

**CÍNTIA RABELO E PAIVA CARIA**

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CAFÉ CAFEINADO E  
DESCAFEINADO NAS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS E  
DO TECIDO ADIPOSEO ASSOCIADAS À OBESIDADE”**

**Bragança Paulista**

**2013**

**CÍNTIA RABELO E PAIVA CARIA**

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CAFÉ CAFEINADO E  
DESCAFEINADO NAS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS E  
DO TECIDO ADIPOSEO ASSOCIADAS À OBESIDADE”**

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alessandra Gambero**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Bragança Paulista**

**2013**

WD 210 C275a Caria, Cíntia Rabelo e Paiva.  
Avaliação dos efeitos do café cafeinado e descafeinado nas alterações hepáticas e do tecido adiposo associadas à obesidade / Cíntia Rabelo e Paiva Caria. -- Bragança Paulista, 2013.  
68 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.  
Orientação de: Alessandra Gambero.

1. Café. 2. Obesidade. 3. Adipocinas. 4. Esteatose. 5. Adipogênese. I. Gambero, Alessandra. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

**CARIA R. P.**, Cíntia, “Avaliação dos efeitos do café cafeinado e descafeinado nas alterações hepáticas e do tecido adiposo associados à obesidade”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e sete de Fevereiro de 2013 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



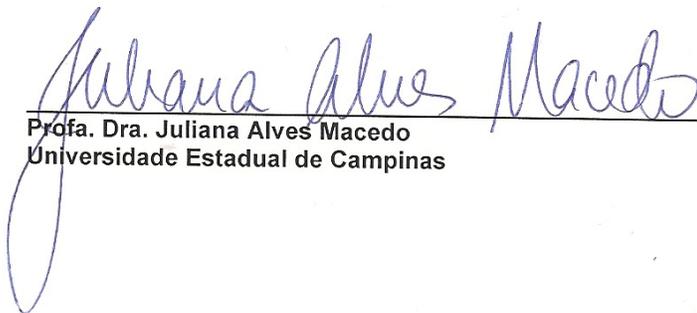
---

**Profa. Dra. Alessandra Gambero**  
Universidade São Francisco



---

**Profa. Dra. Patricia de Oliveira Carvalho**  
Universidade São Francisco



---

**Profa. Dra. Juliana Alves Macedo**  
Universidade Estadual de Campinas

“À minha família, que me propiciaram uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível. E ao meu esposo, que tem lutado pra tornar nossos sonhos e projetos em realizações”.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pelas oportunidades concedidas.

À minha orientadora Dra. Alessandra Gambero pela oportunidade, orientação, compreensão, amizade, confiança e todos os ensinamentos transmitidos.

À todos educadores do programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da USF, especialmente à Dra. Thalita Rocha e Dr. Marcelo Lima Ribeiro, com os quais muito pude aprender e obter elementos para esta dissertação.

Aos educadores Dr. Carlos e Dr. Mário por terem me aceitado no Programa de Estágio Docente (PED) na disciplina de Farmacologia.

À Dra. Juliana Macedo, que com tanta presteza colaborou para esta pesquisa.

As secretárias Vilma e Rita, pelo auxílio nas questões administrativas.

Aos companheiros de laboratório, especialmente Carol, Érica e Simone, por tudo que me ensinaram, pela paciência, atenção e pelos momentos de descontração. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

Aos colegas de classe, especialmente a Juliana Papini, com quem convivi com muita alegria além dos momentos de sala.

Aos meus pais, Eosman e Santina, que de forma especial e carinhosa sempre me apoiaram e me deram força para realizar meus sonhos.

Ao meu esposo, Muller, por todo amor, carinho, paciência e compreensão que tem me dedicado.

À toda minha família e aos amigos de longa data, que mesmo em momentos difíceis, sempre estiveram presentes em minha vida.

À Universidade São Francisco, ao departamento da UNIFAG e ao Biotério, onde encontrei um ambiente acolhedor e com ótima infra-estrutura.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma sempre manifestaram o seu apoio, encorajamento e disponibilidade, contribuindo para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.

“Posso todas as coisas em Cristo que me fortalece”

Filipenses, 4:13

## RESUMO

O café é uma das bebidas mais consumidas no Brasil e no mundo. O fato de ser uma bebida tão popular, aliado à sua importância econômica, explica o interesse por estudos sobre o café, desde a sua composição até seus efeitos na saúde humana. Assim, foram avaliados os efeitos do café cafeinado e descafeinado em alterações metabólicas e inflamatórias associadas à obesidade utilizando modelo de camundongos e dieta hiperlipídica. Extratos de café cafeinado e descafeinado, bem como os compostos fenólicos presentes no café, ácido cafeico e ferúlico foram utilizadas em ensaios *in vitro* com 3T3-L1. Foram utilizados camundongos Swiss mantidos em ração comercial ou dieta hiperlipídica por 8 semanas e divididos em grupos com intervenção de café cafeinado e descafeinado por 2 ou 8 semanas adicionais. Peso corporal, ingestão de ração, níveis glicêmicos e teste de tolerância a insulina (ITT) foram avaliados. Estoques de tecido adiposo e de fígado foram dissecados e biópsias utilizadas para análise da expressão protéica de iNOS por Western blot e da produção de adipocinas por ELISA. Análises histológicas foram realizadas em cortes corados com hematoxilina-eosina. A ação do ácido cafeico e ácido ferúlico, bem como dos extratos de café cafeinado e descafeinado foram avaliadas pelo ensaio de Oil-red em culturas de células 3T3-L1. Não houve redução do peso corpóreo, da ingestão de ração ou de adiposidade nos animais após a intervenção com café. Por outro lado, os níveis glicêmicos estavam reduzidos e a sensibilidade à insulina estava aumentada no grupo que recebeu café cafeinado por 2 semanas adicionais, coincidindo com o aumento de adiponectina no tecido adiposo. No fígado houve melhora de esteatose hepática e redução da iNOS para o café descafeinado no protocolo de 2 semanas adicionais, e para o café cafeinado em ambos protocolos experimentais. *In vitro*, a adipogênese estava aumentada em células 3T3-L1 tratadas com o ácido cafeico, o café cafeinado e descafeinado. Desta forma, podemos sugerir que o consumo de café pode auxiliar de forma positiva reduzindo as alterações inflamatórias associadas a obesidade e melhorando a sensibilidade à insulina quando ingerido por curto período em fase intermediária do estabelecimento da obesidade.

**Palavras-chave:** Café, obesidade, adipocinas, esteatose e adipogênese.

## **ABSTRACT**

Coffee is one of the most consumed beverage in the world, including Brazil. The fact that coffee is one the most popular and consumed beverages in worldwide explain the interest for studies of its composition and effects on human health. Thus, we evaluated the effects of caffeinated and decaffeinated coffee in metabolic and inflammatory alterations associated to obesity using a model of diet induced obesity in mice. Coffee caffeinated and decaffeinated extracts, as well as, caffeic and ferulic acid was assayed in vitro using adipocytes. Swiss mice were feed with commercial chow (CN) or high fat diet (HFD) during 8 weeks and grouped for receiving caffeinated or decaffeinated coffee for 2 or 8 additional weeks. Body weight, food and drink intake, glucose levels and insulin tolerance test (ITT) were evaluated. Depots of adipose tissue and liver biopsies were dissected and used for protein expression in the iNOS by Western blot and adipocytokines by ELISA analysis. Histological analyses in sample liver were carried out using slides stained with hematoxylin-eosin. The action of caffeic and ferulic acid, as well as extracts of caffeinated and decaffeinated coffee were evaluated in adipogenesis assay (Oil-red assay) using cell cultures of 3T3-L1. There was no reduction in body weight, food intake and adiposity in animals after intervention with coffee. But glucose levels were reduced and insulin sensitivity was increased in the group receiving caffeinated coffee for two additional weeks, which coincided with the increase in adiponectin in the adipose tissue. In the liver there was an improvement of hepatic steatosis and reduction of iNOS expression in the decaffeinated coffee during 2 additional weeks, and the caffeinated coffee in both experimental protocols. *In vitro*, adipogenesis was increased in 3T3-L1 cells treated with caffeic acid, caffeinated and decaffeinated coffee. Thus, we suggest that coffee consumption may help positively by reducing inflammatory alterations associated with obesity and by improving insulin sensitivity when ingested by short time in intermediate phase of obesity establishment.

**Key-words:** Coffee, obesity, adipocytokines, steatosis and adipogenesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AKT - Proteína serina

BSA - Albumina bovina sérica (*Bovine Serum Albumin*)

DH - Dieta Hiperlipídica

DMEM - Meio modificado Dulbecco Eagle (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DP - Dieta Padrão

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA - Imunoensaio enzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

EPM - Erro padrão da média

GMPc - Monofosfato de guanosina cíclico

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

IBMX - 3-isobutyl-1-methylxanthine

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IMC - Índice de massa corporal

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida (*Inductible Nitric Oxide Synthase*)

IRS-1 - Substrato 1 do receptor de insulina

ITT - Teste de tolerância a insulina

Kitt - Constante de Inclinação da Curva obtida com o teste de tolerância à insulina

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LPS - Lipopolissacarídeo

NPY - Neuropeptídeo Y

NAFLD - Doença não-alcoólica do fígado gorduroso (*Nonalcoholic fatty liver disease*)

NF-kappaB - Fator de transcrição nuclear kB (*Nuclear factor kappa B*)

PBS - Tampão salina-fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio  
(*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*

Th1 - *T helper 1*

Th2 - *T helper 2*

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

Tris - Tris(hidroximetil)-aminometano

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Composição de macronutrientes da dieta

**Tabela 2:** Efeito do ácido cafeico, ácido ferúlico e dos extratos brutos de café cafeinado e descafeinado sobre a viabilidade celular utilizando ensaio de MTT.

**Tabela 3:** Diferenciação dos adipócitos na presença do ácido cafeico, ácido ferúlico, e dos extratos brutos de café cafeinado e descafeinado pelo ensaio de OilRed

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Divisão dos animais nos grupos experimentais de 2 e 8 semanas.

**Figura 2:** Teor de cafeína presente no controle, no café cafeinado e no café descafeinado.

**Figura 3:** Teor de ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ferúlico e cafeico) presentes no controle, no café cafeinado e descafeinado.

**Figura 4:** Peso corpóreo dos animais durante a vigência da dieta hiperlipídica.

**Figura 5:** Peso corpóreo dos animais durante a vigência da dieta hiperlipídica no protocolo de 2 semanas.

**Figura 6:** Peso corpóreo dos animais durante a vigência da dieta hiperlipídica no protocolo de 8 semanas.

**Figura 7:** Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal

**Figura 8:** Controle de ingestão de dieta dos animais

**Figura 9:** Controle de ingestão de bebidas dos animais

**Figura 10:** Níveis glicêmicos dos animais

**Figura 11:** Teste de tolerância à insulina

**Figura 12:** Adiponectina no tecido adiposo

**Figura 13:** IL-10 no tecido adiposo

**Figura 14:** Leptina no tecido adiposo

**Figura 15:** TNF- $\alpha$  no tecido

**Figura 16:** Amostras de fígado no protocolo de 2 semanas

**Figura 17:** Amostras de fígado no protocolo de 8 semanas

**Figura 18:** Análise estatística da morfologia do fígado (144 pontos)

**Figura 19:** IL-10 no fígado no protocolo de 2 semanas

**Figura 20:** TNF- $\alpha$  no fígado

**Figura 21:** Expressão da proteína iNOS no fígado dos animais no protocolo de 2 semanas

**Figura 22:** Expressão da proteína iNOS no fígado dos animais no protocolo de 8 semanas

## SUMÁRIO

### 1. INTRODUÇÃO

1.1 Sobrepeso e obesidade	01
1.2 Síndrome metabólica	02
1.3 O tecido adiposo e as adipocinas	03
1.4 Marcadores de inflamação hepática	04
1.5 Os antioxidantes	05
1.6 O consumo e a composição química do café	07
1.7 Propriedades funcionais do café	09

### 2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Métodos Analíticos	14
3.1.1 Preparação do café	14
3.1.2 Avaliação da presença de cafeína nos extratos de café	14
3.1.3 Perfil fenólico dos extratos de café	15
3.2 Ensaios <i>in vivo</i>	15
3.2.1 Modelo de Obesidade – Animais	15
3.2.2 Obesidade induzida por dieta e intervenção dos animais	16
3.2.3 Glicemia basal e Teste de tolerância à Insulina (ITT)	17
3.2.4 Sacrifício dos animais e coleta de materiais	18
3.2.5 Análise histológica de esteatose hepática	18
3.2.6 Quantificação de mediadores inflamatórios	18
3.3 Ensaios <i>in vitro</i>	19
3.3.1 Culturas celulares	19
3.3.2 Ensaios de diferenciação de adipócitos	20
3.3.3 Ensaio de Citotoxicidade	20
3.4 Análise Estatística	20

## **4. RESULTADOS**

4.1 Análise cromatográfica de cafeína em café solúvel cafeinado e descafeinado	21
4.2 Análise cromatográfica de ácidos fenólicos em café solúvel cafeinado e descafeinado	21
4.3 Determinação do peso corpóreo	24
4.4 Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal	24
4.5 Controle de ingesta de alimento	28
4.6 Controle de ingesta de bebidas	28
4.7 Níveis glicêmicos	30
4.8 Teste de tolerância à insulina	30
4.9 Avaliação da produção de adipocinas antiinflamatórias no tecido adiposo	32
4.10 Avaliação da produção de adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo	34
4.11 Análise histológica da morfologia do fígado	36
4.12 Avaliação da produção de citocinas (IL-10 e TNF- $\alpha$ ) no fígado	39
4.13 Avaliação da expressão de iNOS no fígado	41
4.14 Avaliação da citotoxicidade do ácido cafeico, ácido ferúlico, e dos extratos brutos de café cafeinado e descafeinado	44
4.15 Determinação da diferenciação e lipólise basal em adipócitos isolados	44
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>56</b>
<b>8. ANEXO</b>	<b>68</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Sobrepeso e Obesidade

O sobrepeso e a obesidade são problemas de saúde que estão aumentando de importância em todo o mundo (da Costa *et al.*, 2012; Sikorski *et al.*, 2012), e alcançando proporções epidêmicas em algumas nações (Rang e Dale, 2011), incluindo países desenvolvidos e subdesenvolvidos, tanto em crianças quanto em adultos de qualquer classe econômica. De acordo com o relatório de Estatísticas Mundiais de Saúde 2012, da Organização Mundial de Saúde, a obesidade é a causa de morte de 2,8 milhões de pessoas por ano. No continente americano 26% dos adultos são obesos, sendo a região com maior incidência do problema. Baseado em dados de 194 países, o departamento de estatísticas da Organização Mundial de Saúde afirma que em todas as regiões do mundo a obesidade duplicou entre 1980 e 2008 (Abeso, 2012). No Brasil o excesso de peso e a obesidade aumentaram nos últimos seis anos, é o que aponta o mais recente levantamento realizado pelo Ministério da Saúde. Segundo o estudo, a proporção de pessoas acima do peso no Brasil avançou de 42,7%, em 2006, para 48,5%, em 2011. No mesmo período, o percentual de obesos subiu de 11,4% para 15,8% (Vigitel, 2012).

A inflamação crônica que se estabelece com a obesidade é um fator chave no desenvolvimento de desordens metabólicas (Munkonda *et al.*, 2012) tais como resistência a insulina, diabetes tipo 2 (Machado *et al.*, 2011; Ghorbani *et al.*, 2012; Munkonda *et al.*, 2012; Telford *et al.*, 2012), doenças cardiovasculares (Lubrano *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2012), hipertensão, (Mariappan *et al.*, 2012; Viguerie *et al.*, 2012), incluindo até algumas formas de câncer (Francischi e Lancha-Junior, 2003; da Costa *et al.*, 2012; Giri *et al.*, 2012), entre outros. Queiroz *et al.* (2009) destacaram que a consequência do desequilíbrio energético pode ser decorrente do aumento na ingestão calórica somado a inatividade física e ao declínio concomitante do gasto energético. O seu envolvimento em processos como obesidade, diabetes melito tipo 2, hipertensão arterial, arteriosclerose, dislipidemias, processos inflamatórios

agudos e crônicos, entre outros, indicam que a compreensão das suas propriedades funcionais contribuirá para melhorar o prognóstico daquelas doenças, cuja prevalência vem crescendo de forma preocupante (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006).

Viguerie *et al.* (2012) concluíram que sobrepeso e obesidade como um acúmulo excessivo ou anormal de gordura que apresenta um risco para a saúde. A gordura corporal representa energia armazenada, e o excesso de gordura ocorre quando os mecanismos homeostáticos que controlam o balanço calórico apresentam alterações ou são suplantados. Portanto, o sobrepeso e a obesidade estão associados à combinação do estilo de vida sedentário, suscetibilidade genética, influências culturais e acesso irrestrito a amplo suprimento de alimentos altamente calóricos (Rang e Dale, 2011).

## **1.2 Síndrome metabólica**

A síndrome metabólica é caracterizada como uma combinação de fatores de risco para a saúde, incluindo obesidade abdominal, resistência a insulina, dislipidemia e hipertensão (Lombardo *et al.*, 2012). Definida pela Fundação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Foundation*) como a presença de obesidade central (gordura visceral) associada à pelo menos duas características incluindo baixo nível de HDL-colesterol, altos níveis de triglicérides, pressão sistólica ou diastólica alta e/ou diabetes tipo 2/aumento da glicemia de jejum (Ford, 2005). A síndrome metabólica estabelece-se com a obesidade (adiposidade), está associada a um quadro de inflamação sistêmica e é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, mortalidade, e a resistência a insulina (Chen *et al.*, 2012).

Hoje é amplamente conhecido o papel da resistência a insulina como elo entre a obesidade de distribuição central, intolerância à glicose, hipertensão arterial, dilipidemia, distúrbios da coagulação, hiperuricemia e microalbuminúria, integrantes da síndrome metabólica “ampliada” (DeFronzo *et al.*, 1991; Reaven, 1994; Timar *et al.*, 2000).

Alterações hepáticas também estão associadas a obesidade. A doença do fígado gorduroso não-alcoólica (*nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (Lombardo *et al.*, 2012), engloba alterações como a esteatose, a esteatohepatite não-alcoólica, a cirrose e o carcinoma hepatocelular, e está intimamente associada a obesidade, diabetes e resistência à insulina (Liu *et al.*, 2012).

### **1.30 Tecido Adiposo e as Adipocinas**

Antes visto como um simples depósito de lipídios, o tecido adiposo é reconhecido atualmente como um importante órgão endócrino, que regula o balanço metabólico do organismo (Clavijo *et al.*, 2007). O tecido adiposo humano é dividido em tecido adiposo marrom, envolvido na atividade termogênica, e tecido adiposo branco que apresenta grande número de células adiposas, os adipócitos, além de células do estroma, tais como os fibroblastos, pré-adipócitos, macrófagos, outros leucócitos e os componentes vasculares (Fernández-Sánchez *et al.*, 2011).

Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar triacilglicerol em períodos em que a oferta de energia é abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit calórico. A regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos tradicionais sistemas neurais e hormonais, e depende das necessidades energéticas do indivíduo (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006).

De acordo com o equilíbrio energético do organismo, os adipócitos podem aumentar ou diminuir de tamanho e, quando ocorre aumento observamos a hipertrofia. A partir de células precursoras, novos adipócitos podem se formar em resposta ao equilíbrio energético positivo persistente caracterizando a hiperplasia (White e Stephens, 2010) e quando há aumento de adiposidade também pode ocorrer uma modificação no perfil das células estromais (Fernández-Sánchez *et al.*, 2011).

Alterações no tamanho e no número de adipócitos podem estar relacionadas à inabilidade do tecido adiposo em funcionar corretamente, o que pode contribuir para o aparecimento de problemas relacionados à obesidade, como dislipidemia, resistência à insulina e risco cardio-metabólico (Godoy-Matos, 2006). Acredita-se que estas alterações sejam decorrentes de um estado de inflamação sistêmica associado ao aumento da adiposidade.

Pereda *et al.* (2012) concluíram que a obesidade é uma condição pró-inflamatória, pois os adipócitos secretam uma variedade de fatores que participam diretamente do processo inflamatório ou regulam outras funções imunológicas. O fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , a interleucina (IL)-6 e a leptina são exemplos de adipocinas pró-inflamatórias (Hotamisligil *et al.*, 1993; Bastard *et al.*, 2000). Por outro lado, os adipócitos também produzem substâncias com efeitos antiinflamatórios, como a adiponectina e a interleucina (IL)-10. Em situações relacionadas ao aumento da adiposidade, observamos um desequilíbrio entre a produção de fatores pró- e antiinflamatórios, contribuindo para a manutenção de um nível moderado de inflamação sistêmica.

#### **1.4 Marcadores de inflamação hepática**

A insulina tem efeitos importantes no metabolismo dos carboidratos e lipídeos, mediando e sendo essencial para o desenvolvimento da esteatose hepática e da esteatoepatite. Em condições fisiológicas a insulina promove a lipogênese periférica e a síntese de glicogênio, inibe a gliconeogênese e diminui a oxidação lipídica. A resistência à insulina está associada ao aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres para o fígado, aumento da  $\beta$ -oxidação mitocondrial e aumento da síntese de triglicerídeos a partir desses ácidos graxos livres. Os triglicerídeos podem se acumular no fígado devido ao aumento da disponibilidade destes ácidos graxos livres ou à diminuição na produção e/ou secreção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (Contos e Sanyal, 2002). Os triglicerídeos acumulados no citoplasma constituem vacúolos, que podem ser identificados com coloração de hematoxilina-

eosina. Se há oxidação dos ácidos graxos, há formação de radicais livres, peróxido de hidrogênio e espécies reativas do oxigênio. (McCullough, 2002).

A peroxidação lipídica parece ligar a esteatose à atividade inflamatória. Dois dos aldeídos produzidos na peroxidação são os principais mediadores: o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal (McCullough, 2002). O malondialdeído ativa o NF- $\kappa$ B (fator de transcrição regulador da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão), promovendo a produção do TNF- $\alpha$ , IL-8, etc. O 4-hidroxinonenal ativa as células do fígado, promovendo a deposição de colágeno e conseqüente fibrose, além de estar implicado na formação dos corpúsculos hialinos de Mallory e na quimiotaxia dos neutrófilos (Day e James, 1998).

A produção de TNF- $\alpha$  estimula a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Rui *et al.*, 2002), uma enzima responsável pela síntese de óxido nítrico, se encontra implicada na resistência a insulina promovida pelo TNF- $\alpha$  (Emanuelli *et al.*, 2001). O controle da expressão da iNOS ocorre principalmente em nível de transcrição, freqüentemente devido à ação sinérgica de dois mediadores. Embora o mecanismo de indução ainda não esteja completamente esclarecido, o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) está relacionado com a indução da NOS por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Duncan e Heales, 2005). A iNOS foi primeiro identificada em macrófagos e seus efeitos se apresentam em locais com inflamação crônica (Sagin *et al.*, 2004), encontrando-se elevada na obesidade (Rui *et al.*, 2002).

### **1.5Os Antioxidantes**

É bem conhecido que muitas substâncias naturais presentes na dieta podem influenciar de maneira positiva, prevenindo o surgimento ou alterando a progressão de alterações associadas à obesidade. Os alimentos de origem vegetal das mais variadas espécies são fontes de diversos compostos que apresentam atividade antioxidante natural (Moller e Loft, 2006; Balstad *et al.*, 2012). O interesse pela atividade antioxidante destes compostos se dá pelo seu potencial efeito na prevenção do estresse oxidativo, causa primária de muitas doenças crônicas (Zambonin *et al.*, 2012),

tais como doenças cardiovasculares (Lallemand *et al.*, 2012), câncer e desordens cerebrais degenerativas (Chu *et al.*, 2000; Luximon-Ramma *et al.*, 2003; Liyana-Pathirana e Shahida, 2006) por provocar danos celulares que, por sua vez, podem promover disfunções fisiológicas e morte celular. O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e o sistema de defesa antioxidante presente no organismo. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem ser geradas durante a irradiação por raios ultravioleta, raios X e raios gama, como produtos de reações catalisadas por metais que podem estar na atmosfera como poluentes. Podem ser também geradas no organismo, por neutrófilos e macrófagos durante processo inflamatório; por exposição a herbicidas, xenobióticos e toxinas e principalmente durante o metabolismo aeróbico, na mitocôndria (cadeia transportadora de elétrons) (Valko *et al.*, 2006; Scandalios, 2005).

O potencial antioxidante destes compostos está associada à própria natureza química, ou seja, devido à sua estrutura, estes são em geral bons agentes redutores e, podem proteger tecidos e estruturas celulares contra danos oxidativos (Shami e Moreira, 2004.; Lallemand *et al.*, 2012), inibindo a oxidação de diversos substratos através da captação de radicais livres, bloqueando reações em cadeia e algumas vezes agindo como quelantes de metais (Shahidi e Wanasundara, 1992), atuando tanto na etapa de iniciação como na de propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (Soares, 2002).

Um dos mais importantes grupos de antioxidantes encontrados nos vegetais são os compostos fenólicos, que além da atividade antioxidante, demonstram atividades antiinflamatória, antialérgica, antimicrobiana e anticarcinogênica (Mosimann *et al.*, 2006; Oleaga *et al.*, 2012). Como propriedades, os compostos fenólicos podem seqüestrar os radicais livres, quelar íons metálicos com atividade redox, modular a expressão gênica e interagir com mecanismos de sinalização celular; sendo atribuída grande parte de sua bioatividade a estas características (Bianchi e Antunes, 1999; Oleaga *et al.*, 2012). Porém os mecanismos de absorção e metabolismo e teores presentes na dieta podem

afetar a eficiência da ação antioxidante e estes aspectos não estão totalmente esclarecidos (Rhodes, 1996; Soobrattee *et al*, 2005).

A ação do estresse oxidativo ocupa papel importante nas manifestações da síndrome metabólica. A literatura reporta que a adequada ingestão de nutrientes antioxidantes está fortemente relacionada à diminuição do risco para a síndrome metabólica, melhorando a sensibilidade insulínica, o perfil lipídico, a pressão arterial, o estresse oxidativo e a inflamação, condições fisiopatológicas relacionadas as doenças crônicas, tais como as cardiovasculares, diabetes tipo 2 e a obesidade (Ferreira *et al.*, 2011).

### **1.60 Consumo e a Composição Química do Café**

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo (Lee *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012). O fato de ser uma bebida tão popular, aliado à sua importância econômica, explica o interesse por estudos sobre o café, desde a sua composição até seus efeitos na saúde humana. Devido sua importância, mais de 80 países em todo mundo cultivam café (Mishra e Slater, 2012), sendo o Brasil o maior produtor mundial de café verde. O gênero *Coffea* compreende aproximadamente 100 espécies, na qual apenas *Coffea arábica* e *Coffea canephora*, também conhecida como café robusta, são comercialmente cultivadas (Mishra e Slater, 2012).

Os últimos dados da Associação Brasileira da Indústria de Café mostram que os brasileiros continuam aumentando o consumo de café. No período compreendido entre Maio/2011 e Abril/2012, a ABIC registrou o consumo de 19,975 milhões de sacas, isto representando um acréscimo e 3,05% em relação ao período anterior correspondente (Maio/10 a Abril/11), que havia sido de 19,383 milhões de sacas. Já o consumo *per capita* foi de 6,18 kg de café em grão cru ou 4,94 kg de café torrado, quase 83 litros para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 1,23% em relação ao período anterior (Abic, 2012).

A Pesquisa de Orçamentos Familiares do IBGE, também indicou que o café é o alimento mais consumido diariamente por 78% da população acima de 10 anos, o que

representa 79,7 litros/habitante ano, muito semelhante ao apurado pela Abic (2012), ou seja, 255 ml/dia ou 93 litros por habitante por ano.

A composição química dos diferentes tipos de café encontrados no mercado é variável em consequência das variedades e das condições em que são produzidos e processados (Abrahão *et al.*, 2008.; Santos *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Dentre os constituintes do café, os mais estudados são a cafeína, principal substância responsável pelo gosto amargo do café; os ácidos carboxílicos; ácidos fenólicos, que determinam a acidez; (Vignoli e Bassoli, 2007), compostos bioativos, como flavonóides, polifenóis, etc (Nogueira e Trugo, 2003; Morais *et al.*, 2009; Oleaga *et al.*, 2012), e os compostos de aroma da família das pirazinas, entre outros (Morais *et al.*, 2009). As proteínas, glicídios redutores e lipídios são importantes após a torrefação, pois sofrem reações originando compostos importantes para o aroma do café (Toci *et al.*, 2006).

Os grãos de café verde apresentam, além da cafeína, uma grande variedade de minerais, aminoácidos, açúcares e lipídeos, como triglicerídeos e ácidos graxos livres. Adicionalmente, o café também possui uma vitamina do complexo B, a niacina e, em maior quantidade que todos os demais componentes, os ácidos clorogênicos, na proporção de 7 a 10%, isto é, 3 a 5 vezes mais que a cafeína. Destes, apenas a cafeína é termoestável, ou seja, não é destruída durante o processo de torrefação (Trugo e Macrae, 1989).

A cafeína é um composto químico classificado como alcaloide do grupo das xantinas e designado quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina. É sintetizada a partir da via metabólica: *xantosina* → *7-metilxantosina* → *7-metilxantina* → *teobromina* → *cafeína* (Ashihara e Crozier, 2001). Vários são os estudos com o objetivo de comprovar os efeitos benéficos da cafeína à saúde humana, tais como a diminuição da fadiga, aumento do estado de alerta, redução na incidência de cirroses e até diminuição do risco de suicídios (Klatsky e Armstrong, 1992). Alguns autores mostram que, quando consumido com moderação, ou seja, de uma a três xícaras de café por dia, não há riscos para a saúde. Esse consumo moderado pode estar relacionado com uma melhora da pressão arterial, prevenção de enfarte do miocárdio, diabetes e até auxílio no controle dos níveis de colesterol (Gallus *et al.*, 2009). A cafeína age como um

estimulante do sistema nervoso central, aumentando a taxa metabólica, relaxando a musculatura lisa dos brônquios, do trato biliar e gastrintestinal, e de parte do sistema vascular (Nehlig, 1999; Sin *et al.*, 2009). Por outro lado, em vários estudos recentes tem sido mostrado que a ingestão de cafeína em excesso (acima de 300 mg por dia) causa vários distúrbios no organismo, que vão desde sintomas desagradáveis, como irritabilidade, dores de cabeça, insônia e alteração de humor (Sin *et al.*, 2009), até problemas mais graves, como doenças coronarianas e/ou câncer (Lopez-Garcia *et al.*, 2009).

Já o ácido clorogênico é um éster formado a partir da esterificação do ácido quínico com derivados do ácido cinâmico como os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, sendo os principais subgrupos de isômeros os ácidos cafeoilquínicos, feruloilquínicos e dicafeoilquínicos e, em menor quantidade, os ácidos *p*-cumaroilquínicos (Lallemant *et al.*, 2012). Além da importância para as características organolépticas da bebida, estes compostos conferem-lhe também um caráter funcional, apresentando bioatividade, onde os de importância neste estudo são: (1) Ácido cafeico – auxilia na inibição do processo de peroxidação lipídica; (2) Ácido clorogênico – possui atividade antioxidante biológica; e (3) Ácido ferúlico – apresenta boa atividade antioxidante, porém possui baixa solubilidade (Soares, 2002).

## **1.7 Propriedades funcionais do café**

Como já citado, o café é uma das bebidas mais consumida no mundo e nas últimas duas décadas tem crescido o número de pesquisas que demonstram seus efeitos benéficos. Dados epidemiológicos indicam que o consumo de café está associado a proteção ou redução do risco da síndrome metabólica. O consumo de 1,5 a 3 xícaras de café por dia, foi capaz de reduzir os níveis de glicose e de triglicérides (Takami *et al.*, 2012), reduziu o risco de diabetes tipo 2 (Wedick *et al.*, 2011). O extrato de café verde GCA<sup>TM</sup> (1050 e 700 mg) reduziu o peso corporal, o índice massa corporal (IMC), a gordura corporal e a frequência cardíaca (Vinson *et al.*, 2012). O consumo de café também está associado com baixas prevalências de doenças hepáticas crônicas

(Birerdinc *et al.*, 2012) como a cirrose não-alcoólica (Ruhl e Everhart, 2005), o carcinoma hepatocelular e diabetes (Kathoff *et al.*, 2010). De fato, o consumo de café habitual pode retardar o desenvolvimento de sintomas associados à síndrome metabólica, reduzindo a circunferência abdominal, a pressão sanguínea, o nível de triglicerídeos e de glicose de jejum (Hino *et al.*, 2007). Há também sugestões que o consumo de café poderia resultar em melhora no quadro da síndrome metabólica por controlar a inflamação associada à obesidade (Kempf *et al.*, 2010). Até a pouco tempo, os estudos sobre as propriedades biológicas do café visavam os efeitos da cafeína sobre a perda de peso, visto que é bem descrito que a cafeína promove lipólise e aumento do gasto energético (Arciero *et al.*, 1995; Greer *et al.*, 2001). Recentemente, outros componentes do café têm despertado o interesse das pesquisas, principalmente o ácido clorogênico. Uma xícara de café contém aproximadamente 100 mg de ácido clorogênico, o principal representante dentre os ácidos hidroxicinâmicos. Quando ingerido, é metabolizado pela microbiota intestinal em vários metabólitos, incluindo o ácido cafeico (Gonthier *et al.*, 2003). Pequenas quantidades livres de ácidos hidroxicinâmicos também são encontradas no café, incluindo o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido vanílico (Clifford, 1985). A presença de ácido cafeico e ácido ferúlico é também detectada precocemente no plasma de voluntários após a ingestão de café (Renouf *et al.*, 2010).

Embora a relação benéfica entre o consumo de café e a progressão de doenças hepáticas e surgimento do diabetes tipo 2 seja bem explorada em estudos epidemiológicos, poucos estudos experimentais foram feitos. A adição de extrato de grão de café verde à dieta de animais durante 14 dias foi capaz de inibir o ganho de peso e o acúmulo de gordura por inibir a absorção e metabolismo de lipídeos no fígado (Shimoda *et al.*, 2006). Camundongos C56BL6 que receberam dieta hiperlipídica por 15 semanas acrescentada de polifenóis totais de café também não ganharam peso como os animais sem a suplementação de polifenóis, bem como apresentaram menor acúmulo de lipídeos no fígado, apresentaram menores níveis séricos de leptina, insulina e glicose (Murase *et al.*, 2011). Camundongos que receberam a dieta hiperlipídica suplementadas com ácido clorogênico ou ácido cafeico também ganharam menos peso e também apresentaram melhora metabólica, reduzindo níveis de leptina e insulina

(Cho *et al.*, 2010). Visando a avaliação das possíveis alterações hepáticas, animais foram mantidos por 4 semanas em dieta hiperlipídica e depois divididos em grupos que receberam café descafeinado, uma solução de polifenóis de café ou melanoidina por mais dois meses associado à dieta hiperlipídica. Este trabalho mostrou que o consumo de café protege o fígado dos danos causados pela dieta hiperlipídica, pois reduz o acúmulo de gordura e a inflamação no fígado (Vitaglione *et al.*, 2010). Animais mantidos em dieta hiperlipídica e suplementados com café cafeinado e descafeinado durante 8 semanas também apresentaram redução de peso, adiposidade e melhoras hepáticas (Fukushima *et al.*, 2009). Ratos Zucker diabéticos e portadores de síndrome metabólica receberam doses diárias de café por 30 dias, os compostos presentes no extrato protegeu o fígado e os rins dos animais contra a lipoperoxidação comumente presente em quadros de diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (Abrahão *et al.*, 2012).

Ensaio *in vitro* com linhagens celulares auxiliam de forma muito eficiente na compreensão dos eventos observados *in vivo*. Adipócitos *in vitro* podem ser úteis em estudos de diferenciação, de funcionalidade (lipólise, produção de adipocinas) e quando mantidos em sistema de co-cultura com macrófagos, podem constituir um modelo da inflamação que se estabelece no tecido adiposo durante a obesidade. Hepatócitos em cultura podem se tornar esteatóticos se expostos a ácidos graxos como o ácido oleico e também constituem um bom modelo para estudos de esteatose (Lombardo *et al.*, 2012.; Vidyashankar *et al.*, 2012).

Kathoff *et al* (2010) estudaram os efeitos do café em cultura de HepG2, confirmando seus efeitos protetores e antioxidantes. Em outro estudo, a suplementação de pão com café verde em condições de cultura de HepG2 aumentou a resistência do cólon e do fígado contra o estresse oxidativo (Glei *et al.*, 2006). Os ácidos fenólicos (cafeico, clorogênico, ferúlico, p-cumárico e ácido cinâmico) mantidos em cultura de HepG2 têm potencial efeito preventivo sobre doença hepática gordurosa não alcoólica em sua fase inicial (Liu *et al.*, 2011). Adipócitos em cultura expostos ao éster fenetil do ácido cafeico isolado de própolis liberam menos leptina, TNF- $\alpha$  e resistina (Juman *et al.*, 2011), liberam mais adiponectina (Ohara *et al.*, 2009) e tem sua diferenciação modificada (Juman *et al.*, 2011). Não há estudos utilizando o ácido cafeico e o ferúlico nestes modelos celulares.

Embora o café seja uma das bebidas mais populares do mundo e já comprovado alguns dos seus efeitos benéficos, na literatura também é citado como uma bebida estimulante que pode causar irritabilidade e ou insônia, por conter alto teor de cafeína (Cavalcante *et al.*, 2000; Maeztu *et al.*, 2001), e pode influenciar no comportamento das pessoas (Nawrot *et al.*, 2003). Há estudos que mostram que a utilização de cafeína, em excesso, pode elevar a pressão arterial, aumentando o risco de doenças cardiovasculares entre os consumidores de café (Cavalcante *et al.*, 2000). Além dos hipertensos, mulheres grávidas e crianças também devem ter um consumo moderado, em virtude dos mecanismos de ação da cafeína (Nurminen *et al.*, 1999). Nestes casos, muitas vezes médicos ou nutricionistas prescrevem o consumo de café descafeinado (Kawachi *et al.*, 1994).

Deste modo, nossa proposta foi estudar os efeitos dos fenólicos do café no tecido adiposo e no fígado, e em culturas celulares de 3T3-L1, independente da presença de cafeína.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do café cafeinado e descafeinado, bem como do ácido cafeico e ferúlico na modulação das alterações inflamatórias no tecido adiposo e no fígado associadas à obesidade.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar *in vivo* a possível ação do consumo de café cafeinado e café descafeinado em camundongos obesos pela introdução prévia de dieta hiperlipídica, avaliando:

- o peso corpóreo, glicemia e sensibilidade periférica à insulina (ITT);
- as alterações dos estoques de tecido adiposo epididimal;
- a expressão de marcadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$  e leptina) e anti-inflamatórios (adiponectina e IL-10) no tecido adiposo;
- a presença de esteatose hepática, bem como de marcadores de inflamação hepática (expressão de citocinas hepáticas, expressão de iNOS).

Avaliar *in vitro* a ação do ácido cafeico e ácido ferúlico, bem como de extratos brutos de café cafeinado e descafeinado em culturas celulares de 3T3-L1, avaliando:

- diferenciação celular e citotoxicidade.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Métodos Analíticos**

##### **3.1.1 Preparação do café**

Foram preparados café cafeinado (café solúvel granulado forte – lote: 21013055) e café descafeinado (café solúvel granulado descafeinado – lote: 21631210), ambos da linha Nescafé® da Nestlé®. Estes foram preparados por infusão de 1,5 g de café em 300 ml de água aquecida por 5 minutos em microondas. Nos ensaios *in vitro* os extratos brutos de café cafeinado e descafeinado já preparados foram filtrados em filtro Millipore 0,22 µm.

##### **3.1.2 Avaliação da presença de cafeína nos extratos de café**

Foram dissolvidos em lavadora Ultra Sônica 100 mg de café cafeinado e descafeinado em 50 mL de água ultrapura a 70°C em balão volumétrico, após o esfriamento completou-se o balão para 100 mL com água ultrapura. Retirou-se uma alíquota que foi filtrada em filtro Millipore 0,45 µm. Utilizou-se um cromatógrafo Dionex UltiMate 3000 (Alemanha), composto por um amostrador automático (WPS-3000(T) SL Analytical), uma bomba quaternária (LPG-3400SD) e um detector de arranjo de diodos UV/VIS (DAD-3000). Todos os módulos foram controlados por computador. Empregou-se coluna C18 Atlantis R (Waters, 5 µm, 4,6 x 150 mm). O volume de injetado foi de 20 µL. A fase móvel foi composta de dois solventes: A) 60% de água Milli-Q e B) 40% metanol. A eluição foi isocrática com fluxo de 1 mL/min. Foi realizada análise qualitativa baseada na comparação do tempo de retenção e espectro de absorção de substâncias conhecidas em relação aos de padrões puros. Os espectros de absorção utilizados foi entre 190 e 480 nm e o cromatograma utilizado para cafeína foi de 274 nm.

### 3.1.3 Perfil fenólico dos extratos de café

Pesou-se 38 mg de ácido cafeico, 31 mg de ácido ferúlico e 52 mg de ácido clorogênico em microtubos, cada amostra foi diluída em 100 µL de metanol e completou-se para 2 mL de água ultrapura. Foi utilizado 50 µL de cada amostra em 600 µL de água miliQ e 200 µL de metanol, As alíquotas foram filtradas em filtro Millipore 0,45 µm. Utilizou-se um cromatógrafo Dionex UltiMate 3000 (Alemanha), composto por um amostrador automático (WPS-3000(T) SL Analytical), uma bomba quaternária (LPG-3400SD) e um detector de arranjo de diodos UV/VIS (DAD-3000). Todos os módulos foram controlados por computador. Empregou-se coluna C18 Atlantis R (Waters, 5 µm, 4,6 x 150 mm). O volume de injetado foi de 20 µl. A fase móvel foi composta de dois solventes: A) água/ácido fórmico, 99.9:0.1 v/v e B) metanol/ácido fórmico, 99.9:0.1 v/v. O fluxo da fase móvel foi de 0.6 mL/min e o gradiente de eluição foi de 10% B por 10 minutos, de 10-25% B em 15 minutos, 25% B por 15 minutos, de 20-65% B em 35 minutos, de 65-100% B em 5 minutos, de 100-5% B em 5 minutos e 10% B por 5 minutos. Foi realizada análise qualitativa baseada na comparação do tempo de retenção. Os espectros de absorção utilizados foi entre 280 e 330 nm.

## 3.2 Ensaio *in vivo*

### 3.2.1 Modelo de Obesidade – Animais

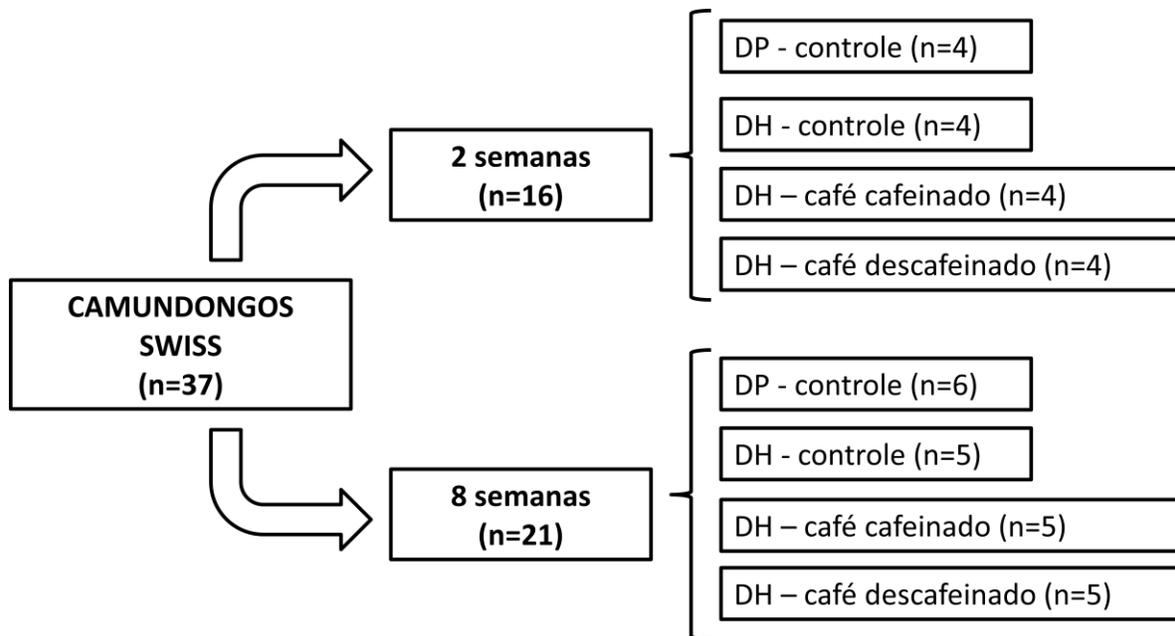
Foram utilizados camundongos Swiss com 6 semanas de idade adquiridos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas individuais e mantidos no Biotério da UNIFAG, com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e temperatura controlada. Os animais se serviram *ad libitum* de água e ração. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal - USF Protocolo 001.10.11 (Anexo 1).

### 3.2.2 Obesidade induzida por dieta e intervenção dos animais

Ao completarem 8 semanas de idade, os animais foram inicialmente divididos em dois grupos, sendo que um recebeu dieta padrão comercial para roedores (Labina®, Agribands-Purina, Paulínia, SP, Brasil) e o outro recebeu dieta hiperlipídica preparada em nosso laboratório conforme Tabela 1 durante 10 semanas. Os animais receberam dieta e bebidas a vontade, foram pesados semanalmente e tiveram a ingestão de dieta e bebidas monitoradas durante a intervenção. Os animais foram tratados com café cafeinado e descafeinado por 2 ou 8 semanas adicionais. A divisão dos grupos experimentais está ilustrada na Figura 1.

Tabela 1. Composição de macronutrientes da dieta (Pauli *et al.*, 2008).

	Dieta Padrão (comercial)		Dieta Hiperlipídica	
	g/kg	Kcal/kg	g/kg	Kcal/kg
Amido de Milho (Q.S.P.)	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Maltodextrina	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mix de Minerais	35	-	35	-
Mix de Vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358



**Figura 1:** Divisão dos animais nos grupos experimentais por 2 e 8 semanas. DP: dieta padrão, DH: dieta hiperlipídica.

### 3.2.3 Glicemia basal e Teste de tolerância à Insulina (ITT)

Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e foi realizada uma pequena incisão na cauda de cada animal para a coleta de uma pequena gota de sangue e determinando a glicemia basal utilizando o glicosímetro. Para o ITT, os animais receberam via i.p. 1,5 U/kg de insulina e os níveis glicêmicos foram avaliados após 5, 10, 15 e 30 minutos. Os valores glicêmicos foram ajustados em um modelo linear e o coeficiente angular da curva foi obtido no programa GraphPad InStat (kITT). O ITT foi realizado na semana anterior ao sacrifício dos animais.

### **3.2.4 Sacrifício dos animais e coleta de materiais**

Os animais foram anestesiados com uma mistura 1:1 v/v de cetamina 100 mg/ml e xilasina a 2% no volume de 0,3 uL para cada 100 g de peso corpóreo visando uma anestesia profunda. A cavidade abdominal foi aberta para acesso a veia abdominal, de onde foi coletado sangue. O animal foi sacrificado pela retirada do coração sob efeito do anestésico. Os estoques de tecido adiposo foram retirados, pesados e os valores expressos como porcentagem do peso corporal. Biópsias de tecido adiposo e fígado foram coletadas.

### **3.2.5 Análise histológica de esteatose hepática**

Fragmentos de fígado foram acondicionados em formalina tamponada a 10%. Após 48 horas foram processados e emblocados em parafina. Cortes histológicos de 5µL foram corados com hematoxilina e eosina. A presença de esteatose hepática foi capturada utilizando microscópio óptico acoplado a sistema de captação de imagens e foi avaliada através da quantificação de esteatose presente em 144 pontos sobrepostos na imagem.

### **3.2.6 Quantificação de mediadores inflamatórios**

Biópsias de tecido adiposo e fígado foram coletadas no dia do sacrifício e estocadas a seco em -80°C. As biópsias foram homogeneizadas em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.6), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, aprotinina 0.1 mg, 35 mg PMSF/ml, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 10 mM, NaF 100 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM e EDTA 4 mM. Os extratos foram centrifugados a 15000 rpm a 4°C, 45 minutos. O

sobrenadante foi coletado e utilizado diretamente no kit comercial de ELISA a fim de quantificar TNF- $\alpha$ , leptina, adiponectina e IL-10. Parte do sobrenadante das biópsias de fígado coletado foi utilizada em experimentos de western blot, onde adicionou-se tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50%; SDS – dodecil sulfato de sódio – 10%) contendo DTT 100 mM e amostras foram aquecidas em água fervente por 5 minutos, aplicadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separadas por eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos anti-iNOS e anti- $\beta$ -Actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc. – Santa Cruz, Califórnia, USA) overnight a 4°C antes de serem reveladas com kits comerciais de quimioluminescência (GE Healthcare Bio-Sciences AB, UK).

### **3.3 Ensaios *in vitro***

#### **3.3.1 Culturas celulares**

Foram utilizadas as linhagens de pré-adipócitos 3T3-L1 adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, estabelecidas em nosso laboratório.

A linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1 foi cultivada em meio basal de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (BSA), 10 ml/L de penicilina/estreptomicina, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48 horas de atingirem a confluência, as células foram incubadas com o meio de diferenciação (0,25  $\mu$ M de dexametasona, 10  $\mu$ g/ml de insulina e 0,5 mM IBMX em meio basal). Após 48 horas, as células foram expostas ao meio de maturação (5  $\mu$ g/mL de insulina em meio basal). As células foram estimuladas com ácido cafeico e ácido ferúlico, nas concentrações de 0,01 mM, 0,02 mM e 0,05 mM, e os extratos brutos de café cafeinado e descafeinado, nas concentrações de 100 mg/ml, 300 mg/ml e 1000 mg/ml, durante e após a diferenciação.

### **3.3.2 Ensaios de diferenciação de adipócitos**

A adipogênese foi observada 15 dias após a indução da diferenciação dos pré-adipócitos (3T3-L1), período no qual as células também foram estimuladas com ácido cafeico, ácido ferúlico e extratos brutos de café cafeinado e descafeinado, a análise foi realizada pelo acúmulo de vesículas lipídicas intracelulares coradas por Oil Red-O (Sigma Aldrich). As células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos e incubadas por 1 hora com solução de OilRed-O. As células coradas foram lavadas com água, secas a 37°C e visualizadas por microscopia óptica. Em seguida o corante foi extraído com isopropanol 100% e quantificado por espectrofotometria a 540 nm.

### **3.3.3 Ensaio de Citotoxicidade**

As células 3T3-L1, maduras e durante diferenciação, estimuladas ou não por ácido cafeico, ácido ferúlico e extratos brutos de café cafeinado e descafeinado, foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade MTT descrito em Mosmann (1983).

### **3.4 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média, acompanhado do respectivo erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significante foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnett para comparações múltiplas e Teste T. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

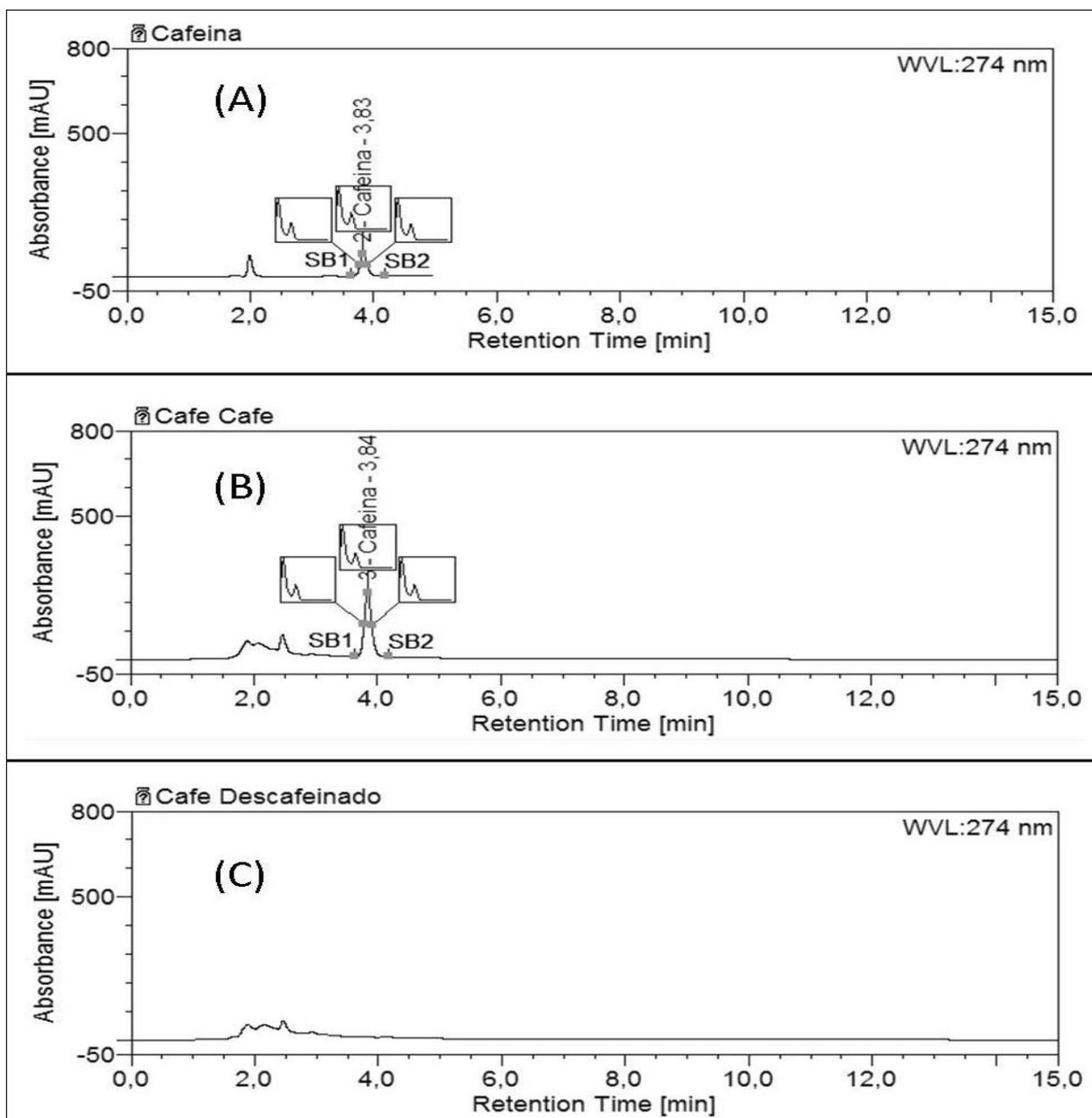
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Análise cromatográfica de cafeína em café solúvel cafeinado e descafeinado**

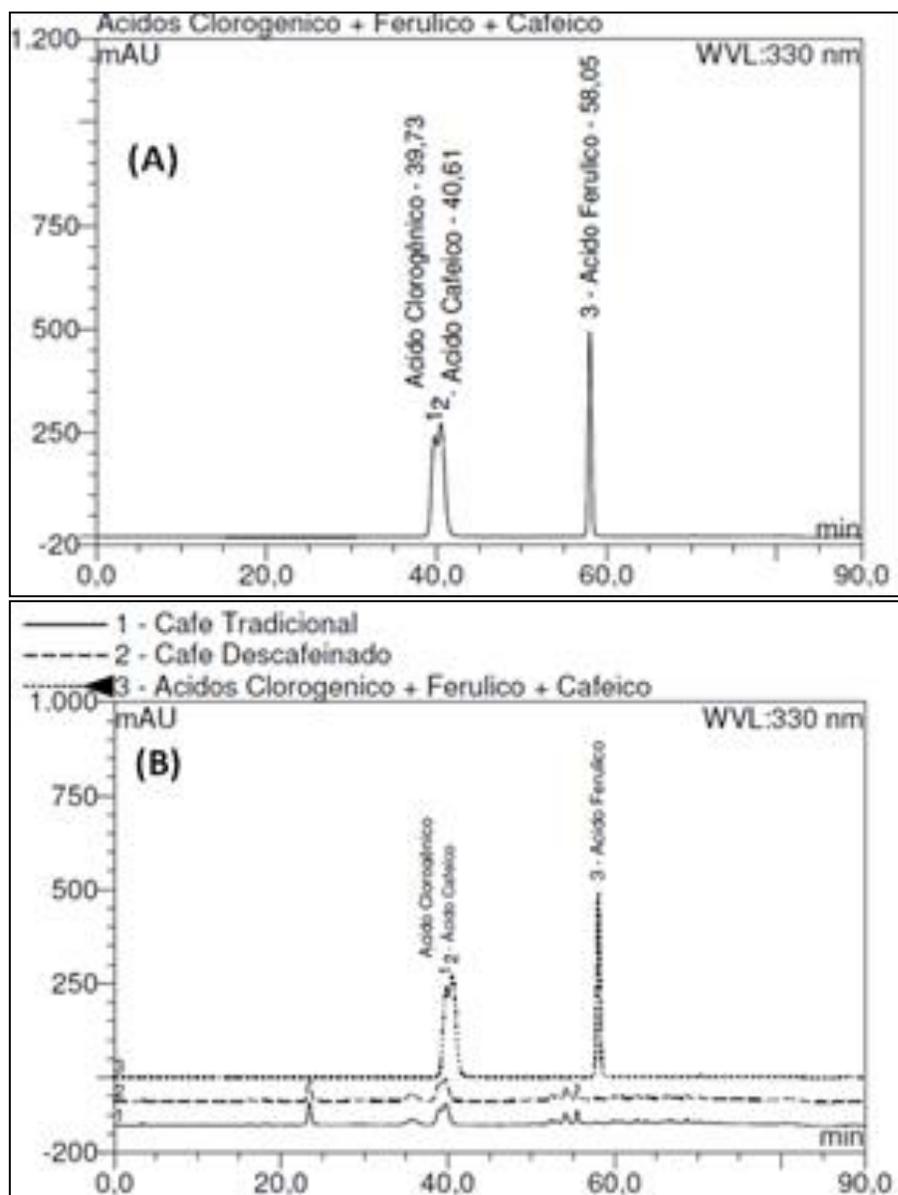
O perfil de cafeína presente nos cafés utilizados foi determinado por HPLC (Figura 2). Observa-se a presença de cafeína em 3,84 minutos no café cafeinado (Figura 2B) assim como no controle onde se utilizou o padrão cafeína (Figura 2A). E como esperado, o mesmo não foi observado para o café descafeinado (Figura 2C).

### **4.2 Análise cromatográfica de ácidos fenólicos em café solúvel cafeinado e descafeinado**

O perfil de ácidos fenólicos presente nos cafés utilizados foi determinado por HPLC e encontra-se descrito na Figura 3. Observa-se a presença de ácido clorogênico e cafeico nas mesmas proporções em ambos extratos. Não foi detectada a presença de ácido ferúlico nas amostras de café utilizadas.



**Figura 2:** Perfil de cafeína presente no controle (Cromatograma A), no café cafeinado (Cromatograma B) e no café descafeinado (Cromatograma C).



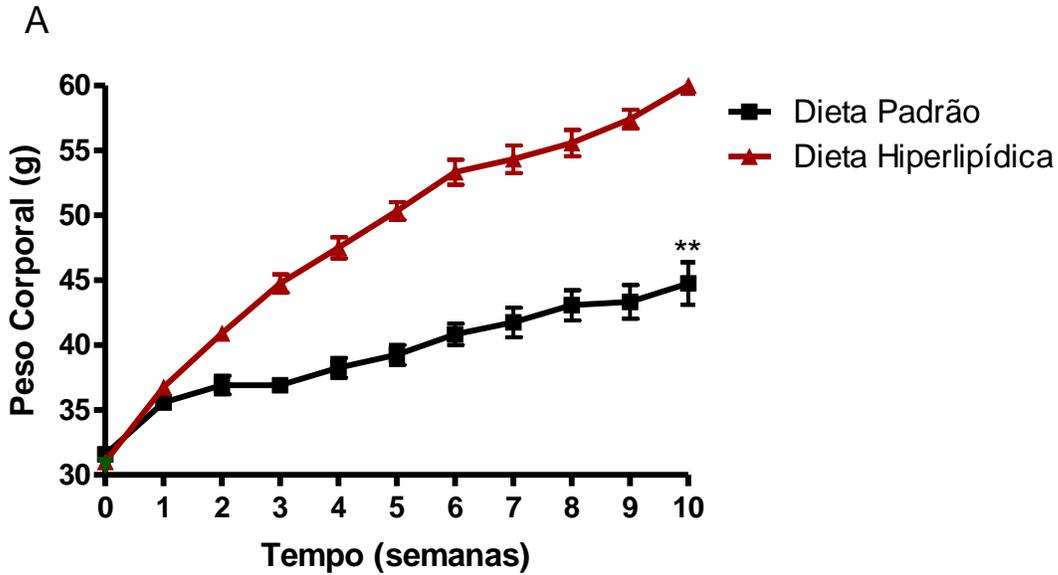
**Figura 3:** Perfil de ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ferúlico e cafeico) presentes no controle (Cromatograma A) e no café cafeinado e descafeinado (Cromatograma B).

### **4.3 Determinação do peso corpóreo**

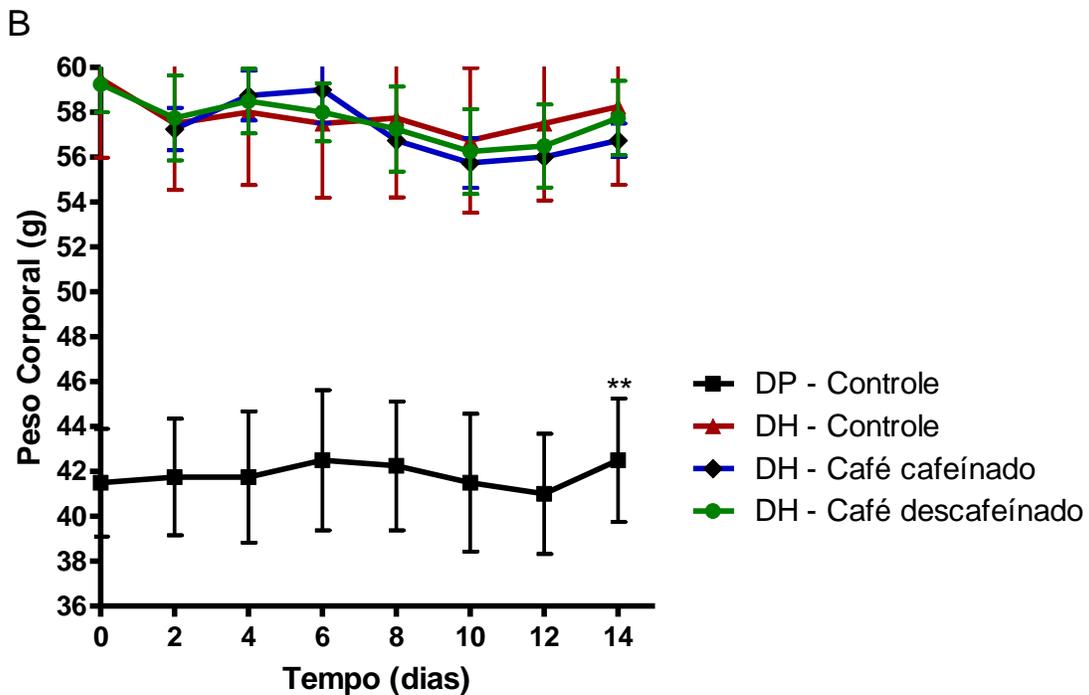
Durante a vigência da dieta hiperlipídica, os animais do grupo DH apresentaram uma alteração significativa no peso corpóreo quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 4). No entanto, não houve redução do peso corpóreo dos animais com a intervenção de café cafeinado e descafeinado no protocolo de 2 semanas (Figura 5) e no protocolo de 8 semanas (Figura 6), quando comparados ao grupo DH.

### **4.4 Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal**

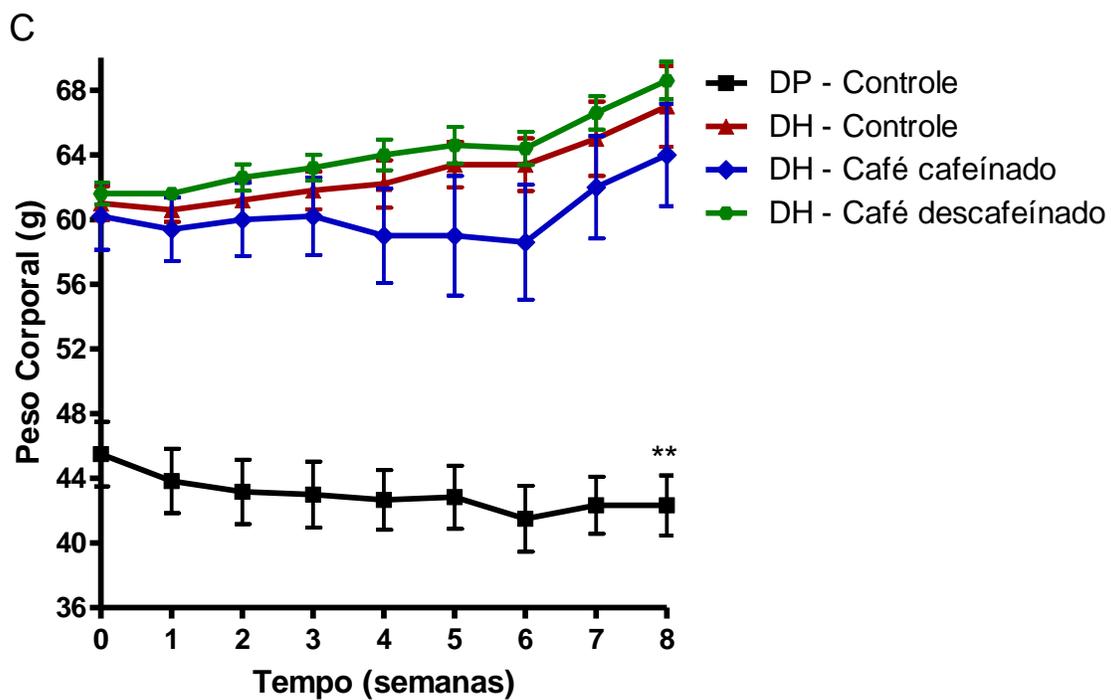
Na avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal não houve redução na adiposidade após intervenção com café, para os dois protocolos experimentais (Figura 7A e 7B). Porém observou-se redução de adiposidade apenas para o café descafeinado com 2 semanas de ingestão da bebida (Figura 7A).



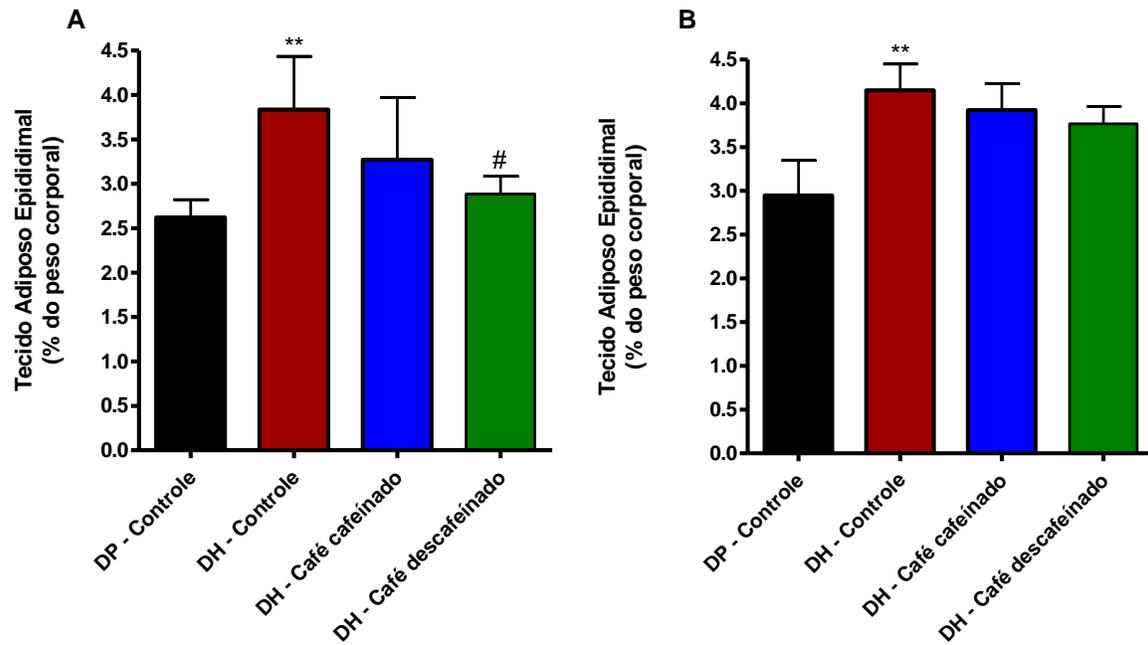
**Figura 4:** Peso corpóreo dos animais durante a vigência da dieta hiperlipídica. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo DH.



**Figura 5:** Peso corpóreo dos animais durante a vigência da dieta hiperlipídica no protocolo de 2 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo DH.



**Figura 6:** Peso corpóreo dos animais durante a vigência da dieta hiperlipídica no protocolo de 8 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo DH.



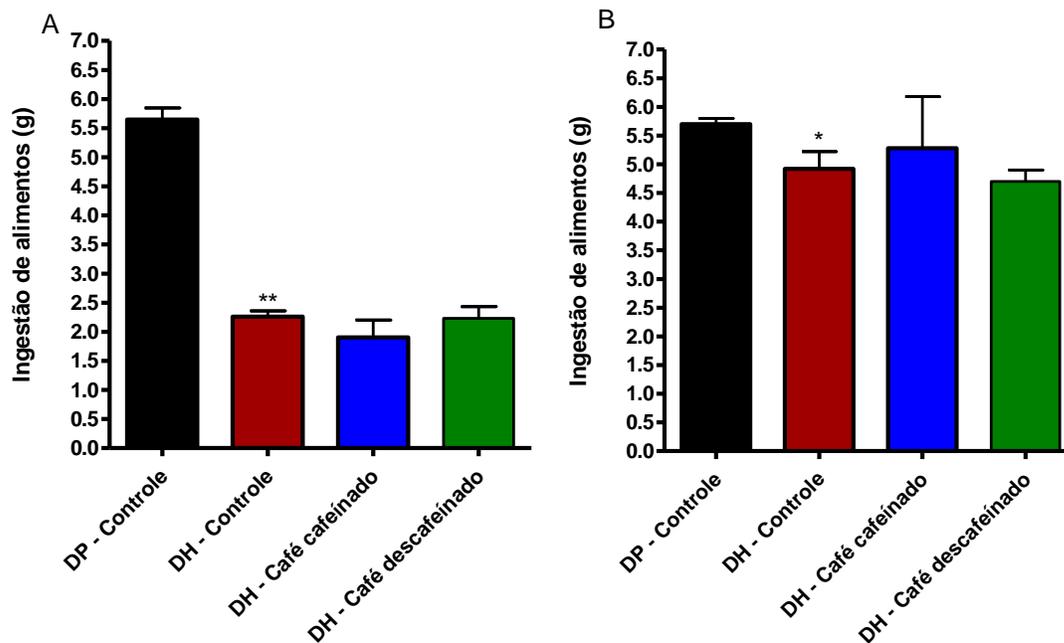
**Figura 7:** Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal em 2 semanas (Painel A) e em 8 semanas (Painel B). \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo DP – controle e # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH – controle.

#### **4.5 Controle de ingesta de alimento**

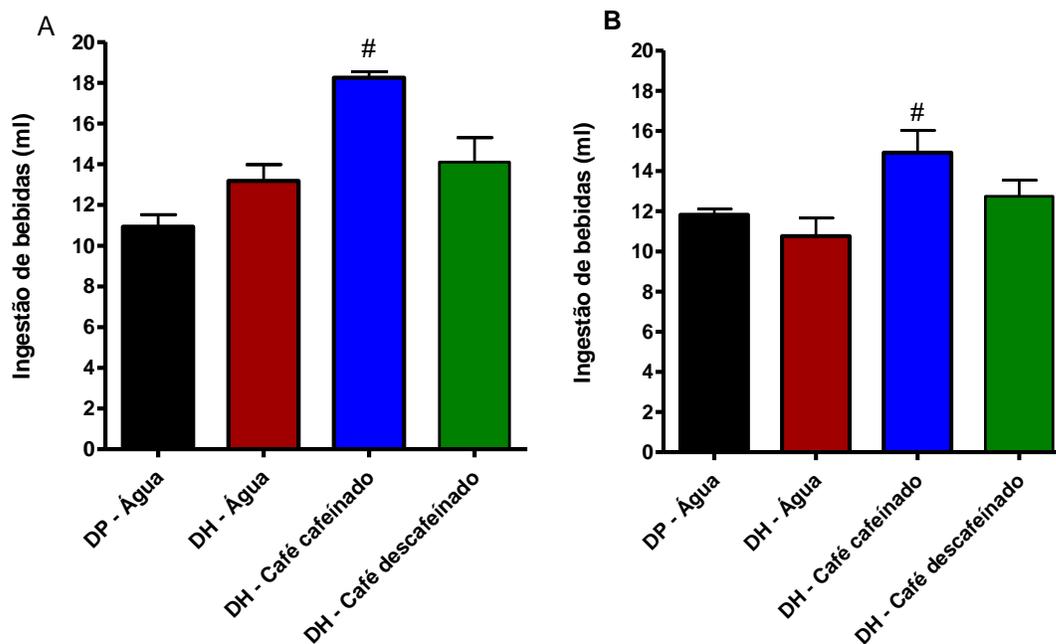
A quantidade de dieta ingerida foi monitorada durante o tratamento dos dois grupos experimentais. Nota-se uma diminuição de ingesta nos grupos DH quando comparado aos grupos DP - controle (Figura 8A e 8B), mas o mesmo não foi observado entre os animais que ingeriram café cafeinado e descafeinado (Figura 8A e 8B) quando comparados aos DH - controle.

#### **4.6 Controle de ingesta de bebidas**

Durante o tratamento dos grupos experimentais, a quantidade de bebida ingerida foi monitorada. Observou-se um aumento de ingesta de café cafeinado quando comparado aos grupos DP - controle (Figura 9A e 9B), porém o mesmo não foi observado entre os animais que ingeriram café descafeinado (Figura 9A e 9B).



**Figura 8:** Controle de ingestão de dieta dos animais no protocolo de 2 semanas (Painel A) e 8 semanas (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\* $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DP - controle.



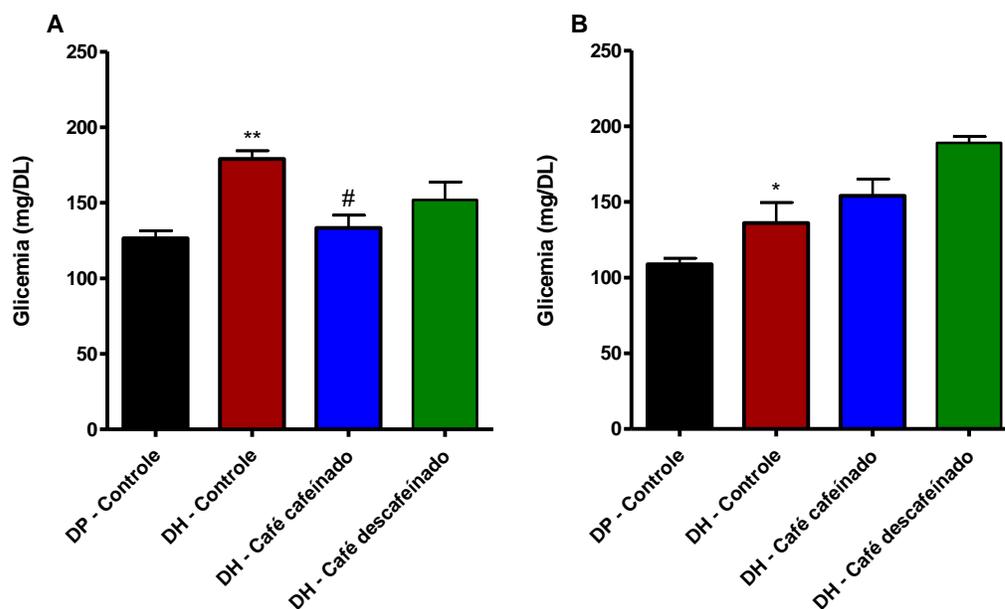
**Figura 9:** Controle de ingestão de bebidas dos animais no protocolo de 2 semanas (Painel A) e 8 semanas (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH - controle.

#### **4.7 Níveis glicêmicos**

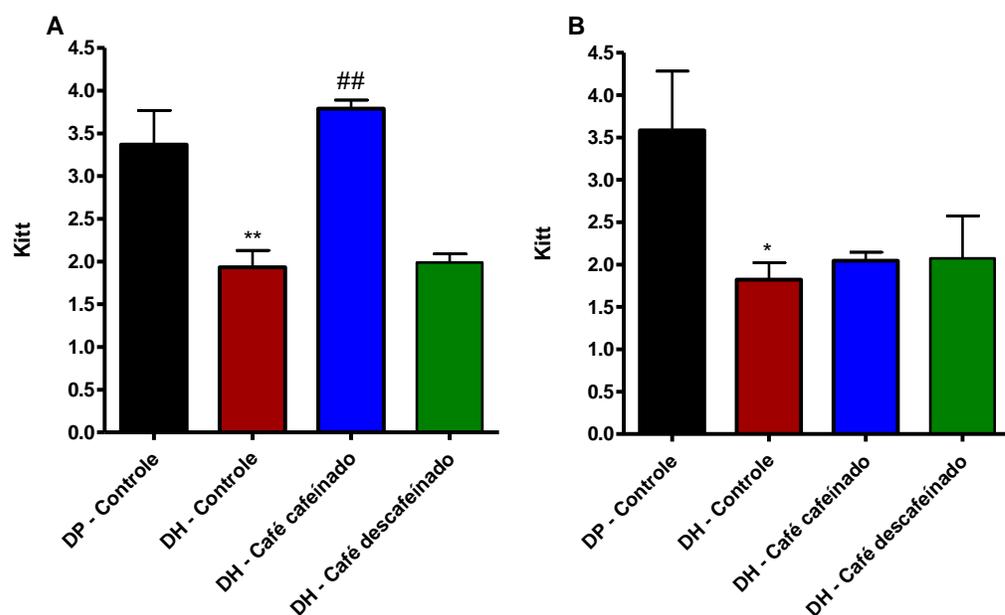
Os níveis glicêmicos foram avaliados ao final da intervenção de café cafeinado e descafeinado e estavam reduzidos apenas nos animais do grupo DH – café cafeinado do protocolo de 2 semanas (Figura 10A). O mesmo não foi observado no protocolo de 8 semanas (Figura 10B).

#### **4.8 Teste de tolerância à insulina**

A administração de insulina aos animais em dieta hiperlipídica (DH) resulta em uma redução menor dos níveis glicêmicos quando comparada ao grupo controle, sugerindo a presença de resistência à insulina (Figura 11A e 11B). No grupo DH - café cafeinado no protocolo de 2 semanas, observa-se uma recuperação na capacidade de reduzir a glicemia em resposta a insulina, sugerindo que estes possam estar mais sensíveis à sinalização periférica da insulina quando comparados ao DH - controle (Figura 11A). Porém o mesmo não foi observado no protocolo de 8 semanas (Figura 11B).



**Figura 10:** Níveis glicêmicos dos animais no protocolo de 2 semanas (Painel A) e no protocolo de 8 semanas (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH.

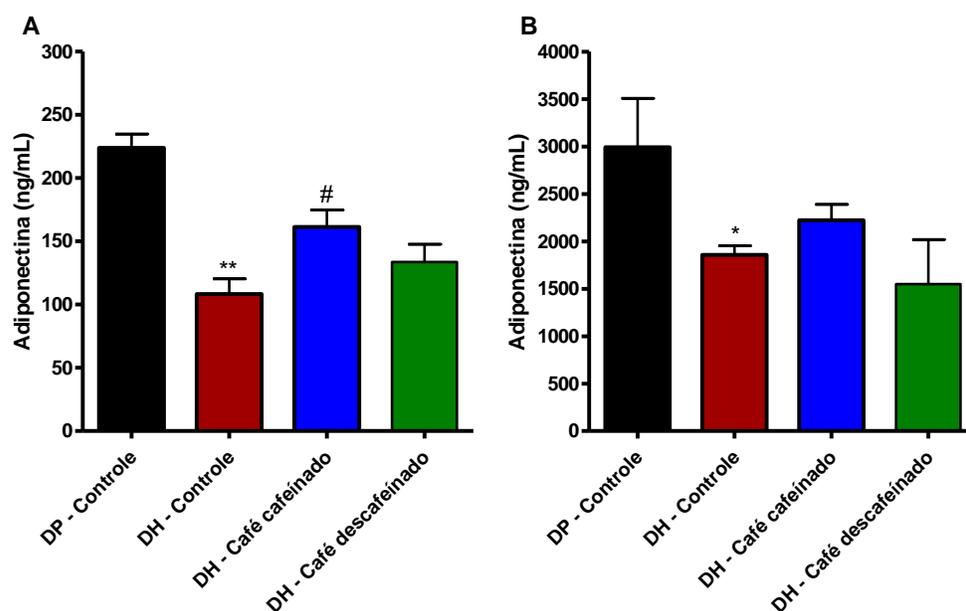


**Figura 11:** Teste de tolerância à insulina do protocolo de 2 semanas (Painel A) e do protocolo de 8 semanas (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle, ##  $p < 0,01$  quando comparado ao DH - controle.

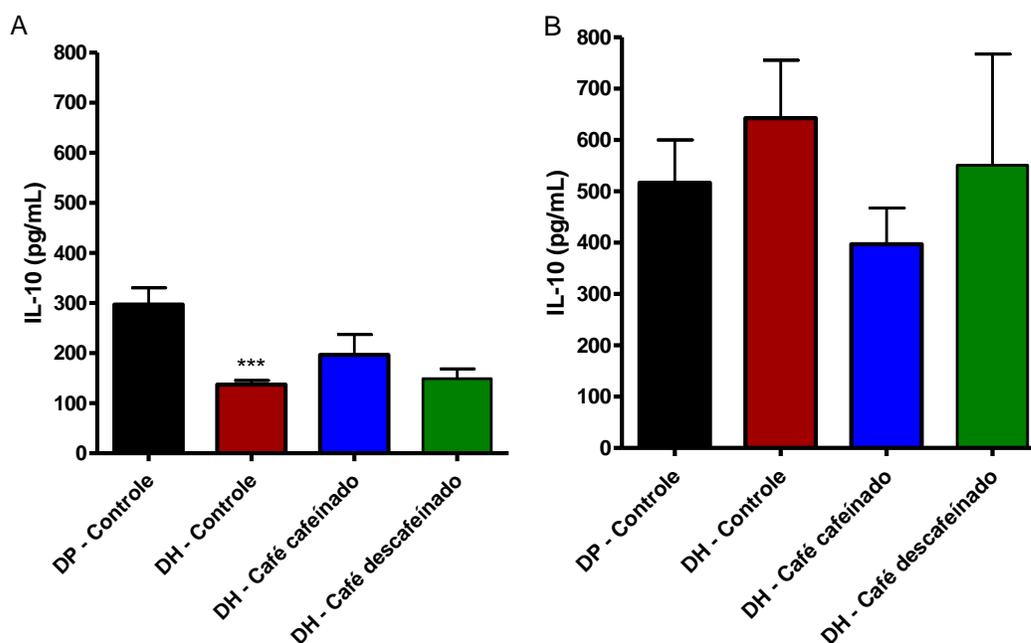
#### **4.9 Avaliação da produção de adipocinas antiinflamatórias no tecido adiposo**

Os níveis de adiponectina no tecido adiposo dos camundongos mantidos em dieta hiperlipídica mostram que nos camundongos obesos o tecido adiposo libera quantidades reduzidas de adiponectina, quando comparado ao controle (Figura 12). No protocolo de 2 semanas o grupo DH – café cafelnado observou-se uma variação e há diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao grupo DH - controle (Figura 12A). Porém o mesmo não foi observado no protocolo de 8 semanas (Figura 12B).

Quanto aos níveis de IL-10 no tecido adiposo não houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos experimentais (Figura 13A e 13B).



**Figura 12:** Adiponectina no tecido adiposo no protocolo de 2 semanas (painel A) e no protocolo de 8 semanas (painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DP – controle; e #  $p < 0,05$  quando comparado ao DH - controle.

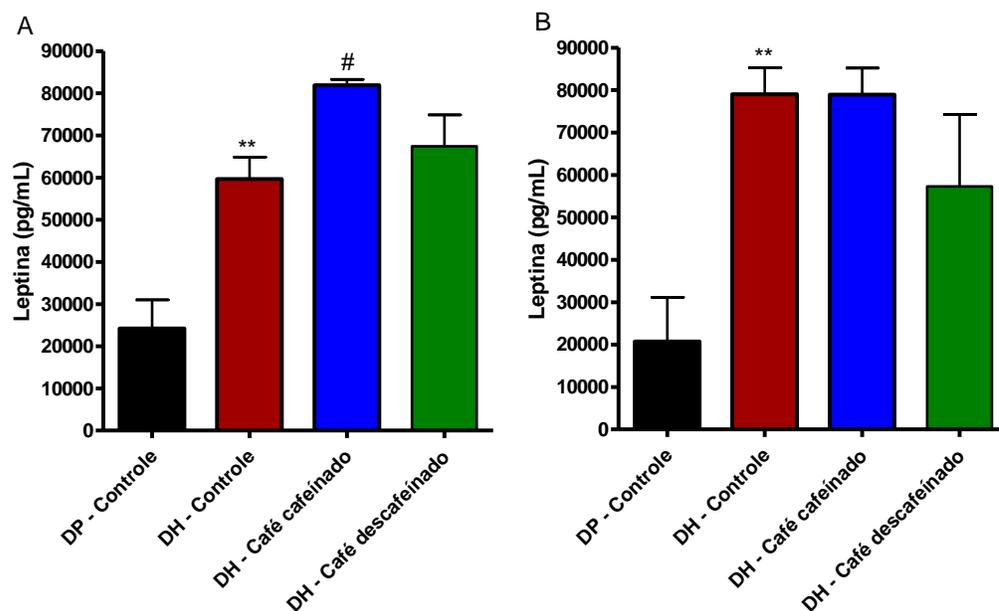


**Figura 13:** IL-10 no tecido adiposo no protocolo de 2 semanas (Painel A) e 8 semanas (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo DP - Controle.

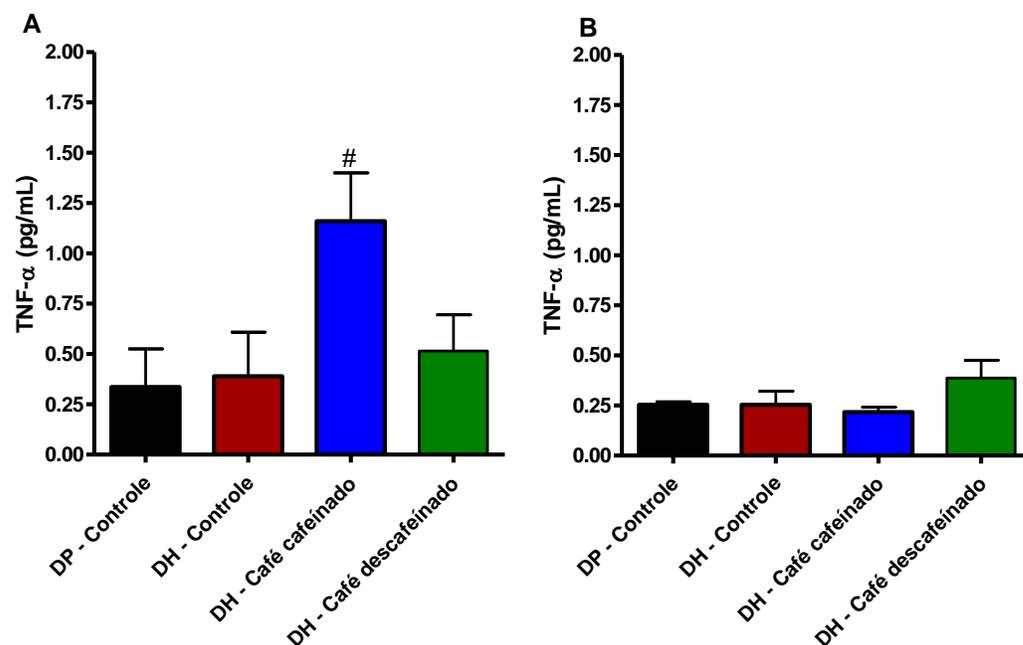
#### **4.10 Avaliação da produção de adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo**

Os níveis de leptina presentes no tecido adiposo de animais do grupo DH – controle estavam maiores quando comparado aos animais do grupo DP - controle para os dois grupos experimentais (Figura 14A e 14B). Também foi observado um aumento significativo no grupo DH – café cafeinado no protocolo de 2 semanas quando comparado ao grupo DH – controle (Figura 14A). No protocolo de 8 semanas não houve aumento e nem redução (Figura 14B).

Houve um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  no protocolo de 2 semanas nos grupos DH – café cafeinado quando comparado ao grupo DH – controle (Figura 15A). Já no protocolo de 8 semanas a intervenção com o café cafeinado e descafeinado não foi capaz de promover alterações estatisticamente significativas (Figura 15B).



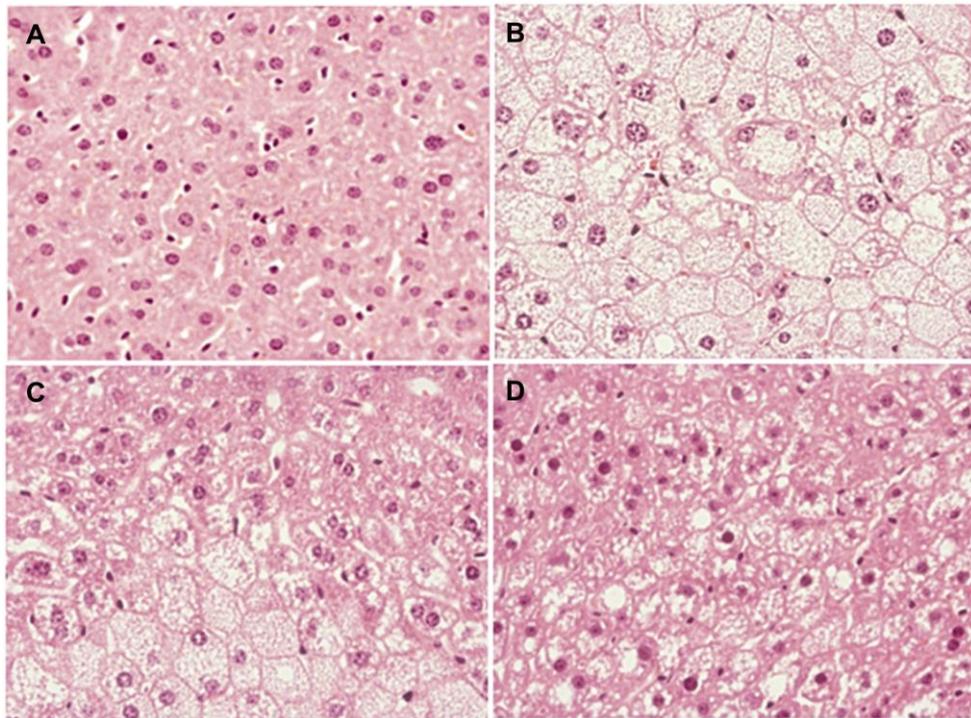
**Figura 14:** Leptina no tecido adiposo no protocolo de 2 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo DP – controle; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH - controle.



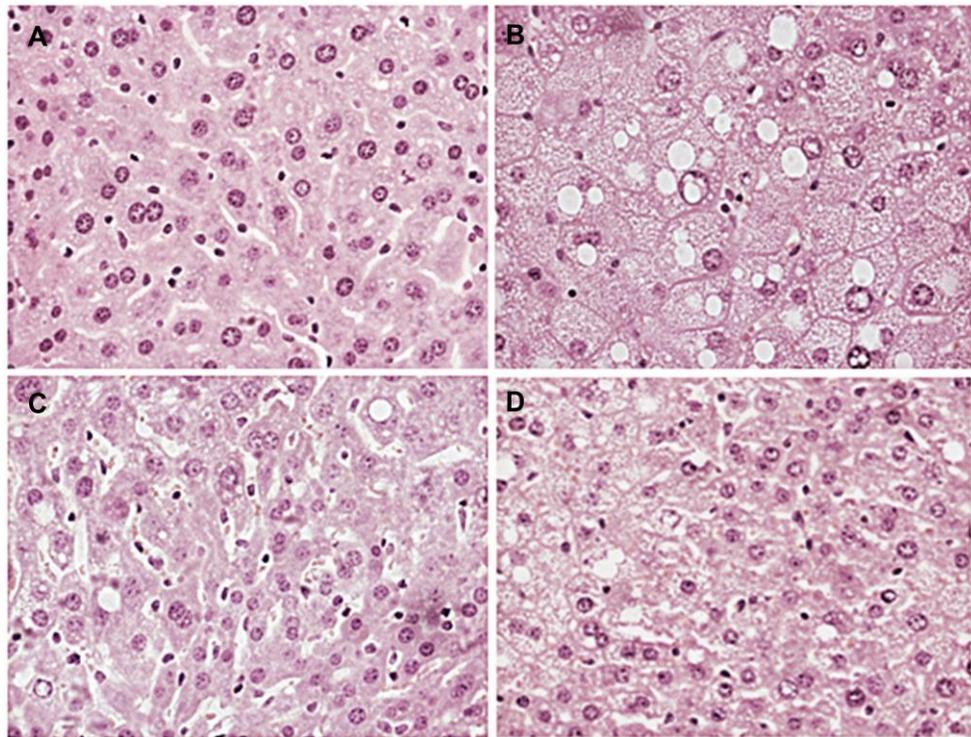
**Figura 15:** TNF-α no tecido adiposo no protocolo de 2 semanas (Painel A) e no protocolo de 8 semanas (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH – controle.

#### **4.11 Análise histológica da morfologia do fígado**

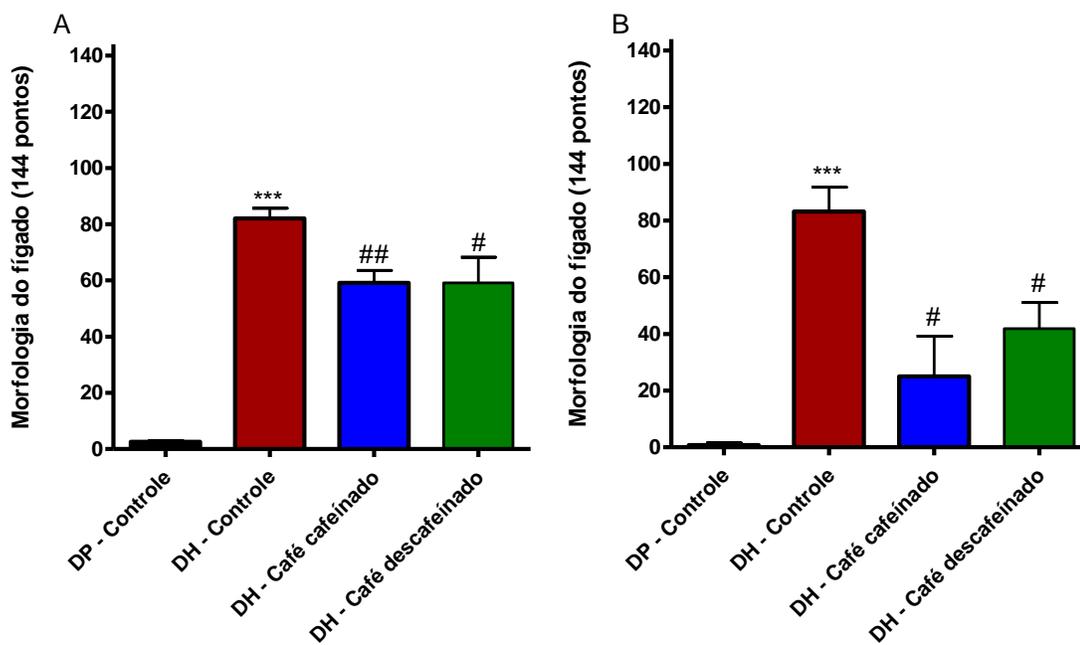
A presença de esteatose hepática foi observada no grupo DH - controle quando comparado ao Controle, e nos grupos DH – café cafeinado e descafeinado observa-se uma redução significativa quando comparado ao grupo DH sem intervenção com café nos dois protocolos experimentais (Figuras 16, 17 e 18).



**Figura 16:** Amostras de fígado no protocolo de 2 semanas, controle (A); DH – controle (B); DH – café cafeinado (C) e DH – café descafeinado (D) – (40X).



**Figura 17:** Amostras de fígado no protocolo de 8 semanas, controle (A); DH – controle (B); DH – café cafeinado (C) e DH – café descafeinado (D) – (40X).

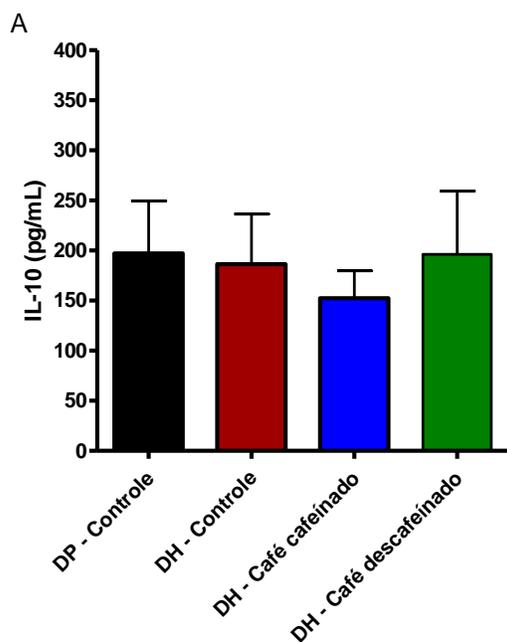


**Figura 18:** Análise estatística da morfologia do fígado (144 pontos) no protocolo de 2 semanas (Painel A) e no protocolo de 8 semanas (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM). \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo DP – controle e ## $p < 0,01$  e # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH – controle.

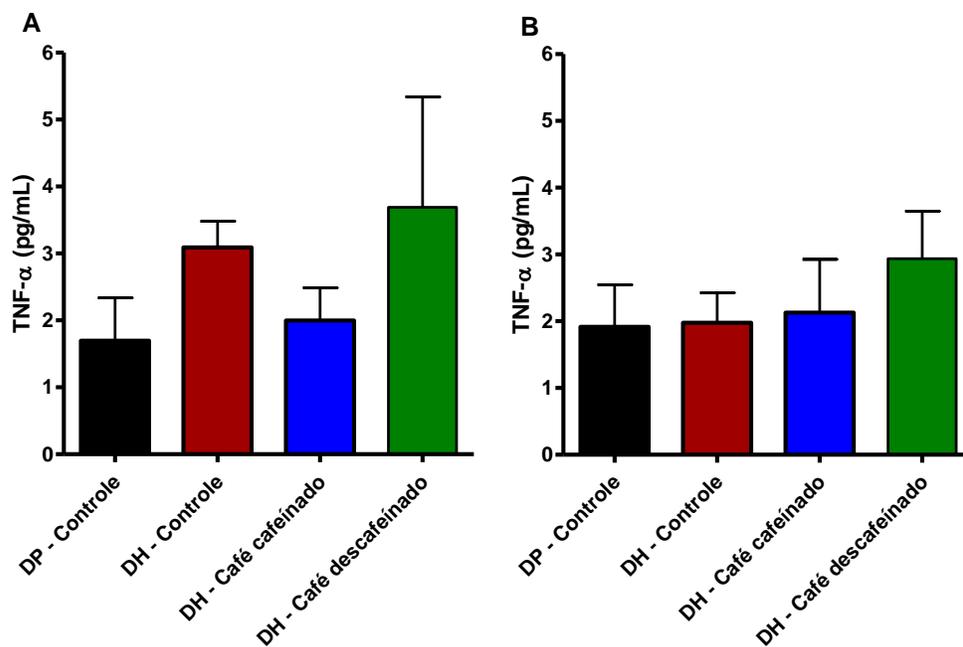
#### **4.12 Avaliação da produção de citocinas (IL-10 e TNF- $\alpha$ ) no fígado**

Após a avaliação dos níveis de IL-10 não observamos diferenças estatisticamente significativas no protocolo com intervenção de café por 2 semanas (Figura 19A).

Os níveis de TNF- $\alpha$  no protocolo de 2 e 8 semanas, a intervenção com o café cafeinado e descafeinado não foi capaz de promover alterações estatisticamente significativas (Figura 20A e 20B).



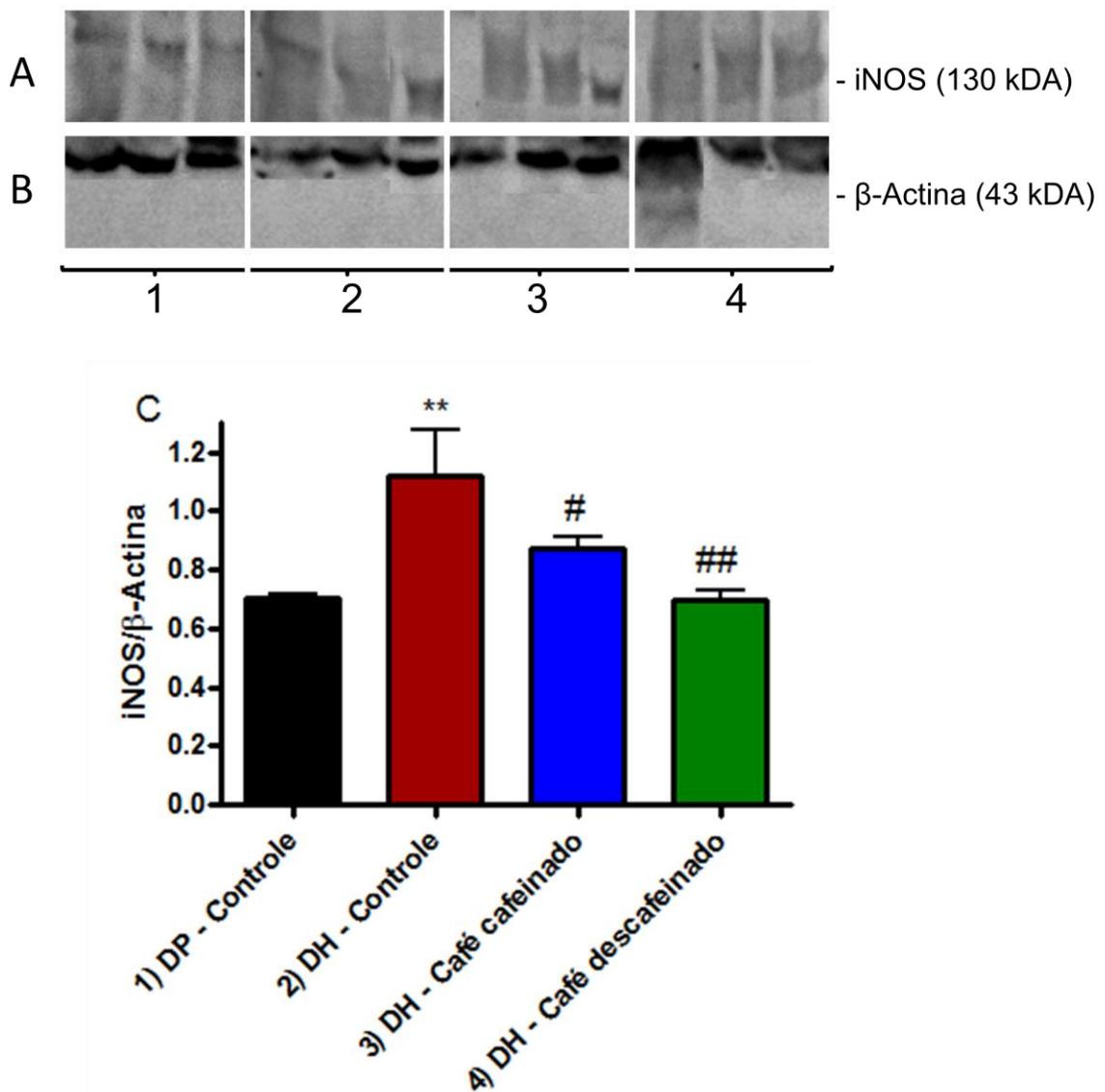
**Figura 19:** IL-10 no fígado no protocolo de 2 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM).



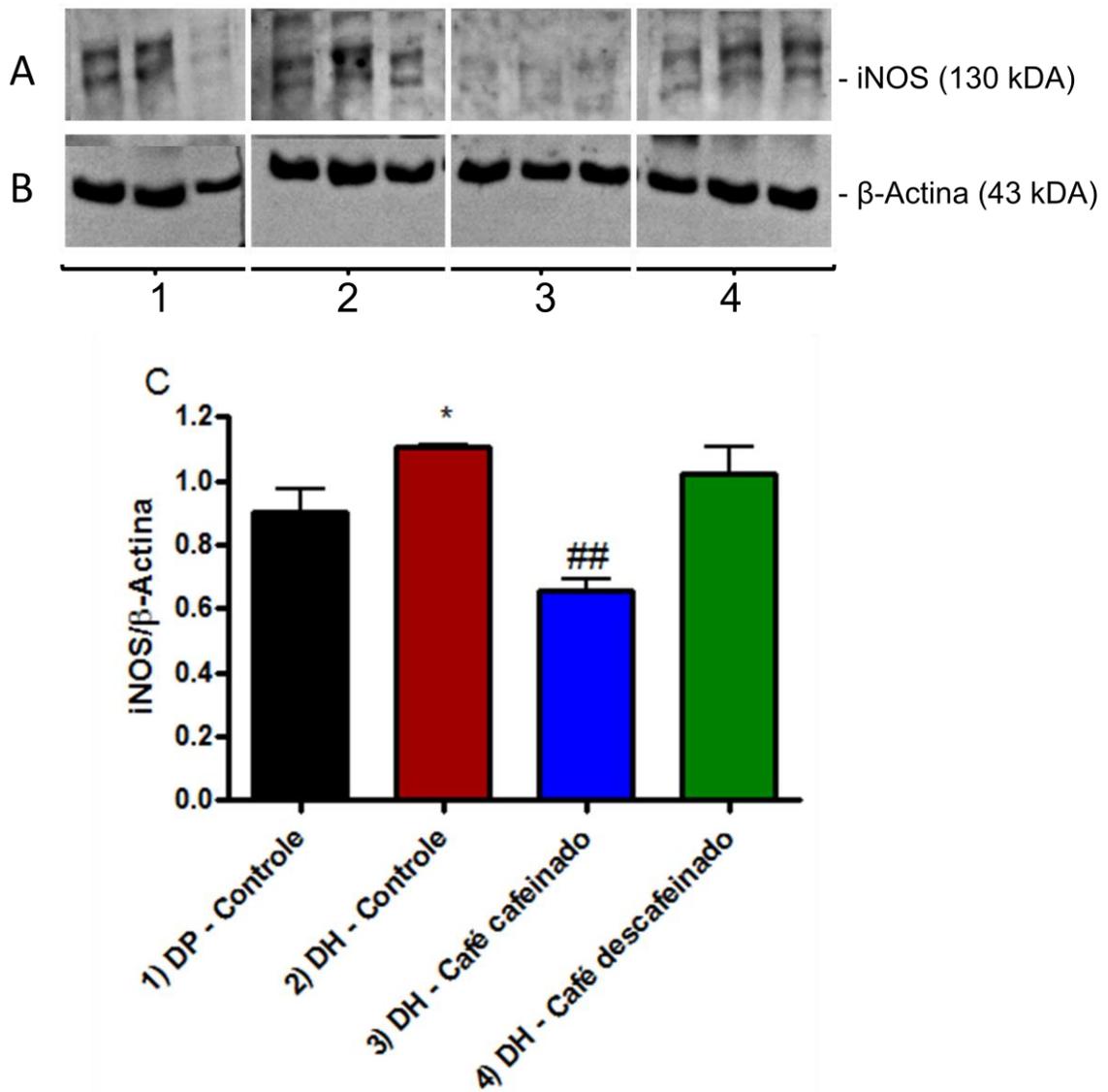
**Figura 20:** TNF-α no fígado no protocolo de 2 semanas (Painel A) e no protocolo de 8 semanas (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM).

#### **4.13 Avaliação da expressão de iNOS no fígado**

Um aumento da expressão protéica de iNOS foi observado no grupo DH - controle, quando comparado ao Controle. Já nos grupos com intervenção de café observamos redução desta enzima para o café cafeinado e descafeinado no protocolo de 2 semanas (Figura 21), e apenas para o café cafeinado no protocolo de 8 semanas (Figura 22).



**Figura 21:** Expressão da proteína iNOS no fígado dos animais no protocolo de 2 semanas (A e B representam as bandas na membrana, C - as barras mostram a média e erro padrão da média (EPM) da quantifica o de iNOS corrigida pela expressão de  $\beta$ -actina. \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao controle, ## $p < 0,01$  e # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH – controle.



**Figura 22:** Expressão da proteína iNOS no fígado dos animais no protocolo de 8 semanas (A e B representam as bandas na membrana, C - as barras mostram a média e erro padrão da média (EPM) da quantifica o de iNOS corrigida pela expressão de  $\beta$ -actina. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle e ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo DH – controle.

#### **4.14 Avaliação da citotoxicidade do ácido cafeico, ácido ferúlico, e dos extratos brutos de café cafeinado e descafeinado**

No ensaio de citotoxicidade *in vitro* com as células 3T3-L1, 6 horas de incubação na presença do ácido cafeico (0,05mM), ácido ferúlico (0,01mM, 0,02mM e 0,05mM), e dos extratos brutos de café cafeinado (100mg/ml e 300mg/ml) e descafeinado (100mg/ml e 300mg/ml) não resultou em efeitos citotóxicos considerando as concentrações utilizadas. Porém, ao incubar as células na presença de 0,01mM e 0,02 de ácido cafeico, e na maior concentração de café cafeinado e descafeinado (1000mg/ml), observamos toxicidade para as células (Tabela 2).

#### **4.15 Determinação da diferenciação e lipólise basal em adipócitos isolados**

Avaliamos a diferenciação dos adipócitos na presença do ácido cafeico, ácido ferúlico, e dos extratos brutos de café cafeinado e descafeinado pelo ensaio de OilRed. Foi possível observar que na presença de 0,02mM do ácido cafeico há um aumento significativo da adipogênese quando comparado ao controle-veículo, porém na menor (0,01 mM) e maior (0,05 mM) dose não houve diferenças significativas. Também pode-se observar um aumento de adipogênese nos extratos de café cafeinado na maior dose (1000mg/ml) e de café descafeinado na menor dose (100mg/ml). Quanto à presença do ácido ferúlico não se observou alterações sobre a adipogênese *in vitro* (Tabela 3).

**Tabela 2:** Efeito do ácido cafeico, ácido ferúlico e dos extratos brutos de café cafeinado e descafeinado sobre a viabilidade celular utilizando ensaio de MTT.

	Concentração	MTT
Veículo - álcool	4µl	1,67 ± 0,08
Ácido cafeico	0,01 mM	1,49 ± 0,04
	0,02 mM	1,49 ± 0,01
	0,05 mM	1,60 ± 0,05
Ácido ferúlico	0,01 mM	1,73 ± 0,01
	0,02 mM	1,71 ± 0,01
	0,05 mM	1,60 ± 0,03
Veículo - água	2µl	1,63 ± 0,06
Café cafeinado	100 mg/ml	1,73 ± 0,11
	300 mg/ml	1,61 ± 0,11
	1000 mg/ml	1,40 ± 0,09*
Café descafeinado	100 mg/ml	1,73 ± 0,08
	300 mg/ml	1,67 ± 0,09
	1000 mg/ml	1,40 ± 0,04*

**Tabela 3:** Diferenciação dos adipócitos na presença do ácido cafeico, ácido ferúlico, e dos extratos brutos de café cafeinado e descafeinado pelo ensaio de OilRed

	Concentração	OilRed
Veículo – álcool	4µl	0,21 ± 0,04
Ácido cafeico	0,01 mM	0,25 ± 0,03
	0,02 mM	0,38 ± 0,03 *
	0,05 mM	0,21 ± 0,02
Ácido ferúlico	0,01 mM	0,17 ± 0,02
	0,02 mM	0,13 ± 0,01
	0,05 mM	0,16 ± 0,02
Veículo – água	2µl	0,19 ± 0,01
Café cafeinado	100 mg/ml	0,24 ± 0,06
	300 mg/ml	0,28 ± 0,03
	1000 mg/ml	0,31 ± 0,06*
Café descafeinado	100 mg/ml	0,30 ± 0,05*
	300 mg/ml	0,24 ± 0,05
	1000 mg/ml	0,23 ± 0,06

\*p<0,05 quando comparado ao veículo.

## 5. DISCUSSÃO

A obesidade está associada a um quadro de inflamação sistêmica, caracterizada pela expansão do tecido adiposo, aumento da produção de adipocinas e outros mediadores inflamatórios, que predispõe os obesos ao desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes do tipo 2 (da Costa *et al.*, 2012), hipertensão, dislipidemia e aterosclerose (Guzik *et al.*, 2006). A combinação de alguns desses fatores caracterizam a síndrome metabólica, que está associada pela hiperinsulinemia e por diferentes intensidades de resistência à insulina, que explicam a relação entre várias anormalidades e a obesidade (Weisberg *et al.*, 2006). Camundongos mantidos em dieta hiperlipídica apresentam um aumento de tecido adiposo, resistência periférica a insulina e glicemia alterada bem como alterações no perfil de produção de adipocinas pró- e antiinflamatórias (De Souza *et al.*, 2005), mostrando-se um modelo eficiente de obesidade (Ye *et al.*, 2012).

O presente estudo demonstra que após 10 semanas de manutenção da dieta hiperlipídica há indução da obesidade nos animais, caracterizada pelo aumento do peso corporal e da adiposidade. Este aumento de adiposidade foi acompanhado de alterações metabólicas, tais como aumento da glicemia basal e redução da sensibilidade periférica à insulina, demonstrado pela redução das inclinações das curvas glicêmicas após a administração da insulina.

Desta forma torna-se possível estudar os efeitos benéficos de substâncias presentes em nossa dieta e até mesmo a ação de fármacos que possam modificar as alterações malélicas associadas à obesidade. Diferentes constituintes do café têm sido sugeridos como potencialmente protetores em diferentes sistemas químicos e biológicos; a explicação estaria nos numerosos antioxidantes presentes na bebida, como o ácido clorogênico, melanoidina, que são produtos formados na reação de Maillard, e a cafeína. Nossa primeira análise consistiu na confirmação das características dos produtos utilizado neste estudo. Em análise cromatográfica observamos a presença de cafeína no café cafeinado e, como esperado, o mesmo não foi observado para o café descafeinado. Observou-se a presença de ácido clorogênico,

cafeico nas mesmas proporções em ambos extratos utilizados mostrando que o processo de descafeinização não altera a composição de outras substâncias com potencial bioativo. Embora não haja durante a rotulagem dos produtos comerciais utilizados neste estudo, detalhamento do processo de descafeinização, o mais utilizado atualmente é a aplicação de fluido supercrítico de CO<sub>2</sub>, que é um solvente natural e atóxico que consegue dissolver até 90% da cafeína do grão. Utiliza-se dióxido de carbono como fluido a pressões e temperaturas elevadas (acima das 72,8 atmosferas e 304,2 K). Durante este processo, os grãos verdes tornam-se marrons e ocorre significativa formação de melanoidinas (Chen *et al.*, 2011). Outros processos ainda em utilização no Brasil envolvem extrações com solventes, como diclorometano, clorofórmio, álcool, acetona, água e outros, sendo o diclorometano o mais utilizado (Inmetro, 2012). Em um trabalho recente o consumo de café cafeinado ou descafeinado esteve associado a um baixo risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Bhupathiraju *et al.*, 2012), corroborando a idéia de que o café, independente da presença ou ausência de cafeína, possa ter efeitos benéficos (Natella e Scaccini, 2012).

Sabe-se que o tecido adiposo possui a capacidade de produção de substâncias que participam da resposta inflamatória, as adipocinas. Chen *et al.* (2012) sugeriram que a presença de síndrome metabólica é proporcional aos níveis dos marcadores inflamatórios. Estas substâncias influenciam uma variedade de processos fisiológicos, entre eles, o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, a proteção vascular, a regulação da pressão e a coagulação sanguínea. Alterações na secreção de adipocinas, conseqüentes à hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, poderiam constituir situação relacionada à gênese do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações (Havel, 2004). Modificando a função dos adipócitos, as adipocinas podem atuar como um fator importante para a redução da sensibilidade tecidual à insulina e contribuir para a expansão do próprio tecido adiposo (Zeyda e Stulnig, 2007).

A intervenção por 2 semanas adicionais de café cafeinado não foi capaz de reduzir o peso corporal e a adiposidade nos camundongos obesos. Porém houve redução significativa da glicemia e da resistência à insulina nos grupos que receberam café cafeinado, coincidindo com o aumento da ingestão de café observado neste grupo.

Já os animais que ingeriram café descafeinado tiveram redução dos estoques de tecido adiposo epididimal, em contrapartida não houve redução de peso corporal e a quantidade de café ingerida foi 30% menor que os animais que ingeriram o café cafeinado.

Além disso, a ingestão por 2 semanas da bebida cafeinada observou-se aumento na produção da adiponectina pelo tecido adiposo, porém, a produção de leptina e TNF- $\alpha$  também estava aumentada para o mesmo grupo.

A adiponectina e a leptina são bem conhecidas por terem um papel importante no metabolismo dos lípidos e da glicose, bem como na regulação inflamatória (Kadowaki *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Morton *et al.*, 2007; Tschritter *et al.*, 2003; Wannamethee *et al.*, 2007). Estudos anteriores mostraram associação positiva do consumo de café com adiponectina (Imatoh *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2008). Em um ensaio clínico, os níveis de adiponectina aumentam após o consumo de oito xícaras de café por dia (Kempf *et al.*, 2010). Yamashita e colaboradores (2012) verificaram que a quantidade de consumo de café está associada positivamente com os níveis de adiponectina e inversamente com os níveis de leptina. A adiponectina é secretada principalmente pelo tecido adiposo visceral (Yarrow *et al.*, 2012). Em contraste à maioria das proteínas secretadas pelos adipócitos, a expressão de adiponectina diminui à medida que o tecido adiposo aumenta (Ouchi *et al.*, 1999) e sua concentração no soro encontra-se reduzida em indivíduos e roedores obesos ou resistentes à insulina. Foi sugerido que indivíduos com concentrações circulantes elevadas de adiponectina estão menos sujeitos ao desenvolvimento de diabetes tipo 2, quando comparados àqueles com concentrações reduzidas (Spranger *et al.*, 2003). Além disso, a adiponectina demonstra capacidade de inibir a expressão de moléculas de adesão, suprimindo, inclusive, a expressão de TNF- $\alpha$  induzida por essas moléculas de adesão (Goldstein e Scalia, 2004; Fantuzzi, 2005). Concentração plasmática reduzida de adiponectina também se associa significativamente com risco de doenças cardiovasculares em humanos (Funahashi *et al.*, 2004). Nesse sentido, a adiponectina circulante parece proteger o endotélio vascular contra a maioria dos processos envolvidos na etiopatogenia da aterosclerose. Em indivíduos que apresentaram uma redução nos teores circulantes da adipocina, foram observadas várias disfunções

metabólicas associadas. Grande parte dos indivíduos manifesta diabetes, hipertensão, dislipidemia e aterosclerose (Funahashi *et al.*, 2004), sugerindo a existência de associação entre hipoadiponectinemia e o estabelecimento da síndrome metabólica. Recentemente, verificou-se que a administração de adiponectina recombinante reduziu a glicemia e melhorou a resistência à insulina em modelos de ratos obesos ou diabéticos. O efeito da adiponectina na melhoria da sensibilidade à insulina é mediado, pelo menos em parte, por um aumento da oxidação de gordura por ativação da enzima adenina monofosfatoquinase, em músculos esqueléticos, semelhante à ação sinalizada pela própria insulina. A adiponectina também ativa essa enzima no fígado, resultando na redução da produção de glicose hepática (Yamauchi *et al.*, 2002). Em nossos resultados o aumento de adiponectina para os camundongos que ingeriram café cafeinado coincide com a redução de glicemia e na melhoria da sensibilidade à insulina, porém este aumento significativo desta adipocina não foi capaz de suprimir a expressão de TNF- $\alpha$  como citado na literatura (Fantuzzi, 2005).

Contrariamente, TNF- $\alpha$  e IL-6 são potentes inibidores da expressão e secreção de adiponectina. O TNF- $\alpha$  é um dos mediadores importantes da resposta inflamatória na obesidade (Ye *et al.*, 2012), representando um produto dos macrófagos relacionado a distúrbios metabólicos e processos crônicos de inflamação (Coppack, 2001; Ghorbani, *et al.*, 2012). Recentes descobertas sugerem que concentrações elevadas de TNF- $\alpha$  induzem danos cardíacos (Mariappan *et al.*, 2012). Investigações têm revelado que a expressão de TNF- $\alpha$  está aumentada na obesidade e diminui com a perda de peso corporal, melhorando a sensibilidade à insulina (Fruhbeck *et al.*, 2001). Há referências de que roedores tratados com dieta hiperlipídica apresentam aumento significativo da expressão de TNF- $\alpha$  e alteração da via de sinalização insulínica *in vivo* (Morin *et al.*, 1997). Anticorpos anti TNF- $\alpha$  melhoram a sensibilidade à insulina em roedores obesos, enquanto que animais deficientes de TNF- $\alpha$ , mesmo quando submetidos a dieta hiperlipídica, apresentam-se protegidos em relação ao desenvolvimento de obesidade com resistência à insulina. O aumento da expressão gênica de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo bem como a sua elevada concentração plasmática poderia induzir à obesidade, em parte, por alterar a liberação na circulação de outras adipocinas, como a adiponectina. O aumento de TNF- $\alpha$  para o grupo que ingeriu café cafeinado após 2 semanas de

intervenção com café, gerou uma contradição à melhora observada na resistência a insulina e a glicemia basal para o mesmo grupo.

Outra adipocina pro-inflamatória que desempenha papel importante na obesidade é a leptina. Seus teores circulantes são proporcionais à massa adiposa, apresentando-se elevados em animais obesos (Halaas *et al.*, 1995). Nesse sentido, verificou-se que a ocorrência de mutações nos receptores de leptina imprime, tanto em roedores como em humanos, resistência aos efeitos do controle da ingestão de alimentos atribuídos a essa adipocina. Adicionalmente, a verificação da presença da proteína em animais e indivíduos sem sobrepeso, estendeu o reconhecimento da existência de uma importante função fisiológica da leptina no controle do balanço energético, da massa corporal bem como da função neuroendócrina (Ahima, 2000). Interagindo com diferentes sistemas neuroendócrinos centrais, envolvidos no controle da ingestão de alimentos, incluindo, por exemplo, o neuropeptídeo Y (NPY), sintetizado no núcleo arqueado do hipotálamo, que constitui um potente estimulador da ingestão de alimentos (Campfield *et al.*, 1995). A deficiência ou resistência à leptina causam superexpressão de NPY hipotalâmico, implicado na hiperfagia da obesidade (Schwartz *et al.*, 1996). Outro sistema regulador da homeostase energética envolve a insulina hipotalâmica. Concentração fisiológica de leptina inibe a secreção de insulina em ratos, cujo efeito parece ser mediado indiretamente via ação do sistema nervoso central (Muzumdar *et al.*, 2003). Tanto deficiência quanto resistência à leptina, em roedores obesos, está acompanhada de severa resistência à insulina. Com a intervenção de café cafeinado por 2 semanas, verificou-se um aumento de leptina nos animais, em contrapartida houve melhora a resistência a insulina para este grupo e não observamos aumento nem redução de ingestão alimentar.

O fato de termos observado uma melhora metabólica nos animais que ingeriram o café cafeinado pode ter uma explicação em um trabalho conduzido em população não-diabética, com IMC normal e multiétnica, cuja conclusão aponta para o café cafeinado interferindo na resistência à insulina, mas causando reações não benéficas na glicemia pós-prandial e o café descafeinado promovendo um melhor funcionamento/resposta da célula beta pancreática (Loopstra-Masters *et al.*, 2011). O modelo experimental de obesidade que utilizamos no protocolo de 2 semanas (10 semanas de dieta

hiperlipídica) tem como principal aspecto a resistência dos tecidos periféricos à insulina associada à hiperinsulinemia, o que poderia justificar a ação benéfica da bebida cafeinada.

Em 8 semanas adicionais de ingestão de café não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo, mas o consumo de café cafeinado também foi superior ao consumo de café descafeinado neste protocolo.

Atualmente a síndrome metabólica também está diretamente relacionada ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (Mulhall *et al.*, 2002). Esta engloba um amplo espectro de doenças que abrange desde a esteatose hepática simples sem sinais inflamatórios até manifestações mais severas como a esteatohepatite não alcoólica e a cirrose hepática (Angulo e Lindor, 2002). Neste estudo, a presença de esteatose hepática foi observada em camundongos obesos. Curiosamente houve melhora significativa da esteatose nos animais com intervenção de café cafeinado e também com café descafeinado para os dois protocolos experimentais.

O papel das adipocitocinas ou citocinas na fisiopatologia da NAFLD tem sido amplamente discutido, podendo contribuir como um fator chave no fenômeno de resistência insulínica e aumento da sobrecarga de lipídeos hepáticos. Os níveis séricos e no tecido hepático de TNF- $\alpha$  tem apresentado resultados discrepantes em vários estudos, talvez porque a meia vida desta citocina é relativamente curta e seus níveis circulantes sejam baixos, o que pode não refletir as mudanças ocorridas no tecido hepático ou ainda a baixa sensibilidade dos métodos utilizados (Vinson *et al.*, 2012). Em análise de biópsias de fígado os níveis de TNF- $\alpha$  não aumentaram com a esteatose e não diminuíram com a intervenção de café. Contrariamente, a IL-10 sendo uma citocina antiinflamatória central na contra regulação da família Th2, inibe a síntese de diversos mediadores Th1, podendo assim ter propriedades antifibróticas em modelos específicos de injúrias hepáticas (Reng *et al.*, 2009). Níveis circulantes baixos foram revelados em pacientes obesos, e o tratamento com este agente previne indução lipídica de resistência insulínica (Hong *et al.*, 2009). Desta forma, avaliou-se os níveis de IL-10 em biópsias de fígado, onde não observamos redução da citocina nos animais obesos e não observamos aumento da mesma com a intervenção de café.

A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida, a iNOS foi avaliada no fígado dos animais. A iNOS é induzida por uma variedade de estímulos inflamatórios e sintetiza elevados níveis de óxido nítrico, conduzindo à geração de espécies reativas de nitrogênio (Mabalirajan *et al.*, 2010). O estresse nitrosativo leva a modificações covalentes e inibição de várias proteínas fundamentais na sinalização da insulina (Carvalho-Filho *et al.*, 2006; Pilon *et al.*, 2010). Estudos mostram que o bloqueio crônico de óxido nítrico, através do uso de L-NAME, em camundongos obesos ou a deleção do gene da iNOS diminui a adiposidade induzida pela dieta hiperlipídica, reduz a inflamação do tecido adiposo e melhora a sinalização da insulina no músculo esquelético, sugerindo que o óxido nítrico desempenha papel modulatório no desenvolvimento da obesidade e resistência a insulina (Tsuchiya *et al.*, 2007). Esta expressão encontra-se elevada na obesidade; camundongos com mutações no gene da iNOS desenvolvem menos resistência a insulina, associada a obesidade do que seus controles com gene intacto da iNOS (Rui *et al.*, 2002), justificando o aumento da expressão da iNOS observada nos animais mantidos em dieta hiperlipídica por 10 e 16 semanas.

Em estudo *in vivo*, a indução de iNOS foi observada em dois modelos de resistência à insulina, na obesidade induzida por dieta hiperlipídica e no camundongo diabético ob/ob (obesidade induzida por deficiência em leptina), onde, a sinalização da insulina pela via IR/IRS-1/Akt estava diminuída, e os níveis de S-nitrosação dessas proteínas encontravam-se aumentados no músculo esquelético. Determinou-se, assim, que a S-nitrosação de proteínas envolvidas na transmissão do sinal da insulina seria um novo mecanismo molecular de resistência à insulina associado à indução da iNOS. Ao descobrir tais conexões, imaginou-se uma estratégia de ação: reduzir a resistência à insulina bloqueando a ação da iNOS, caminho que se mostrou promissor em estudos preliminares (Carvalho-Filho, 2006). Outro estudo investigou se a resistência à insulina, mediada por S-nitrosação de proteínas envolvidas nos passos iniciais da via de transdução do sinal de insulina, pode ser revertida pelo exercício físico agudo, constatou-se que uma única sessão de exercício, pode reverter a tolerância à insulina induzida pela dieta em ratos obesos, melhorando a sinalização da insulina, em paralelo com uma diminuição na expressão de iNOS (Pauli *et al.*, 2008). Com a intervenção com

café cafeinado observamos redução dessa expressão em ambos protocolos, porém somente observamos redução de iNOS para o café descafeinado no protocolo de 2 semanas de ingestão. Embora não tenhamos observado melhora da resistência a insulina no protocolo de longo prazo, esta inibição pode estar associada a melhora da resistência insulina observada com a ingestão de café cafeinado a curto prazo, como citado na literatura.

Dentre as diversas substâncias presentes na composição química do café, além dos nutrientes, muitos estudos têm verificado a influência de seus constituintes na saúde, principalmente a cafeína com a elevação da pressão arterial; os dispenos cafestol e o kahweol com a dislipidemia; e os ácidos clorogênicos com a proteção cardiovascular, por suas propriedades antioxidantes (Lima *et al.*, 2010). Sabe-se que a cafeína é conhecida por inibir fosfodiesterases, a mobilização de cálcio intracelular, e que atua como um antagonista nos receptores de adenosina, os quais podem alterar potencialmente o óxido nítrico. Em estudo cruzado, indivíduos receberam café cafeinado e descafeinado, e/ou cafeína, onde os níveis de cafeína no soro foram medidos após uma hora e cada hora por quatro horas. Neste estudo, o café descafeinado não teve nenhum efeito sobre os níveis de óxido nítrico exalável, sugerindo que a cafeína é o agente principal que causa diminuição de óxido nítrico exalável, isto pode ser explicado pelo antagonismo do receptor de adenosina, ou pela alteração dos níveis de GMPc (Bruce *et al.*, 2002; Warke *et al.*, 2012). Os efeitos de kahweol sobre a produção e a expressão de iNOS foi avaliada em macrófagos ativado por lipopolissacarídeo (LPS), onde a produção de nitrito induzida por LPS foi marcadamente reduzida de uma forma dose-dependente. Além disso, o kahweol suprimiu a expressão de iNOS, através da inibição de NF-kappaB (Kim *et al.*, 2004).

Modelos *in vitro* vem sendo estabelecidos para estudos celulares e moleculares afim de atender às dificuldades em estudar adipogênese *in vivo*, dentre esses modelos a linhagem celular 3T3-L1 é a mais utilizada. Essa linhagem de fibroblastos quando cultivada em meio adequado pode se diferenciar em pré-adipócitos e depois adquirir um fenótipo de adipócito maduro, depositando triglicerídeos em vesículas lipídicas no seu citoplasma e expressando genes que também são expressos por adipócitos maduros *in vivo* (Atiar *et al.*, 2008). Ao estimular a linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1 com café

cafeinado e descafeinado, ácido cafeico e ferúlico avaliamos a diferenciação de adipócitos pelo ensaio de Oil-red. Em nossos resultados a presença do ácido cafeico e ferúlico e dos extratos de café cafeinado e descafeinado, não foram capazes de inibir a diferenciação dos adipócitos *in vitro*, ao contrário, observou-se nas doses 0,02 mM do ácido cafeico, 1000 mg/ml do café cafeinado e 100 mg/ml do café descafeinado, o aumento da adipogênese. Não há relatos prévios na literatura sobre os efeitos do café, do ácido cafeico e ferúlico na diferenciação de adipócitos *in vitro*. A escolha destes compostos neste trabalho se deve a biodisponibilidade dos mesmos após a ingestão de café (Renouf *et al.*, 2010). Experimentos adicionais deverão ser conduzidos para melhor compreensão deste resultado. No entanto, vale ressaltar que não se observaram alterações no peso corporal dos animais que ingeriram café nos experimentos *in vivo*.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente trabalho demonstraram que a ingestão de café cafeinado por 2 semanas melhora o controle glicêmico, a sinalização da insulina e aumenta a produção de adiponectina, apesar de não reduzir o peso corporal e a adiposidade e que o café descafeinado é capaz de reduzir a adiposidade em camundongos obesos mantidos por 10 semanas em dieta hiperlipídica. Após 16 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica associada a 8 semanas de consumo de café não observamos o mesmo efeito benéfico nas alterações inflamatórias no tecido adiposo. No fígado, verificamos a redução da iNOS e melhora na esteatose hepática em ambos protocolos experimentais utilizados com o café cafeinado. O café descafeinado foi capaz somente de melhorar a esteatose hepática e a expressão de iNOS no protocolo de 2 semanas. Nossos dados corroboram o descrito em estudos epidemiológicos que sugerem que o café cafeinado, mas não o descafeinado, atua melhorando a resistência à insulina. No entanto, podemos sugerir que o consumo em longo prazo associado à progressão das alterações deletérias associadas à obesidade não foi tão eficaz como o consumo de curto prazo em fase mais inicial de tais alterações.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeso. OMS: Obesidade Mata 2,8 milhões por Ano. Maio. 2012. [Acesso em: 20 jun. 2012]. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/lenoticia/876/oms:-obesidade-mata-28-milh%C3%B5es-por-ano.shtml>>.

Abic. Associação Brasileira da Indústria de Café Solúvel. **Café**. [Acesso em: 20 jun. 2012]. Disponível em: <http://www.abic.com.br/estatisticas.html>

Abrahão, S. A.; Pereira, R.G.F.A.; Lima, A.R.; Ferreira, E.B.; Malta, M.R. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesq. Agropec. Bras**, 43 (12): 1799-1804, 2008.

\_\_\_\_\_, Pereira, R.G.F.A.; Sousa, R.V.; Lima, A.R. Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de café bebida mole. **Pesq. Agropec. Bras.**, 47(1): 127-133, 2012.

Ahima, R.S.; Flier, J.S. Leptin. **Ann Rev Physiol**, 62:413-37, 2000.

Amado, T. C. F.; Arruda, I. K. G. Hipertensão arterial no idoso e fatores de risco associados. **Rev. Bras. Nutr. Clin**, 19( 2): 94-99, 2004.

Arciero, PJ, Gardner AW, Calles-Escandon J, Benowitz NL, Poehlmen ET. Effects of caffeine ingestion on NE kinetics, fat oxidation, and energy expenditure in younger and older men. **Am J Physiol**, 268(6 Pt 1): E1192-1198, 1995.

Ashihara, H.; Crozier, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, 6 (9): 407-413, 2001.

Atiar Rahman M.; Kumar S. G.; Lee S. H.; Hwang H. S.; Kim H. A.; Yun J. W. Proteome analysis for 3T3-L1 adipocyte differentiation. **J Microbiol Biotechnol**, 18(12):1895-902, 2008.

Balstad, T.R.; Carlsen, H.; Myhrstad, M.C.; Kolberg, M.; Reiersen, H.; Gilen, L.; Ebihara K, Paur.; Blomhoff, R. Coffee, broccoli and spices are strong inducers of electrophile response element-dependent transcription *in vitro* and *in vivo* - studies in electrophile response element transgenic mice. **Mol Nutr Food Res**, 55(2):185-97, 2011.

Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Rev Nutr**, 12(2): 123-130, 1999.

Birerdinc, A.; Stepanova, M.; Pawloski, L.; Younossi, Z.M. Caffeine is protective in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Aliment Pharmacol Ther**, 35(1):76-82, 2012.

Bruce, C.; Yates, D.H.; Thomas, P.S. Caffeine decreases exhaled nitric oxide. **Thorax**, 57:361-363, 2002.

Brupathiraju, S.N.; Pan, A.; Malik, V.S.; Manson, J.E.; Willett, W.C.; van Dam, R.M.; Hu, F.B. Caffeinated and caffeine-free beverages and risk of type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr**, 2012.

Campfield, L.A.; Smith, F.J.; Guisez, Y.; Devos, R.; Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, 269(5223): 546-9, 1995.

Carvalho-Filho, M.A.; Ueno, M.; Carvalheira, J.B.; Velloso, L.A.; Saad, M.J. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 291(3):476-82, 2006.

Cavalcante, J. W. S.; Santos, P.R.M.; Menezes, M.G.F.; Marques, H.O.; Cavalcante, L.P.; Pacheco, W.S. Influência da cafeína no comportamento da pressão arterial e da agregação plaquetária. **Arq. Bras. Cardiol**, 75( 2): 97-101, 2000.

Chen, S-J.; Yen, C-H.; Huang, Y-C.; Lee, B-J.; Hsia, S.; Lin, P.T. Relationships between Inflammation, Adiponectin, and Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. **PLoS One**, 7(9):e45693, 2012.

Chen, Y.; Brown, P.H.; Hu, K.; Black, R.M.; Prior, R.L.; Ou, B.; Chu, Y-F. Supercritical CO<sub>2</sub> Decaffeination of Unroasted Coffee Beans Produces Melanoidins with Distinct NF- $\kappa$ B Inhibitory Activity. **Journal of Food Science**, 76(7), 2011.

Cho, A.-S.; Jeon, S.-M.; Kim, M.-J.; Yeo, J.; Seo, K.; Choi, M.-S.; Lee, M.K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, 48: 937-943, 2010.

Chu, C.K.; Ma, L.; Olgen, S.; Pierra, C.; Du, J.; Gumina, G.; Gullen, E.; Cheng, Y.C.; Schinazi, R.F. Synthesis and antiviral activity of oxaselenolane nucleosides. **J. Med Chem**, 43(21): 3906-12, 2000.

Clavijo, M.A; Camargo, D.G; Alegría, C.G. Adipogénesis *in vitro* de células 3T3-L1. **Rev.Fac.Med**, 15(2), 2007.

Clifford, M. N.; Willson, K.C. The composition of green and roasted coffee beans. in coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage. **Chapman and Hall**:London, 1985.

Contos, M.J.; Sanyal, A.J. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. **Adv Anat Pathol**, 9: 37- 51, 2002.

Coppack, S.W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proc Nutr Soc**. 60(3):349-56, 2001.

Da Costa, L.A.; Arora, P.; García-Bailo, B.; Karmali, M.; El-Sohemy, A.; Badawi, A. The association between obesity, cardiometabolic disease biomarkers, and innate immunity-related inflammation in Canadian adults. **Diabetes Metab Syndr Obes**, 5:347-55, 2012.

Day, C.P.; James, O.F.W. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? **Gastroenterol**, 114: 842-4, 1998.

DeFronzo, R.A.; Ferrannini, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, 14:173-94, 1991.

De Souza, C. T.; Araujo, E. P.; Bordin, S.; Ashimine, R.; Zollner, R. L.; Boschero, A. C.; Saad, M. J.; Velloso, L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, 146(10):4192– 4199, 2005.

Duncan, A.J., Heales, S.J.R. Nitric oxide and neurological disorders. **Molecular Aspects of Medicine**, 26: 67-96, 2005.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, 115(5):911-9, 2005.

Fernández-Sánchez, D.; Jorge M. Lobo, J.M.; Abellán, P.; Millán, A. How to identify future sampling areas when information is biased and scarce: An example using predictive models for species richness of Iberian water beetles. **J Nature Conservation**, 19: 54–59, 2011.

Ferreira, A.L.A.; Correa, C.R.; Freire, C.M.M.; Moreira, P.L.; Berchieri-Ronchi, C.B.; Reis, R.A.S.; Nogueira, C.R. Metabolic syndrome: updated diagnostic criteria and impact of oxidative stress on metabolic syndrome pathogenesis. **Rev. Bras. Clin. Med.**, 9(1):54-61, 2011.

Fonseca-Alaniz, M.H.; Takada, J.; Alonso-Vale, M.I.C.; Lima, F.B. Tecido Adiposo e Regulação Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 50(2), 2006.

Frühbeck, G.; Gómez-Ambrosi, J.; Salvador, J. Leptin-induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes. **Faseb J**, 15(2):333-40, 2001.

\_\_\_\_\_; Gomez-Ambrosi, J.; Muruzabal, F.J.; Burrell, M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 280(6):E827-47, 2001.

Fukushima, Y.; Kasuga, M.; Nakao, K.; Shimomura, I.; Matsuzawa, Y. Effects of coffee on inflammatory cytokine gene expression in mice fed high-fat diets. **J. Agric. Food Chem**, 57(23): 11100-5, 2009.

Funahashi, T.; Matsuzawa, Y.; Kihara, S. Adiponectin as a potential key player in metabolic syndrome Insights into atherosclerosis, diabetes and cancer. **Int Congress Series**, 1262:368-71, 2004.

Gallus, S.; Tramacere, I.; Tavani, A.; Bosetti, C.; Bertuccio, P.; Negri, E.; La Vecchia, C. Coffee, black tea and risk of gastric cancer. **Cancer Causes and Control**, 20 (8): 1-6, 2009.

Glei, M.; Kirmse, A.; Habermann, N.; Persin, C.; Pool-Zobel, B.L. Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. **Nutr Cancer**, 256(2):182-92, 2006.

Greer, J.; McCalla, G.; Vassileva, J.; Deters, R.; Bull, S.; Kettel, L. (2001) Lessons Learned in Deploying a Multi-Agent Learning Support System: The I-Help Experience. **Proceedings International AI and Education Conference**, 410-421, 2001.

Godoy-Matos, A. F. **Síndrome metabólica**. São Paulo: Atheneu, 2006.

Goldstein, B.J.; Scalia, R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. **J Clin Endocrinol Metab**, 89(6):2563-8, 2004.

Gonthier, P.; Nicolotti, G.; Cellerino, G.P. Effectiveness of some chemical treatments against *Heterobasidion* spp. in spruce forests and their ecological impact. **J Plant Pathology**, 85 (4), 291-291, 2003.

Ghorbani, M.; Ardestani, M.S.; Gigloo, S.H.; Cohan, R.A.; Inanlou, D.N., Ghorbani, P. Anti Diabetic effect of CL 316,243 (A b3-Adrenergic Agonist) by Down Regulation of Tumour Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) Expression. **PLoS ONE**, 7(10): e45874, 2012.

Giri, A.; Sturgeon, S. R.; Luisi, N.; Bertone-Johnson, E.; Balasubramanian, R.; Reeves, K.W. Caffeinated Coffee, Decaffeinated Coffee and Endometrial Cancer Risk: A Prospective Cohort Study among US Postmenopausal Women. **Nutrients**, 3: 937-950, 2011.

Guzik, T.J.; Mangalat, D.; Korbut, R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? **J Physiol Pharmacol**, 57:505-28, 2006.

Halaas, J.L.; Gajiwala, K.S.; Maffei, M.; Cohen, S.L.; Chait, B.T.; Rabinowitz, D.; Lallone, R.L.; Burley, S.K.; Friedman, J.M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, 269(5223):543-6, 1995.

Havel, P.J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/ lipid metabolism. **Diabetes**, 53(1): 143-51, 2004.

Hong, E.G.; Ko, H.J.; Cho, Y.R.; Kim, H.J.; Ma, Z.; Yu, T.Y.; Friedline, R.H.; Kurt-Jones, E.; Finberg, R.; Fischer, M.A.; Granger, E.L.; Norbury, C.C.; Hauschka, S.D.; Philbrick, W.M.; Lee, C.G.; Elias J.A.; Kim, J.K. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. **Diabetes**, 58(11): 2525-35, 2009.

Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S.; Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259:87-91, 1993.

Imatoh, T.; Tanihara, S.; Miyazaki, M.; Momose, Y.; Uryu, Y.; Une, H. Coffee consumption but not green tea consumption is associated with adiponectin levels in Japanese males. **Eur J Nutr**, **50**: 279–284, 2011.

Inmetro. Programa de Análise de Produtos: **Relatório sobre Análise do Teor de Cafeína em Produtos Descafeinados**. Rio de Janeiro: mai, 2012.

Juman, S.; Yasui, N.; Okuda, H.; Ueda, A.; Negishi, H.; Miki, T.; Ikeda, K. Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits Differentiation to Adipocytes in 3T3-L1 Mouse Fibroblasts. **Biol. Pharm. Bull**, 33(9): 1484-1488, 2010.

Kadowaki, T.; Yamauchi, T.; Kubota, N.; Hara, K.; Ueki, K.; Tobe, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**, 116: 1784–1792, 2006.

Kalthoff, S.; Ehmer, U.; Freiberg, N.; Manns, M.P.; Strassburg, C.P. Coffee induces expression of glucuronosyltransferases by the aryl hydrocarbon receptor and Nrf2 in liver and stomach. **Gastroenterology**, 139(5):1699-710, 2010.

Kawachi, I.; Colditz, G.A.; Stone, C.B. Does coffee drinking increase the risk of coronary heart disease? Results from a metaanalysis. **Br. Heart J**, 72: 269-275, 1994.

Kempf, K.; Herder, C.; Erlund, I.; Kolb, H.; Martin, S.; Carstensen, M.; Koenig, W.; Sundvall, J.; Bidel, S.; Kuha, S.; and Tuomilehto, J. Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial<sup>1–3</sup>. **Am J Clin Nutr**, 91(4): 950-7, 2010.

Kim, J.Y.; Jung, K.S.; Lee, K.J.; Na, H.K.; Chun, H.K.; Kho, Y.H.; Jeong, H.G. The coffee diterpene kahweol suppresses the inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **Cancer Lett**, 213(2):147-54, 2004.

Kim, S.G.; Kim, H.Y.; Seo, J.A.; Lee, K.W.; Oh, J.H.; Kim, N.H.; Choi, K.M.; Baik, S.H.; Choi, D.S. Relationship between serum adiponectin concentration, pulse wave velocity and nonalcoholic fatty liver disease. **Eur J Endocrinol**, 152: 225–231, 2005.

Klatsky, A. L.; Armstrong, M. A. Alcohol, smoking, coffee, and cirrhosis. **American Journal of Epidemiology**, 136 (10): 1248-1257, 1992.

Lallemand, L.A.; Zubieta, C.; Lee, S.G.; Wang, Y.; Acajjaoui, S.; Timmins, J.; McSweeney, S.; Jez, J.M.; McCarthy, J.G.; McCarthy, A.A. A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee. **Plant Physiology**, 160(1): 249–260, 2012.

Lee, K.A.; Chae, J.; Shim, J.H. Natural diterpenes from coffee, cafestol and kahweol induce apoptosis through regulation of specificity protein 1 expression in human malignant pleural mesothelioma. **J Biomed Sci**, 26;19:60, 2012.

Li, S.; Shin, H.J.; Ding, E.L.; Van Dam, R.M. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, 302: 179–188, 2009.

Lima, A.R.; Pereira, R.G.F.A.; e Abrahão, S.A. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Quim. Nova**, 33(1): 20-24, 2010.

Liu, Y.; Wang, D.; Zhang, D.; Lv, Y.; Wei, Y.; Wu, W.; Zhou, F.; Tang, M.; Mao, T.; Li, M.; Ji, B. Inhibitory effect of blueberry polyphenolic compounds on oleic acid-induced hepatic steatosis *in vitro*. **J Agric Food Chem**, 59(22):12254-63, 2011.

Liyana-Pathirana, C.M.; Shahidi, F. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. **J. Agric Food Chem**, 54(4):1256-64, 2006.

Lombardo, E.; Van Roomen, C.P.A.A.; Van Puijvelde, G.H.; Ottenhoff, R.; Van Eijk, M.; Aten, J.; Kuiper, J.; Overkleeft, H.S.; Groen, A.K.; Verhoeven, A.J.; Aerts, J.M.F.G.; Bietrix, F. Correction of Liver Steatosis by a Hydrophobic Iminosugar Modulating Glycosphingolipids Metabolism. **PLoS ONE**, 7(10): e38520, 2012.

Loopstra-Masters, R.C.; Liese, A.D.; Haffner, S.M.; Wagenknecht, L.E.; Hanley, A.J. Associations between the intake of caffeinated and decaffeinated coffee and measures of insulin sensitivity and beta cell function. **Diabetologia**, 54:320–328, 2011.

Lopez-Garcia, E.; Rodriguez-Artalejo, F.; Rexrode, K.M.; Logroscino, G.; Hu, F.B.; van Dam, R.M. Coffee consumption and risk of stroke in women. **Circulation**, 119 (8): 1116-1123, 2009.

Lubrano, C.; Saponara, M.; Barbaro, G.; Specchia, P.; Addessi, E.; Costantini, D.; Tenuta, M.; Di Lorenzo, G.; Genovesi, G.; Donini, L.M.; Lenzi, A.; Gnassi, L. Relationships between Body Fat Distribution, Epicardial Fat and Obstructive Sleep Apnea in Obese Patients with and without Metabolic Syndrome. **PLoS ONE**, 7(10): e47059, 2012.

Luximon-Ramma, A.; Bahorun, T. Soobrattee, M.A.; Aruoma, O.I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **J. Agric Food Chem**, 50(18): 5042-7, 2002.

Mabalirajan, U.; Ahmad, T.; Leishangthem G.D.; Joseph, D.A.; Dinda, A.K.; Agrawal, A.; Ghosh, B. Beneficial effects of high dose of L-arginine on airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a murine model of asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 125(3): 625-35, 2010.

Machado, L.M.M.; Costa, T.H.M.; Silva, E.F.; Dórea, J.G. Association of Moderate Coffee Intake with Self-Reported Diabetes among Urban Brazilians. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 8, 3216-3231, 2011.

Mariappan, N.; Elks, C.M.; Haque, M.; Francis, J. Interaction of TNF with Angiotensin II Contributes to Mitochondrial Oxidative Stress and Cardiac Damage in Rats. **PLoS ONE**, 7(10): e46568, 2012.

Martin, R.M.; Patel, R.; Zinovik, A.; Kramer, M.S.; Oken, E.; Vilchuck, K.; Bogdanovich, N.; Sergeichick, N.; Gunnarsson, R.; Grufman, L.; Foo, Y.; Gusina, N. Filter Paper Blood

Spot Enzyme Linked Immunoassay for Insulin and Application in the Evaluation of Determinants of Child Insulin Resistance. **PLoS ONE**, 7(10): e46752, 2012.

McCullough, A.J. Update on nonalcoholic fatty liver disease. **J Clinic Gastroenterol**, 34: 255-62, 2002.

Meztu, L.; Andueza, S.; Ibañez, C.; Paz de Peña, M.; Bello, J.; Cid, C. Multivariate methods for characterization and classification of espresso coffees from different botanical varieties and types of roast by foam, taste, and mouthfeel. **J. Agric. Food Chem**, 49 (10-11): 4743-4747, 2001.

Mishra, M.K.; Slater, A. Recent Advances in the Genetic Transformation of Coffee. *Biotechnology Research International*. **AgBiotechNet**, vol. 2012, Article ID 580857, 17 pages, 2012.

Mooler, P.; Loft, S. Dietary antioxidant and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. **Free Radic Biol Med**, 41(3): 388-415, 2006.

Morais, S.A.; Aquino, F.J.T.; Nascimento, P.M.; Nascimento, E.A.; Chang, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café Conillon submetido a diferentes graus de torra. **Quim. Nova**, 32(2): 327-331, 2009.

Morin, C.L.; Eckel, R.H.; Marcel, T.; Pagliassotti, M.J. High fat diets elevate adipose tissue derived tumor necrosis factor-alpha activity. **Endocrinology**, 138(11):4665-71, 1997.

Morton, G.J. Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. **J Physiol**, 583: 437-443, 2007.

Mosimann, A.L.P.; Wilhelm-Filho, D.; Da Silva, E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol. **BioFactors**, 26(1): 59-70, 2006.

Mulhall, B.P.; Ong, J.P.; Younossi, Z.M. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. **J. Gastroenterol. Hepatol**, 17: 1136-1143, 2002.

Munkonda, M.N.; Lapointe, M.; Miegueu, P.; Roy, C.; Gauvreau, D.; Richard, D.; Cianflone, K. Recombinant Acylation Stimulating Protein Administration to C32/2 Mice Increases Insulin Resistance via Adipocyte Inflammatory Mechanisms. **PLoS ONE**, 7(10): e46883, 2012.

Murase, T.; Misawa, K.; Minegishi, Y. Aoki, M. Ominami, H.; Suzuki, Y.; Shibuya, Y.; Hase, T. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. **AJP-Endocrinol. Metab**, 300: 122-133, 2011.

Muzumdar, R.; Ma, X.; Yang, X.; Atzmon, G.; Bernstein, J.; Karkanias, G.; Barzilai, N. Physiologic effect of leptin on insulin secretion is mediated mainly through central mechanisms. **FASEB J**, 17(9):1130-2, 2003.

Natella, F.; Scaccini, C. Role of coffee in modulation of diabetes risk. **Nutrition Reviews**, 70(4): 207–217, 2012.

Nawrot, P.; Jordan, S.; Eastwood, J.; Rotstein, J.; Hugenholtz, A.; Feeley, M. Effects of caffeine on human health. **Food Addit. Contam**, 20, 1-30, 2003.

Nehlig, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 23 (4): 563-576, 1999.

Nogueira, M.; Trugo, L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciênc. Tecnol. Alim**, 3(2): 296-299, 2003.

Nurminen, M.L.; Niittynen, L.; Korpela, R.; Vapaatalo, H. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. **Eur. J. Clin. Nutr**, 53, 831-839, 1999.

Oleaga, C.; Ciudad, C.J.; No'e, V.; Izquierdo-Pulido, M. Coffee Polyphenols Change the Expression of STAT5B and ATF-2 Modifying Cyclin D1 Levels in Cancer Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Article ID 390385, 17 pages, 2012.

Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y.; Maeda, K.; Kuriyama, H.; Okamoto, Y.; Hotta, K.; Nishida, M.; Takahashi, M.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**, 100(25): 2473-6, 1999.

Pauli, J. R.; Ropelle, E. R.; Cintra, D. E.; Carvalho-Filho, M. A.; Moraes, J. C.; De Souza, C. T.; Velloso, L. A.; Carnevali, J. B.; Saad, M. J. Acute physical exercise reverses S-nitrosylation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **J. Physiol**, 586(2): 659-71, 2008.

Pereda, J.; Perez, S.; Escobar, J.; Arduini, A.; Asensi, M.; Serviddio, G.; Sabater, L.; Aparisi, L.; Sastre, J. Obese Rats Exhibit High Levels of Fat Necrosis and Isoprostanes in Taurocholate-Induced Acute Pancreatitis. **PLoS ONE**, 7(9): e44383, 2012.

Pereira, F.; Lancha-Junior. Obesidade: Causas e Conseqüências. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 47(2), 2003.

Pilon, G.; Charbonneau, A.; White, P.J.; Dallaire, P.; Perreault, M.; Kapur, S.; Marette, A. Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOOO- induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. **PLoS One**, 28;5(12): e15912, 2010.

Queiroz, J.C.F; Alonso-Vale, M.I.C; Curi, R; Lima, F.B. Control of adipogenesis by fatty acids. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 53(5), 2009.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J.; Henderson, G. **Farmacologia**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

Reaven, G.M. Syndrome X: 6 years later. **J Intern Med**, 736:13-22, 1994.

Reng, X.D.; Dai, L.L.; Huang, C.Q.; He, C.M.; Yang, B.; Chen, L.J. Relationship between anti-fibrotic effect of Panax notoginseng saponins and serum cytokines in rat hepatic fibrosis. **Biochem Biophys Res Commun**, 388(1): 31-4, 2009.

Renouf, M.; Guy, P.; Marmet, C.; Longet, K.; Fraering, AL.; Moulin, J.; Barron, D.; Dionisi, F. Cavin, C.; Steiling, H.; Williamson, G. Plasma appearance and correlation between coffee and green tea metabolites in human subjects. **Br. J. Nutr.** 104(11):1635-40, 2010.

\_\_\_\_\_; Guy, P. A.; Marmet, C.; Fraering, A-L.; Longet, K.; Moulin, J.; Enslin, M.; Barron, D.; Dionisi, F.; Cavin, C.; Williamson, G.; and Steiling, H. Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption: Small intestine and colon are key sites for coffee metabolism. *Mol Nutr Food Res.* 54(6): 760-6, 2010.

Rhodes, M.J.C. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. **Proceedings of the Nutrition Society**, 55: 371-397, 1996.

Ruhl, C. E.; Everhart, J. E. Coffee and tea consumption are associated with a lower incidence of chronic liver disease in the United States. **Gastroenterology**, 129(6):1928-36, 2005.

Rui, L.; Yuan, M.; Frantz, D.; Shoelson, S.; White, M. F. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. **J Biol Chem**, 277(44):42394-8, 2002.

Sagin, F.G., Sozmen, E.Y., Ersoz, B., Mentis, G. Link Between Monoamine Oxidase and Nitric Oxide. **NeuroToxicology**, 25, 2004.

Santos, M.A.; Chalfoun, S.M.; Pimenta, C.J. Influência do processamento por via úmida e tipos de secagem sobre a composição, físico-química e química do café (*Coffea arabica* L). **Ciênc. Agrotec**, 33(1): 213 218, 2009.

Scandalio, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defense (review). **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, 38: 995-1014, 2005.

Schwartz, M.W.; Baskin, D.G.; Bukowski, T.R.; Kuijper, J.L.; Foster, D.; Lasser, G.; Schwartz, M.W.; Baskin, D.G.; Prunkard, D.E.; Porte, D. Jr.; Woods, S.C.; Seeley, R.J.; Weigle, D.S. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes**, 45(4):531-5, 1996.

Shahidi, F.; Wanasundara, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 32(1):67-103, 1992.

Shami, N.J.I.E.; Moreira, E.A.M. Lycopene as antioxidant agent. **Rev Nutr**, 17(2): 227-236, 2004.

Shimoda, H.; Seki, E.; Aitani, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 6:9, 2006.

Sikorski, C.; Luppá, M.; Brahler, E.; König, H.H.; Riedel-Heller, S.G. Obese Children, Adults and Senior Citizens in the Eyes of the General Public: Results of a Representative Study on Stigma and Causation of Obesity. **PLoS ONE**, 7(10): e46924, 2012.

Sin, C.W.M.; Ho, J.S.C.; Chung, J.W.Y. Systematic review on the effectiveness of caffeine abstinence on the quality of sleep. **Journal of Clinical Nursing**, 18 (1): 13-21, 2009.

Soares, S.E. Phenolic acids as antioxidants. **Rev Nutr**, 15(1): 71-81, 2002.

Soobrattee, M.A.; Neergheen, V. S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions **Mutation Research**, 579: 200-213, 2005.

Spranger, J.; Kroke, A.; Mohlig, M.; Bergmann, M.M.; Ristow, M.; Boeing, H.; Pfeiffer, A.F. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, 361(9353):226-8, 2003.

Takami, H.; Nakamoto, M.; Uemura, H.; Katsuura, S.; Yamaguchi, M.; Hiyoshi, M.; Sawachika, F.; Juta, T.; Arisawa, K. Inverse Correlation Between Coffee Consumption and Prevalence of Metabolic Syndrome: Baseline Survey of the Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study in Tokushima, Japan. **J Epidemiol**, 2012.

Telford, R.D.; Cunningham, R.B.; Telford, R.M.; Kerrigan, J.; Hickman, P.E.; Potter, J.M.; Abhayaratna, W.P. Effects of Changes in Adiposity and Physical Activity on Preadolescent Insulin Resistance: The Australian LOOK Longitudinal Study. **PLoS ONE**, 7(10): e47438, 2012.

Timar, O.; Sestier, F.; Levy, E. Metabolic syndrome X: A review. **Can J Cardiol**, 16:779-89, 2000.

Toci, A.; Farah, A.; Trugo, L.C. Efeito do processamento de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Quim. Nova**, 29(5): 965- 971, 2006.

Trugo, R.C.; Macrae, R. Application of high performance liquid chromatography to the analysis of some non-volatile coffee components. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 39 (1): 97-107, 1989.

Tschritter, O.; Fritsche, A.; Thamer, C.; Haap, M.; Shirkavand, F.; Rahe, S.; Staiger, H.; Maerker, E.; Häring, H.; Stumvoll, M. Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. **Diabetes**, 52: 239–243, 2003.

Tsuchiya, K.; Sakai, H.; Suzuki, N.; Iwashima, F.; Yoshimoto, T.; Shichiri, M.; Hirata, Y. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. **Endocrinology**, 148(10): 4548-56, 2007.

Valko, M. Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, 160: 1-40, 2006.

Vidyashankar, S.; Sharath-Kumar, L.M.; Barooah, V.; Sandeep-Varma, R.; Nandakumar, K.S.; Patki, P.S. Liv.52 up-regulates cellular antioxidants and increase glucose uptake to circumvent oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells. **Phytomedicine**, 19(13):1156-65, 2012.

Vigitel. Quase metade da população brasileira está acima do peso. 2012. [Acesso em: 20 jun. 2012]. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4718/162/quase-metade-da-populacao-brasileira-esta-acima-do-peso.html>>.

Vignoli, J. A.; Bassoli, D.G. Determinação de ácidos carboxílicos e fenólicos em café solúvel utilizando HPLC/DAD. **Rev. Anal**, 27: 76-79, 2007.

Viguerie, N.; Montastier, E.; Maoret, J-J.; Roussel, B.; Combes, M.; Valle, C.; Villa-Vialaneix, N.; Iacovoni, J.S.; Martinez, J.A.; Holst, C.; Astrup, A.; Vidal, H.; Clément, K.; Hager, J.; Saris, W.H.M.; Langin, D. Determinants of Human Adipose Tissue Gene Expression: Impact of Diet, Sex, Metabolic Status, and Cis Genetic Regulation. **PLoS Genet**, 8(9): e1002959, 2012.

Vinson, J.A.; Burnham, B.R.; Nagendran, M.V. Randomized, double-blind, placebo-controlled, linear dose, crossover study to evaluate the efficacy and safety of a green coffee bean extract in overweight subjects. **Diabetes Metab Syndr Obes**, 5:21-7, 2012.

Vitaglione, P.; Morisco, F.; Mazzone, G.; Amoruso, D.C.; Ribecco, M.T.; Romano, A.; Fogliano, V.; Caporaso, N.; D'Argenio, G. Coffee liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. **Hepatology**, 52:(5), 2010.

Wannamethee, S.G.; Tchernova, J.; Whincup, P.; Lowe, G.D.; Kelly, A.; Rumley, A.; Wallace, A.M.; Sattar, N. Plasma leptin: associations with metabolic, inflammatory and haemostatic risk factors for cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, 191: 418–426, 2007.

Warke, T.J.; Shields, M.D.; Finnegan, J. Caffeine and exhaled nitric oxide. **Thorax**, 58: 281, 2012.

Wedick, N.M.; Brennan, A.M.; Sun, Q.; Hu, F.B.; Mantzoros, C.S.; Van Dam, R.M. Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **Nutr J**, 10:93, 2011.

Weisberg, S.P.; Hunter, D.; Huber, R.; Lemieux, J.; Slaymaker, S.; Vaddi, K.; Charo, I.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W. Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of

high-fat feeding. **J Clin Invest**, 116:115-24, 2006.

White, U. A.; Stephens, J. M. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol**. 318(1-2):10-4, 2010.

Williams, C.J.; Fargnoli, J.L.; Hwang, J.J.; Van Dam, R.M.; Blackburn, G.L.; Hu, F.B.; Mantzoros, C.S. Coffee consumption is associated with higher plasma adiponectin concentrations in women with or without type 2 diabetes: a prospective cohort study. **Diabetes Care**, 31: 504–507, 2008.

Yamashita, K.; Yatsuya, H.; Muramatsu, T.; Toyoshima, H.; Murohara T.; Tamakoshi, K. Association of coffee consumption with serum adiponectin, leptin, inflammation and metabolic markers in Japanese workers: a cross-sectional study. **Nutr Diabetes**, 2(4): e33, 2012.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Minokoshi, Y.; Ito, Y.; Waki, H.; Uchida, S.; Yamashita, S.; Noda, M.; Kita, S.; Ueki, K.; Eto, K.; Akanuma, Y.; Froguel, P.; Foufelle, F.; Ferre, P.; Carling, D.; Kimura, S.; Nagai, R.; Kahn, B.B.; Kadowaki, T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med**, 8(11):1288-95, 2002.

Yarrow, J.F.; Beggs, L.A.; Conover, C.F.; McCoy, S.C.; Beck, D.T.; Borst, S.E. Influence of Androgens on Circulating Adiponectin in Male and Female Rodents. **PLoS ONE**, 7(10): e47315, 2012.

Ye, Z.; Huang, Y.; Liu, D.; Chen, X.; Wang, D.; Huang, D.; Zhao, L.; Xiao, X. Obesity Induced by Neonatal Overfeeding Worsens Airway Hyperresponsiveness and Inflammation. **PLoS ONE**, 7(10): e47013, 2012.

Zambonin, L.; Caliceti, C.; Segal, F.V.D.; Fiorentini, D.; Hrelia, S.; Landi, L.; Prata, C. Dietary Phenolic Acids Act as Effective Antioxidants in Membrane Models and in Cultured Cells, Exhibiting Proapoptotic Effects in Leukaemia Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, ID 839298, 12 pages, 2012.

Zeyda, M.; Stulnig, T. M. Adipose tissue macrophages. **Immunol Lett**, 112(2):61-7, 2007.

## 8. ANEXO I

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 20 de Outubro de 2011.

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Projeto de Pesquisa:** “Avaliação dos possíveis efeitos benéficos do café normal e descafeinado, do ácido caféico e ácido ferúlico nas alterações hepáticas e do tecido adiposo associadas à obesidade”.

**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Saúde e Biológicas

**Autor(es):** Prof(a). Dr (a). Alessandra Gambero; Cintia Rabelo e Paiva Caria

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 001.10.11

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária dia **20/10/2011** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer: APROVADO**

**Carlos Augusto Real Martinez**  
**Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa**  
**Universidade São Francisco**

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825  
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300  
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933  
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036