios de creatinina (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	1,783 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	1,738 A	-3

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

## 5.2) ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

O sangue é uma suspensão de células (glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas) em um líquido chamado plasma, que é constituído por água, sais minerais, vitaminas, proteínas e lipídeos (Verrastro *et al.*, 2005).

Os glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas têm sua origem, após o nascimento, na medula de todos os ossos, mas no adulto, apenas os ossos chatos (esponjosos) compreendem o órgão hematopoético (Verrastro *et al.*, 2005).

As primeiras células formadas são células totipotentes, que podem originar as demais células, quer da linhagem vermelha, branca ou placentária (Verrastro *et al.*, 2005).

As células que participam da remodelação óssea possuem origens distintas. Os osteoblastos, derivam da linhagem de células mesenquimais, enquanto os osteoclastos, provêm de unidades formadoras comuns de granulócitos e macrófagos da medula óssea denominadas de UFC-GM (linhagem linfócito-monócito-macrófago-osteoclasto). Assim, pode-se dizer que o processo de formação óssea é formado por células próprias do tecido ósseo, que preenchem a lacuna de reabsorção com a síntese de matriz colagenosa. Já a reabsorção óssea é formada por células que não são próprias do tecido ósseo. São células de linhagem sangüínea que são atraídas à superfície óssea para dar início ao processo reabsortivo (Fernandes *et al.*, 1996).

Assim, como as células sangüíneas e os osteoclastos derivam de um local comum, a medula óssea, é plausível que a hematopoiese e a osteoclastogênese podem estar sobre as mesmas influências, sofrendo interferência de substâncias localmente produzidas, como as citocinas. Estas possibilitam o recrutamento das células progenitoras e a ativação ou depressão do processo de remodelação, tanto em relação à formação quanto à reabsorção óssea (Fernandes *et al.*, 1996).

Assim, a avaliação do hemograma completo pode ser útil para o rastreamento das causas da osteoporose, principalmente, se esta for de origem secundária, como a que foi induzida neste trabalho nos animais por glicocorticóide.

O hemograma é o nome dado ao conjunto de avaliações das células do sangue que, reunido aos dados clínicos, permite conclusões diagnósticas e prognósticas de grande número de patologias. O hemograma é composto por três determinações básicas que incluem as avaliações do leucograma (ou série branca), o eritrograma (ou série vermelha) e das plaquetas (*Lorenzi, 2003*).

O leucograma é a parte do hemograma que inclui a avaliação dos glóbulos brancos, que podem ser classificados em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e pelos não granulócitos (linfócitos e monócitos). Este exame é indicado para o diagnóstico e acompanhamento de processos infecciosos, inflamatórios, alérgicos, tóxicos e neoplásicos.

Já o eritrograma avalia especificamente a série vermelha, através dos seguintes parâmetros: números de glóbulos vermelhos, dosagens de hemoglobina e hematócritos e índices hematimétricos.

Nas tabelas 23 e 24 encontram-se os valores médios de leucócitos totais e suas porcentagens de variação, do soro de coelhos mais jovens (48 dias de idade) e coelhos mais adultos (140 dias de idade), respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 23, o tratamento com a tintura de café casca cereja reduziu o número de leucócitos em 33%, mas este valor não foi estatisticamente significativo. Já o tratamento com fruto cereja promoveu um aumento significativo de 159% neste mesmo parâmetro.

O tratamento com o flavonóide hesperidina não provocou alteração significativa no número de leucócitos, comparado ao grupo doente não tratado.

A inflamação é uma reação caracterizada por reação de vasos sanguíneos, levando ao aumento de fluidos e leucócitos com objetivos de destruir, diluir e isolar os agentes lesivos.

O medicamento utilizado como indutor da osteoporose, a dexametasona, é considerada uma droga imunossupressora e antiinflamatória. Portanto, este glicocorticóide promove uma diminuição do número de leucócitos. De fato, como observado nas tabelas 23 e 24, os menores valores de leucócitos, com exceção do tratamento com a tintura casca cereja, ocorreram no grupo doente não tratado, onde apenas foi administrado o glicocorticóide.

Não estão bem estabelecidos os valores normais de leucócitos para coelhos, porém, a tintura fruto cereja aumentou significativamente estes valores, indicando a presença de um processo inflamatório.

**Tabela 23. Valores médios de leucócitos totais ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Leucócitos (<math>10^3\mu</math>)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	5,4933 A	-
G2- Ração	9,6617 B	76
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	14,2333 B	159
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	3,5500 A	-33

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 24. Valores médios de leucócitos totais ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Leucócitos (<math>10^3\mu</math>)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	7,9900 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	8,0450 A	1

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

As tabelas 25 e 26 representam os valores médios de linfócitos com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos mais jovens e coelhos mais adultos, respectivamente.

O tratamento com fruto cereja aumentou o número de linfócitos em 43% e a tintura de casca cereja diminuiu este mesmo parâmetro em 34%, porém estes valores não foram significativos estatisticamente, quando comparados ao grupo que recebeu apenas dexametasona e não foi tratado (G1).

Na tabela 26, o tratamento com hesperidina, assim como a casca cereja, diminuiu em 34% o número de linfócitos, e este valor também não foi significativo quando comparado ao grupo osteoporótico.

Como observado nos leucócitos, o grupo tratado apenas com o glicocorticóide foi o que apresentou menores valores de linfócitos, fato explicado pela função antiinflamatória da dexametasona.

Os linfócitos são encontrados no sangue contribuindo para 20-30% dos leucócitos. Esta percentagem varia muito de acordo com a saúde do indivíduo. Em casos de depressão, estresse, esta percentagem decresce, ou no caso de uma infecção viral, esta percentagem eleva consideravelmente. Numa rejeição de transplante, também observamos grande aumento de linfócitos (*Lorenzi, 2003*).

Os linfócitos não são formados exclusivamente na medula, como os demais leucócitos presentes no sangue, nem são derivados dos mieloblastos, como aqueles. Sua formação ocorre, durante todo o tempo, em diversos órgãos ou estruturas de nosso corpo que apresentam os denominados tecidos linfóides: gânglios linfáticos, amígdalas, adenóides, timo, baço, etc (*Verrastro, 2005*).

**Tabela 25. Valores médios de linfócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

Tratamentos	Linfócitos ( $10^3\mu$ )	% Variação*
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	2,1600 A	-
G2- Ração	5,2167 B	142
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	3,0867 A	43
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	1,4317 A	-34

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 26. Valores médios de linfócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

Tratamentos	Linfócitos ( $10^3\mu$ )	% Variação*
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	3,3333 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	2,2000 A	-34

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

As tabelas 27 e 28 representam os valores médios de mielócitos, com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos mais jovens e coelhos mais adultos, respectivamente.

Observou-se que a tintura de café fruto cereja, na tabela 27, promoveu um aumento significativo de 158% sobre os valores de mielócitos, quando comparados ao grupo doente não tratado. Já a tintura de casca cereja (tabela 27) e o tratamento com hesperidina (tabela 28) resultaram em um decréscimo, não estatisticamente significativo, de 28 e 30%, respectivamente.

O mielócito é uma célula da medula óssea, que deriva do mieloblasto e da qual provêm os granulócitos do sangue. Segundo as suas granulações citoplásmicas, distinguem-se três tipos: o mielócito neutrófilo, o mielócito eosinófilo e o mielócito basófilo. Os mielócitos estão presentes em grande número no sangue em determinadas formas de leucemia.

**Tabela 27. Valores médios de mielócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

Tratamentos	Mielócitos ( $10^3\mu$ )	% Variação*
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	0,3367 A	-
G2- Ração	0,6750 B	100
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	0,8700 B	158
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	0,2417 A	-28

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 28. Valores médios de mielócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

Tratamentos	Mielócitos ( $10^3\mu$ )	% Variação*
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	0,638 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	0,451 A	-30

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 29 e 30 encontram-se os valores médios de granulócitos, com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos mais jovens e coelhos mais adultos, respectivamente.

Na tabela 29, a tintura de fruto cereja do café aumentou significativamente os valores de granulócitos em 243%. A tintura de casca cereja, na tabela 29, e a hesperidina, na tabela 30, diminuíram em 27 e 33% este mesmo parâmetro, embora não tenha sido estatisticamente significativo.

Granulócitos são células brancas do sangue, cujo citoplasma contém várias granulações e seu núcleo diversos lobos. Conforme estas granulações,

estas células são classificadas em neutrófilos, eosinófilos ou basófilos (Verrastro, 2005).

Os granulócitos, em particular os neutrófilos, são responsáveis pela defesa do organismo contra patógenos. Eles realizam fagocitose, processo relacionado com a função de quimiotaxia e com a capacidade de ataque e morte aos microorganismos invasores do meio interno. Os outros granulócitos, eosinófilos e basófilos, também podem realizar fagocitose, porém com menos eficácia que os neutrófilos. Os eosinófilos e os basófilos estão mais aumentados nas reações de tipo alérgico ou imunológico (Verrastro, 2005).

**Tabela 29. Valores médios de granulócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Granulócitos (<math>10^3\mu</math>)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	2,9967 A	-
G2- Ração	3,8017 A	26
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	10,2850 B	243
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	2,1933 A	-27

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 30. Valores médios de granulócitos ( $10^3\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Granulócitos (<math>10^3\mu</math>)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	4,0167 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	5,3967 A	33

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 31 e 32 encontram-se os valores médios de contagem de eritrócitos totais, com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 dias e 140 dias de idade, respectivamente.

O tratamento com fruto cereja (tabela 31) promoveu um decréscimo na contagem de eritrócitos totais, não estatisticamente significativo comparado ao grupo 1, de 1%. Já o tratamento com casca cereja induziu uma redução significativa deste mesmo parâmetro de 13%.

Na tabela 32, a hesperidina aumentou em 2% a contagem de eritrócitos totais, sendo este valor não estatisticamente significativo comparado ao grupo doente não tratado.

Os eritrócitos são as chamadas células vermelhas do sangue ou hemáceas. São constituídas basicamente por globulina e hemoglobina.

**Tabela 31. Valores médios de contagem de eritrócitos totais ( $10^6\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

Tratamentos	Contagem de eritrócitos totais ( $10^6\mu$ )	% Variação*
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	6,5667 A	-
G2- Ração	7,7317 B	18
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	6,4900 A	-1
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	5,7050 B	-13

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 32. Valores médios de contagem de eritrócitos totais ( $10^6\mu$ ) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

Tratamentos	Contagem de eritrócitos totais ( $10^6\mu$ )	% Variação*
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	6,0367 A	-
G36 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	6,1260 A	2

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G6).

Nas tabelas 33 e 34 encontram-se os valores médios hemoglobina, com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 dias e 140 dias de idade, respectivamente.

O tratamento com fruto cereja (tabela 31) e com o flavonóide hesperidina (tabela 32) promoveram um aumento na contagem de hemoglobina, não estatisticamente significantes comparado ao grupo doente não tratado (G1), de 1 e 0,5%, respectivamente. Já o tratamento com casca cereja induziu uma redução significativa deste mesmo parâmetro de 11%.

A hemoglobina é uma metaloproteína que está presente nas hemáceas. É composta de 4 moléculas protéicas de estrutura terciária e 4 grupamentos heme que contém o ferro, um para cada molécula de hemoglobina, e a sua função é transportar o oxigênio (principalmente) e o gás carbônico (em menor quantidade) aos tecidos.

A diminuição da concentração da hemoglobina abaixo dos níveis normais, respeitanto as variações para sexo e idade, caracteriza uma anemia. Na prática, pode-se dizer que um indivíduo apresenta anemia quando apresenta valores inferiores a 11g de hemoglobina por 100 mL de sangue (11g/dL) para crianças e mulheres e 12g/dL para homens. Entretanto, é necessário considerar que a hemoglobina seja funcionante e não desnaturada e que o volume sanguíneo seja normal.

Os valores normais de hemoglobina para coelhos com idade superior a 40 dias são 15,97g/dL  $\pm$  1,93 (Lippincott Willians e Wilkin, 1986). Porém, todos

os grupos apresentaram valores inferiores a 15,97 g/dL, até mesmo os normais (14,68 g/dL), o que pode comprometer o transporte de oxigênio para os tecidos.

Os coelhos realizam coprofagia, que consiste na recolha dos excrementos “moles” do ânus com a boca, processo este que normalmente se realiza durante à noite. Assim, os alimentos sofrem primeiramente uma digestão parcial no intestino delgado e passam rapidamente para o ceco do animal, onde são produzidos as excretas “moles” e permanecem por mais de 6 horas. Neste período, o bolo alimentar sofre alterações sobre a influências da flora microbiana e alguns protozoários. A celulose, é uma das substâncias mais atingidas, ela sofre transformações químicas que conduz à formação de várias substâncias, entre elas, o ácido láctico. Quando este é absorvido e entra na circulação, contribuem para o fornecimento de energia. No ceco também ocorre síntese de vitaminas do complexo B pelas bactérias presentes (Duarte e Carvalho, 1979).

Após, estas excretas seguem o trajeto até o ânus, onde são recolhidas pela boca por ação de um estímulo pelas glândulas das supra-renais. Com a ingestão destes excrementos “moles”, ocorre a segunda fase da digestão, onde as excretas sofrem ação de enzimas digestivas no trato gastrointestinal, completando a absorção dos nutrientes. Nesta segunda fase, as excretas não passam pelo ceco, penetram diretamente no cólon, onde são transformadas em excrementos mais consistentes (Duarte e Carvalho, 1979).

Quando o coelho está exposto a um determinado estresse, como pode ocorrer com o confinamento, ocorre uma inibição das supra renais, e uma posterior parada da coprofagia. Assim, ocorre uma diminuição da absorção de nutrientes, principalmente de aminoácidos e vitaminas do complexo B e a vitamina C (Duarte e Carvalho, 1979).

A vitamina C favorece a absorção do ferro não-heme presente em alimentos de origem vegetal, a sua diminuição, pode favorecer o desenvolvimento da anemia por deficiência de ferro, conseqüentemente uma menor concentração de hemoglobina. Isto também pode comprometer o metabolismo ósseo, visto que a vitamina C participa da formação do colágeno, que está presente no tecido ósseo.

**Tabela 33. Valores médios de hemoglobina (g/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	12,8667 A	-
G2- Ração	14,6833 B	14
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	13,0167 A	1
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	11,4333 B	-11

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 34. Valores médios de hemoglobina (g/dL) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	12,0333 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	12,0800 A	0,5

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado)

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

As tabelas 35 e 36 representam os valores médios de hematócrito, com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos mais jovens e coelhos mais adultos, respectivamente.

O tratamento com fruto cereja (tabela 35) e com o flavonóide hesperidina (tabela 36) promoveram um aumento na contagem de eritrócitos totais, não estatisticamente significantes comparado ao grupo doente não tratado da mesma idade, de 4 e 0,5%, respectivamente. Já o tratamento com casca cereja induziu uma redução significativa deste mesmo parâmetro em 9%.

Os índices hematimétricos são valores fornecidos pelo contador eletrônico que auxiliam a caracterizar o quadro anêmico. Eles avaliam as hemáceas em relação ao tamanho e o conteúdo de hemoglobina. Dentre eles estão o hematócrito (%), que indica o volume eritrocitário, o volume corpuscular médio (VCM), que determina o tamanho as hemáceas, a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), que representam a cor da hemácea e o RDW distribuição media das células, que indica a anisocitose (variação do tamanho das hemáceas).

O hematócrito, corresponde, em porcentagem, ao volume de hemáceas em relação ao volume total de sangue. O mesmo número de hemáceas pode conter valores de hematócrito diferentes, conforme o estado de hidratação do indivíduo. A desidratação e a redução do volume plasmático geram valores mais elevados e a hipovolemia e o aumento no volume plasmático resultam em valores menores de hematócrito. Assim, não é um índice adequado para ser usado isoladamente no diagnóstico de uma anemia (Fischbah, 2005).

**Tabela 35. Valores médios de hematócrito (%) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Hematócrito (%)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	40,0167 A	-
G2- Ração	46,8500 B	17
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	41,7000 A	4
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	36,2667 B	-9

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 36. Valores médios de hematócrito (%) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

Tratamentos	Hematócrito (%)	% Variação*
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	38,1000 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	38,3000 A	0,5

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado)

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 37 e 38 estão os valores médios de volume corpuscular médio (VCM), com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos mais jovens e coelhos mais adultos, respectivamente.

O tratamento com casca cereja (tabela 37) e com o flavonóide hesperidina (tabela 38) promoveram um aumento na contagem de eritrócitos totais, não estatisticamente significantes comparado ao grupo doente não tratado da mesma idade, de 2 e 0,2%, respectivamente. Já o aumento de 3% deste mesmo parâmetro pelo tratamento com fruto cereja foi estatisticamente significativo.

O VCM é um índice que representa o tamanho da hemácea. Hemáceas com VCM abaixo de 80 são consideradas microcíticas, valores acima de 95 indicam uma macrocitose, e uma normocitose é caracterizado por um VCM normal. Hemáceas microcíticas representam anemia por deficiência de ferro, já que este mineral é fundamental para o processo normal de hemoglobinação das hemáceas. Já as macrocíticas podem caracterizar uma anemia megaloblástica, por deficiência de vitamina B12 ou folato, cofatores indispensáveis para a maturação nuclear normal dos precursores eritrocíticos. Anemias por sangramento agudo ou doença crônica possuem hemáceas normocíticas, porém, a concentração de hemoglobina e o número de glóbulos vermelhos são anormais (Fischbah, 2005).

**Tabela 37. Valores médios de volume corpuscular médio (VCM) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

Tratamentos	VCM (fl)	% Variação*
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	62,0000 A	-
G2- Ração	60,6667 A	-2
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	64,1666 B	3
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	63,5000 A	2

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 38. Valores médios de volume corpuscular médio (VCM) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

Tratamentos	VCM (fl)	% Variação*
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	63,0000 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	63,1667 A	0,2

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 39 e 40 estão os valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM), com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 e 140 dias de idade, respectivamente.

Os tratamentos com tinturas de café fruto cereja e casca cereja, na tabela 39, e com o flavonóide hesperidina, na tabela 40, induziram um aumento nos valores de hemoglobina corpuscular médio de 2,5%, 3% e 0,3%, respectivamente. Porém, estes resultados não foram estatisticamente significativos quando comparado ao grupo dos animais osteoporóticos.

O HCM e o CHCM são índices de cor, que refletem a concentração de hemoglobina presente nas hemáceas.

**Tabela 39. Valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuai vermelho.**

Tratamentos	HCM (pg)	% Variação*
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	19,6333 A	-
G2- Ração	18,9833 A	-3
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	20,1167 A	2,5
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	20,2333 A	3

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado)

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 40. Valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

Tratamentos	HCM (pg)	% Variação*
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	19,8660 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	19,9330 A	0,3

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 41 e 42 estão os valores médios de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 e 140 dias de idade, respectivamente.

Na tabela 41, os tratamentos com fruto cereja e casca cereja promoveram uma redução na concentração de hemoglobina corpuscular média de 2 e 0,3%, respectivamente, porém estes valores não foram significativos estatisticamente quando comparados ao G1. Já o tratamento com hesperidina aumentou em 1% este mesmo parâmetro, mas também não foi significativo.

A concentração da hemoglobina corpuscular média é calculada pela relação entre a hemoglobina obtida por 100 dL e o volume corpuscular, sendo o resultado dado em porcentagem.

**Tabela 41. Valores médios de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuai vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>CHCM (g/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	31,7500 A	-
G2- Ração	31,2833 A	-1,5
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	31,2500 A	-2
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	31,6400 A	-0,3

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 42. Valores médios de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>CHCM (g/dL)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	31,2833 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	31,6333 A	1

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Nas tabelas 43 e 44 estão os valores médios de distribuição do tamanho das hemácias (RDW), com suas porcentagens de variação, do soro de coelhos com 48 e 140 dias de idade, respectivamente.

Os tratamentos com tinturas de café fruto cereja e casca cereja, na tabela 43, e com o flavonóide hesperidina, na tabela 44, induziram um aumento nos valores de RDW de 1%, 0,4% e 5%, respectivamente. Porém, estes resultados não foram estatisticamente significativos quando comparado ao grupo dos animais osteoporóticos.

O RDW corresponde à amplitude de distribuição do tamanho das hemáceas. É um índice de anisocitose, que indica o quanto a população de hemáceas se desvia do tamanho médio (Verrastro, 2005).

**Tabela 43. Valores médios de amplitude de distribuição do tamanho das hemácias (RDW) em soro sanguíneo de coelhos com 48 dias de idade submetidos ao tratamento com tinturas de fruto cereja e casca cereja do café catuaí vermelho.**

<b>Tratamentos</b>	<b>RDW (%)</b>	<b>% Variação*</b>
G1- Ração + Dexametasona (animais mais jovens)	16,5500 A	-
G2- Ração	16,2660 A	-2
G3 - Ração + Dexametasona + 1 mL Fruto cereja	16,7160 A	1
G4 - Ração + Dexametasona + 1 mL Casca cereja	16,6200 A	0,4

% de variação em relação à G1 (grupo doente não tratado).

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G1).

**Tabela 44. Valores médios de amplitude de distribuição do tamanho das hemácias (RDW) em soro sanguíneo de coelhos com 140 dias de idade submetidos ao tratamento com o flavonóide hesperidina.**

<b>Tratamentos</b>	<b>RDW (%)</b>	<b>% Variação*</b>
G5- Ração + Dexametasona (animais mais adultos)	16,2160 A	-
G6 - Ração + Dexametasona + 30 mg Hesperidina	16,9660 A	5

% de variação em relação à G5 (grupo doente não tratado)

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G5).

Com relação ao efeito da dexametasona nos parâmetros hematológicos, os dados na literatura são muito escassos. Assim, este trabalho pode contribuir para a compreensão desta possível relação.

## 6) CONCLUSÃO

Os marcadores bioquímicos e hematológicos utilizados não permitiram o diagnóstico da osteoporose, bem como a avaliação das alterações de remodelação óssea.

É necessário que análises com marcadores mais específicos do tecido ósseo sejam realizadas para a compreensão dos reais efeitos das tinturas de café e do flavonóide hesperidina na osteoporose.

Os valores de fosfatase alcalina total foram significativamente maiores no grupo normal comparado ao grupo que recebeu apenas dexametasona. Como a fosfatase alcalina total é considerada um biomarcador de formação óssea, estes resultados sugerem que a densidade óssea dos animais com dexametasona não tratados foi menor comparado ao grupo controle.

A tintura de fruto cereja do café, promoveu um aumento significativo nos níveis de glicose e triacilglicerídeo, comparados ao grupo doente não tratado com a mesma idade. Esta mesma tintura, no capítulo anterior, onde foi avaliado o efeito do café no diabetes, reduziu significativamente a glicose nos animais diabéticos. Inúmeros trabalhos também mostram que o consumo de café pode reduzir o risco de diabetes tipo 2. Entretanto, a cafeína, quando consumida por indivíduos que possuem altos níveis de glicocorticóides por um defeito hormonal ou devido a um tratamento farmacológico parece potencializar o efeito deletério do glicocorticóide no metabolismo da glicose. Portanto, pacientes que possuem altos níveis de glicocorticóides devem controlar a ingestão de produtos que contenha cafeína, dentre eles o café.

Em contrapartida, o flavonóide cítrico hesperidina reduziu significativamente os níveis de triacilglicerídeo, comparados ao grupo que recebeu apenas dexametasona com a mesma idade. Este dado sugere que o uso de substâncias que contenham este flavonóide, como as frutas cítricas, são úteis na prevenção da hipertrigliceridemia promovida pelos glicocorticóides.

A tintura de fruto cereja do café aumentou significativamente os valores de leucócitos, comparado ao grupo doente da mesma idade, sugerindo o desenvolvimento de um possível processo inflamatório.

## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, J.H.; Oliveira, A.; Bracco, O.L.; Kayath, M.; Guarniero, R. Teriparatida PTH [1-34]rh): Uma nova perspectiva no tratamento da osteoporose. **Acta ortop. bras.** v. 11 no.3 São Paulo July/Aug. 2003.

Albertazzi, P.; Pansini, F.; Bonaccorsi, G.; Zanotti, L.; Forini, E.; De Aloysio, D. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. **Obstet Gynecol.**, v. 91, p. 6-11, 1998.

Alekel, D. L.; Germain, A. S.; Peterson, C. T.; Hanson, K. B.; Stewart, J. W.; Toda, T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 844–852, 2000.

Anderson, J.J.; Ambrose, W.W.; Garner, S.C. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v.217, n.13, p.345-350, 1998.

Andrea, J.; Conlisk, M.P.H.; Deborah, A.; Galuska, M.P.H. Is Caffeine Associated with Bone Mineral Density in Young Adult Women? **Preventive Medicine**, v. 31, p. 562–568, 2000.

Årnlöv, J.,; Vessby, B.; Riserus, U. Coffee consumption and insulin sensitivity. **JAMA**. v. 291, p. 1199-1201, 2004.

Arts, J.; Kuiper, G. G.; Janssen, J. M.; Gustafsson, J. A.; Lowik, C. W.; Pols, H. A.; Leeuwen, J. P. Differential expression of estrogen receptors and mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. **Endocrinology**, 138, p. 5067–5070, 1997.

Bagdade, J. D.; Yee, E.; Alberts, J.; Pykalisto, O. J. Glucocorticoids and triglyceride transport: effects on triglyceride secretion rates, lipoprotein lipase,

and plasma lipoproteins in the rat. **Metabolism**, New York, v. 25, n. 5, p. 533–542, 1976.

Bandeira, F.; Freese, E.; Theodosio, C. Epidemiologia, genética e patogênese da osteoporose. In: Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Faria M (Org). Osteoporose. Rio de Janeiro: **Medsa**, p. 113-26, 2002.

Bandyopadhyay, S.; Lion, J.M.; Mentaverri, R.; Ricupero, D.A.; Kamel, S.; Romero, J.R.; Chattopadhyay, N. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenina. **Biochemical Pharmacology**. v. 72, p. 184 – 197, 2006.

Barger-Lux, M.J.; Heaney, R.P. Caffeine and the calcium economy revisited, **Osteoporos. Int.**, v. 5, p. 97–102, 1995.

Barger-Lux, M.J.; Heaney, R.P.; Stegman, M.R. Effects of moderate caffeine intake on the calcium economy of premenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 722–725, 1990.

Bavaresco, L.; Bernardini, A.; Battastini, AM. O. Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v.17, nº 7/9, 2005.

Bellosta, P.; Masramon, L.; Mansukhani, A.; Basilico, C. p21WAF1/CIP1 acts as a brake in osteoblast differentiation. **J. Bone Miner. Res.** 18, p. 818– 826, 2003.

Beynen, A. C. Boiled coffee fails to raise cholesterol in hamsters and rats. **Br. J. Nutr.**, v. 76, p.755-764, 1996.

Bikle, D.D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. **Am J Med**, v. 103, p. 427-36, 1997.

Borba, V.Z.C.; Lazaretti-Castro, M. Osteoporose Induzida por Glicocorticoide **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 43/6, p. 452-456, 1999.

Borba, V.Z.C.; Lazaretti-Castro, M. Osteoporose induzida por glicocorticóide. *Arq Brás Endocrinol Metab*, v. 43, n° 6, dez, 1999.

Botolin, S.; Faugere, M.C.; Malluche, H.; Orth, M.; Meyer, R.; McCabe, L.R. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology*, v. 146(8), p. 3622–31, 2005.

Brown, J.P.; Josse, R.G. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ*, 167 Suppl, p. 1-34, 2002.

Canalis, E. Mechanism of glucocorticoid action in bone: Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 81, p. 3441-7, 1996.

Cassidy, J.T. Osteopenia and osteoporosis in children. *Clin Exp Rheumatol.*, v. 17, p. 245-50, 1999.

Chiba, H.; Uehara, M.; Wu, J.; Wang, X.; Masuyama, R.; Suzuki, K.; Kanazawa, K.; Ishimi, Y. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *Journal of Nutrition*, v. 33, n. 6, p. 1892-1897, 2003.

Clapauch, R.; Meirelles, R.M.R; Julião, M.A.S.G.; Loureiro, C.K.C.; Giarodoli, P.B.; Pinheiro, S.A; Harrigan, A.R.; Spritzer, P.M.; Pardini, D.P.; Weiss, R.V.; Athayde, A.; Russo, L.A; Póvoa, L.C. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.

Compston, J. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Horm. Res*, v. 60, p. 77–79, 2003.

Contran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. In: **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1251p, 2000.

Cumming, R.G.; Klineberg, R.J. Case-control study of risk factors for hip fractures in the elderly. **Am J Epidemiol**, v. 139, p. 493-503, 1994.

Cummings, S.R.; Nevitt, M.C.; Browner, W.S.; Stone, K.; Fox, K.M. Risk factors for hip fracture in white women: study of Osteoporotic Fractures Research Group. **N Engl J Med**, v. 332, p. 767-73, 1995.

Delmas, P.D. Bone marker nomenclature. **Bone**; 28:575, 2001.

Delmas, P.D.; Eastell, R.; Garnero, P.; Seibel, M.J.; Stepan, J. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. **Osteoporosis Int**, Suppl 6, p. 2-17, 2000.

De Roos, B.; Caslake, M.J.; Stalenhoef, A.F.H.; Bedford, D.; Demacker, P.N.M.; Katan, M.B. The coffee diterpene cafestol increases plasma triacylglycerol by increasing the production rate of large VLDL apolipoprotein B in healthy normolipidemic subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73, p.45-52, 2001.

Dixon, A.S.J. Health of the nation and osteoporosis. **Ann Rheum Dis.**, v. 51, p. 914-918, 1992.

Dourador, E. B. Osteoporose Senil. **Arq Brás Endocrinol Metab** vol 43, nº6, dezembro, 1999.

Duarte, A.T.; Carvalho, J.M. **Cunicultura. Livraria clássica**. Editora, 1ª edição, 413p 1979.

Eastell, R.; Reid, D.M.; Compston, J.; Cooper, C.; Fogelman, I.; Francis, R.M. An UK consensus group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. **J Intern Med**, v. 244, p. 271-92, 1998.

Ebeling Pr, Atley Lm, Guthrie Jr.; Burger, H.G.; Dennerstein, L.; Hopper, J.L.; Wark, J.D. Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, p. 3366 - 3371, 1996.

Einhorn, T.A. Enhancement of fracture-healing. **Journal Bone Joint Surgery**, v. 77, n. 6, p. 940-956, 1995.

Elkind-Hirsch, K. Effect of dietary phytoestrogens on hot flushes: can soy-based proteins substitute for traditional estrogen replacement therapy? **Menopause**, v. 8, p. 154-6, 2001.

Emim, J. A.; Oliveira, A. B.; Lapa, A. J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and coumestrol, in rats and mice. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 46, p. 118–122, 1994.

Esteves, E.A.; Monteiro, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Rev. Nutr., Campinas**, v.14(1), p. 43-52, jan./abr., 2001.

Fernandes, C.E.; Mello, R.; Wehba, S.; Machado, R.B. Osteoporose pós-menopáusia, 1996. Disponível em <http://menopausiaonline.com>. Acesso em 04/12/2007.

Fischbach, F.T. Manual de enfermagem: exames laboratoriais e diagnósticos – 7ª ed. Rio de Janeiro. **Ed. Guanabara Koogan**, 2005.

Focking, M.; Schmiegel, D.; Trapp, T. Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, p. 435–439, 2005.

Food and Nutrition Information Center. Dietary Reference Intakes: Elements. Disponível em: <http://www.iom.edu/Object.File/Master/7/294/0.pdf>. Acessado em 27/09/07.

Franco-Colin, M.; Tellez-Lopez, A. M.; Quevedo-Corona, L.; Racotta, L. Effects of longterm high-sucrose and dexamethasone on fat depots, liver fat, and lipid fuel fluxes through the retroperitoneal adipose tissue splanchnic area in rats. **Metabolism**, New York, v. 49, n. 10, p. 1289-1294, 2000.

Fujioka, M.; Uehara, M.; Wu, J.; Adlercreutz, H.; Suzuki, K.; Kanazawa, K.; Ken, T.; Yamada, K.; Ishimi, Y. Equol, a Metabolite of Daidzein, Inhibits Bone Loss in Ovariectomized Mice. **Journal of Nutrition**, v.134, p. 2623–2627, 2004.

Gallagher, J.C., Satpathy, R., Rafferty, K., Haynatzka, V. The effect of soy protein isolate on bone metabolism. **Menopause**, v. 11, p. 290–298, 2004.

Galsworthy, T.D.; Wilson PL: Osteoporosis. It steals more than bone. **Am J Nurs** 96: 27-33, 1996.

Gao, Y. H.; Yamaguchi, M. Anabolic effect of daidzein on cortical bone in tissue culture: comparison with genistein effect. **J. Bone Miner. Res.**, v. 1, p. 453, 1995.

Garcia-Moreno, C.; Catalan, M.P.; Ortiz, A.; Alvarez, L.; De la Piedra. C. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. **Bone**. v. 35, p. 170–7, 2004.

Garnero, P.; Delmas, P.D. Biochemical markers of bone turnover - Applications for Osteoporosis. **Endocrinol Metab Clin N Am**, v. 27, p. 303-23, 1998.

Girasole, G.; Jilka, R.I.; Passeri G. 17 $\beta$ -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblastic in-vitro: potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. **J Clin Invest**, 89:883, 1992.

Glantschnig, H., Fisher, J.E., Wesolowski, G., Rodan, G.A., Reszka, A.A. M-CSF, TNF $\alpha$  and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. **Cell Death Differ**, v. 10, p. 1165–1177, 2003.

Glazier, M.G.; Bowman, M.A. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. **Arch Intern Med** 161, p. 1161-72, 2001.

Gong, G.; Stern, H.S.; Cheng, S.C.; Fong, N.; Mordeson, J.; Deng, H.W.; Recker R.R. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. **Osteoporos. Int**, v. 9, p. 55–64, 1999.

Goodman, L.S.; Gilman, A.G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, p. 422- 424, 2003.

Greendale, G. A.; Fitzgerald, G.; Huang, M. H.; Sternfeld, B.; Gold, E.; Seeman, T.; Sherman, S.; Sowers, M. Dietary soy isoflavones and bone mineral density: results from the study of women's health across the nation. **Am. J. Epidemiol**, v. 155, p. 746–754, 2002.

Gregório, L.H.; LAcativa, P.G.S.; Melazzi, A.C.C.; Russo, L.A.T. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, nº 4, Agosto 2006.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9ª edição, editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 1997.

Hallberg, L., Rossander-Hultén, L., Brune M., Gleerup, A. Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, p.317-327, 1992 .

Hanley, D.A. Biochemical markers of bone turnover. In: Henderson JE, Goltzman D, editors. The osteoporosis primer. 1st ed. **Cambridge:University Press**, p. 239-52, 2000.

Happonen, P.; Voutilainen, S.; Salonen, J.T. Coffee drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. **J. Nutr.**, v.134, p.2381-2386, 2004.

Harris, S.S.; Dawson-Hughes, B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.60, n.4, p.573-578,1994.

Hasling, C.; Sondergaard, K.; Charles, P.; Mosekilde, L. Calcium metabolism in postmenopausal osteoporotic women is determined femoral neck. *J Nutr*, v. 122, p. 1119–26, 1992.

Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology Therapeutics*, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

Head, K.A. Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. *Alternative Medicine Review*, v. 4, n. 1, p. 10-22, 1999.

Heaney, R.P.; Recker, R.R. Determinants of endogenous fecal calcium in healthy women. *Journal of Bone Mineral Research*, v. 9, p. 1621–1627, 1994.

Heaney, R.P.; Recker, R.R. Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. *J Lab Clin Med*, v. 99, p. 46–55, 1982.

Hernandez-Avila, M.; Colditz, G.A.; Stampfer, M.J.; Rosner, B. Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-aged women. *Am J Clin Nutr*, v. 54, p. 157–63, 1991.

Hillard, T.C.; Stevenson, J.C. Role of estrogen in the development of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 49(suppl), p. 55-59, 1991.

Holm, K.; Dan, A.; Wilbur, J.; Li, S.; Walker, J. A longitudinal study of bone density in midlife women. *Health Care Women Int*, v. 23, p. 678-91, 2002.

Horcajada-Molteni, M.N.; Crespy, V.; Coxam, V.; Davicco, M.J.; Remesy, C.; Barlet, J.P. Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. *J. Bone Miner. Res.*, v. 15, p. 2251–2258, 2000.

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. **Proc Natl Acad Sci USA**. 96, 3540–5, 1999.

Ishimi, Y.; Miyaura, C.; Ohmura, M.; Onoe, Y.; Sato, T.; Uchiyama, Y.; Ito, M.; Wang, X.; Suda, T.; Ikegami, S. Selective effect of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. **Endocrinology**, v. 140, p. 1893-1900, 1999.

Jerome, C.P.; Johnson, C.S.; Vafai, H.T.; Kaplan, K.C.; Bailey, J.; Capwell, B. Effect of treatment for 6 months with human parathyroid hormone (1-34) peptide in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Bone**, v. 25, p. 301-9, 1999.

Jochum, W.; David, J.P.; Elliott, C.; Wutz, A.; Plenk Jr., H.; Matsuo, K.; Wagner, E.F. Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. **Nat. Med.** v. 6, p. 980– 984, 2000.

Johansson C, Mellstrom D, Lerner U, Osterberg T. Coffee ing: a minor risk factor for bone loss and fractures. **Age Ageing**, v. 21:20–6, 1992.

Kanis, J.A.; Melton, L.J.; Christiansen, C. The diagnosis of osteoporosis. **J Bone Min Res**, v. 9, p. 1137-41, 1994.

Katagiri, T., Takahashi, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Dis**. v. 8, p. 147–159, 2002.

Kelly, K.A.; Tanaka, S.; Baron, R.; Gimble, J.M. Murine bone marrow stromally derived BMS2 adipocytes support differentiation and function of osteoclast-like cells in vitro. **Endocrinology**; v. 139, p. 2092–101, 1998.

Key, L. L.; Wolf, W. C.; Gundberg, C. M.; Ries, W. L. Superoxide and bone resorption. **Bone**, v. 15, p. 431–436, 1994.

Khoury, M.J. Genetic and Epidemiological Approaches to the Search for Gene-Environment Interaction: the Case of Osteoporosis. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.147, p.1-2, 1998.

Kiel DP, Felson DT, Hannan MT, Anderson JJ, Wilson PW. caffeine and the risk of hip fracture: the Framingham Study. **Am J Epidemiol**, v. 132, p. 675–84, 1990.

Koes, R. E.; Quattrocchio, F.; Mol, J. N. M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **Bioessays**, v. 16 (12), p. 123-132, 1994.

Kuiper, G. G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . **Endocrinology**, v. 138, p. 863-870, 1997.

Kuiper, G. G.; Lemmen, J. G.; Carlsson, B.; Corton, J. C.; Safe, S. H.; van der Saag, P. T.; van der Burg, B.; Gustafsson, J. A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor. **Endocrinology**, v. 135, p. 4252–4263, 1998.

Kwan, S.T.; Padrines, M.; Theoleyre, S.; Heymann, D.; Fortun, Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 15, p. 49–60, 2004.

Lee, A.J.; Hodges, J.S.; Eastell, R. Measurement of osteocalcin. **Am Clin Biochem**, v. 37, p. 432-46, 2000.

Lee, Y.B.; Lee, H.J.; Kim, K.S.; Lee, J.Y.; Nam, S.Y.; Cheon, S.H.; Sohn, H.S. Evaluation of the preventive effect of isoflavona extract on bone loss in ovariectomized rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 68, n. 5, p. 1040-1045, 2004.

Leite, M.O.R. Tratamento da Osteoporose Pós-Menopansa. **Arq Bras. Endocrinol. Matab.**, v. 43, n°6, dezembro, 1999.

Li, B.; Yu, S. Genistein Prevents Bone Resorption Diseases by Inhibiting Bone Resorption and Stimulating Bone Formation. **Biol. Pharm. Bull.** .v. 26, n. 6, p. 780-786, 2003.

Lopes. R. M., Oliveira, T. T., Nagem, T. J., Pinto, A. S. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **R. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. São Paulo, n.17, p. 18-22, nov/dez. 2000.

Lorenzi, T.F. **Manual de Hematologia. Propedêutica e clínica**. 3ª edição, Editora Médica Científica, São Paulo, 2003.

Lukert, B.P. Glucocorticoid and drugs-induced osteoporosis. In: Favus MJ, editor. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, p. 278-82, 1996.

Manolagas, S.C.; Weinstein, R.S. New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v. 14, p. 1061-6, 1999.

Mei, J.; Yeung, S. S.; Kung, A. W. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 86, p. 5217–5221, 2001.

Melton, L.I.; Riggs, B.I. Epidemiología de las fracturas relacionadas con la edad. In: AVIOLI LV. (ed) El síndrome osteoporótico. Detección, Prevención y Tratamiento. **Madrid. Ediciones CEA**, p.1, 1989.

Mennen, L.I. De Courcy, G.P. Guillard, J.C.; Ducros, V.; Bertrais, S.; Nicolas, J.P.; Maurel, M.; Zarebska, M.; Favier, A.; Franchisseur, C.; Hercberg, S.;

Galan, P. Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 1279 – 1289, 2002.

Meyer, H.E.; Pedersen, J.I.; Loken, E.B.; Tverdal, A. Dietary factors and the incidence of hip fracture in middle-aged Norwegians: a prospective study. **Am J Epidemiol**, v.145, p. 117–23, 1997.

Middleton, E. Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, Issue 4, p. 673-751, 2000.

Molteni, A.; Brizio-Molteni, L.; Persky, V. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, p.751-756, Supplement 3, 1995.

Moreira, C. O uso dos fitoestrogênios em ginecologia: evidências para o emprego clínico dos fitoestrogênios na prevenção e no tratamento da osteoporose da mulher pós-menopausada. **Boletim da Sociedade de Reumatologia do Rio de Janeiro**, v. 32, n. 112, p. 9-13, 2004.

Motta, V.T. **Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 419p., 2003.

Mundy, G.; Garrett, R.; Harris, S.; Chan, J.; Chen, D.; Rossini, G.; Boyce, B.; Zhao, M.; Gutierrez, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, 286, p. 1946–1949, 1999.

Muscuietti, L. V.; Martino, V. S. Atividades Biológicas dos Flavonóides Naturais. In: Yunes, R.A.; Filho, V. C., **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Ed. Univale, 1ª edição, 2007.

Nahás, E.A.P.; Neto, J.N.; De Luca, L.A.; Traiman, P.; Pontes, A.; Dalben, I. Efeitos da isoflavona sobre os sintomas climatéricos e o perfil lipídico na mulher

em menopausa. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** vol.25 no.5 Rio de Janeiro June 2003.

NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake, Optimal calcium intake. **JAMA** 272:1942, 1994.

Notoyaa, M.; Tsukamotoa, Yu.; Nishimurab, H.; Wooc, Je-Tae.; Nagaic, K.; Leed, I.S.; Hagiwaraa, H. Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. **European Journal of Pharmacology.** 485, p. 89– 96, 2004.

Nuttall, M.E.; Gimble, J.M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. **Curr Opin Pharmacol;** v. 4(3), p. 290–4, 2004.

Ohta, A.; Uehara, M.; Sakai, K.; Takasaki, M.; Adlercreutz, H.; Morohashi, T.; Ishimi, Y. A combination of dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized mice. **J. Nutr.**, v. 132, p. 2048–2054, 2002.

Ohta, M.; Cheuk, G.; Thomas, K.A.; Kamagata-K, Y.; Wink, C.S.; Yazdani, M.; Falster, A.J.; Simmons, W.B.; Nakamoto, T. Effects of caffeine on the bones of aged, ovariectomized rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 43, p. 52–59, 1999.

Ohta, M.; Ide, K.; Cheuk, G.; Cheuk, S.L.; Yazdani, M.; Nakamoto, T.; Thomas K.A. A caffeine diet can alter the mechanical properties of the bones of young ovariectomized rats. **Ann. Nutr. Metab**, v. 46, p. 108–113, 2002.

Oliveira, T.T.; Gomes, S.M.; Nagem, T.J.; Costa, N.M.B.; Secom, P.R. Efeito de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos. **Rev. Nutr.** v.15 n.1 Campinas ene. 2002.

Pang, J.L.; Ricupero, D.A.; Huang, S.; Fatma, N.; Singh, D.P.; Romero, J.R. Chattopadhyay N. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. ***B i ochemical Pharmacology***, v. 71, p. 8 18 – 8 26, 2006.

Pardini, D. Terapêutica de reposição hormonal na osteoporose da pós menopausa. ***Arq Bras Endocrinol Metab.***, vol.43 no.6 São Paulo Dec. 1999.

Parfitt, A.M. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. ***J Cell Biochem***; 55, p. 273-86, 1994.

Parfitt, A.M. The cellular basis of bone remodeling. ***Calcif Tissue Int***, 36(suppl):537, 1984.

Phan, T.T.; See, P.; Tran, E.; Nguyen, T.T.T.; Chan, S.Y.; Lee, S.T.; Huynh, H. Suppression of insulin-like growth factor signaling pathway and collagen expression in keloid-derived fibroblasts by quercetin: its therapeutic potential use in the treatment and/or prevention of keloids. ***Br. J. Dermatol.*** 148, p. 544–552, 2003.

Pietta, P. G. “**Proceedings 2<sup>a</sup> International Conference on Natural Antioxidants and Anticarcionogens**”, Helsinki, 137, 1999.

Pinto, A.S. Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona, isoladamente e em associação, na osteoporose induzida com dexametasona. 2004. 54f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - ***Universidade Federal de Viçosa, Viçosa***, MG, 2004.

Post, S.M.; Ross, B.; Vermeulen, M.; Afman, L.; Jong, M.C.; Dahlmans, V.E.H.; Havekes, L.M.; Stellaard, F.; Katan, M.B.; Princen, H.M.G. Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E\*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis. ***Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***, v. 20, p. 1551-1556, 2000.

Pottratz, S.T.; Bellido, T.; Mocharla, H.; Crabb, D.; Manologas, S.C. 17 $\beta$ -estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. **J Clin Invest**, 93:994,1999.

Radominski, S.C.; Pinto-Neto, A.M.; Marinho, R.M. Osteoporose pós-menopausa: Diretrizes da Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. [on line] 2002. Disponível em: [http:// www.org.br/](http://www.org.br/).

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.470-478, 2003.

Rapuri, P.B.; Gallagher, J.C.; Kinyamu, H.K.; Ryschon, K.L. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderlywomen and interacts with vitamin D receptor genotypes. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 74, p. 694–700, 2001.

Rapuri, P.B.; Gallagher, J.C.; Nawaz, Z. Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH) $_2$ D $_3$  stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 103, p. 368–371, 2007.

Riggs, B.L. Pathogenesis of osteoporosis. **Am J Obstet Gynecol**, 156(5): 1342, 1987.

Riggs, B.L.; Melton, L.J. Involutional osteoporosis. **N Engl J Med**, 314, p. 676-86, 1986.

Riggs, B.L.; Melton, L.J. The worldwide problem of osteoporosis: Insights afforded by epidemiology. **Bone**, v. 17(5 suppl.), p. 505-11, 1995.

Rosen, H.N.; Dresner-Pollak, R., Moses, A.C.; Et Al. Specificity of urinary excretion of cross- linked N-telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover. **Calcif Tissue Int** , 54, p. 26 - 29, 1994.

Rosengren, A.; Dotevall, A.; Wilhelmsen, L.; Thelle, D.; Johansson, S. Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up study. **J Intern Med**, v. 255, p. 89-95, 2004.

Russell, R.G.G. Cellular regulatory mechanisms that may underlie the effects of corticosteroids on bone. **Br J Rheumatol**, v. 32(suppl 2), p. 6-10, 1993.

Russo, L.A.T. Osteoporose Pós-Menopausa: Opções Terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 45/4, p. 401-406, 2001.

Sabatakos, G.; Sims, N.A.; Chen, J.; Aoki, K.; Kelz, M.B.; Amling, M.; Bouali, Y.; Mukhopadhyay, K.; Ford, K.; Nestler, E.J.; Baron, R. Overexpression of DFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. **Nat. Med.** v. 6, p. 985– 990, 2000.

Sakamoto, W.; Nishihira, J.; Fujie, K.; Iizuka, T.; Handa, H.; Ozaki, M.; Yukawa, S. Effect of coffee consumption on bone metabolism. **Bone**, v. 28, p. 332–336, 2001.

Santos, C.L.; Rafacho, A.; Bosqueiro, J.R. Efeitos da administração de dexametasona *in vivo* sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 101-110, July./Sept. 2007.

Saraiva, G. L., Lazaretti-Castro, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 46/1, p. 72-78, 2002.

Sathyamoorthy, N.; Wang, T. T. Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. **Eur. J. Cancer**, v. 33, p. 2384–2389, 1997.

Seeman, E. Osteoporosis: trials and tribulations. In: Advances in the epidemiology, prevention, and treatment of osteoporosis and fractures. **Am J Med**, 103, p. 74-89, 1997.

Setchell, K. D.; Brown, N. M.; Lydeking-Olsen, E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **J. Nutr.**, v. 132, p. 3577–3584, 2002.

Shafer, S.H.; Phelps, S.H.; Williams, C.L. Reduced DNA synthesis and cell viability in small cell lung carcinoma by treatment with cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors. **Biochem. Pharmacol**, v. 56, p. 1229–1236, 1998.

Silva, J.L.; Silva, R.P.; Jorge, R.M.; Silva, F.R.D.; Filho, S.A.; Fonseca, A. P.N.D. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss Celastraceae. **Rev. Bras. Farmacognosia**. 15(1):30-35, 2004.

Silva, R. R. Alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e flavonóides na osteoporose induzida por glico-corticóide Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola)-**Universidade Federal de Viçosa, Viçosa**, MG, 2006.

Slavin, B. G.; Ong, J. M.; Kern, P. A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 35, n. 9, p. 1535-1541, 1994.

Smith, E.; Hill, R.L.; Lehman, I.R.; Lefkowitz, R.J.; Handler, P.; White, A. **Bioquímica Mamíferos**, ed: Guanabara, sétima edição, Rio de Janeiro, RJ, 1988.

Son, Y.O.; Kook, S.H.; Choi, K.C.; Jang, Y.S.; Choi, Y.M. Quercetin accelerates TNF- $\alpha$ -induced apoptosis of MC3T3-E1 osteoblastic cells through caspase-dependent and JNK mediated pathways, **European Journal of Pharmacology**, 2007.

Son, Y.O.; Kook, S.H.; Choi, K.C.; Jang, Y.S.; Jeon, Y.M.; Kim, J.G.; Lee, K.Y.; Kim, J.; Chung, M.S.; Chung, G.H.; Lee, J.C. Quercetin, a bioflavonoid,

accelerates TNF-alpha-induced growth inhibition and apoptosis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. **Eur. J. Pharmacol.** 529, p. 24–32, 2006a.

Speer, K.; Tewis, R.; Maontag, A. 16-O-Methylcafestol - ein neues Diterpen im Kaffee - Entdeckung und Identifizierung. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 192, p. 451 – 454, 1991.

Stevenson, J.C.; Hyllyard, C.I.; Macintyre, I. Calcitonin and the calcium regulating hormones in postmenopausal women. **Lancet**, i:965,1981.

Suda, T.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; IIMI, E.; Gillespie, M.T.; Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endocrinol Rev**, v. 20, p. 345–7, 1999.

Suh, K.S., Koh, G., Park, C.Y., Woo, J.T., Kim, S.W., Kim, J.W., Park, I.K., Kim, Y.S. Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. **Phytochemistry**, v. 63, p. 209–215, 2003.

Takayanagi, H.; Sato, K.; Takaoka, A.; Taniguchi, T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. **Immunol Rev**, v. 208, p. 181-93, 2005.

Tassinari, M.S.; Gerstenfeld, L.C.; Stein, G.S.; Lian, J.B. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. **J. Bone Miner. Res.**, n. 6, p. 1029–1036, 1991.

Tavani, A.; Negri, E.; La Vecchia, C. Coffee intake and risk of hip fracture in women in northern Italy. **Prev Med**, v. 24, p. 396–400, 1995.

Thelle, D.S.; Arnesen, E.; Forde, O.H. The Tromso heart study. Does coffee raise serum cholesterol? **N. Engl. J. Med.**, v.308, n.24, p. 1454-1457, 1983.

Thomas, T.; Gori, F.; Spelsberg, T.C.; Khosla, S.; Riggs, B.L.; Conover, C.A. Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. **Endocrinology**. v. 140, p. 5036–5044, 1999.

Torgenton, D.J.; Bell-Syer, S.E. Hormone replacement therapy and prevention of nonvertebral fractures: a meta-analysis of randozimed trials. **JAMA**, 285, p. 2891-7, 2001.

Torres, R.; Marcelino, C.; Vieira, L.; Bandeira, F. Prevalência de osteoporose em 1441 mulheres encaminhadas para determinação da densidade óssea. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.42, p.182, 1998.

Uehara, M.; Ohta, A.; Sakai, K.; Suzuki, K.; Watanabe, S.; Adlercreutz, H. Dietary fructooligosaccharides modify intestinal bioavailability of a single dose of genistein and daidzein and affect their urinary excretion and kinetics in blood of rats. **J. Nutr.**, v. 131, p. 787–795, 2001.

Urgert, R.; Katan, M.B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annu Rev Nutr** ;17, p.305–24, 1997.

van Dam, R.M.,; Feskens, E.J. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v. 360, p. 1477- 1488, 2002.

van Dam, R.M. Coffee and type 2 diabetes: From beans to beta-cells. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.16, p. 69 - 77, 2006.

van Dam, R.M.; Hu, F.B. Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes. **JAMA**, v. 294, No. 1, 2005.

Vandersluis, I.M.; Muinck Keizer-Schrama, S.M.P.F. Osteoporosis in childhood: bone density in children in health and disease. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 14, p. 817-32, 2001.

Vargas, D.M.; Audi, L.; Carrascosa. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 367-370, 1997.

Verrastro, T.; Lorenzi, T.F.; Neto, S.W. **Hematologia e Hemoterapia – Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica**, São Paulo, ed. Atheneu, 1ª edição, 303p, 2005.

Vieira, J.G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 43, p. 415-22, 1999.

Wang, B.; Jenkins, J.R.; Trayhurn, P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF-alpha. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288(4),p. 731–40, 2005.

Weaver, C.M.; Proulx, W.R.; Heaney, R. Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.70, p.543-548, 1999.

Weinstein, R.S.; Jilka, R.L.; Parfitt, A.M.; Manolagas, S.C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. **J. Clin. Invest**, v. 102, p. 274–282, 1998.

WHO study group: Assesment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series 843, Geneva, **World Health Organization**, p.121-129, 1994.

Williams, J.P.; Jordan, S.E.; Barnes, S. Tyrosine kinase inhibitor effects on osteoclastic acid transport. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.68, n.6, p.1369-1374, Supplement, 1998.

Woo, J.T., Nakagawa, H., Notoya, M., Yonezawa, T., Udagawa, N., Lee, I.S., Ohnishi, M., Hagiwara, H., Nagai, K. Quercetin suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation and activation of osteoclasts. ***Biol. Pharm. Bull***, v. 27, p. 504–509, 2004.

Wood, R.J.; Fleet, J.C. The genetics of osteoporosis: vitamin D receptor polymorphisms. ***Annu. Rev. Nutr.***, v. 18, p. 233–258, 1998.

Yasuda, H.; Shima, N.; Nakagawa, N. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998.

Yuen, K.C.; Kendler, D.; Khan, A.; Brown, J.; Fortier, M. Osteoporosis: In “Osteoporosis”. ***The Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada***. p.31-41, 2000/2001.

Zhang, D.W.; Cheng, Y.; Wang, N.L.; Zhang, J.C.; Yang, M.S.; Yao X.S. Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblast. ***Phytomedicine***, 2007.

Zhao, G.; Monier-Faugere, M.C.; Langub, M.C.; Geng, Z.; Nakayama, T.; Pike, J.W.; Chernausk, S.D.; Rosen, C.J.; Donahue, L.R.; Malluche, H.H.; Fagin, J.A.; Clemens, T.L. Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. ***Endocrinology***. v. 141, p. 2674– 2682, 2000.

Ziger, F.; Zago, R.J.; Huelen, M.; Silva, M.B.; Skare, T. L. Catarata em corticoterapia sistêmica: prevalência e relação com tempo e dose cumulativa de glicocorticóides ***Arq Bras Oftalmol***, v. 66, p. 153-5, 2003.

Zmuda, J.M.; Cauley, J.A.; Ferrell, R.E. Vitamin D receptor Gene Variants and Osteoporosis. ***Epidemiologic Reviews***, Baltimore, v.22, n.2, p.203-217, 2000.

Zuanazzi, J. A. S. Flavonóides. **In Farmacognosia – da planta ao medicamento.** Simões, CM. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, JC. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. Porto Alegre/ Florianópolis:Ed. da UFRGS/Ed. Da UFSC, 4<sup>a</sup> edição, pág. 499-526, 2002.