



**ALESSANDRA DOS SANTOS DANZIGER SILVÉRIO**

**EFEITO DA BEBIDA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)  
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E  
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM RATOS  
DIABÉTICOS**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**ALESSANDRA DOS SANTOS DANZIGER SILVÉRIO**

**EFEITO DA BEBIDA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) SOBRE O ESTRESSE  
OXIDATIVO E AGREGAÇÃO PLAQUETARIA EM RATOS  
DIABÉTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira

Coorientadoras

Dra. Stella Maris da Silveira Duarte

Dra. Maria Rita Rodrigues

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silvério, Alessandra dos Santos Danziger.

Efeito da bebida de café (*Coffea arábica* L.) sobre o estresse oxidativo e agregação plaquetária em ratos diabéticos / Alessandra dos Santos Danziger Silvério. – Lavras : UFLA, 2014.

171 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira.

Bibliografia.

1. Café. 2. Diabetes. 3. Estresse oxidativo. 4. NOX2. 5. Plaquetas (Sangue)-Agregação. 6. Produtos finais de glicação avançada. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.93

**ALESSANDRA DOS SANTOS DANZIGER SILVÉRIO**

**EFEITO DA BEBIDA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) SOBRE O ESTRESSE  
OXIDATIVO E AGREGAÇÃO PLAQUETARIA EM RATOS  
DIABÉTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 09 de maio de 2014.

Dra. Celeste Maria Patto de Abreu UFLA

Dra. Danyelle Romana Rios UFSJ

Dr. Michel Cardoso De Angelis Pereira UFLA

Dr. Raimundo Vicente de Sousa UFLA

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2014**

Aos meus filhos, Laíza e João Pedro, minha vida,

**DEDICO**

A DEUS,

**OFEREÇO.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tantas graças alcançadas, muitas bênçãos e glórias! Com certeza Tua presença era sublime. Obrigada, “Santíssimo Sacramento”, absolutamente por tudo! Cada batida do meu coração Te louva e Te adora!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade concedida.

À professora Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira, minha orientadora e amiga. Agradeço seu acolhimento, a sua atenção, incentivo e seu exemplo de profissionalismo e competência. Deixo aqui registrado meu respeito e admiração!

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e em especial ao Departamento de Análises Clínicas pelo acolhimento e permissão para realização dos experimentos, fundamental para a viabilização deste estudo.

À professora Dra. Stella Mares da Silveira Duarte, minha eterna e admirável professora e amiga. Docente por excelência que me ensinou a amar a Hematologia. Obrigado por valorizar o meu trabalho, sem seu apoio eu não teria realizado esse sonho de vida. Só DEUS em sua infinita misericórdia pode recompensá-la por tamanha generosidade. Deixo aqui a minha sincera gratidão!

À professora Dra. Maria Rita Rodrigues, pela atenção, dedicação e contribuição essencial para a realização deste trabalho. Seu apoio, ensinamentos e paciência foram fundamentais durante toda a execução dos experimentos e elaboração dos artigos.

À professora Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula, pela amizade e apoio inestimável durante todo o curso e colaboração essencial na elaboração do artigo para o exame de qualificação. DEUS lhe pague!

Ao professor Dr. Eric Batista Ferreira pela colaboração e ensinamentos de estatística.

Ao meu marido, Gilberto, sempre presente e acreditando no meu trabalho, mesmo nos momentos de minha fraqueza.

Ao meu querido irmão, Eduardo, pelo apoio essencial nas traduções dos trabalhos.

À minha querida mãe Anésia, exemplo de força!

À Claudia Ferreira de Souza, como aprendi com você. Exemplo de determinação, companheirismo, cumplicidade e inteligência. Amiga que fiz pelo caminho. Obrigada pela amizade, minha admiração e respeito são imensos! Agradeço a sua cooperação em todas as etapas na realização desse trabalho!

Ao Bruno, André, Adriene e Eliana pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos acadêmicos dos cursos de Farmácia e Biomedicina da UNIFAL, Alfenas-MG, que participaram ativamente neste projeto, inclusive durante as férias, fins de semana e feriados.

As minhas colegas de doutorado, Maria Elisa de Castro Moreira, Rafaela Berggman, Flávia Della Lúcia, que tornaram os inúmeros quilômetros percorridos entre Alfenas e Lavras menos cansativos e agradáveis!

Agradeço à Cocam e Ipanema Agro Indústria S/A, em especial aos amigos Whashington e Selma que me concederam os cafés.

Aos colegas da UFLA, em especial a Telma Brandão pela amizade e apoio.

Aos meus colegas docentes da UNIFENAS pelo companheirismo e palavras de estímulo, em especial a Julieta Maria Santos!

Aos professores da banca examinadora, Dra. Celeste Maria Patto de Abreu, Dra. Danyelle Romana Rios, Dr. Michel Cardoso de Angelis e Dr. Raimundo Vicente de Souza pelos ensinamentos e contribuição fundamental para este estudo.

Entretanto, expomos sabedoria entre os experimentados; não, porém, a sabedoria deste século, nem a dos poderosos desta época, que se reduzem a nada; mas falamos a sabedoria de Deus em mistério, outrora oculta, a qual Deus preordenou desde a eternidade para a nossa glória; sabedoria essa que nenhum dos poderosos deste século conheceu. Coríntios 2.6-8

Hoje levantei pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite.  
É minha função escolher que tipo de dia terei hoje...  
Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho.  
Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a DEUS por ter um teto pra morar.  
Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades.  
Se as coisas não saírem como planejei, posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.  
O dia está na minha frente, esperando para ser o que eu quiser... (Charles Chaplin)



## RESUMO GERAL

Este estudo teve por objetivo verificar a influência da bebida de café em diferentes sistemas biológicos de ratos Wistar diabéticos induzidos por aloxano. Em todos os experimentos, utilizou-se bebida de café *Coffea arabica* L., fervida e filtrada, preparada no momento do uso. Determinou-se a composição de ácidos clorogênicos totais, teor de fenólicos totais, cafeína, trigonelina e niacina do café. Dividiu-se os animais em grupos não diabéticos e diabéticos (induzidos por aloxano via intraperitoneal), animais tratados por gavagem com água, com os inibidores aminoguanidina e apocinina, e com a bebida de café por um período de 50 dias em doses e concentrações padronizadas. Realizou-se o recrutamento de neutrófilos utilizando-se caseinato de sódio via intraperitoneal, as amostras biológicas de soro e sangue total foram obtidas por punção cardíaca e o plasma citratado por punção da aorta abdominal. Realizou-se testes para avaliar o perfil glicêmico através das dosagens de glicemia de jejum e HbA1c, o perfil renal por meio das dosagens de ureia e creatinina, os níveis circulantes de produtos finais de glicação avançados-AGEs fluorescentes no soro e o hemograma. Avaliou-se a geração do *pool* de espécies reativas de oxigênio-ERO por quimiluminescência amplificada por luminol e a atividade da enzima NOX2 através da geração de ânion superóxido através do ensaio de redução do citocromo C tendo como ativador o PMA, a atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos peritoneais frente à *Candida albicans*. Avaliou-se a agregação plaquetária frente ao agonista ADP. Pela análise dos dados obtidos, constatou-se que a ingestão da bebida de café não afetou o perfil glicêmico dos animais, no entanto, reduziu a formação de AGEs e também a agregação plaquetária no modelo experimental adotado. A aminoguanidina, foi eficiente em inibir a formação de AGEs, e além disso, inibiu também a agregação plaquetária. Adicionalmente, a ingestão da bebida de café não interferiu na função renal dos animais, reduziu a geração de ERO dos animais e a geração de ânion superóxido nos animais diabéticos, não interferiu com as atividades fagocíticas e microbicida de neutrófilos peritoneais frente à *Candida albicans*. O tratamento com a apocinina, apesar de inibir a atividade da NOX2, não alterou a capacidade de fagocitose e microbicida de neutrófilos peritoneais dos animais em estudo frente à *Candida albicans*.

Palavras-chave: Café. Diabetes *mellitus*. Estresse oxidativo. Produtos finais de glicação avançados. NOX2. Agregação plaquetária.

## GENERAL ABSTRACT

This study aimed at verifying the influence of the coffee beverage in different biological systems of alloxan-induced diabetic Wistar rats. In all experiments, the *Coffea arabica* beverage was used, boiled and filtered, prepared at the moment of use. The composition of total chlorogenic acids, total phenolic contents, caffeine, trigonellina and coffee niacin were determined. The animals were divided into non-diabetic and diabetic (alloxan-induced via intraperitoneal) groups, animals treated by gavage with water, with the aminoguanidine and apocynin inhibitors, and with the coffee beverage for a period of 50 days, in standardized doses and concentrations. The neutrophils' recruitment was performed using sodium caseinate via intraperitoneal, the serum and total blood biological samples were obtained by cardiac puncture and the citrated plasma by abdominal aorta puncture. The tests were performed to evaluate the glycemic profile through the doses of fasting blood glucose and HbA1c, the renal profile through doses of urea and creatinine, circulating levels of serum fluorescent advanced glycation end products – AGEs and complete blood count. The generation of oxygen reactive species - ORS pool was evaluated by luminol amplified chemiluminescence and activity of the NOX2 enzyme, through the generation of superoxide anion by means of the cytochrome C reduction trial, using the PMA as activator, the phagocytic and microbicide activities of peritoneal neutrophils in contrast to *Candida albicans*. Platelet aggregation was evaluated in contrast to the ADP agonist. With the analyses of the obtained data, it was noticed that the ingestion of the coffee beverage did not affect the glycemic profile of the animals, however, the formation of AGEs was reduced as well as the platelet aggregation in the adopted experimental model. The aminoguanidine was efficient in inhibiting the formation of AGEs and, in addition, inhibited platelet aggregation. In addition, the ingestion of coffee beverage did not interfere in the renal function, reduced the generation of ORS of the animals and the generation of superoxide anion in diabetic the animals, did not interfere with the phagocyte and microbicide activities of peritoneal neutrophils of the studied animals in contrast to *Candida albicans*.

Keywords: Coffee. *Mellitus* diabetes. Oxidative stress. Advanced glycation end products. NOX2. Platelet aggregation.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Processo de desmetilação da trigonelina durante a torração do café.....	20
Figura 2	Estrutura química da cafeína .....	21
Figura 3	Estrutura química da cafeína em comparação com a adenosina .....	25
Figura 4	Estrutura fundamental do ácido 5-o-cafeoilquinico (ácido clorogênico).....	27
Figura 5	Estresse oxidativo e o diabetes .....	30
Figura 6	Rotas de formação e produtos finais de glicação avançada (AGE).....	32
Figura 7	Aumento da produção de AGEs e suas consequências patológicas.....	34
Figura 8	Estrutura molecular da aminoguanidina.....	36
Figura 9	Componentes da NOX2 em estados de repouso (A) e após ativação celular (B) .....	40
Figura 10	Estrutura química da apocinina.....	41
Figura 11	Mecanismo de inibição da NOX2 pela apocinina.....	42
Figura 12	Participação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão.....	46

### SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

#### ARTIGO 1

<b>Figure 1.</b>	Percentage of glycated hemoglobin.....	77
<b>Figure 2.</b>	Fluorescent AGEs in serum of the animals.....	81
<b>Figure 3.</b>	Determination of urea in the serum of animals. ....	82
<b>Figure 4.</b>	Determination of creatinine in serum of the animals.....	84

**Figure 5.** Platelet agregation in animals. ....85

**ARTIGO 2**

**Figure 1.** Percentage of glycated hemoglobin..... 110

**Figure 2.** Measurement of superoxide anion. .... 113

**Figure 3.** Measurement of the pool of reactive oxygen species..... 115

**Figure 4:** Effect of beverage coffee and APO on the ability of neutrophils  
to phagocytosis *C. albicans*. .... 116

**Figure 5:** Effect of beverage coffee and APO on the killing of *C. albicans*. .. 117

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Composição química do grão de café arábica cru.....	19
Tabela 2	Classificação etiológica de diabetes <i>mellitus</i> .....	29

### SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

#### ARTIGO 1

<b>Table 1.</b> Hematological parameters of the rats in different treatment groups. ....	79
--	----

#### ARTIGO 2

<b>Table 1.</b> Compounds bioactives of the Coffee. Levels of caffeine, total phenols and total chlorogenic acids, trigonelline and niacin detected in the integral coffee beverages. ....	108
<b>Table 2.</b> Hematological parameters of the rats in different treatment groups. ....	110

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	<b>Características socioeconômicas do café</b> .....	16
2.2	<b>Aspectos botânicos do café</b> .....	17
2.3	<b>Composição química do café</b> .....	18
2.4	<b>Componentes bioativos do café que podem afetar a saúde humana</b> .....	22
2.4.1	<b>Cafeína</b> .....	24
2.4.2	<b>Compostos fenólicos</b> .....	26
2.4.3	<b>Cafestol e Caveol</b> .....	28
2.5	<b>Diabetes <i>mellitus</i></b> .....	29
2.6	<b>Produtos Finais de Glicação Avançados – AGEs</b> .....	31
2.7	<b>Sistema NOX2</b> .....	36
2.8	<b>Efeito hemostático</b> .....	42
3	<b>CONCLUSÕES</b> .....	49
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	67
	<b>ARTIGO 1 Ingestion of coffee (<i>Coffea arabica</i> L.) reduces advanced glycation end product (AGEs) formation and platelet aggregation in diabetic rats</b> .....	67
	<b>ARTIGO 2 Coffee reduces NOX2 activity and ROS release by peritoneal neutrophils from rats diabetics</b> .....	98
	<b>APÊNDICES</b> .....	127

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

A partir do grão de café torrado é produzida uma bebida com aroma e sabor bastante apreciados, sendo por isso amplamente consumida por todas as classes sociais e em diversos países. Considerado como uma das grandes riquezas brasileiras, o café acelerou o desenvolvimento e a inserção do Brasil no comércio internacional. A produção e comercialização do café empregam cerca de milhões de pessoas e se tornaram uma atividade fundamental do ponto de vista econômico. De acordo com o Bureau de Inteligência Competitiva do Café do Centro de Inteligência em Mercado (CIM/UFLA), a demanda por cafés certificados continuará crescendo nos próximos anos. O relatório Brasil Food Trends 2020 indica o consumo de alimentos produzidos de forma sustentável como uma das cinco principais tendências que irão influenciar a indústria alimentícia nessa década.

Os diversos produtos de origem natural têm sido amplamente investigados e impulsionam a busca de novas substâncias que possam contribuir com a saúde, de forma a atuar na profilaxia ou amenizando a progressão de diversas doenças crônicas. Entre eles, o café contribui com diversas substâncias com atividade farmacológica como a cafeína e os ácidos fenólicos potencialmente benéficos à saúde. A cafeína é um dos componentes mais explorados do café devido às suas propriedades fisiológicas excitantes do sistema nervoso central. Atualmente o café tem despertado o interesse da comunidade científica não só pelos efeitos causados pela cafeína, mas por conter também outros compostos com propriedades antioxidantes, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antiplaquetária, por ação principal dos ácidos clorogênicos presentes em sua composição química.

Nas últimas décadas, houve um aumento de doenças crônicas, tais como, as doenças cardiovasculares, diabetes e o câncer. É preocupante, pois essas afetam consideravelmente a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos e geram custos diretos e indiretos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o diabetes é considerado um problema de saúde pública prevalente, crescente, dispendioso sob o ponto de vista social e econômico, de grande impacto na morbimortalidade por suas complicações cardíacas, cerebrovasculares, vasculares periféricas, oculares, renais, neuropáticas, capaz de acelerar a morte e levar a incapacidades.

A relação entre o estresse oxidativo e as complicações diabéticas tem sido largamente estudada, mas os mecanismos fisiopatológicos e bioquímicos são inconclusivos. Os tratamentos atuais para o diabetes consistem no controle glicêmico e da pressão arterial, através de agentes hipoglicemiantes, orientações nutricionais e qualidade no estilo de vida. Estudos em andamento focam nos mecanismos patogênicos desencadeados pela hiperglicemia, com a finalidade de inibir a injúria vascular, reduzir a formação de diacilglicerol - DAG, produtos finais de glicação avançada - AGEs e espécies reativas de oxigênio - ERO, inibir a NOX2 e prevenir a interação entre AGEs e seu receptor (RAGE) e assim retardar os mecanismos responsáveis pelas complicações diabéticas.

As relações entre o consumo da bebida de café, saúde e doença são conflitantes. Evidências sugerem que o consumo de café pode reduzir o risco de diabetes *mellitus*, influenciando no metabolismo da glicose, na tolerância à insulina e no estresse oxidativo em consequência da hiperglicemia crônica.

Devido a esses fatos objetivou-se avaliar a influência da ingestão da bebida de café sobre o estresse oxidativo e agregação plaquetária em ratos diabéticos. São objetivos específicos avaliar a influência da ingestão da bebida de café sobre o perfil glicêmico, perfil renal, geração de AGEs, atividade da NOX2, atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos em ratos diabéticos.



## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Características socioeconômicas do café**

O nome café tem origem na província Keffa, onde moradores da região da Abissínia-Etiópia descobriram os primeiros grãos no século VI (RANHEIM; HALVORSEN, 2005).

O café foi inserido com interesse comercial durante o século XV (BUTT; SULTAN, 2011) servindo como ponto de encontro para negociantes. As primeiras cafeterias foram abertas pelos árabes e mais tarde, o café foi vendido na Europa, introduzindo assim uma nova bebida nos hábitos dietéticos do povo ocidental (YANAGIMOTO et al., 2004). Os europeus tiveram seu primeiro contato com o café nos mercados de Veneza no século XV, quando era vendido com fins terapêuticos e, somente em 1720, foi aberta a primeira cafeteria, aumentando a sua popularidade e, portanto o seu consumo.

Relatos sobre o primeiro contato com o café na América do Norte datam de 1668 e, daí em diante, a bebida de café passou a ser apreciada nas cidades maiores e nas sociedades da época que começaram a operar com cafés (LEITE, 2002; LEITE; SILVA, 2000).

A produção do café foi um importante ponto de partida para o desenvolvimento econômico e crescimento do interior do Brasil. No início, foi cultivado nas áreas próximas ao litoral do país, mas o clima quente e altitudes baixas não contribuíram para o seu cultivo, então os produtores de café mudaram-se para o interior, construindo rodovias e estradas de ferro para transportar o produto até os portos e, assim, a produção de café se tornou ascendente, ganhando poder na economia brasileira (GRAAFF, 1986; LEITE, 2002).

A bebida de café é a segunda bebida mais consumida, sendo superada apenas pela água. População de todo o mundo consome cerca de 500 bilhões de copos dessa bebida anualmente (CLARKE; VITZTHUM, 2001; PRAKASH et al., 2002).

O Brasil é um dos países com maior diversidade de grãos, o que resulta em cafés com características variáveis, que está associado a um conjunto de fatores, como a melhoria da qualidade do café, a consolidação do mercado de cafés, maiores investimentos, a melhoria da percepção do café quanto aos aspectos dos benefícios para a saúde e a melhoria das condições econômicas no Brasil (SIMÕES; FARONI; QUEIROZ, 2008).

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2014), a produção de café, em Minas Gerais, está estimada em 26.640.622 sacas na safra 2014, com variação percentual de 2,9% para mais ou para menos. A produtividade média do estado deverá atingir 26,4 sacas de café por hectare.

## **2.2 Aspectos botânicos do café**

O cafeeiro pertence à família *Rubiaceae* e provém de uma árvore do gênero *Coffea*, com várias espécies identificadas (CARVALHO et al., 2001; MONROY, 2005). Uma árvore tropical perene e lenhosa que cresce em grandes altitudes, uma planta com cerca de 80 diferentes espécies conhecidas, mas as duas espécies de café, sob o ponto de vista econômico, mais importantes são *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta), com diferenças intrínsecas, pelas suas características sensoriais, físicas e químicas.

*Coffea arabica* ocupa 74% do café cultivado no Brasil, enquanto que a *Coffea canephora*, 26% do total. Estas duas variedades são diferentes quanto ao sabor, aparência e em concentração de alguns constituintes, como a cafeína (BUTT; SULTAN, 2011) e assim, originam bebidas com características

sensoriais distintas. A espécie *Coffea arabica* é mais valorizada comercialmente nas Américas e nas demais regiões onde é cultivada. A tendência de consumo da bebida de café é favorável ao café arábica, em comparação com o robusta (COFFEE AND TEA AUTHORITY - CTA, 2003), pois é de qualidade superior e de maior aceitação em todos os mercados (BANDEIRA et al., 2009).

Segundo Matiello (1991), o café da espécie *Coffea arabica* se adapta às condições de clima tropical de altitude com umidade e temperaturas amenas, enquanto que a espécie *Coffea canephora* adapta-se às regiões equatoriais baixas, quentes e úmidas, de maior rusticidade.

### **2.3 Composição química do café**

A constituição química do café é complexa e variável, pois depende de vários fatores tais como: a espécie botânica, as condições de cultivo, o clima da região de plantio e processo de secagem. Além disso, o tipo de processamento a que os grãos serão submetidos, o grau de torração e de moagem, o método de preparo da bebida vão ser decisivos para definir os atributos finais da bebida, suas características sensoriais diferenciadas, e intervirão na concentração dos compostos bioativos dessa bebida (CLARKE, 2003). Na Tabela 1, está apresentada a composição química média do grão de café cru (TSUKUI; OIGMAN; REZENDE, 2014).

A descafeinação e filtração são processos aos quais os grãos são submetidos para remover componentes como a cafeína e a fração lipídica do café. Os grãos passam por diversas transformações físicas e químicas, que vão determinar aspectos importantes no produto final, como sabor e características biológicas (PARRAS et al., 2007; SACCHETTI et al., 2009).

Tabela 1 Composição química do grão de café arábica cru

Componente	Café arábica (%)
Cafeína	0,8 - 1,4
Trigonelina	0,6 - 1,2
Minerais	3,0 - 5,4
Ácidos clorogênicos totais	6,7 - 9,2
Ácidos alifáticos não voláteis	2,0 - 2,9
Ácidos voláteis	0,1
Carboidratos solúveis	9,0 - 12,5
Polissacarídeos insolúveis	46 - 53
Lignina	1,0 - 3,0
Proteínas	8,5 - 12,0
Aminoácidos livres	0,2 - 0,8
Ceras	0,2 - 0,3
Óleos	7,7 - 17,7

Fonte: Tsukui, Oigman e Rezende (2014)

Segundo Morgano et al. (2002), os cafés crus são ricos em minerais, apresentando de 3,0 a 5,4% dessas substâncias que são essenciais às funções metabólicas fundamentais do organismo humano, com destaque para os macrominerais como o cálcio ( $954 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), potássio ( $15.785 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), magnésio ( $1.806 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) e fósforo ( $1.380 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), e os microminerais como cobre ( $14,7 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), cobalto ( $0,164 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), ferro ( $38,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), manganês ( $22,9 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) e zinco ( $4,93 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ).

De acordo com o United States Department of Agriculture - USDA (2004) (Banco de Dados de Referência de Nutrientes), aproximadamente 240 mL de bebida de café fornece 7 mg de magnésio e 30 mL de café expresso proporcionam 24 mg de magnésio. Assim, uma xícara de café pode oferecer até 1-5% da ingestão diária recomendada (RDA) de magnésio ( $420 \text{ mg.100 g}^{-1}$ ) para homens adultos (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997).

Uma xícara de bebida de café pode também fornecer 116 mg de potássio e uma dose de café expresso fornece até 34 mg (USDA, 2004), sugerindo que uma xícara de café contribui apenas com 1-2% da ingestão apropriada de potássio ( $4.700 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) para adultos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2004).

A trigonelina é comprovadamente um componente bioativo, assim como outros componentes presentes em grãos de café verde, que são precursores do sabor e aroma específicos da bebida de café. O café é um dos únicos produtos que mediante um processo tão drástico como a torrefação produz uma vitamina importante para o metabolismo humano, a niacina, uma vitamina do complexo B (MORAIS et al., 2009) (Figura 1).

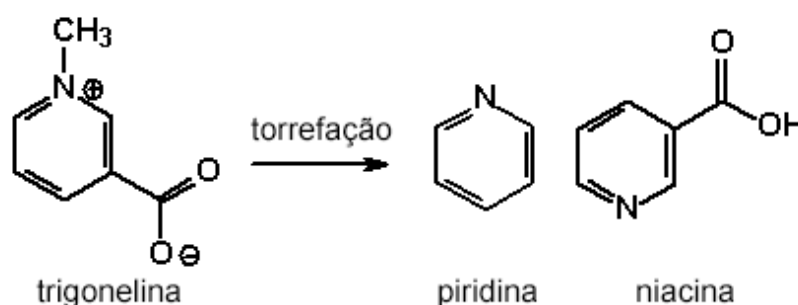


Figura 1 Processo de desmetilação da trigonelina durante a torrefação do café  
Fonte: Morais et al. (2009)

Além da importância da trigonelina para o desenvolvimento do aroma da bebida de café, alguns autores têm salientado a sua interferência em funções metabólicas no organismo humano, como a sua participação no metabolismo da glicose. As plantas ricas em trigonelina são consumidas como medicamentos populares para diabético. Dados na literatura relatam um efeito hipoglicemiante transitório em diabéticos, com a diminuição dos valores plasmáticos de glicose (TUNNICLIFFE; SHEARER, 2008).

Uma xícara de café pode contribuir com 6-18% da ingestão diária recomendada de niacina (16 mg.100 g<sup>-1</sup>) para um homem adulto (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998).

A cafeína (1,3,7-trimetil xantina) (Figura 2) é um alcaloide das purinas com efeito pesticida presente naturalmente nos grãos de café (HIGDON; FREI, 2006; SPILLER, 1998).

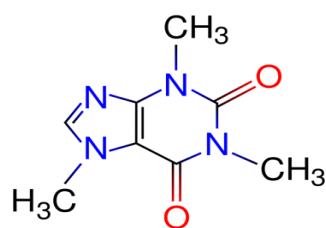


Figura 2 Estrutura química da cafeína

Fonte: Butt e Sultan (2011)

A cafeína tem um aspecto de pó cristalino branco com sabor amargo e foi isolada pela primeira vez do café em 1820 (MATIJASEVICH; SANTOS; BARROS, 2005; MAZZAFERA; CROZIER; MAGALHÃES, 1991). O café é a fonte mais rica em cafeína da dieta humana e 240 mL de café solúvel contém cerca de 100 mg de cafeína (BELAY et al., 2008). Dependendo das técnicas de processamento pós-colheita dos frutos os teores de cafeína podem ser reduzidos, mas, em regra, a sua concentração permanece em torno de 0,65-2,30% (MCCUSKER; GOLDBERGER; CONE, 2003; RANHEIM; HALVORSEN, 2005).

As plantas sintetizam diversos compostos fenólicos e polifenólicos, com estruturas e funções variadas. Entre estes compostos, os ácidos clorogênicos representam uns dos principais componentes da fração fenólica dos grãos de café verde (CARDOSO et al., 2011). A ingestão da bebida de café representa a

principal fonte alimentar de ácidos clorogênicos e ácidos cinâmico (ácido cafeico) (CLIFFORD, 1999; HIGDON; FREI, 2006).

Os principais grupos de ácidos clorogênicos encontrados nos grãos de café verde incluem os ácidos cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos, feruloilquínicos, *p*-cumaroilquínicos e ésteres mistos dos ácidos cafeico e ferúlico com ácido quínico, com pelo menos três isômeros por grupo. Durante a torração do café, os ácidos clorogênicos podem ser parcialmente isomerizados, hidrolizados ou degradados a compostos de baixo peso molecular. As altas temperaturas do processo de torração originam também lactonas e a polimerização dos ácidos clorogênicos com outros componentes do café formando as melanoidinas, também com propriedades antioxidantes (FARAH; DONANANGELO, 2006).

Segundo Olthof, Hollman e Katan (2001), o teor de ácido clorogênico presente em 200 mL de bebida de café pode variar de 70-350 mg e cerca de 35-175 mg de ácido cafeico. Estudos em humanos indicaram que 33% do ácido clorogênico e 95% de ácido cafeico ingeridos na dieta são absorvidos no trato gastrointestinal por colostomia. Cerca de dois terços do ácido clorogênico ingeridos atingem o cólon, onde podem ser metabolizados pela microbiota presente. No cólon, o ácido clorogênico é provavelmente hidrolisado em ácido cafeico e ácido quínico. Embora o ácido clorogênico e o ácido cafeico tenham atividade antioxidante *in vitro*, não está claro quanto a sua atividade antioxidante *in vivo*, pois eles são extensivamente metabolizados, e os seus metabólitos têm, frequentemente, atividade antioxidante inferior a dos compostos parentais (IWAI et al., 2004).

#### **2.4 Componentes bioativos do café que podem afetar a saúde humana**

Em um conteúdo histórico, o consumo da bebida de café era relacionado ao tabagismo, ao consumo excessivo de álcool, a uma dieta pobre em nutrientes

e a um estilo de vida sedentário. Em várias pesquisas são relatados efeitos controversos, associam ao café algumas atividades biológicas potencialmente benéficas e outras adversas à saúde humana (RANHEIM; HALVORSEN, 2005).

A bebida de café é preparada de diferentes maneiras, de acordo com os costumes dos consumidores de cada região. É a partir de sementes torradas e posteriormente moídas, que se obtém a bebida contendo uma série de moléculas bioativas que estão presentes também em outros produtos naturais. O principal efeito do consumo da bebida de café sobre a saúde humana tem sido associado ao seu teor de cafeína. Já está documentado os efeitos farmacológicos da cafeína, principalmente no sistema nervoso central (NATELLA; SCACCINI, 2012).

A atividade antioxidante da bebida de café é atribuída ao seu teor de cafeína, trigonelina, ácido cafeico, produtos gerados na reação de *Maillard*, as melanoidinas, os voláteis furanos e pirróis, compostos fenólicos, lípides, polissacarídeos, fibra alimentar solúvel e minerais (HIGDON; FREI, 2006; SPILLER, 1998).

Compostos com atividade biológica presentes naturalmente em alimentos, entre eles o café cru, café torrado e a bebida de café, apresentam diversas atividades farmacológicas, incluindo atividade antioxidativa, anti-inflamatória, antineoplásica, hipoglicemiante, antiglicação, antimicrobiana e antiviral. Devido a esses efeitos potencialmente benéficos à saúde, em especial, à proteção contra uma variedade de patologias, como a doença arterial coronariana (DAC), alguns tipos de câncer e diabetes, o interesse nesses compostos é crescente, e vários estudos para esclarecer seu mecanismo de ação na saúde têm sido realizados nas últimas décadas (CARDOSO et al., 2011; JUNG et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008).



### 2.4.1 Cafeína

Um alcaloide do grupo das xantinas, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é o componente bioativo cientificamente mais estudado do café por sua ação psicoestimulante (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). É também consumida na forma de fármacos (FRARY; JOHNSON; WANG, 2005).

É rápida e quase completamente absorvida no estômago e em menor proporção no intestino e distribuída aos tecidos, incluindo o cérebro. Após sua absorção, é metabolizada no fígado, onde acontece a remoção dos grupos metila através da ação de enzimas do citocromo-P450, como a isoforma CYP1A2 que é responsável por quase 95% do metabolismo primário da cafeína.

A CYP1A2 catalisa a desmetilação do grupo 3-metilxantina formando 1,7-dimetilxantina (paraxantina). A paraxantina é desmetilada formando 1-metilxantina, que por sua vez é oxidada a ácido 1-metilúrico por ação da enzima xantina oxidase. A paraxantina pode também ser hidroxilada por ação da CYP2A6 para formar ácido 1,7-dimetilúrico, ou acetilada pela N-acetiltransferase-2 (NAT2) para formar 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil, um composto instável que pode ser transformado nanoenzimaticamente para formar 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil (CREWS; OLIVIER; WILSON, 2001; KRUL; HAGEMAN, 1998).

Os metabólicos da cafeína são funcionalmente ativos e agem de formas distintas em vários sistemas biológicos do organismo. Ligam-se às células nervosas do sistema nervoso central, agem estimulando a concentração, melhorando o humor e diminuindo a sensação de cansaço após exercícios físicos e mentais. Têm capacidade de, também, atuar sobre o metabolismo basal, produzindo o aumento da secreção de suco gástrico e facilitando o processo digestivo. Estimulam o trabalho cardíaco, beneficiando a sua capacidade

funcional, além de ativar a circulação sanguínea, levando à dilatação dos vasos periféricos (CORNELIS et al., 2006; PARDO-LOZANO et al., 2007).

Os mecanismos de ação da cafeína nas células-alvo estão relacionados à inibição da enzima fosfodiesterase, responsável pela destruição do mediador químico intracelular adenosina monofosfato cíclico (AMP-cíclico), o que causa um aumento do AMP cíclico intracelular; e ao antagonismo dos receptores de adenosina A1 e subtipos A2.

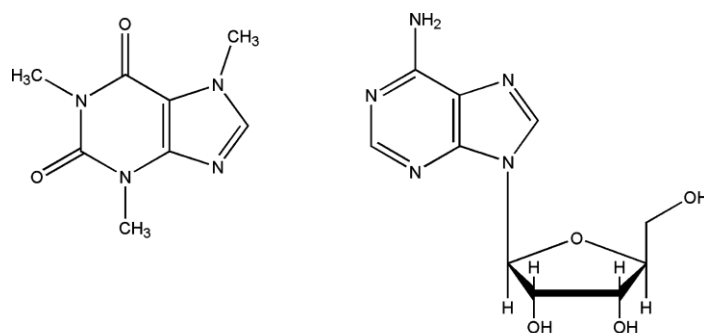


Figura 3 Estrutura química da cafeína em comparação com a adenosina  
Fonte: Higdon e Frei (2006)

Estruturalmente, a cafeína é semelhante à molécula de adenosina (Figura 3) (JAMES, 2004), um forte neuromodulador endógeno, que inibe a liberação de diversos neurotransmissores como o glutamato, ácido gama-aminobutírico, acetilcolina e monoaminas. A adenosina age diminuindo a atividade neural e promove vasodilatação, com isso provoca uma sensação de sonolência.

A cafeína pode bloquear os receptores da adenosina (A1 e A2), interagindo com eles. Assim, a ação inibitória da adenosina fica impedida, sendo o efeito da cafeína, conseqüentemente, estimulante. Ou seja, quando a cafeína ocupa o receptor de adenosina, ela impede a ação da adenosina sobre o sistema nervoso central. Alguns efeitos fisiológicos associados com a administração de cafeína incluem estimulação do sistema nervoso central, a elevação da pressão

sanguínea, aumento da taxa metabólica e da diurese (CARRILLO; BENITEZ, 2000; HIGDON; FREI, 2006).

Diversos estudos relatam uma relação direta entre a cafeína e o metabolismo da glicose, assim como com a sensibilidade à insulina (GREENBERG; BOOZER; GELIEBTER, 2006). A ingestão de cafeína foi associada à redução da sensibilidade à insulina em estudos metabólicos de curta duração (BATHENA; VELASQUEZ, 2002; CARDOSO et al., 2011; GREER et al., 2001). Esse efeito é supostamente devido ao aumento da síntese de epinefrina pela cafeína ou por antagonizar o receptor de adenosina (CARDOSO et al., 2011; KEIJERS et al., 2002).

A epinefrina é um neurotransmissor que pode atuar de diversas formas influenciando a taxa metabólica, inibindo a secreção de insulina, a glicogenólise e a mobilização de ácidos graxos, e a adenosina pode diminuir a lipólise (CARDOSO et al., 2011; GRAHAM; HIBBERT; SATHASIVAM, 2008).

Não está totalmente esclarecida a relação entre a cafeína e o diabetes *mellitus*, assim não é indicado que sejam extrapolados seus efeitos para uso crônico da bebida de café, pois o estímulo da cafeína no aumento dos níveis de epinefrina diminuem após ingestão crônica da bebida de café (CARDOSO et al., 2011; ROBINSON et al., 2004).

#### **2.4.2 Compostos fenólicos**

Aos compostos fenólicos é atribuída uma participação direta e indireta no sabor e aroma da bebida (ABRAHÃO et al., 2008; MOREIRA; TRUGO; MARIA, 2000). Devido às suas propriedades antioxidantes, ou seja, a sua capacidade de neutralização ou adsorção de radicais livres, esses compostos têm despertado interesse, pois apresentam potencial terapêutico como protetores contra doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, doença de Parkinson e

doença de Alzheimer's (CELIK; IYISOY; AMASYALI, 2009; CONNEY et al., 2007; FARAH; DONANGELO, 2006; KY et al., 2001; SUZUKI et al., 2008).

Entre os compostos fenólicos, os ácidos clorogênicos englobam um conjunto de substâncias, sendo ésteres formados a partir da reação de esterificação entre o ácido transcinâmico (ou p-cumárico, ferúlico e cafeico) com o ácido quínico. Estão presentes tanto na forma monoesterificada, como di e triesterificada (CLIFFORD, 1999; HIGDON; FREI, 2006). O ácido clorogênico mais comum é o ácido 5-o-cafeoilquínico (Figura 4).



Figura 4 Estrutura fundamental do ácido 5-o-cafeoilquínico (ácido clorogênico)

Fonte: Oliveira e Bastos (2011)

O processo de torração é a etapa da industrialização que exerce maior influência sobre o tipo e quantidade de compostos fenólicos no produto final. Ocasionalmente também diversas transformações químicas, como a desnaturação e degradação de proteínas originando moléculas menores. Os ácidos clorogênicos originam outros compostos, essenciais para o aroma volátil, que fornecem os aspectos do flavor do café torrado, juntamente com os derivados de açúcares, proteínas e lipídeos.

Dessa forma, muitos compostos voláteis do café têm origem na Reação de Maillard como as melanoidinas, material polimérico com efeitos benéficos à saúde por serem considerados antioxidantes, responsáveis pela inibição da

degradação oxidativa no organismo. Essa ação antioxidante é influenciada pelo número e posição dos grupos OH, assim como pelas posições de glicosilação presente nos fenólicos. Alguns dos produtos da reação de Maillard também estão envolvidos em mecanismos de envelhecimento dos organismos (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

### **2.4.3 Cafestol e Caveol**

Dois álcoois diterpenoides, o cafestol e caveol, são encontrados em níveis significativos no café (RANHEIM; HALVORSEN, 2005).

Eles são componentes naturais dos grãos de café (RANHEIM; HALVORSEN, 2005; VIANI, 1986) e são liberados durante a torração e o preparo da bebida de café quando é adicionada água quente, mas são quase totalmente retidos no filtro utilizado para preparar a bebida de café filtrada. Estes componentes estão associados à hipercolesterolemia, mas embora esses diterpenos fiquem parcialmente retidos no filtro, há relatos de que o consumo da bebida de café filtrada esteja associado a risco de doença cardiovascular (RANHEIM; HALVORSEN, 2005; THELLE, 1995).

A relação entre o café e os níveis séricos de colesterol total e LDL-c tem sido muito investigada (THELLE, 1995). Alguns autores relatam um aspecto positivo entre o consumo da bebida de café e os níveis séricos de colesterol total. As diversas maneiras com que a bebida de café é preparada levam à hipótese de que o método de preparação é fundamental para determinar o seu grau de atividade em sistemas biológicos (HIGDON; FREI, 2006; URGERT; KATAN, 1997).

## 2.5 Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* é uma doença multifatorial, frequente na sociedade moderna. Constitui um grupo heterogêneo de enfermidades metabólicas de etiologias diversas caracterizadas em comum por uma hiperglicemia crônica e alterações no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas derivados de defeitos na secreção de insulina, da ação da insulina ou de ambos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA, 2013).

A classificação atual do diabetes *mellitus* é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA, 2013) e recomendada pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) inclui quatro formas clínicas (descritas na Tabela 2): DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos e DM gestacional.

Tabela 2 Classificação etiológica de diabetes *mellitus*

---

<b>I. Diabetes tipo I</b>	Destruição das células beta, usualmente levando à deficiência completa de insulina
	A. Autoimune
	B. Idiopático
<b>II. Diabetes tipo II</b>	Graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina
<b>III. Outros tipos específicos</b>	
	A. Defeitos genéticos da função da célula beta
	B. Defeitos genéticos da ação da insulina
	C. Doenças do pâncreas exócrino
	D. Endocrinopatias
	E. Indução por drogas ou produtos químicos
	F. Infecções
	G. Formas incomuns de diabetes imunomediado
<b>IV. Diabetes gestacional</b>	

---

Fonte: ADA (2013)

Está bem estabelecida na literatura que a alta taxa glicêmica é a principal responsável pelos distúrbios metabólicos nos diabéticos, considerada como um importante fator no desenvolvimento de danos teciduais, em consequência das complicações severas no diabetes, efeitos esses que podem ser retardados com o controle glicêmico (RODRÍGUES et al., 2012).

Todo componente celular pode sofrer danos oxidativos e os distúrbios metabólicos desencadeados pela hiperglicemia estão diretamente relacionados a mecanismos diversos, tais como ao aumento da atividade da aldose redutase - via dos polióis; ativação da proteína cinase C (PKC) e ao aumento da formação de produtos avançados de glicação não enzimática (AGEs) (KOYA; KING, 1998) (Figura 5). Em vista dos prejuízos causados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio-ERO/ e espécies reativas de nitrogênio-ERN, a geração dessas espécies reativas parece ser um ponto em comum entre essas vias metabólicas. Uma fonte importante de ERO é a ativação da enzima NOX2 que desempenha um papel central nas células fagocíticas neutrofilicas durante o processo de defesa do organismo contra patógenos microbianos (SHEN, 2010).

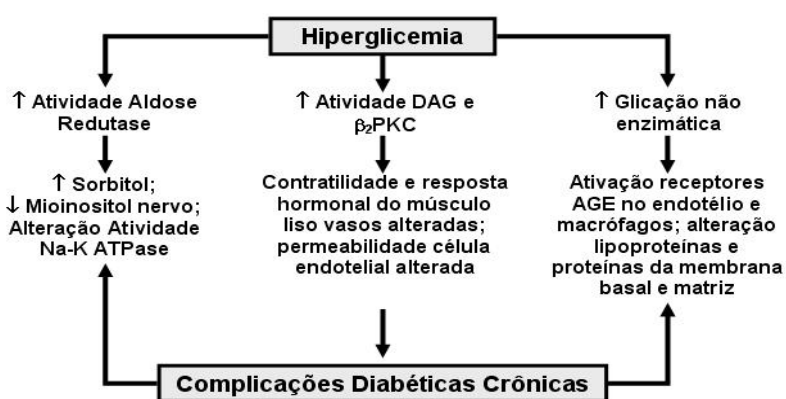


Figura 5 Estresse oxidativo e o diabetes

Fonte: adaptado Reis et al. (2008)

Nota: AGE: produtos finais da glicação avançados; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinase C

Os efeitos crônicos de ERO/ERN são considerados agentes importantes no processo de diabetes. O papel central do estresse oxidativo nas desordens e na progressão do diabetes tem sido amplamente investigado. Embora determinado nível de ERO e ERN esteja comprometido na regulação de processos fisiológicos, o dano oxidativo causado às células resultante do desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e a capacidade de defesa antioxidante do organismo podem agravar patologias, podendo levar à inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL-c) e à morte celular (BARBOSA; OLIVEIRA; TOJAL, 2008; HALIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As complicações macro e microvasculares do diabetes *mellitus* são a principal causa de morbidade e mortalidade nas sociedades industrializadas e são um problema grave de saúde pública cada vez maior, em todo o mundo (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

## **2.6 Produtos Finais de Glicação Avançados – AGEs**

Tanto estudos *in vitro*, quanto, *in vivo*, sugerem consequências da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) que podem contribuir diretamente para a progressão da patologia diabética. Dos diversos mecanismos propostos que tentam elucidar como a hiperglicemia crônica acarreta danos celulares e teciduais, como neuropatia, nefropatia e retinopatia diabética, a formação dos AGEs é considerada uma das mais importantes (BROWNLE, 2001; PEPPA; URIBARRI; VLASSARA, 2003). A alta concentração de glicose na célula é o ponto de partida para a formação de AGEs tanto intra, quanto extracelulares.



Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são resultantes de modificações pós-translacionais que ocorrem em proteínas, por uma sequência de reações entre resíduos de aminoácidos básicos e hidratos de carbono ou carbonilas reativas.

Constituem componentes formados a partir de interações aminocarbonilo, induzidas por reações não enzimáticas entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfatídeos ou ácidos nucleicos (MONNIER, 2003). A molécula de glicose pode ligar-se à estrutura de proteínas, mediada por uma reação não enzimática denominada reação de Maillard ou glicação (Figura 6).

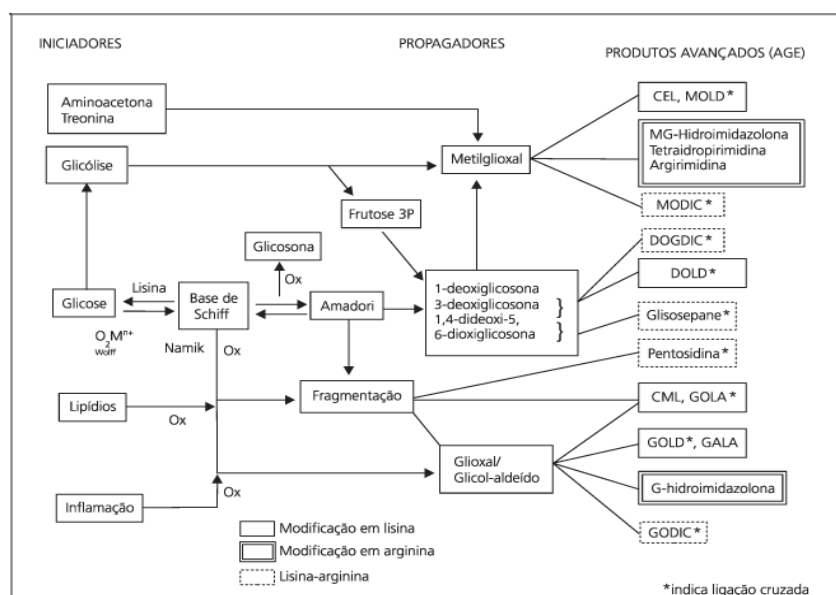


Figura 6 Rotas de formação e produtos finais de glicação avançada (AGE)

Fonte: Adaptado de Monnier (2003) e Seara, Oliveira e Barbosa (2008)

Nota: CML: carboximetilisina; carboxietilisina (CEL); DOGDIC: ligação cruzada imidazolina derivada de 3-deoxiglicossone; DOLD: dímero de lisina e 3-deoxiglicossone; GOLA: glioxal lisina amida; GOLD: dímero de glioxal-lisina, GALA: ácido glioxílico lisina amida; GODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de glioxal; MODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de metilglioxal; MOLD: dímero de metilglioxal-lisina.

Os AGEs mais estudados são, N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina (CML), de maior concentração no soro, N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina (CEL), pirralina, dímero de lisina derivado do glioxal (GOLD), dímero de lisina derivado do metil glioxal (MOLD), dímero de lisina derivado da 3-deoxiglucosona (DOLD), 1-alquil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol (AFGP) e FFI (2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-H-imidazol) e os fluorófos pentosidina e argipiridina (AHMED et al., 2002; IKEDA et al., 1998).

Os AGEs podem ser altamente lesivos à estrutura e à função dos vasos sanguíneos por diferentes mecanismos. Seus efeitos patológicos estão relacionados à capacidade destes compostos de alterar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas, os AGEs extracelulares interferem nas interações matriz-matriz e célula-matriz (GOLDIN et al., 2006).

Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais, causam enrijecimento da vasculatura, suprimem a atividade do óxido nítrico (NO) e da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e aumento da expressão de mediadores inflamatórios.

A participação dos AGEs como agentes favoráveis ao desenvolvimento de complicações diabéticas encontra-se estabelecida na literatura (JAKUS; RIETBROCK, 2004). Quanto à glicação intracelular, sabe-se, que estes compostos medeiam as alterações patológicas que levam a modificações de proteínas intracelulares envolvidas na expressão gênica.

Sabe-se que, os AGEs formados podem interagir com nucleotídeos, histonas ou proteínas envolvidas na transcrição do DNA celular e alterar propriedades importantes para a homeostase celular. Podem também alterar moléculas da matriz extracelular vizinha, intervindo na sinalização entre a matriz e a célula, causando disfunção em proteínas, como a albumina, que ativam em sequencia receptores de AGEs (RAGEs) estimulando a produção de

citocinas inflamatórias como interleucina 1 e 6, fator de crescimento I, fator de necrose tumoral alfa, prostaglandinas e fator estimulante de colônias de granulócitos (BROWNLEE, 2001; GOLDIN et al., 2006) (Figura 7).

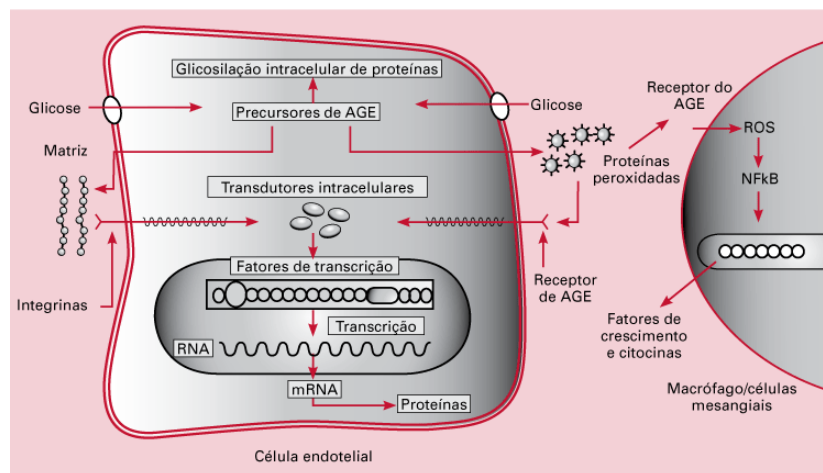


Figura 7 Aumento da produção de AGEs e suas consequências patológicas  
Fonte: Brownlee (2001)

Os efeitos tóxicos do oxigênio têm sido associados ao desenvolvimento e progressão de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas. Estudos demonstraram que os AGEs podem causar alterações metabólicas intensas, como afetar a integridade e a função dos vasos sanguíneos de maneiras diversas. Possuem a propriedade de se acumular nos órgãos-alvo que podem ser acometidos no diabetes, entre eles, o rim e a retina principalmente e, ainda, nas placas ateroscleróticas.

Na camada íntima dos vasos sanguíneos, os AGEs fazem ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas da matriz, aprisionam proteínas plasmáticas, além de interagirem com receptores para modular grande número de propriedades celulares, estimulam também a produção de endotelina-1, um potente vasoconstritor produzido pelas células endoteliais por meio da ativação

do NF-kB (fator de transcrição nuclear kappa B). Os AGEs interagem com as células que se acumulam nas placas ateroscleróticas, como macrófagos e as células musculares lisas, gerando estímulos que aumentam a resposta inflamatória, ativam plaquetas e a coagulação sanguínea (OLLAS et al., 2005).

Somado a esses processos, a interação dos AGEs com componentes da parede dos vasos sanguíneos aumenta a permeabilidade vascular, a expressão da atividade hemostática e pró-coagulante e a geração de ERO, resultando na expressão elevada de moléculas de adesão leucocitárias endoteliais (BIERHAUS et al., 1998). Portanto, os AGEs são agentes promotores da aterogênese, colaborando para a propagação do processo inflamatório, proliferativo e para perturbação vascular. Ligações cruzadas dos AGEs com o colágeno têm sido demonstradas em diabéticos, o que justifica a ocorrência de complicações crônicas dessa doença, tais como, rigidez vascular e espessamento de membranas basais.

A associação entre doença aterosclerótica e alterações da hemostasia e fibrinólise resulta em complicações trombóticas. A hiperatividade plaquetária é também um fator importante, responsável por trombozes, comuns nos pacientes com diabetes (OLLAS et al., 2005).

*In vivo*, a formação desses produtos pode envolver neutrófilos, monócitos e macrófagos, os quais, após estímulo inflamatório, produzem mieloperoxidase (MPO) e a enzima NOX2, que induzem a formação de mais AGEs por meio da oxidação de aminoácidos (HUEBSCHMANN et al., 2006).

A pesquisa de produtos de origem natural leva à descoberta de novos fármacos que podem agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas no organismo humano. Opções terapêuticas que inibam os AGEs ou reduzam o estresse oxidativo e nitrosativo podem ser eficientes em retardar as complicações diabéticas.

A aminoguanidina (Figura 8) possui ação inibitória na formação de AGEs devido à hidrazina presente em sua estrutura química, a qual reage com os compostos glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicose que são compostos intermediários na cadeia de formação dos AGEs (THORNALLEY, 2003). Além dos efeitos sobre a glicação avançada, a aminoguanidina em doses mais baixas pode atuar de maneira específica inibindo a atividade da enzima iNOS e assim reduzir o estresse nitrosativo (SZABO et al., 1997). A aminoguanidina também pode inibir o metabolismo da histamina, o catabolismo de poliaminas e a atividade da catalase, assim como potencializar os efeitos da angiotensina na produção de prostaciclina (NILSSON, 1999).

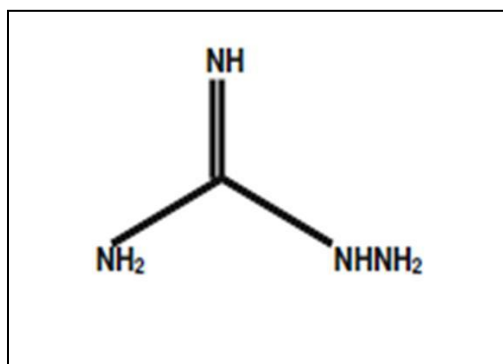


Figura 8 Estrutura molecular da aminoguanidina

Fonte: Sliman et al. (2010)

## 2.7 Sistema NOX2

Vários estudos destacam as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) como fundamentais para progressão de numerosas doenças crônicas, incluindo hipertensão, aterosclerose, falência cardíaca e diabetes. Essas espécies são moléculas altamente bioativas e com vida curta, derivadas, principalmente, da redução do oxigênio molecular (RABÊLO et al., 2010).

Os leucócitos constituem um grupo heterogêneo de células sanguíneas responsáveis pela resposta imune inata. São glóbulos brancos com funções fagocíticas essenciais na defesa do organismo contra micro-organismos invasores e partículas estranhas. Os neutrófilos são as únicas células do organismo capazes de executar “*burst oxidativo*”, ou seja, gerar ERO em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios. Essas EROs são geradas por mecanismos dependentes da MPO (mieloperoxidase), uma das enzimas presentes nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, e por mecanismos independentes da MPO (LETO, 1999).

A fagocitose é um processo de defesa do organismo mediado por diversos fatores, entre eles, receptores ativos, no qual o fagócito engloba um organismo alvo ou partícula. Promove rearranjos do citoesqueleto, e assim a membrana plasmática do fagócito emite pseudópodes em torno de seu alvo iniciando um processo que forma um vacúolo ligado à membrana chamado de fagossoma (NORDENFELT; TAPPER, 2011).

Os neutrófilos, são as células fagocíticas circulantes mais abundantes do sistema imune inato, respondem rapidamente a estímulos quimiotáticos, realizam funções fagocitárias e são as principais células atuantes na resposta inflamatória. São extremamente importantes na defesa do hospedeiro contra micro-organismos invasores e partículas estranhas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1995).

O neutrófilo da corrente sanguínea recebendo a informação de uma reação inflamatória inicial sofre uma intensa alteração no seu metabolismo intermediário e, dessa forma, é ativado. Suas moléculas de adesão serão expressas e passarão a consumir ativamente oxigênio em suas mitocôndrias. Assim, uma vez estimulados, são capazes de produzir um metabolismo oxidativo, não mitocondrial, denominado como “*burst*” oxidativo ou respiratório.

Durante a inflamação, ocorre o recrutamento e a ativação de neutrófilos e a infecção é combatida por fagocitose e liberação de moléculas antimicrobianas, matando assim micro-organismos; mas a capacidade destrutiva dos neutrófilos de forma exagerada pode causar danos nos tecidos do hospedeiro e contribuir para o desenvolvimento de uma série de doenças infecciosas e autoimunes (WITKO-SARSAT et al., 2000).

Em seguida à sua migração, os neutrófilos são ainda capazes de amplificar a resposta inflamatória, por liberar mais mediadores inflamatórios (HEIT et al., 2002). O recrutamento dessas células para o local da inflamação envolve uma sequência de fases, tais como, ativação, rolamento, adesão e transmigração, ordenada por moléculas de adesão expressas na membrana dos leucócitos e das células endoteliais, envolvidas na interação leucócito-endotélio (LEY et al., 2007).

Os neutrófilos produzem ERO durante o processo de fagocitose, e essa, é uma propriedade marcante exercida por essas células (NORDENFELT; TAPPER, 2011). A produção de ERO pela NOX2, em pequenas quantidades, pode funcionar na sinalização metabólica e, em grandes quantidades, pode originar dano oxidativo às células.

A migração celular constitui um evento chave na resposta inflamatória de qualquer etiologia. Os neutrófilos são uma das primeiras células a deixar a vasculatura e migrar para o tecido. Uma vez aderidos ao endotélio, os neutrófilos, penetram na íntima arterial por diapedese através das junções entre as células endoteliais. O início desse processo é mediado pela ligação reversível das glicoproteínas selectinas encontradas tanto no neutrófilo como no endotélio (DOWNEY et al., 1999).

O micro-organismo fagocitado é mantido dentro do vacúolo formado, o fagossomo, que se funde com o lisossomo, rico em enzimas proteolíticas e oxidativas que conferem aos fagócitos sua atividade antimicrobiana. A fusão do

fagossomo com o lisossomo resulta no fagolisossomo onde se dá a destruição do micro-organismo (DITTMAR et al., 2000).

A NOX2 das células fagocíticas é um dos principais mecanismos de defesa do sistema imune inato do organismo humano, cuja função fundamental é gerar ERO para destruir micro-organismos fagocitados durante o processo de resposta antimicrobiana respiratória (VIGNAIS, 2002). Assim, entre os mecanismos de defesa microbicida exercido pelos neutrófilos está a produção de ERO por parte da NOX2, um complexo enzimático multiproteico associado às membranas citoplasmáticas e dos grânulos específicos dos neutrófilos, formado de subunidades citoplasmáticas e de vesículas fagocíticas (RINCÓN; DÍAZ; QUINTERO, 2011).

A NOX2 é um complexo enzimático encontrado em diversas células de origem mesodérmica. Quando os fagócitos são expostos a estímulos adequados, as subunidades se unem e o complexo rapidamente se ativa. É formado por cinco componentes principais: p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> e p40<sup>phox</sup> que são subunidades citoplasmáticas, p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>phox</sup>, subunidades de membrana. A interação das proteínas gp91<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup> origina um heterodímero transmembrana flavocitocromo b<sub>558</sub>, uma flavohemoproteína ligada à membrana com a função de transferir elétrons através da membrana para o fagossomo ou para o espaço extracelular (CROSS; JONES, 1991; TAYLOR; JONES; SEGAL, 1993). Essas subunidades citoplasmáticas nas células em repouso permanecem dormentes. A produção de ERO é importante para a resposta microbicida, mas em quantidades elevadas pode causar danos aos tecidos do hospedeiro (ARIAS et al., 2004).

A ativação da NOX2 se dá pela translocação das subunidades citoplasmáticas p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup> para a membrana das vesículas fagocíticas ou para a membrana plasmática mediada por estímulos ativadores da proteína quinase C (PKC) e participação de proteínas acessórias como Rac2 (proteína G regulatória) (VIGNAIS, 2002). Transcorrida essa interação, o



NADPH oxidado a  $\text{NADP}^+$  e os elétrons são transferidos para o oxigênio molecular através do grupo FAD presente no flavocitocromo  $b_{558}$  e grupos HEME gerando o ânion superóxido (BABIOR, 1999; DELEO; QUINN, 1996) (Figura 9).

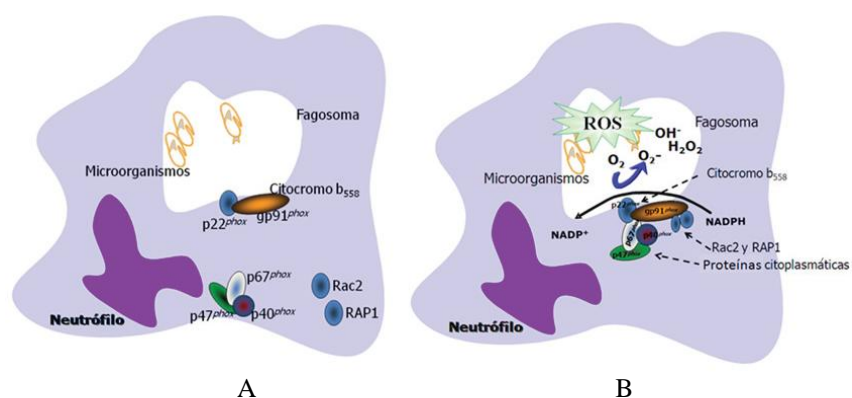


Figura 9 Componentes da NOX2 em estados de repouso (A) e após ativação celular (B)

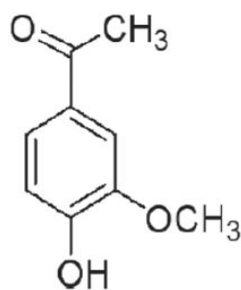
Fonte: Rincón, Díaz e Quintero (2011)

Nas últimas décadas, têm sido realizados estudos de compostos que tenham a capacidade de inibir a ação da enzima NOX2 e assim diminuir os danos causados pelas EROs em algumas patologias, como, por exemplo, no tratamento da hipertensão e diabetes. Existem diversos inibidores da NOX2, entre eles destaca-se a apocinina (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008), isolada da planta medicinal *Picrorhiza kurroa* (Figura 10).

A apocinina tem múltiplas ações biológicas além dos efeitos antioxidantes, e tem sido largamente utilizada para bloquear a atividade da NOX2 *in vitro* (DUSTING; SELEMIDIS; JIANG, 2004), sendo caracterizada como um inibidor do complexo enzimático NOX2 desde a década de 80,

diminuindo efetivamente a formação de ânions superóxidos (HEUMÜLLER et al., 2008).

O mecanismo de ação da apocinina não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que a mesma inibe a migração do componente citossólico p47<sup>phox</sup> do citoplasma para a membrana celular prevenindo a sua união a gp91<sup>phox</sup> e dessa forma a ativação do complexo enzimático (XIMENES et al., 2007).



**Apocinina**

Figura 10 Estrutura química da apocinina

Fonte: Galgani et al. (2013)

Estudos de Johnson et al. (2002) demonstram que o mecanismo de ação da apocinina envolve sua metabolização por meio da ação catalítica da enzima mieloperoxidase e a consequente geração de um produto dimérico. Sugere-se que este metabólito iniba a agregação e translocação para a membrana dos componentes citossólicos da NOX2. A inibição somente é efetiva na presença dos dímeros de apocinina (Figura 11).

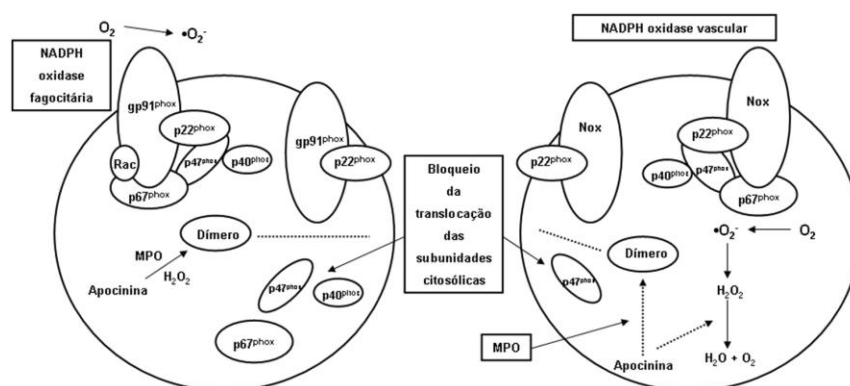


Figura 11 Mecanismo de inibição da NOX2 pela apocinina

Fonte: Adaptado de Touyz (2008)

## 2.8 Efeito hemostático

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos. Têm origem na medula óssea (ERUSALIMSKY; MARTIN, 1996; SHORE-LESSERSON, 2007), circulam no sangue com o formato de pequenos discos, com dimensões de 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  diâmetro, espessura em torno de 1,0  $\mu\text{m}$  e volume de 7 fL (FARIA; DAL BO, 2008) cuja principal função é a hemostasia primária, exercida através da formação do tampão plaquetário em locais dos vasos que tenham sofrido danos, reduzindo a perda sanguínea e auxiliando a cicatrização de ferimentos.

É também um importante componente da resposta imune, pois apresenta uma grande variedade de receptores e moléculas de adesão em sua membrana, além de numerosos grânulos com conteúdo de mediadores como citocinas, quimiocinas, fatores de coagulação, fatores angiogênicos e moléculas de adesão.

Diversas patologias contribuem para a ativação plaquetária, como ocorre em casos de doenças cardiovasculares e diabetes. Fatores como, a elevação dos níveis de colesterol, diabetes, fumo e obesidade, levam ao aumento da reatividade das plaquetas, levando à sua agregação e à formação de coágulos

podendo desencadear doença cardiovascular isquêmica (EFRAIM et al., 2011; KWIK-URIBE, 2005).

Muito embora o mecanismo de defesa contra hemorragias exercido pelas plaquetas seja geralmente benéfico, a ativação das plaquetas do sangue é fundamental para separar o processo fisiológico e patológico, que conduz a alterações morfológicas, adesão (na parede dos vasos define o primeiro passo na hemostasia e trombose), secreção e agregação plaquetária (EFRAIM et al., 2011; KWIK-URIBE, 2005).

As plaquetas podem ser afetadas pelos constituintes da dieta humana. Há muitos compostos presentes nos alimentos que interferem na função das plaquetas de diversas maneiras. Entre eles estão os compostos fenólicos, vitaminas e carotenoides presentes nas frutas, vegetais e bebidas, em especial o café (DREOSTI, 2000; HALLIWELL, 2000; HUNG et al., 2000; VISIOL; BORSANI; GALLI, 2000; YOUNG; WODSIDE, 2001).

O endotélio vascular tem papel protetor contra trombose e vasoespasmo por sua resposta às plaquetas agregadas. O revestimento endotelial da parede vascular desempenha funções antiagregantes e antitrombóticas, entre elas, a função de barreira física entre o meio circulante e os demais componentes da parede vascular (OLLAS et al., 2005).

Em situações fisiológicas, as plaquetas circulam no sangue em estado não ativado sob a forma discoide, são impedidas de interagir subendotelialmente graças ao endotélio vascular que funciona como uma barreira que exerce ativamente funções antiadesivas e antiagregantes, principalmente através da liberação de prostaglandina - PGI<sub>2</sub> e óxido nítrico (ASAKURA, 2004; CAUWENBERGHS et al., 2007).

As plaquetas exercem importante papel nos processos inflamatórios, de coagulação e de trombose. Os estímulos inflamatórios podem gerar um desequilíbrio entre as propriedades homeostáticas do endotélio, o que pode

resultar em estimulação local, e em sequência, um estado favorável à coagulação local e sistêmica.

Um potente indutor da resposta imune e mediador do recrutamento de leucócitos na inflamação é o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), uma das primeiras citocinas liberadas no sítio de infecção. Este promove um estado favorável ao mecanismo de coagulação ao inibir a síntese da proteína C e aumentar a produção do fator tecidual do endotélio e monócitos (ASAKURA, 2004; CAUWENBERGHS et al., 2007).

As plaquetas ativadas que são recrutadas para a lesão aterosclerótica liberam o conteúdo de seus grânulos que podem estimular a quimioatração leucocitária (fator ativador plaquetário, proteína inflamatória do macrófago-1 $\alpha$ , proteínas catiônicas), estimular a proliferação de células musculares lisas e de fibroblastos (fator transformador de crescimento- $\beta$ , fator de crescimento derivado da plaqueta, serotonina) e promover a síntese de colágeno (WAGNER; BURGER, 2003).

Uma vez ativadas e aderidas ao endotélio e às lesões ateroscleróticas, as plaquetas geram uma maior expressão do ligante CD40 solúvel (renomeado CD 154), o qual tem ação essencial na progressão da aterosclerose ao interagir com o CD40. A ligação do CD40 às células associadas ao ateroma, especialmente às células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos, media o processo de aterogênese através da expressão de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, metaloproteinasas e pró-coagulantes (SCHONBECK; LIBBY, 2001).

A modulação exercida pelo endotélio sobre a reatividade vascular é essencial para evitar trombose, efeito comum no diabetes. O desenvolvimento de doenças que alteram as propriedades hemostáticas envolve injúria e/ou disfunção vascular e reatividade plaquetária, como já descrito.

Substâncias geradas pelas plaquetas após a sua ativação também apresentam efeito sobre o vaso sanguíneo. As plaquetas ativadas secretam através de seus grânulos uma enorme quantidade de compostos como os nucleotídeos (ATP - adenosina trifosfato e ADP - adenosina difosfato), serotonina, tromboxano A<sub>2</sub> e tromboplastina, que originará trombina, e fator ativador de plaquetas (PAF). Algumas destas substâncias são estimulantes da musculatura lisa vascular, amplificam ativação plaquetária e estabilizam o coágulo. Os nucleotídeos também têm capacidade de liberar o óxido nítrico (NO) quando em presença de endotélio intacto. Então, o efeito vasodilatador exercido pelo NO, prevalece sobre o vasoconstritor, proporcionando aumento de fluxo local e remoção das plaquetas ativadas, em consequência, impedindo, a formação de trombo. Há também liberação de PGI<sub>2</sub> que, além de vasodilatador, tem capacidade de inibir a agregação plaquetária, o que dificulta a formação do trombo. O NO atua sobre as plaquetas inibindo os três componentes de sua função hemostática, como a adesão, ativação, secreção e agregação, sendo assim, interferindo na inflamação e na hemostasia (ASAKURA, 2004).

As plaquetas ativam alguns de seus receptores de membrana, a glicoproteína IIb/IIIa particularmente, em resposta aos sinalizadores extracelulares que podem ser o ADP e a trombina, que são solúveis, ou o colágeno que constitui o subendotélio (CAUWENBERGHS et al., 2007).

A ativação plaquetária em decorrência do endotélio lesado resulta em agregação plaquetária, formação de trombo e espasmo vascular por estarem o NO e a PGI<sub>2</sub> diminuídos ou ausentes, prevalecendo, o efeito vasoconstritor do fator de ativação plaquetário - PAF, do tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Figura 12) e da serotonina. O NO interfere na ação dos leucócitos no processo inflamatório e modula a expressão de proteínas de adesão como a P-selectina produzida no endotélio, reduzindo, dessa forma, a adesão leucocitária à parede vascular (LEE et al., 2004).

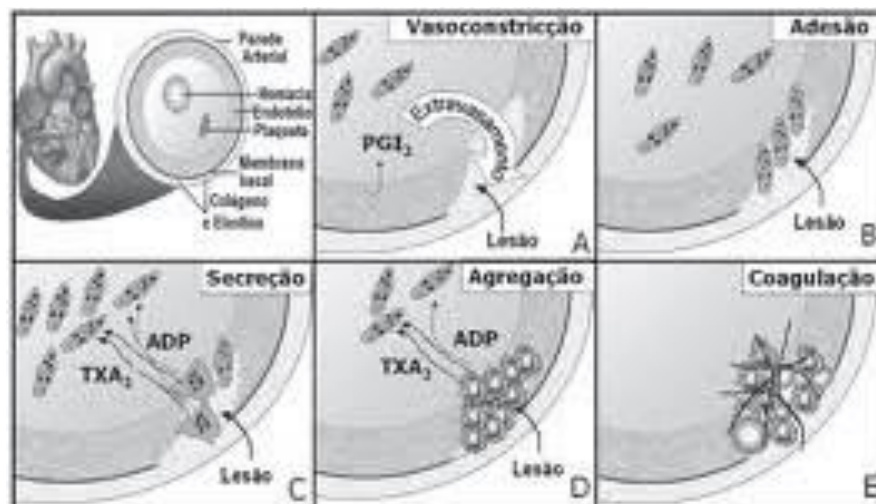


Figura 12 Participação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão

Fonte: Bates e Lau (2005), Erhardtson (2002) e Stassen, Arnout e Deckmyn (2004)

Nota: A: processo de injúria (lesão) com exposição de agonistas plaquetários; B: adesão das plaquetas ao subendotélio; C: mudança de forma da plaqueta com secreção dos grânulos; D: ligação plaqueta/plaqueta; E: depósito da fibrina sobre o tampão plaquetário.

Desse modo o endotélio vascular participa ativamente desse processo, libera um grande número de substâncias de relaxamento, dentre eles o NO, que através da modulação do tônus vascular, promove dilatação, o que representa um sistema local altamente efetivo (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). O NO é capaz de interferir no diâmetro e resistência vascular, inibe a interação dos elementos sanguíneos com a parede dos vasos.

Em patologias vasculares, a diminuição da síntese de NO reduz a perfusão tecidual e estimula a formação de trombos; enquanto que o excesso na formação de NO em estados patológicos resulta em maior vasodilatação e choque, com a redução da atividade plaquetária prejudicando a hemostasia (CHESTER et al., 1990; COOKE et al., 1992).

Compostos naturais têm sido amplamente investigados, quanto à sua ação anticoagulante e/ou antiplaquetária (CHAVES et al., 2010). Estudos *in vitro* evidenciam que a cafeína é bloqueadora da fosfodiesterase impedindo, assim, a conversão da adenosina monofosfato cíclico em 5-adenosina monofosfato, acarretando o aumento da adenosina monofosfato cíclico e consequente inibição da agregação plaquetária (CAVALCANTE et al., 2000; GILMAN et al., 1985). Entretanto, também é demonstrado que a cafeína, ao bloquear os receptores A<sub>2</sub> da adenosina presentes nas plaquetas provoca a agregação plaquetária, ou seja, um efeito trombótico (BAK; GROBBEE, 1990; CAVALCANTE et al., 2000).

Já está documentado um efeito antiplaquetário do café, este efeito, também foi demonstrado para suco de frutas, vinho tinto, cebola, chá e tomate. Esses resultados comprovam a importância da dieta na modulação da rede de plaquetas e confirmam o importante papel da dieta na prevenção ou auxiliar na progressão de doenças como o diabetes (HODGSON et al., 2002; HUBBARD et al., 2006; O'KENNEDY et al., 2006; PIGNATELLI et al., 2002; POLAGRUTO et al., 2003).

A hiperglicemia pode conduzir a um estado plaquetário ativado aumentando a adesão plaquetária, resultando em agregação e assim a formação de trombos. A piora do controle glicêmico leva à inflamação e ruptura das placas ateromatosas (OUVINA et al., 2001). Entre os mecanismos responsáveis por essas alterações, estão os AGEs formados intracelularmente, que podem alterar estruturas celulares importantes para a homeostasia vascular (BROWNLEE, 2005).

Há um interesse crescente sobre os processos que acarretam modificações de mecanismos hemostáticos e sua relação com as desordens vasculares no diabetes, supostamente, essas modificações podem ter especial importância para determinar o aumento de risco da enfermidade macro e



microvascular no diabetes (BARRANTES et al., 1985; FULIER, 1979). Deste modo, as evidências de uma tendência trombótica aumentada no diabetes podem ter implicações etiológicas, preventivas e terapêuticas (MCMILLAN, 1975).

As células e seus componentes não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos, assim, para reforçar os sistemas antioxidantes de defesa, é desejável a ingestão de substâncias com capacidade antioxidante para combater o excesso de ERO no organismo. Alguns polifenóis, como o flavonol quercetina e os flavonóis catequina e epicatequina, além de carotenoides e vitaminas C e E, ácidos clorogênicos, apresentam elevada atividade antioxidante comprovada (EFRAIM et al., 2011; JACOB; BURRI, 1996).

### 3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a bebida de café possui atividade antioxidante, demonstrados através da sua capacidade de inibir a geração do *pool* de ERO e ânion superóxido nos modelos experimentais utilizados. Encontramos também propriedades antiglicação do café demonstrada através da redução na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) no nosso modelo experimental. Esse efeito pode ser devido a compostos com ação antioxidante, como os compostos fenólicos, em especial os ácidos clorogênicos, dentre outros, que foram determinados no café utilizado no tratamento dos animais. O café demonstrou um efeito antiagregante plaquetário, esses resultados são especialmente interessantes, uma vez que o diabetes é um fator de risco para trombose e que o café é uma bebida amplamente apreciada no mundo contemporâneo. Adicionalmente, a ingestão da bebida de café não interferiu na função renal e não afetou o perfil glicêmico dos animais em estudo. Além disso, a ingestão da bebida de café não alterou a capacidade de fagocitose e microbicida de neutrófilos peritoneais dos animais em estudo frente à *Candida albicans*. Novos estudos poderão ser realizados para elucidar os mecanismos de ação do café e estabelecer o potencial terapêutico desses compostos para os pacientes diabéticos e prevenir as complicações crônicas que acompanham a hiperglicemia.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PODER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. São Paulo: Elsevier, 1995. 560 p.
- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1799-1804, dez. 2008.
- AHMED, N. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. **Biochemical Journal**, London, v. 364, n. 1, p. 1-14, 2002.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Position statement: standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 36, n. 1, p. S11-66, 2013. Supplement.
- ARIAS, A. A. et al. Expression y actividad de posibles normales em La proteína de 67 Kd Del sistema NADPH oxidasa utilizando El sistema COS<sup>phox</sup>. **Biomédica**, Bogota, v. 24, n. 3, p. 262-272, 2004.
- ASAKURA, H. et al. Combined antiplatelet agentes might help prevent arterial. **Thrombosis and Haemostasis**, Carrboro, v. 91, n. 1, p. 71-76, 2004.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, New York, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, Mar. 1999.
- BAK, A. A.; GROBBEE, D. E. Coffee, caffeine and hemostasis: a review. **Netherlands Journal of Medicine**, Utrecht, v. 37, n. 5/6, p. 242-246, Dec. 1990.

BANDEIRA, R. D. C. C. et al. Composição volátil dos defeitos intrínsecos do café por CG/EM-HEADSPACE. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 309-314, 2009.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; TOJAL, L. S. e. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BARRANTES, A. et al. Modificaciones de la hemostasia em la diabetes mellitus del adulto. **Revista Costarricense de Ciencias Médicas**, San José, v. 6, n. 2, p. 87-96, 1985.

BATES, E. R.; LAU, W. C. Controversies in antiplatelet therapy for patients with cardiovascular disease. **Circulation**, Baltimore, v. 11, n. 7, p. 267-271, 2005.

BATHENA, S. J.; VELASQUEZ, M. T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 76, n. 6, p. 1191-201, Dec. 2002.

BELAY, A. et al. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 1, p. 310-315, May 2008.

BIERHAUS, A. et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus: I., the AGE concept. **Cardiovascular Research**, Philadelphia, v. 37, n. 3, p. 586-600, 1998.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, London, v. 414, n. 6865, p. 813-820, Dec. 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, New York, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. Coffee and its consumption: benefits and risks. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 51, n. 4, p. 363-373, Apr. 2011.

CARDOSO, L. M. et al. Efeito das tinturas de café torrado e moído nos níveis séricos de colesterol, triglicérides e glicose em ratos diabéticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 32, n. 1, p. 77-81, 2011.

CARRILLO, J. A.; BENITEZ, J. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. **Clinical Pharmacokinetics**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 127-153, Aug. 2000.

CARVALHO, L. M. et al. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de café Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, mar. 2001.

CAUWENBERGHS, S. et al. Hemostatic and signaling functions of transfused platelets: transfusion medicine reviews. **Transfusion Medicine Reviews**, London, v. 21, n. 4, p. 287-294, 2007.

CAVALCANTI, J. W. S. et al. Influência da cafeína no comportamento da pressão arterial e da agregação plaquetária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 75, n. 2, p. 97-101, 2000.

CELIK, T.; IYISOY, A.; AMASYALI, B. The effects of coffee intake on coronary heart disease: ongoing controversy. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 118-120, Sept. 2009.

CHAVES, D. S. A. et al. Metabólicos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 172-180, 2010.

CHESTER, A. H. et al. Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. **Lancet**, London, v. 336, n. 8720, p. 897-900, Oct. 1990.

CLARKE, R. J. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. London: Academic, 2003. v. 3, 1486 p.

CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. Z. **Coffee: recent developments**. Berlin: Blakwell Science, 2001. 272 p.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature occurrence and dietary burden. **Journal of Science and Food Agriculture**, Easton, v. 79, n. 3, p. 362-372, Mar. 1999.

COFFEE AND TEA AUTHORITY. **The profile of Ethiopian coffee**. Addis Ababa, 2003. 24 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: safra 2014, primeiro levantamento**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 13 maio 2014.

CONNERY, A. H. et al. Stimulatory effect oral administration of tea, coffee or caffeine on UVB-induced apoptosis in the epidermis of SKH-1 mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 224, n. 3, p. 209-213, Nov. 2007.

COOKE, J. P. et al. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 90, n. 3, p. 1168-1172, Sept. 1992.

CORNELIS, M. C. et al. Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. **JAMA**, Chicago, v. 295, n. 10, p. 1135-1141, Mar. 2006.

CREWS, H. M.; OLIVIER, L.; WILSON, L. A. Urinary biomarkers for assessing dietary exposure to caffeine. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 18, n. 12, p. 1075-1087, Dec. 2001.

CROSS, A. R.; JONES, O. T. Enzymic mechanisms of superoxide production. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1057, n. 3, p. 281-298, May 1991.

DELEO, F. R.; QUINN, M. T. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 60, n. 6, p. 677-691, Dec. 1996.

DITTMAR, T. et al. Lessons from tumor and immunocompetent cells: the quantitative engagement of ligand-receptor interactions modulates stop-and-gobehaviour as well as proliferation. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 60, n. 2, p. 27-33, 2000. Supplement.

DOWNEY, G. P. et al. Phagosomal maturation, acidification, and inhibition of bacterial growth in nonphagocytic cells transfected with FcγRIIA receptors. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 40, p. 28436-28444, Oct. 1999.

DREOSTI, E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition**, Tarrytown, v. 16, n. 7/8, p. 692-694, July/Aug. 2000.

DUSTING, G. J.; SELEMIDIS, S.; JIANG, F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 97-103, 2004. Suplemento.

EFRAIM, P. et al. Revisão: polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 181-201, jul./set. 2011.

ERHARDTSEN, E. To general haemostasis: the evidence-based route. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, San Diego, v. 32, n. 1, p. 47-52, 2002.

ERUSALIMSKY, J. D.; MARTIN, J. F. Cellular model systems to study megakaryocyte differentiation. In: WATSON, S. P.; AUTHI, K. S. (Ed.). **Platelets-A practical approach**. New York: Oxford University, 1996. chap. 2.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacases, v. 18, n. 1, p. 23-36, Jan./Mar. 2006.

FARIA, M. G.; DAL BÓ, S. Determinação do intervalo de referência para o volume plaquetário médio (VPM) utilizando o analisador hematológico Penta 120 ABX. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 39-41, 2008.

FRARY, C. D.; JOHNSON, R. K.; WANG, M. Q. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 105, n. 1, p. 110-113, Jan. 2005.

FULIER, J. H. et al. Haemostatic variables associated with diabetes and its complications. **British Medical Journal**, London, v. 2, p. 964-969, 1979.

GALGANI, F. J. E. et al. Efecto de la ingesta aguda de vanillina sobre la resistencia insulínica en humanos. **Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes**, Santiago, v. 6, n. 1, p. 6-11, 2013.

GIMAN, A. G. et al. **Drugs used in the treatment of asthma: the pharmacological basis of therapeutics**. 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: McGraw Hill, 1985. 630 p.

GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, Baltimore, v. 114, n. 6, p. 597-605, 2006.

GRAAFF, J. **The economics of coffe**. Wageningen: Pudoc, 1986. 294 p.

GRAHAM, T. E.; HIBBERT, E.; SATHASIVAM, P. Metabolic and axercise endurance effects of coffee and caffeine ingestion. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 85, n. 3, p. 883-889, Sept. 2008.



GREENBERG, J. A.; BOOZER, C. N.; GELIEBTER, A. Coffee, diabetes, and weight control. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 84, n. 4, p. 682-693, 2006.

GREER, F. et al. Caffeine ingestion decreases glucose disposal during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp in sedentary humans. **Diabetes**, New York, v. 50, n. 10, p. 2349-2354, Oct. 2001.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, Philadelphia, v. 47, n. 3, p. 410-418, Aug. 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 5<sup>th</sup> ed. Oxford: Clarendon, 1999. 704 p.

HEIT, B. et al. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration opposing chemotactic gradients. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 159, n. 1, p. 91-102, 2002.

HEUMÜLLER, S. et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, Dallas, v. 51, n. 2, p. 1-7, Feb. 2008.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 46, n. 2, p. 101-123, 2006.

HODGSON, J. M. et al. Acute effects of ingestion of black tea on postprandial platelet aggregation in human subjects. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 87, n. 2, p. 141-145, Feb. 2002.

HUBBARD, G. P. et al. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 96, n. 3, p. 482-488, Sept. 2006.

HUEBSCHMANN, A. G. et al. Diabetes and glycoxidation end products. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 29, n. 6, p. 1420-1432, 2006.

HUNG, L. M. et al. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 549-555, Aug. 2000.

IKEDA, K. et al. Immunochemical approaches to AGE-structures: characterization of anti-AGE antibodies. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 215, pt. 1, p. 95-104, 1998.

INSTITUTE OF MEDICINE. Magnesium. In: \_\_\_\_\_. **Dietary reference intakes: calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride**. Washington: National Academy, 1997. p. 190-249.

INSTITUTE OF MEDICINE. Niacin. In: \_\_\_\_\_. **Dietary reference intakes: thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B-6, vitamin B-12, pantothenic acid, biotin, and choline**. Washington: National Academy, 1998. p. 123-149.

INSTITUTE OF MEDICINE. Potassium. In: \_\_\_\_\_. **Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate**. Washington: National Academies, 2004. p. 173-246.

IWAI, K. et al. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 15, p. 4893-4898, July 2004.

JACOB, R. A.; BURRI, B. J. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 63, n. 6, p. 985S-990S, June 1996.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological Research**, Praha, v. 53, n. 2, p. 131-142, 2004.

JAMES, J. E. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. **Psychosomatic Medicine**, New York, v. 66, n. 1, p. 63-71, Jan./Feb. 2004.

JOHNSON, D. K. et al. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, London, v. 9, n. 3, p. 191-203, 2002.

JUNG, U. J. et al. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 38, n. 7, p. 1134-1145, 2006.

KEIJERS, G. B. et al. Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 25, n. 2, p. 364-369, Feb. 2002.

KRUL, C.; HAGEMAN, G. Analysis of urinary caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applied**, Amsterdam, v. 709, n. 1, p. 27-34, May 1998.

KOYA, D.; KING, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes**, New York, v. 47, pt. 6, p. 859-866, 1998.

KWIK-URIBE, C. Potential health benefits of cocoa flavonols. **The Manufacturing Confectioner**, Princeton, v. 85, n. 10, p. 43-49, 2005.

KY, C. L. et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L and *C. canephora* P accessions. **Food Chemistry**, London, v. 75, n. 2, p. 223-230, Nov. 2001.

LEE, K. J. et al. Protective effect of acteoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. **Life Science**, Elmsford, v. 74, n. 8, p. 1051-1064, Jan. 2004.

LEITE, C. A. M.; SILVA, D. M. A demanda de cafés especiais. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Café: produtividade, qualidade e sustentabilidade**. Viçosa, MG: UFV, 2000. p. 51-73.

LEITE, R. A. **Mucilagem residual e qualidade da bebida do café cereja descascado**. 2002. 134 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

LETO, T. L. The respiratory burst oxidase. In: GALLIN, J. L.; SNYDERMAN, R. (Ed.). **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. p. 769-786.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leucocyte adhesion Scade updated. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 7, n. 9, p. 678-689, Sept. 2007.

MATIELLO, J. B. **A café do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo, 1991. 320 p.

MATIJASEVICH, A.; SANTOS, I. S.; BARROS, F. C. Does caffeine consumption during pregnancy increase the risk of fetal mortality?: a literature review. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1676-1684, nov./dez. 2005.

MAZZAFERA, P.; CROZIER, A.; MAGALHAES, A. C. Caffeine metabolism in coffee arabica and other species of coffee. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 3913-3916, Dec. 1991.

MCCUSKER, R. R.; GOLDBERGER, B. A.; CONE, E. J. Caffeine content of specialty coffees. **Journal of Analytical Toxicology**, Niles, v. 27, n. 7, p. 520-522, Oct. 2003.

MCMILLAN, D. Deterioration of the microcirculation in diabetes. **Diabetes**, New York, v. 24, p. 949-957, 1975.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 109-142, June 1991.

MONNIER, M. N. Intervention against the Maillard reactions in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 419, n. 1, p. 1-15, 2003.

MONROY, G. M. E. R. **Caracterización del aroma del café molido de Puerto Rico mediante la técnica de microextracción en fase sólida (spme) y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (gc/ms)**. 2005. 156 p. Dissertação (Mestrado em Ciência y Tecnología de Alimentos) - Universidade de Puerto Rico, San José, 2005.

MORAIS, S. A. L. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante o café conilon submetido a diferentes graus de torra. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 327-331, mar. 2009.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; MARIA, C. A. B. de. Compostos voláteis do café torrado: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 195-203, jul. 2000.

MORGANO, M. A. et al. Determinação de minerais em café cru. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 19-23, 2002.

NATELLA, F.; SCACCINI, C. Role of coffee in modulation of diabetes risk. **Nutrition Review**, Baltimore, v. 70, n. 4, p. 207-217, Apr. 2012.

NILSSON, B. O. Biological effects of aminoguanidine: an update. **Inflammation Review**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 9030-9036, 1999.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 90, n. 2, p. 271-284, Aug. 2011.

O'KENNEDY, N. et al. Effects of tomato extract on platelet function: a double-blinded crossover study in healthy humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 84, n. 3, p. 561-569, Sept. 2006.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, M. H. D. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLLAS, B. et al. Inhibition of blood platelet adhesion and acretion by different phenolics from *Yucca achidigera* Roezl. Bark. **Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 199-206, Feb. 2005.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 1, p. 66-71, Jan. 2001.

OUVIÑA, S. M. et al. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 102, n. 2, p. 107-114, 2001.

PARDO-LOZANO, R. et al. Caffeine: a nutrient, a drug, or a drug of abuse? **Adicciones**, Palma de Mallorca, v. 19, n. 3, p. 225-238, 2007.

PARRAS, P. et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, London, v. 102, n. 3, p. 582-592, 2007.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clinical Diabetes**, Alexandria, v. 21, n. 4, p. 186-187, 2003.

PIGNATELLI, P. et al. Red and white wine differently affect collagen-induced platelet aggregation. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, San Diego, v. 32, n. 5/6, p. 356-358, Sept./Dec. 2002.

POLAGRUTO, J. A. et al. Effects of flavonoid-rich beverages on prostacyclin synthesis in humans and human aortic endothelial cells: association with ex vivo platelet function. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 6, n. 4, p. 301-308, 2003.

PRAKASH, N. S. et al. AFLP analysis of introgression in coffee cultivars (*Coffea arabica* L.) derived from a natural interspecific hybrid. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 3, p. 265-271, 2002.

RABÊLO, L. A. et al. Papel da NADPH oxidase no desbalanço redox. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v. 94, n. 5, p. 684-693, 2010.

RANHEIM, T.; HALVORSEN, B. Coffee consumption and human health: beneficial or detrimental?: mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 49, n. 3, p. 274-284, Mar. 2005.

REIS, J. S. et al. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 52, n. 7, p. 1096-1105, out. 2008.

RIBEIRO, I. S. et al. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 52/53, p. 13-18, June 2008.

RINCÓN, J. C. A.; DÍAZ, L. Y. G.; QUINTERO, J. A. L. Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas. **Iatreia**, Medellín, v. 23, n. 4, p. 362-372, 2011.

ROBINSON, L. E. et al. Caffeine ingestion before an oral glucose tolerance test impairs blood glucose management in men with type 2 diabetes. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, n. 10, p. 2528-2533, Oct. 2004.

RODRÍGEUS, S. A. et al. Diabetes mellitus. **Medicine**, London, v. 11, n. 17, p. 995-1002, 2012.

SACCHETTI, G. et al. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 90, n. 1, p. 74-80, Jan. 2009.

SCHÖNBECK, U.; LIBBY, P. CD40 signaling and plaque instability. **Circulation Research**, Baltimore, v. 89, n. 12, p. 1092-1103, Dec. 2001.

SEARA, L. T.; OLIVEIRA, S. L.; BARBOSA, J. H. P. O papel dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

SHEN, G. X. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Birmingham, v. 88, pt. 3, p. 241-248, 2010.

SHORE-LESSERSON, L. Platelet inhibitors and monitoring platelet function: implications for bleeding. **Hematology Oncology Clinics North America**, Maryland, v. 21, n. 1, p. 51-63, Feb. 2007.

SIMÕES, R. O.; FARONI, L. R. D.; QUEIROZ, D. M. Qualidade dos grãos de café (*Coffea arabica* L.) em coco processado por via seca. **Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 2, p. 139-146, 2008.

SLIMAN, S. et al. Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 333, n. 1, p. 9-26, 2010.

SPILLER, M. A. The chemical components of coffee. In: \_\_\_\_\_. **Caffeine**. Boca Raton: CRC, 1998. p. 97-161.

STASSEN, J. M.; ARNOUT, J.; DECKMYN, H. The hemostatic system. **Current Medicinal Chemistry**, Wageningen, v. 11, n. 17, p. 2245-2260, 2004.



STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators of Inflammation**, Sylvania, v. 2008, p. 106-507, Dec. 2008.

SUZUKI, A. et al. Hydroquyhydroquinone interferes with the chlorogenic acid-induced restoration of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 21, n. 1, p. 23-27, 2008.

SZABÓ, C. et al. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 14, p. 9030-9036, 1997.

TAYLOR, W. R.; JONES, D. T.; SEGAL, A. W. A structural model fr the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain. **Protein Science**, Cold Springer Harbor, v. 2, n. 10, p. 1675-1685, Oct. 1993.

THELLE, D. S. Coffee, tea and coronary heart disease. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 6, n. 1, p. 25-27, Feb. 1995.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

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

TOUYZ, R. M. Apocynin, NADPH oxidase and vascular cells: a complex matter. **Hypertension**, Dallas, v. 51, p. 172-174, Dec. 2008.

TSUKUI, A.; OIGMAN, S. S.; REZENDE, C. M. Óleo de grãos de café cru: diterpenos cafestol e caveol. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 6, n. 1, p. 16-33, 2014.

TUNNICLIFFE, J. M.; SHEARER, J. Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, Ottawa, v. 33, n. 6, p. 1290-1300, June 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Nutrient database for standard reference, release 17**. Washington, 2004. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

URGERT, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 17, p. 305-324, 1997.

VIANI, R. Coffee. In: ULLMANN'S encyclopedia of industrial chemistry. Weimheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1986. p. 315-339.

VIGNAIS, P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59, n. 9, p. 1428-1459, 2002.

VISIOL, F.; BORSANI, L.; GALLI, C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 419-425, 2000.

WAGNER, D. D.; BURGER, P. C. Platelets in inflammation and thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v. 23, n. 12, p. 2131-2137, Dec. 2003.

WITKO-SARSAT, V. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory Investigation**, London, v. 80, n. 5, p. 617-653, May 2000.

XIMENES, V. F. et al. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 457, n. 2, p. 134-141, Jan. 2007.

YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 3, p. 592-596, Feb. 2004.

YOUNG, I. S.; WODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 54, n. 3, p. 176-186, Mar. 2001.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, London, v. 414, p. 782-787, Dec. 2001.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1** Ingestion of coffee (*Coffea arabica* L.) reduces advanced glycation end product (AGEs) formation and platelet aggregation in diabetic rats

**Artigo preparado de acordo com a norma para submissão do periodico  
Journal of ethnopharmacology**

**Ingestion of coffee (*Coffea Arabica* L.) reduces advanced glycation end product (AGEs) formation and platelet aggregation in diabetic rats**

**ABSTRACT**

The relationship between the bioactive compounds present in coffee and health has been widely investigated. Studies have demonstrated the role of these bioactive constituents in various biological systems, including an inverse relationship between coffee consumption and the risk of diabetes and its complications. Chronic hyperglycemia promotes the generation of advanced glycation end products (AGEs) formed by the modification of proteins via the Maillard reaction. AGE formation has been shown to promote cellular alterations in diabetic rats, which may lead to hemostatic system disorders among others. In this study, we compared the effects of coffee and aminoguanidine, an inhibitor of protein glycation on AGE formation and platelet aggregation in diabetic rats. The renal function of the treated rats was assessed by urea and creatinine measurement because the kidney is the mostly site of clearance of AGEs. Our results showed that the ingestion of coffee reduced AGE formation and platelet aggregation in our animal model. Aminoguanidine was effective in inhibiting AGE formation and platelet aggregation. In addition, we showed that coffee has no effect on the animal's renal function. These results are particularly interesting because hemostasis complications are common in diabetic patients, and coffee is a widely consumed beverage. However, further studies are needed to elucidate the mechanisms behind the actions of coffee.

**Keywords:** *Coffea Arabica* L., diabetes mellitus, advanced glycation end product (AGEs), aminoguanidine, platelet aggregation.

## 1. INTRODUCTION

Phenolic compounds present in foods and beverages have been associated with a decreased risk of the development of several chronic diseases (Ribeiro et al., 2008). Coffee, which contains chlorogenic acid as a main component, is the major source of phenolic compounds in the human diet (Lafay et al., 2006; Gomez-Ruiz et al., 2007; Natella and Scacini, 2012) and one of the most appreciated beverages worldwide. Because of its specific organoleptic characteristics and potential effects on human health, coffee has aroused the interest of the scientific community (Alvez et al., 2009).

The chemical composition of the coffee bean is quite complex and depends on the variety, cultivar, processing type, degree of roasting and grinding, and the method of beverage preparation (Smith, 1987; Sato et al., 1995; Illy and Viani, 2005; Lima et al., 2010). Furthermore, factors and dietary habits of coffee consumers, such as frequency of coffee ingestion, lifestyle, and genetic predisposition to developing certain diseases, can equally affect the possible effects of coffee on health (Higdon and Frei, 2006).

Chronic conditions, such as diabetes and cardiovascular diseases, are currently the primary causes of increased morbidity and mortality in the world and therefore serious public health problems (ADA, 2013).

The main complications caused by chronic hyperglycemia during diabetes include systemic metabolic disorders for which increasing oxidative stress has been implicated as a crucial player (Reis et al., 2008; Wu et al., 2011). Among the key factors that can explain the ability of these compounds to alter the chemical and functional properties of various biological structures is the formation of advanced glycation end products (AGEs) (Browlee, 2001; Peppia et al., 2003). The chronic state of hyperglycemia contributes significantly to endothelial injury through the generation of free radicals, through interactions

with cellular receptors, or via cross-linking with proteins. The irreversible glycation of subendothelial collagen and other structural proteins changes vase structure and promotes vascular permeability and the synthesis of pro-inflammatory cytokines, leading to diabetic complications, such as macrovascular disorders (Reasner, 2008; Borissoff et al., 2011). Moreover, platelets adhere to subendothelial components and become activated via cell signaling, resulting in cellular shape change, secretion and aggregation. It has been reported that hyperglycemia increases the propensity for platelets to aggregate and degranulate, leading to a hypercoagulable state (Barg et al., 2007; Gray et al., 2008; Michelson, 2010).

Coffee, which contains a combination of bioactive components, especially phenols, is one of the several therapeutic candidates that have been studied in the search for compounds that can prevent the complications caused by diabetes. This study aims to determine the effects of coffee on the formation of AGEs and platelet aggregation in diabetic rats.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. The preparation and characterization of both integral

Samples of coffee (*Coffea arabica* L., planted in Brazil) were provided by Cocam Industry (Catanduva-SP, Brazil). The integral coffee were roasted to the same degree. Coffee beverages were prepared at a 10 % (w/v) concentration. The coffee powder was put on a paper filter funnel (Whatman N°3, General Electric Company), and water at 90 °C was poured over the powder (Duarte et al., 2005). These beverage samples were lyophilized to perform the chemical analyses. For the bioassays, the drinks were always prepared at the time of administration to the animals.

### 2.2. Determining bioactive compounds in the beverages

The total phenolic content was determined with the Folin- Ciocalteu method, using tannic acid as the standard (Lima et al., 2010). To determine the caffeine, chlorogenic acid (CGA), trigonelina and niacina contents, hot water extraction procedures were used according to Lima et al. (2010). The chromatographic separation of the compounds was performed with an HPLC apparatus equipped with data transmitter (Jasco LC - NetII / ADC, Japan), high pressure pumps (Jasco PU-980, Japan), automatic refrigerated injector (4 ° C, Jasco AS - 2057 Plus, Japan) and photodiode detector (Jasco MD - 2015 Plus, Japan) on a reverse phase column (Phenomenex, 250 x 4.60 mm C18 ODS - 2; 5µm) eluting (1mL/min) for 30 minutes at room temperature with acetate buffer gradient (PA, Aldrich, Germany) (a) methanol and (B) (HPLC grade), according to Chambel et al. (1997), at 1 mL / min. The concentrations of 5-caffeoylquinic



acid (5-CQA) and caffeine, trigonelline and niacin were calculated by means of calibration curves made with their respective standards (Sigma).

### 2.3. Administration of coffee beverages, induction diabetes and treatment with a AGEs inhibitor (aminoguanidine)

Twelve-week-old male Wistar rats from the animal house of the Federal University of Alfenas, weighing  $320 \pm 20$  g, were maintained at a temperature of  $23^{\circ}\text{C}$ , with a light–dark period of 12h, and received commercial feed and water ad libitum during the entire experimental period. All in vivo experiments followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of UNIFAL-MG doc. n° 420/2012 e 536/2013.

Filtered coffee beverages were administered animals by gavage for a period of 50 days at a dose of 7.2 ml/kg/day, which is equivalent to the daily human consumption of eight 50-mL cups of coffee. The control group received the same dosage of water. The induction of diabetes was performed in animals kept fasting for 12 hours by intraperitoneal administration of alloxan (2% solution) at a dose of 150 mg/kg (Szkudelski, 2001; de Souza Fereira, 2012). In this study were considered diabetic animals had glycemia above 250 mg / dL verified by the Trinder reaction, 7 days after the induction (Stoppa, 2006).

The treatment with aminoguanidine (AMG) (Edelstein and Browlee, 1992) (100mg/Kg/day) by gavage for 50 days was started 7 days after the administration of alloxan and confirmation of diabetic status.

#### 2.4. Experimental delineation

After a week of acclimatization, the animals were divided into 6 groups, non-diabetic animals treated with distilled water (ND), non-diabetic animals treated with aminoguanidine (ND+AMG), non-diabetic animals treated with full arabica coffee (ND+CF), diabetic animals treated with water (D), diabetic rats treated with aminoguanidine (D+AMG), and diabetic animals treated with full arabica coffee (D+CF). On day 51 the animals were fasted for 12 hours, anesthetized the animals were sacrificed by deepening anesthesia following the administration of 40 mg.kg<sup>-1</sup> sodium pentobarbital intraperitoneally. Blood was obtained by puncturing the heart and the abdominal aorta distributed in siliconized test tubes without additive into, siliconized tubes containing ethylene diamine tetraacetic acid and sodium citrate-containing tubes. They were then euthanized by cervical dislocation.

#### 2.5. Glycemic profile

Blood glucose was determined by enzymatic method (Burtis and Ashwood, 2008). The glycated hemoglobin (HbA1c) was assessed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) by ion exchange equipment D-10 Dual BIO-RAD, using calipers level 1 e level 2, Kit Hemoglobin A1c Program e Dual Program BIO-RAD®.

#### 2.6. Renal profile

The dosages of urea and creatinine were made by commercial kit, using the Jaffe method for creatinine and urea enzymatic colorimetric method (modified Berthelot) in automated machine (HumaStart, Human®).

## 2.7. AGEs Spectrofluorometric measure

AGEs were quantified by measuring fluorescence as described by Zilin et al. (2001). Briefly, serum samples (70  $\mu\text{L}$ ) were mixed with 1,6 mL of TCA ( $0.15 \text{ mol.L}^{-1}$ ) in microcentrifuge tubes, and 330  $\mu\text{L}$  of chloroform was added. The tubes were shaken vigorously to complete the precipitation of proteins and to extract lipids to organic phase and then centrifuged (10 min, 13000g). Measurements were performed in aqueous layer at room temperature in a 1 cm cuvette pathlength. The spectrofluorometer was adjusted at wavelengths of 350nm (excitation) and 440nm (emission) with a gap width of 5 nm. The results were expressed as arbitrary unit divided by the concentration of specific proteins in the serum (AU/ mg protein) (Alhamdani et al., 2007).

## 2.8. Haemostatic parameters

Platelet aggregation was assessed in aliquots of plasma that was rich in platelets, according to Silvério et al. (2013), using 1  $\mu\text{M}$  adenosine diphosphate as an agonist in a dual channel aggregometer (Qualitem), standardized at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

## 2.9. Haematological parameters

Haematological blood samples, collected in tubes containing ethylene diaminetetraacetic acid, were processed in an Analyser Counter 19 (Wiener Laboratories, Argentina, Rosario, 2007-2009) to determine 19 hematological parameters.

## 2.10. Statistical Analysis

Three experiments were conducted in Completely Randomized Design (CRD) and analyzed under double factorial scheme (2 levels of diabetes and 3 levels of inhibitors). Tukey test was performed for qualitative factors, when necessary (5% of significance level).

Eventual missing data were estimated according to the analysis of variance linear model, resulting in a balanced scores table.

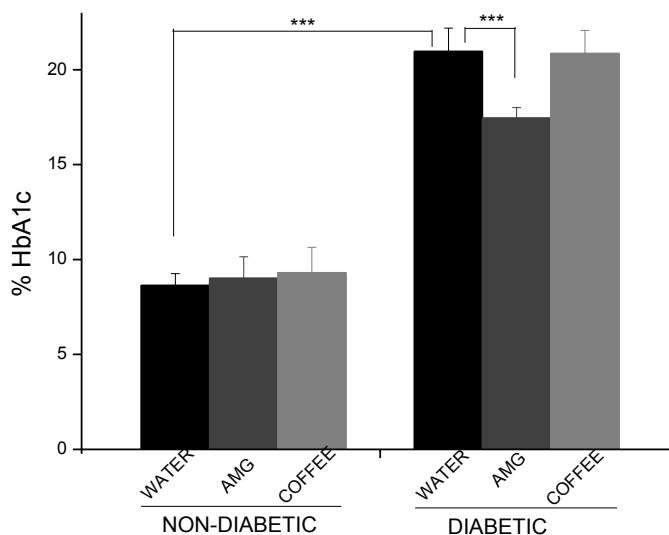
All analyses were performed in R (R CORE TEAM, 2013) using ExpDes package (Ferreira, Cavalcanti, Nogueira, 2013).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Among the several bioactive compounds present in coffee (*Coffea arabica* L.) that were evaluated in this study, the concentrations of caffeine and trigonelline were found to be  $0.76 \pm 0.01$  mg/mL and  $0.17 \pm 0.01$  mg/mL, respectively, which is consistent with the average content found in filter arabic Brazilian coffees (Nogueira and Trugo, 2003). In addition, coffee contains antioxidants such as polyphenols. The total phenolic content was found to be  $6.55 \pm 0.04$  mg gallic acid eq/mL, and the total chlorogenic acid content was  $0.582 \pm 0.007$  mg/mL. Chlorogenic acids and their derivatives represent the major phenolic compounds in coffee (Clifford, 1985).

Diabetic animals had a significantly higher concentration of fasting glucose (data not shown) and HbA1c compared to the non-diabetic animals (Figure 1), thereby demonstrating the effectiveness of alloxan. However, coffee ingestion had no effect on fasting blood glucose and HbA1c levels in either group (Figure 1).

**Figure 1.** Percentage of glycated hemoglobin.



The values are presented as the mean  $\pm$  SD of the three experiments performed in triplicate to measure the percentage of HbA1c in the non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic rats were treated with water, AMG or coffee, and diabetic rats were treated with water, aminoguanidine (AMG), or coffee. \*\*\* $p < 0,001$ .

Previously published data on the effect of caffeine on blood glucose levels are controversial. While short-term metabolic studies performed in humans have shown that caffeine at acute doses reduces insulin sensitivity (Keijzers et al., 2002; Thong et al., 2002), others have demonstrated increased sensitivity of insulin receptors upon caffeine treatment (Van Dam et al., 2006).

Several mechanisms have been proposed to explain how compounds in coffee, such as chlorogenic acid, could affect glucose homeostasis and diabetes progression. Studies have shown that chlorogenic acid may slow down the catabolism of carbohydrates and inhibit glucose absorption in the gut, thereby reducing the mobilization of glucose by the liver and enhance glucose uptake in

peripheral tissues (Natella and Scacini, 2012). These effects may explain why coffee consumption has a greater effect on plasma glucose levels after overhead compared to fasting levels (Van Dam et al., 2004).

Aminoguanidine (AMG), one of the agents commonly used to prevent the formation of AGEs in animal models, is an effective agent for reducing AGEs formation and lowering the severity of diabetes-associated structural and functional alterations (Huebschmann et al., 2006). The use of a treatment that blocks AGEs or reduces oxidative and nitrosative stress can be effective in the control of diabetic complications. In addition to the effects on advanced glycation, aminoguanidine at lower doses may specifically inhibit the activity of iNOS and reduce nitrosative stress (Szabo et al., 1997).

Our results demonstrate the efficacy of AMG treatment in preventing glycation of proteins. As expected, both HbA1c and AGE levels were significantly decreased in diabetic animals treated with AMG (Figure 1). Several studies have demonstrated that aminoguanidine slows the development of diabetes complications such as nephropathy, vasculopathy and neuropathy. However, its toxicity is still a limitation for its use in vivo (McEniery, 2006).

The measurement of glycated hemoglobin (HbA1c) is an important biomolecular marker. It is a variant of hemoglobin that carries an Amadori product in its  $\beta$  chain that reflects the occurrence of hyperglycemia in the three months prior to its measurement and, indirectly, advanced glycation. To investigate how glycated hemoglobin may be influenced by anemic states and hematological parameters in animals, experiments were performed to verify whether the induction of diabetes or associated treatments modified the erythrogram in these animals.

As shown in table 1, the average erythrocyte and total leucocyte count in the diabetic group differed little from that of the non-diabetic group. Aminoguanidine treatment and coffee intake did not change the erythrocyte and

leukocyte counts in the animals studied. Some studies have demonstrated the ability of phenolic compounds to form complexes with Fe (II), present in large quantities in the hemoglobin molecule, which could interfere with its absorption in the gastrointestinal tract and consequently lead to iron deficiency (Mennen et al., 2005; Elhabiri et al., 2007; Agnieszka and Borowska, 2008). However, data from this study suggest that consumption of coffee is not capable of altering the levels of circulating hemoglobin in rats on a balanced diet.

**Table 1.** Hematological parameters of the rats in different treatment groups.

Parameters	Hem ( $\times 10^{12}$ L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Leuk ( $\text{mm}^3$ )
Non-diabetic	8,7 ( $\pm 0,4$ )	16,7 ( $\pm 0,7$ )	46,0 ( $\pm 1,5$ )	5785 ( $\pm 348,4$ )
Diabetic	8,8 ( $\pm 0,4$ )	17,2 ( $\pm 1,1$ )	48,7 ( $\pm 2,9$ )	5522 ( $\pm 243,8$ )
ND+AMG	8,6 ( $\pm 0,6$ )	17,0 ( $\pm 0,4$ )	46,6 ( $\pm 2,0$ )	5825 ( $\pm 436,7$ )
D+AMG	8,6 ( $\pm 0,5$ )	17,1 ( $\pm 1,1$ )	47,9 ( $\pm 2,8$ )	5514 ( $\pm 402,9$ )
ND+CF	8,8 ( $\pm 0,5$ )	17,9 ( $\pm 0,3$ )	47,7 ( $\pm 1,9$ )	5542 ( $\pm 395,2$ )
D+CF	8,7 ( $\pm 0,5$ )	17,0 ( $\pm 1,0$ )	47,8 ( $\pm 2,9$ )	5275 ( $\pm 377,0$ )

The results represent the mean  $\pm$  standard deviation for five determinations per treatment.

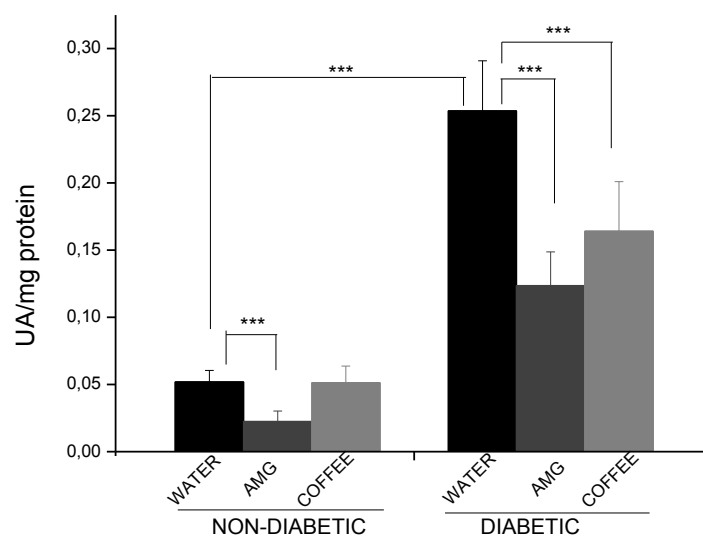
ND+AMG non-diabetics treated with aminoguanidine, ND+CF non-diabetics treated with coffee, D+AMG diabetic treated with aminoguanidine, D+CF diabetic treated with coffee, Hem red blood cells, Hb hemoglobin, Ht hematocrit, Leuk leucocytes.

The contribution of AGEs in the development and progression of diabetic complications is well established (Jakus; Rietbrock, 2004). AGEs may act by modifying intracellular proteins involved in gene regulation in the nearby extracellular matrix molecules by interfering in signaling between the matrix and the cell causing dysfunction in proteins, such as albumin. This subsequently activates receptors of AGEs (RAGES) stimulating the production of pro-inflammatory cytokines, prostaglandin stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor (Goldin et al., 2006). Because AGEs, the final products of advanced glycation, are one of the main factors that could potentially explain



how chronic hyperglycemia leads to cell and tissue damage observed in diabetes, their serum concentration was determined in the animals studied. The serum concentration of the well characterized and widely studied fluorescent AGEs pentosidine and argipiridine were measured in the experimental animals (Henle, 2003; Ahmed, 2005). Circulating levels of fluorescent AGEs were significantly higher in diabetic animals compared to the non-diabetic animals (Figure 2). Although it has already been demonstrated that AGEs production increases significantly under conditions of hyperglycemia or oxidative stress, several mechanistic details of this pathway are still unclear (Lapolla et al., 2005; Jay et al., 2006). As mentioned above, serum concentration of the AGEs significantly decreased in aminoguanidine-treated diabetic and non-diabetic animals treated (Figure 2). Our results demonstrate the effectiveness of aminoguanidine treatment in preventing AGE formation in diabetic patients. Similarly, coffee reduced AGEs formation but only in diabetic animals (Figure 2).

**Figure 2.** Fluorescent AGEs in serum of the animals.



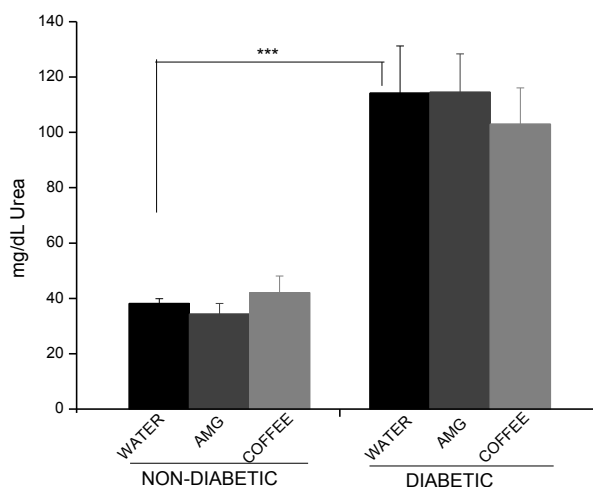
The values are presented as means  $\pm$  SD of the three experiments performed in triplicate to measure of the fluorescent AGEs in serum in the non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic rats were treated with water , AMG or coffee and diabetic rats were treated with water , aminoguanidine (AMG) , or coffee. \*\*\* $p < 0,001$ .

There has been significant interest in identifying dietary components that combat diabetic complications by reducing the deleterious accumulation of AGEs in the body. Although no food component has been specifically indicated as being anti-AGEs *in vivo*, certain compounds present in coffee, such as phenolic compounds, have been studied intensively and have been shown to have the ability to inhibit AGEs formation (Babu et al., 2006).

The involvement of AGEs in the pathogenesis of diabetic micro- and macroangiopathy is well established in literature (Coughlan et al., 2008; Noordzij et al., 2008). Additionally, because the kidneys are the major site for AGEs clearance, they are the main target of deleterious AGE-mediated changes (Miyata et al., 1998). Therefore, we evaluated the renal function in both groups

of animals by measuring urea and creatinine levels. As shown in Figure 3, significantly higher levels of urea are present in the serum of diabetic animals, and aminoguanidine treatment or coffee intake did not change the renal profile of the diabetic rats studied. Urea, the major product of protein metabolism in the liver, is synthesized from CO<sub>2</sub> and ammonia and circulates in the blood before being filtered in the kidneys, where most of it is excreted in urine. Urea levels are sensitive to changes in primary renal functions and is an important marker in conditions such as diabetes that affect primary renal function alterations (Nosadini, 2002). However, because urea concentration is influenced by the degree of hydration and dietary habits, it is less specific than creatinine for the assessment of renal function.

**Figure 3.** Determination of urea in the serum of animals.

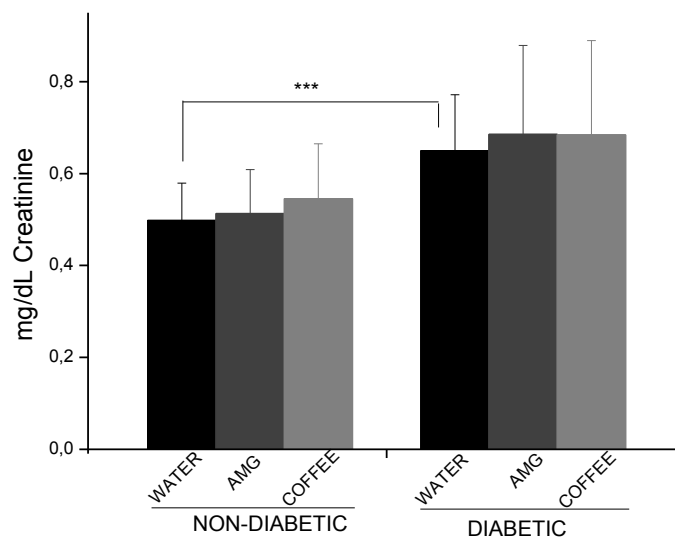


The values are presented as means  $\pm$  SD of the three experiments performed in triplicate to measure of the ureia in serum in the non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic rats were treated with water , AMG or coffee and diabetic rats were treated with water , aminoguanidine (AMG) , or coffee. \*\*\*p<0,001.

In this study, aminoguanidine treatment or coffee intake did not affect serum creatinine levels in the diabetic animals (Figure 4). Creatinine, which is a breakdown product of creatine phosphate in muscle, is usually produced at a constant rate, and its levels are directly proportional to muscle mass. Interestingly, creatinine levels also reflect the glomerular filtration rate because its concentration in the blood increases as the renal filtration rate is reduced (Gómez-Marcos et al., 2010).

AGEs can be highly detrimental to the integrity and function of blood vessels in several ways. In the interior of the vessel wall, AGEs form intra- and intermolecular crosslinked matrix proteins, plasma protein traps, and interact with receptors to modulate many cellular properties in addition to inducing the production of the potent vasoconstrictor endothelin-1 by endothelial cells through activation of the NF- $\kappa$ B pathway. The interaction of AGEs with components of the vessel wall increases vascular permeability, expression of procoagulant activity and the generation of ROS resulting in increased leukocyte adhesion molecules in the endothelial layer (Bierhaus et al., 1998). Additionally, platelet hyperactivity is an important factor commonly associated with chronic diabetes complications (Ollas et al., 2005).

**Figure 4.** Determination of creatinine in serum of the animals.



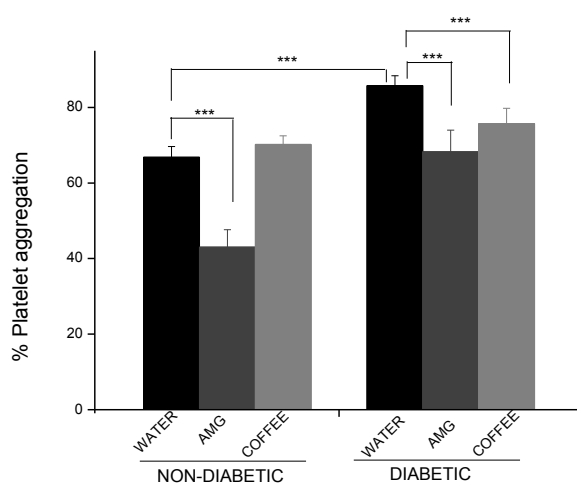
The values are presented as means  $\pm$  SD of the three experiments performed in triplicate to measure of the creatinine in serum in the non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic rats were treated with water , AMG or coffee and diabetic rats were treated with water , aminoguanidine (AMG) , or coffee \*\*\* $p < 0,001$ .

Patients with diabetes generally have a box and hypercoagulable hypofibrinolysis. However, the degree of abnormality of the hemostatic system in diabetic patients is still not well understood. To evaluate the effects of coffee on primary hemostasis in diabetic rats, platelet aggregation against the ADP agonist was determined. Platelet aggregation was significantly increased in the diabetic animals (Figure 5), suggesting that the osmotic effect of glucose and ROS are in excess in serum, leading to platelet to aggregation and degranulation (Keating et al., 2003). An increase in platelet activity and thrombus formation has been suggested to play a role in diabetes, atherosclerosis, cardiac disease and hypertension (Aaron et al., 2001). Several studies have shown increased platelet

reactivity in diabetic patients through increased levels of specific markers, such as beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in platelet granules in plasma (Grant, 2007) and increased expression of platelet membrane glycoproteins GPIb and GPIIb/IIIa. Reduced fluidity of membranes has also been correlated with glycation of proteins of the platelet membrane (Winocour, 1994; Kuhne et al., 1995).

It was observed that aminoguanidine significantly reduced platelet aggregation in non-diabetic and diabetic animals (Figure 5). This can be due to its antioxidant activity (Kelly et al., 2001) that blocks protein glycation and is able to reduce reactivity changes in platelets, thereby helping to ameliorate the endothelial dysfunction that is intrinsic in diabetes.

**Figure 5.** Platelet aggregation in animals.



The values are presented as means  $\pm$  SD of the three experiments performed in triplicate to measure of the platelet aggregation in the non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic rats were treated with water , AMG or coffee and diabetic rats were treated with water , aminoguanidine (AMG) , or coffee. \*\*\* $p < 0,001$ .

Our results demonstrate that coffee does not reduce platelet aggregation in non-diabetic animals and reduces aggregation in diabetic animals to levels comparable to that of the non-diabetic group (Figure 5). Bhaskar (2010) showed that coffee is effective in inhibiting platelet aggregation against different agonists such as ADP, collagen, arachidonic acid and epinephrine. Natella et al. (2008) has suggested that the antiplatelet effect of coffee is caffeine-independent but dependent on the intracellular interaction between the phenolic acids in coffee and platelets. Studies evaluating the *in vitro* platelet function in diabetic subjects showed an increase in the reactivity and expression of GPIb and GPIIb/IIIa and increased glycation of platelet membrane proteins (Soares et al., 2010). The compounds found in coffee could be acting in these platelet constituents. It has been shown previously that phenolic compounds may exert an inhibitory effect on the eicosanoid biosynthesis enzymes, such as cyclooxygenase and lipoxygenase, leading to reduced production of adhesion molecules on the arterial wall and reduced platelet aggregation (Zern and Fernandez, 2005), thereby reducing the risk of thrombosis, a major complication of diabetes.

It is important to note that the species of coffee, the roasting process, and the method of brewing, among other variables, modifies the amount of the bioactive components, such as chlorogenic acid, caffeine, and melanoidins. That are suggested to be mainly responsible for the antioxidative effects of coffee and can alter the effects described in other studies.

#### **4. CONCLUSION**

In conclusion, we showed that coffee intake reduces the formation of AGEs and platelet aggregation in our experimental model. Aminoguanidine was effective in inhibiting the AGEs formation and platelet aggregation. Additionally, we showed that coffee has no effect on the renal function of animals.

These results are especially interesting because diabetes is an important risk factor for thrombosis, characterized by a hypercoagulable state and hypofibrinolysis, and coffee is a widely consumed beverage in the contemporary world.

Further investigations are needed to elucidate the mechanisms of coffee function and to establish the therapeutic potential of this compound for patients with diabetes to prevent the chronic complications that accompany hyperglycemia.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the FAPEMIG.



## REFERENCES

Aaron I. V., Tomris Erbas, T., Park, T. S., Nolan, R., Pittenger, G. L. (2001). Platelet Dysfunction in Type 2 Diabetes Reviews/Commentaries/Position Statements. *Diabetes Care* 24:1476–1485.

Agnieszka, S., Borowska, E. J. (2008). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods Hum Nutr* 63:147–156.

Ahmed, N. (2005). Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 67(1):3-21.

Alhamdani, M. S., Al-Azzawie, H. F., Abbas, F. K. (2007). Decreased formation of advanced glycation end-products in peritoneal fluid by carnosine and related peptides. *Perit. dial. int.*, Downsvie, CA, v. 27, pt 1, p. 86-89.

Alves, R.C., Casal, S., Oliveira, B. (2009). Benefícios o café na saúde: Mito ou realidade? *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 8, 2169-2180.

American Diabetes Association, (2013). Position statement: standards of medical care in diabetes-2013. *Diabetes Care*; 36.Suppl.1:S11-66.

Babu, P. V. A., Sabitha, K. E., Shymaladevi, C. S. (2006). Green tea impedes dyslipidemia, lipid peroxidation, protein glycation and ameliorates Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in the heart of streptozotocin-diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 162(2):157-64.

Barg, A., Osis, R., George, T., Schneider, M. F., Schillers, H., Oberleithner, H., Schneider, S. W. (2007). Soluble plasma-derived Von Willebrand factor assembles to a haemostatically active filamentous network. *Thromb Haemost.* 97(4):514-526.

Bierhaus, A., Marion, A., Hofmann, Ziegler, R., Peter, P. (1998). AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus I. The AGE concept *Nawroth Cardiovascular Research* 37. 586–600.

Borisoff, J. I., Spronk, H. M., Ten, Cat. H. (2011). The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med*; 364(18): 1746-1760.

Braskar, S., Rauf, A. A. (2010). Modulatory effect of coffee on platelet function. *Indian J Physiol Pharmacol.* 454(2):141-8.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*;414:813-20.

Burtis, C. A., Ashwood, E. (2008). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. (6a. ed). W.B. Saunders Company, Philadelphia. p. 952.

Chambel, P., Oliveira, M. B., Andrade, P.B., Seabra, R. M. & Ferreira, M. A. (1997). Development of an HPLC/Diode-Array detector method for simultaneous determination of 5-HMF, Furfural, 5-O-Caffeoylquinic acid and caffeine in coffee. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, New York, v. 20, n. 18, p. 2949-2957.

Clifford, M. N. (1985). Chlorogenic acids. In Coffee. Pp. 153-202. [RJ Clarke and R Macrae, editors]. London: Elsevier Applied Science. 153-202.

Coughlan, M. T., Mibus, A. L., Forbes, J. M. (2008). Oxidative stress and advanced glycation in diabetic nephropathy. *Ann N Y Acad Sci.* 1126:190-3.

De Souza Ferreira, C., Araújo, T. H., Ângelo, M. L., Pennacchi, P. C., Okada, S. S., Paula, F. B. A., Migliorini, S., Rodrigues, M. R. (2012). Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. *Cell Biochem Funct*, 30: 604-610.

Duarte, S. M. S., Abreu, C. M. P., Menezes, H. C., Santos, M. R., Gouvêa, C. M. C. P. (2005) Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciência Tecnol Alime* 25:387-393.

Edelstein, D. and Brownlee, M. (1992). Aminoguanidine ameliorates albuminuria in diabetic hypertensive rats. *Diabetologia*.35(1):96-97.

Elhabiri, M., Carreër, C., Marmolle, F., Traboulsi, H., (2007). Complexation of iron (III) by catecholate-type polyphenols *Chimica Acta, Inorganica* 360 353–359.

Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. ., Creager, M. A. (2006). Review. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 8;114(6):597-605.

Gómez-Marcos, M. A., Martínez-Salgado, C., Grandes, G., Recio-Rodríguez, J. I., Castaño Sánchez, Y., Rodríguez, S. E., García-Ortiz, L. (2010). [Subclinical

and established kidney disease in recently diagnosed hypertensive patients]. *Med Clin (Barc)*. Mar 6;134(6):246-53. doi: 10.1016/j.medcli.2009.06.068.

Gomez-Ruiz, J. A., Leake, D. S., Ames, J. M. (2007) .In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5:6962-6969.

Grant, P. J. (2007). Diabetes melito as prothrombotic condition. *J Intern Med*. 262(2):157-72.

Gray, E., Mulloy, Barrowcliffe, T. W. (2008).*Thromb.Haemostasis*,99, 807-818.

Henle, T. (2003). AGEs in food: do they play a role in uremia? *Kidney Int Suppl*. 63(84):S145-7.

Higdon, J.V., Frei, B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:101–123.

Huebschmann, A. G., Regensteiner, J. G., Vlassara, H., Reusch, J. E. (2006). Diabetes and glicoxidation end products. *Diabetes Care*. 29(6):1420-32.

Illy, A., Viani, R. (2005). *Espresso Coffee: the Science of Quality*; 2ed, Elsevier Academic Press: London.

Jakus, V., Rietbrock, N. (2004). Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res.*;53(2):131-42.

Jay, D., Hitomi, H., Griendling, K. K. (2006). Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 40(2):183-92.

Keating, F. K., Sobel, B. E., Schneider, D. J. (2003). Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes mellitus. *Am J cardiol.* 92(11): 1326-5.

Keijzers, G. B., De Galan, B. E., Tack, C. J., Smits, P. (2002). Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans *Diabetes Care.* 25:364-369.

Kelly, D.J., Gilbert, R.E., Cox, A.J., Soulis, T., Jerums, G., Cooper, M. E. (2001). Aminoguanidine ameliorates overexpression of prosclerotic growth factors and collagen deposition in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*;12(10):2098-107.

Kuhne, T., Hornstein, A., Semple, J., Chang, W., Blanchette, V., Freedman, J. (1995). Flow cytometric evaluation of platelet activation in blood collected into EDTA vs. Diatube-H a sodium citrate solution supplemented with theophylline, adenosine, and dipyridamole. *Am J Hematol.* 50(1):40-5. Comment in: *Am J Hematol.* 1997; 54(4):343-4.

Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Bensson, C., Scalbert, A. (2006). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *Br J Nutr* 96(1):39-46.

Lapolla, A., Fedele, D., Traldi, P. (2005). Glyco-oxidation in diabetes and related diseases. *Clin Chim Acta.* 357(2):236-50.

Lima, A.R., Pereira, R. G. F. A., Abrahão, S. A, Duarte, S. M. S., Paula, F. B. A. (2010). Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. *Quím Nova* 33(1):20–24.

McEniery, C. M. (2006). Novel therapeutic strategies for reducing arterial stiffness. *Br J Pharmacol.* 148(7):881-3.

Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr* 81(1):326S-329S.

Michelson, A. D. (2010). Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.*9(2):154-169.

Miyata, T., Ueda, Y., Horie, K., Nangaku, M., Tanaka, S., Van Ypersele de Strihou, C., Kurokawa, K. (1998). Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int.* 53(2):16-22.

Natella, F., Nardini, M., Belevi, F., Pignatelli, P., Di Santo, S., Ghiselli, A., Violi, F., Scaccini, C. (2008). Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *Br J Nutr.* 100(6):1276-82.

Natella, F., Scacini, C. (2012). Role of coffee in modulation of diabetes risk. *Nutrition reviews,* Vol. 70(4):207-217.

Nogueira, M., Trugo, L. C. (2003). Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Cienc Tecnol Aliment* 23(2):296-299.

Noordzij, M. J., Lefrandt, J. D., Smit, A. J. (2008). Advanced glycation end products in renal failure: an overview. *J Ren Care*. 34:207-12.

Nosadini, R. (2002). Hypertension and renal complications in type 2 diabetes. *Semin Vasc Med*. 2002 Feb;2(1):109-19.

Ollas, B., Wachowiez, B., Stochmal, A., Oleszek, W. (2005). Inhibition of blood platelet adhesion and aggregation by different phenolics from *Yucca schottlandii* Roem. *Nutrition*, v.21, p. 199-206.

Peppas, M., Uribarri, J., Vlassara, H. (2003). Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clin Diabetes*.; 21(4):186-7.

R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Reasner, C. A. (2008). Reducing cardiovascular complications of type 2 diabetes by targeting multiple risk factors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 52:136-144.

Reis, J. S., Veloso, C. A., Mattos, R. T., Purish, S., Nogueira-Machao, J. A. (2008). Estresse oxidativo: revisão de sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.52 no.7. São Paulo. 1096-1105.

Ribeiro, I. S., Rocha, J., Sepodes, B., Mota-Felipe, H., Ribeiro, M. H. (2008). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *J Molec Catalys B: Enzymatic*; 52-53:13-18.

Sato, K., Akiba, Y., Kimura, S., Horiguchi, M. (1995). Species differences between chicks and rats in inhibition of lipoprotein hydrolysis by Triton WR-1339. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 112(3):315–319.

Silvério, A. S. D., Pereira, R. G. F. A., Lima, A. R., Paula, F. B. A., Rodrigues, M. R., Baldissera, L. Jr., Duarte, S. M. S. (2013). The effects of the decaffeination of coffee samples on platelet aggregation in hyperlipidemic rats. *Plant Food Hum Nutr.* 68, PP 268-273.

Smith, A. W. (1987). *Em Coffee: Chemistry*; Clarke, R. J.; Macrae R., eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, vol. 1.

Soares, A. L., Sousa, M. O., Fernandes, A. P. S., Moura and Carvalho, Maria das Graças. (2010). Alterações do sistema hemostático nos pacientes com diabetes melito tipo 2. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online]. vol.32, n.6, pp. 482-488.

Stoppa, G. R., Cesquini, M., Roman, E. A., Ogo, S. H., Torsoni, M. A. (2006). Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. *Life Sciences, Oxford*, v. 78, n. 12, p. 1352-1361.

Szabó, C., Ferrer-Sueta, G., Zingarelli, B., Southan, G. L., Sazman, A. L., Radi, R. (1997). Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem.* 272(14):9030-6.



Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*; 50: 537–546.

Thong, F. S., Derave, W., Kiens, B., Graham, T. E., Urso, B., Wojtaszewski, J. F., Hansen, B. F., Richter, E. A. (2002): caffeine-induced impairment of insulin action but not insulin signaling in human skeletal muscle is reduced by exercise. *Diabetes*. 51:583-590.

Van Dam, R. M., Pasman, W. J., Verhoef, P. (2004). Effects of coffee consumption on fasting blood glucose and insulin concentrations: randomized controlled trials in healthy volunteers. *Diabetes Care*.27:2990-2992.

Van Dam, R. M., Willet, W. C, Manson, J. E., Hu, F. B. (2006). Coffee, caffeine, and Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. Vol 29, 2. 398-403.

Winocour, P. D. (1994). Platelets, vascular disease, and diabetes mellitus. *Can J Physiol Pharmacol*. 72(3):295-303.Review.

Wu, C-H., Huang, H-W., Lin, J-A., Hiang, S-M., Yen, G-C. (2011). The proglycation effect of caffeic acid leads to the elevation of oxidative stress and inflammation in monocytes, macrophages and vascular endothelial cells. *Journal of Nutrition Biochemistry* 22; 585-595.

Zern, T. L., Fernandez, M. L. (2005). Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr*. 135:2291-2294.

Zilin, S., Naifeng, L., Bicheng, L., Jiping, W. (2001). The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. Clin. chim. acta., Amsterdam, v. 313, p. 69-75.

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

**ARTIGO 2 Coffee reduces NOX2 activity and ROS release by peritoneal neutrophils from rats diabetics**

**Artigo preparado de acordo com a norma para submissão do periodico  
FOOD CHEMISTRY.**

**Coffee reduces NOX2 activity and ROS release by peritoneal neutrophils  
from rats diabetics**

**ABSTRACT**

Coffee is a complex mixture of substances with potential beneficial and adverse health effects that is widely consumed by all social classes and is part of the diet of many countries. Diabetes is an important morbidity in industrialized societies because it compromises productivity and quality of life and generates direct and indirect costs. Information regarding the effects of coffee on health is broad but controversial. The present study evaluated the influence of coffee on NOX2 activity and the generation of ROS; the impact of this effect on phagocytosis and killing of neutrophils against *Candida albicans* was also analyzed because candidiasis is common in diabetic patients. Our results show that coffee inhibited NOX2 activity in diabetic animals and reduced the pool of ROS in non-diabetic and diabetic animals, but this activity did not affect the phagocytosis or killing of these cells. Treatment with apocynin inhibited NOX2 activity and compromised the ability of peritoneal neutrophils of non-diabetic animals to kill *Candida albicans*. In diabetic animals, apocynin had no effect on the killing of *Candida albicans*, and diabetic animals exhibited decreases in the activity of MPO, which is an important enzyme for the action of apocynin.

**Keywords:** Diabetes Mellitus, *Coffea arabica* L., NOX2, Apocinin, Reactive oxygen

## 1 INTRODUCTION

The consumption of coffee is widespread in many countries, and its potential health effects have been widely studied. The relationship between the consumption of coffee and human health and disease are complex as its composition, its preparation and the ingested dose may vary (Roales-Nieto, San Pedro, Luciano, Coronado, 2004). Among the many bioactive substances that are present in the beverage, two stand out: caffeine and chlorogenic acid, which are substances associated with reduced risk of developing several diseases such as arteriosclerosis, cancer and diabetes mellitus (Volz et al., 2012).

Diabetes mellitus is a heterogeneous group of metabolic diseases of diverse etiology that are characterized by chronic hyperglycemia and alterations in the metabolism of lipids, carbohydrates and proteins due to defects in insulin secretion, insulin action or both (ADA, 2013). The complications of diabetes mellitus, its complex pathophysiology and the current pandemic are of increasing concern worldwide because diabetes is the leading cause of morbidity and mortality in developed countries (Patel, Kumar, Laloo, Hemalath, Patel, 2012).

A high glucose level is mainly responsible for the changes in metabolic pathways in diabetics and is considered an important factor in the development of tissue damage, but these effects may be reversible with glycemic control. Some authors suggest that major changes are caused by hyperglycemia linked to increased flow in the polyol pathway, activation of protein kinase C (PKC) and increased formation of advanced glycation end products (AGEs) (Koya & King, 1998). The generation of ROS (reactive oxygen species) seems to be a common thread among these pathways, and a major source of ROS is the activation of NOX2.

The killing and microbicidal functions of neutrophils are directly related to the metabolic pathway that involves NOX2 and generates ROS (Shen, 2010). Changes in ROS production by phagocytes have been identified as a major cause of immune system dysfunction in diabetics and of their increased susceptibility to bacterial and fungal (Kempf et al., 2007) infections. However, data on the influence of the diabetic state on the modulation of NOX2 are still unclear.

Evidences suggest that high consumption of coffee may reduce the risk of diabetes mellitus by affecting glucose metabolism with respect to insulin tolerance and oxidative stress as a consequence of chronic hyperglycemia (Muriel & Arauz, 2010). Despite numerous reports in the literature on the association between coffee consumption and diabetes, these data are still inconclusive.

In this context, the present study aimed to verify the influence of coffee on ROS generation by NOX2 and on the phagocytic function of neutrophils and microbicidal activity toward *Candida albicans* (*C. albicans*) in diabetic rats.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 *The Preparation and Characterization of Both Integral*

Samples of coffee (*Coffea arabica* L., planted in Brazil) were provided by Cocam Industry (Catanduva-SP, Brazil). Coffee beverages were prepared at a 10 % (w/v) concentration. The coffee powder was put on a paper filter funnel (Whatman N° 3, General Electric Company), and water at 90°C was poured over the powder (Duarte, Abreu, Menezes, Santos, Gouvêa, 2005). These beverage samples were lyophilized to perform the chemical analyses. For the bioassays, the drinks were always prepared at the time of administration to the animals.

### 2.2 *Determining Bioactive Compounds in the Beverages*

The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method, with galic acid as the standard (Lima, Pereira, Abrahão, Duarte, Paula, 2010). To determine the caffeine, chlorogenic acid (CGA), trigonelline and niacin contents, hot water extraction procedures were used according to Lima et al. (2010). The chromatographic separation of the compounds was performed using an HPLC apparatus equipped with transmitter data (Jasco LC - NetII / ADC, Japan), high pump pressure (Jasco PU-980, Japan), refrigerated automatic gun (4°C, Jasco AS - 2057 Plus, Japan) and photodiode detector (Jasco MD - 2015 Plus, Japan) on a reverse phase column (Phenomenex, 250 x 4.60 mm C18 ODS – 2,5 µm), eluted (1 mL/min) for 30 minutes at room temperature with an acetate buffer gradient (PA, Aldrich, Germany) (a) and then methanol (b) (HPLC grade) at 1 mL / min. The concentrations of 5-caffeoylquinic acid (5-CQA), caffeine, trigonelline and niacin were calculated using calibration curves made with their respective standards (Sigma).

### 2.3 *Administration of Coffee Beverages, Induction of Diabetes and Treatment with a NOX2 Inhibitor (Apocynin)*

Twelve-week-old male Wistar rats from the animal house of the Federal University of Alfenas, weighing  $320 \pm 20$  g, were maintained at a temperature of  $23^{\circ}\text{C}$ , with a light–dark period of 12h, and received commercial feed and water ad libitum during the entire experimental period. All in vivo experiments followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of UNIFAL-MG (doc. n° 420/2012 and 503/2013).

Filtered coffee beverages were administered to animals by gavage for 50 days at a dose of 7.2 ml/kg/day, which is equivalent to a daily human consumption of eight 50-mL cups of coffee. The non-diabetic group received the same dosage of water. The induction of diabetes was performed in animals that had been fasted for 12 hours by intraperitoneal administration of alloxan (2% solution) at a dose of 150 mg/kg (Szkudelski, 2001). In this study, animals were considered diabetic when they showed a blood glucose level above 250 mg/dL, as verified using the Trinder reaction, 7 days after induction (Stoppa, Cesquini, Roman, Ogo, Torsoni, 2006). The treatment with apocynin (Soo Min et al., 2009) (Sigma) (16mg/kg/day) by gavage for 50 days was started 7 days after the administration of alloxan and confirmation of diabetic status.

### 2.4 *Experimental delineation*

After a week of acclimatization, the animals were divided into 6 groups: non-diabetic animals treated with distilled water (ND), non-diabetic animals treated with apocynin (ND+APO), non-diabetic animals treated with full arabica coffee (ND+CF), diabetic animals treated with water (D), diabetic rats treated



with apocynin (D+APO), and diabetic animals treated with full arabica coffee (D+CF). On day 51, neutrophil recruitment was carried out using intraperitoneal administration of 2 ml of 12% sodium caseinate (w/v) (Sigma) that was diluted in 0.9% sterile saline; and after 4 hours, the animals were sacrificed by deepening anesthesia following the administration of 40 mg.kg<sup>-1</sup> sodium pentobarbital intraperitoneally. After gentle massage of the abdomen, the intraperitoneal cavity was washed with 15 mL of sterile, cold phosphate-buffered saline (PBS). The cell suspension was obtained by aspiration with a syringe and 40 x 12mm needle, centrifuged at 4°C (500g for 10 minutes), packed in curved-bottom polypropylene tubes and kept on ice until the tests. Blood was obtained by puncturing the heart and distributed into siliconized tubes containing ethylene diamine tetraacetic acid without additives. The animals were then euthanized by cervical dislocation.

### 2.5 *Cell counting and viability assessment*

The number of viable cells (>98% neutrophils) was determined in a Neubauer chamber (Knittel Glaser, Braunschweig, Germany) under an optical microscope by Trypan blue exclusion. The differential cell count was performed after fixation and May–Grunwald–Giemsa staining.

### 2.6 *Yeast preparation*

*C. albicans* yeast (ATCC 5372) was opsonized by 10% (v/v) non-immune rat serum in 0,01 mol.l<sup>-1</sup> of phosphate buffer, pH 7,2, containing 0,15 mol.l<sup>-1</sup> of NaCl (PBS) for 30 min at 37°C with orbital shaking at 150 rpm. Viability was determined by exclusion of methylene blue 0,05% (99,9%), and

the number of *C. albicans* was determined in a Neubauer's chamber (de Souza Ferreira et al., 2012).

### 2.7 *Glycemic profile*

Blood glucose was determined by enzymatic method. The glycosylated hemoglobin (HbA1c) was assessed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) by ion exchange equipment D-10 Dual BIO-RAD, using calipers level 1 e level 2, Kit Hemoglobin A1c Program e Dual Program BIO-RAD®.

### 2.8 *NOX2 system activity (Cit C reduction)*

The production of superoxide anions by NOX2 in neutrophils was monitored by the reduction of cytochrome C. The test was conducted in a plastic bucket containing  $1 \times 10^6$  neutrophils per millilitre,  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  of cytochrome C and  $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$  of catalase in PBS containing  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  of glucose, pH 7,4. The buckets were kept at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min in a spectrophotometer to balance the system. Superoxide production was initiated by the addition of PMA (12-myristate 13-acetate phorbol) ( $100 \text{ ng.ml}^{-1}$ ). After the addition of PMA, the reaction was monitored by spectrophotometry for 3 min at a wavelength of 550 nm (Jones & Hancock, 1994).

### 2.9 *Chemiluminescence amplified by luminol*

The chemiluminescence of luminol is commonly used to evaluate the oxidative burst that occurs when intact phagocytes are activated by the addition of a stimulus, such as PMA, in an assay usually termed luminol-enhanced

chemiluminescence of activated phagocytes. For this assay, neutrophils were activated with PMA (53 ng per test) in a reaction mixture containing 1 mmol.l<sup>-1</sup> of luminol and 1x10<sup>6</sup> neutrophils per millilitre. The intensity of chemiluminescence was followed in a Geomax luminometer® 20/20, and the final volumes were 0,3ml. The chemiluminescence is expressed as relative light units per second (RLU/s). The reaction was performed in PBS, pH 7,4, and followed for 30 min. All measurements were made at 37°C (Rodrigues, Russo, Campa, Rodrigues, 2002). As controls, the reactions were carried out without cells, without luminal or without PMA.

### 2.10 Phagocytosis of *C. albicans* and candidacidal activity

Neutrophils (1x10<sup>6</sup>) were incubated in sterile plastic tubes (to avoid cell adherence) at 37°C with opsonized *C. albicans* (1x10<sup>7</sup>) at a 1:10 ratio at 37°C in 1ml of RPMI medium in a rotatory system (10 rpm). After 30, 60, 90 and 120 min of incubation, an aliquot of 50 ml of this suspension were adhered to cover slip glass by cytocentrifugation (Sorocito FANEM). After centrifugation, cover slips were stained with Wright's and May-Giemsa stains (Souza, Kang, Nardinelli, Borelli, 2001). Neutrophils with one or more attached yeasts were scored as phagocytic cells. However, this method did not distinguish between engulfed yeast and those which were attached to the cell surface (Islam & Nabi, 2003). The percentage of phagocytic cells and the number of yeast cells attached per 100 randomly chosen neutrophils were counted by examining at least 200 neutrophils per preparation. For candidacidal activity determination, cell viability of attached cells was assessed using the dye exclusion (Rosenfeld) test (de Souza Ferreira et al., 2012).

### *2.11 Haematological parameters*

Haematological blood samples collected in tubes containing EDTA were processed in an Analyser Counter 19 (Wiener Laboratories, Argentina, Rosario, 2007-2009) for 19 haematological parameters.

### *2.12 Statistical analysis*

Three experiments were conducted in Completely Randomized Design (CRD). The first one, regarding fagocitosis and killing, was analyzed under double factorial scheme split in time (2 levels of diabetes, 3 levels of inhibitors and 4 times). The second one was not time dependent, what simplified to a regular double factorial scheme (2 levels of diabetes and 3 levels of inhibitors).

Eventual missing data were estimated according to the analysis of variance linear model, resulting in a balanced scores table.

Tukey test was performed for qualitative factors and regression model were fitted for time, when necessary (5% of significance level).

All analyses were performed in R (R CORE TEAM, 2013) using ExpDes package (Ferreira, Cavalcanti, Nogueira, 2013).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The profiles of the bioactive compounds (caffeine, total phenolics and total ACG, trigonelline and niacin) are presented in Table 1.

**Table 1.** Compounds bioactives of the Coffee. Levels of caffeine, total phenols and total chlorogenic acids, trigonelline and niacin detected in the integral coffee beverages.

Bioactive compounds				
Caffeine (mg/dL)	Total phenols (mg gallic acid eq/mL)	Total CGA (mg/mL)	Trigonelline (mg/mL)	Niacin (mg/mL)
0,76±0,01	6,55±0,04	0,582±0,007	0,17±0,01	0,016±0,001

The results represent the mean ± standard deviation (n=5). CGA chlorogenic acids

The detected caffeine and trigonelline contents were similar to the average content found in beverages prepared from Brazilian arabica beans using the filter method (Camargo, Toledo, Farah, 1998). Caffeine is thermally stable, unlike trigonelline and ACQ, which are thermosensitive, so the processes of roasting, extraction and drying should have less influence on the final content of caffeine in the product (Marcucci, Benassi, Almeida, Nixdorf, 2013). However, roasting causes significant losses of trigonelline, and its concentration in beverages varies according to the type of coffee. Trigonelline is demethylated during roasting to form niacin, which is an important vitamin for human metabolism, in quantities of 20 mg per 100 g of roasted coffee per mL (Yoshinari, Takenake & Igarashi, 2013).

Coffee is a major source of dietary phenolics, which are nearly entirely represented by chlorogenic acid (Natella & Scaccini, 2012) (Table 1). Several in vitro studies have suggested the potential beneficial effects of chlorogenic acid in guarding the health of consumers of this beverage (Chaves et al., 2010). The

dose used in this study (7.2 ml/kg/day) is equivalent to a daily human consumption of 8 cups of 50 ml of boiled and filtered coffee.

To monitor the installation of diabetes, the blood glucose level was determined seven days after the induction of diabetes and monitored weekly by measuring glycosuria. All animals that showed reversal of the diabetes state over the two-month trial were excluded. The glucose levels were measured at the time of sacrifice, and a significant difference was observed between the non-diabetic animals and diabetic groups, regardless of treatment, showing that the induction of diabetes by alloxan was effective (data not shown).

Because blood glucose indicates only a momentary state, we evaluated the glycation of proteins by measuring HbA1c (Figure 1). Several studies have used the measurement of glycation end products in the serum or tissues of diabetic patients to assess the risk of disease progression, and one of the parameters that is measured is HbA1c (Yonekura et al., 2003). The formation of glycated hemoglobin occurs irreversibly and progressively in erythrocytes and is proportional to the glucose level in the blood. Erythrocytes are freely permeable to glucose molecules, and hemoglobin is exposed to the same concentrations of plasma glucose. Because glycated hemoglobin accumulates within erythrocytes, they have the same half-life. For this reason, we also evaluated the hematological parameters of the animals to exclude any interference with the HbA1c values (Table 2). As shown in Table 2, the hematological parameters were not different between groups and did not affect HbA1c; the animals showed no changes in the red blood cells.

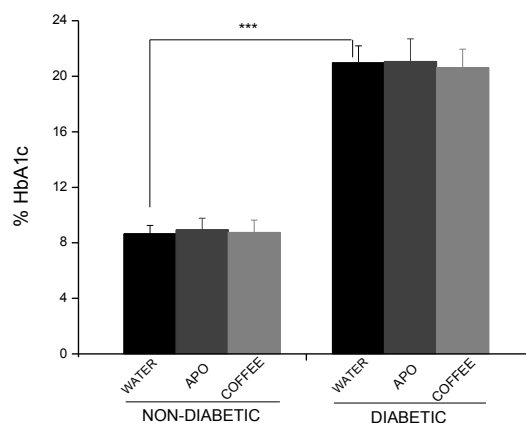
**Table 2.** Hematological parameters of the rats in different treatment groups.

Parameters	Hem ( $\times 10^{12}$ L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Leuk ( $\text{mm}^3$ )
Non-diabetic	8,7 ( $\pm 0,4$ )	16,7 ( $\pm 0,7$ )	46,0 ( $\pm 1,5$ )	5785 ( $\pm 348,4$ )
Diabetic	8,8 ( $\pm 0,4$ )	17,2 ( $\pm 1,1$ )	48,7 ( $\pm 2,9$ )	5522 ( $\pm 243,8$ )
ND + APO	8,3 ( $\pm 0,3$ )	18,0 ( $\pm 0,6$ )	45,4 ( $\pm 1,7$ )	5771 ( $\pm 442,4$ )
D + APO	8,6 ( $\pm 0,4$ )	16,7 ( $\pm 1,0$ )	48,4 ( $\pm 3,0$ )	5485 ( $\pm 371,6$ )
ND + CF	8,8 ( $\pm 0,5$ )	17,9 ( $\pm 0,3$ )	47,7 ( $\pm 1,9$ )	5542 ( $\pm 395,2$ )
D + CF	8,7 ( $\pm 0,5$ )	17,0 ( $\pm 1,0$ )	47,8 ( $\pm 2,9$ )	5275 ( $\pm 377,0$ )

The results represent the mean  $\pm$  standard deviation for five determinations per treatment

ND+APO non-diabetics treated with apocynin, ND+CF non-diabetics treated with coffee, D+APO diabetic treated with apocynin, D+CF diabetic treated with coffee, Hem red blood cells, Hb hemoglobin, Ht hematocrit, Leuk leucocytes

After 50 days of treatment, the HbA1c levels were significantly higher in diabetic than non-diabetic animals, and this effect was independent of treatment with APO or coffee (Figure 1).

**Figure 1.** Percentage of glycated hemoglobin.

The values are presented as means  $\pm$  SD of the three experiments performed in triplicate of the percentage of Hb A1c from non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic treated with: water, APO or coffee and diabetic treated with: water, APO, or coffee. \*\*\* $p < 0,001$ . APO apocynin.

The data regarding the influence of coffee on glycemia in diabetic subjects are contradictory. Studies have shown a hyperglycemic effect of caffeine on the decrease in insulin sensitivity and glucose tolerance, and this effect can be modified when caffeine is consumed within a complex mixture, such as coffee, because other compounds can neutralize or antagonize the negative effect of caffeine on glucose metabolism, *e.g.*, chlorogenic acid and trigonelline have a hypoglycemic effect (Natella & Scaccini, 2012). Chlorogenic acid has also been found to inhibit the liver enzyme glucose-6-phosphatase, which plays a critical role in the production of glucose in the liver, *in vitro* (Van Dijk et al., 2009).

In this study, treatment of the animals with apocynin did not affect the glucose levels (Figure 1), a result that is consistent with the literature. Studies on the effect of apocynin and the NOX2 system on glycemia are scarce and focus on the complications of hyperglycemia (Díaz, Bravo, Samper, García, Barrera, 2011). Here, treatment of the animals with apocynin did not affect glucose levels (Figure 1), and this result is consistent with the descriptions of this effect in the literature (Thallas-Bonke et al., 2008).

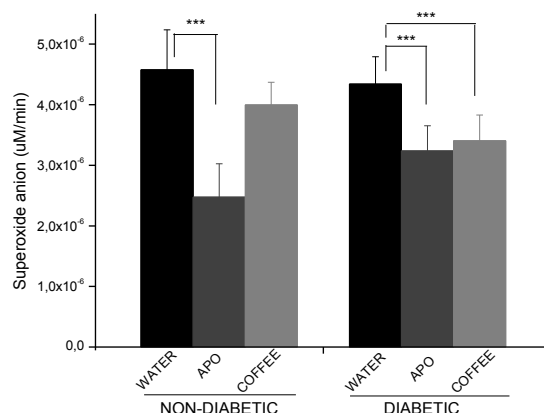
We evaluated the production of superoxide anion, which reflects the activity of NOX2 through the reduction of cytochrome C. Figure 2 shows no difference in the generation of superoxide anion among non-diabetic and diabetic animals. Ionoghuchi et al. (1992) demonstrated that the production of ROS in cultured endothelial cells exposed to high glucose levels is similar to that of cells in response to stimulation by PMA, suggesting a greater translocation of PKC to the membrane and, thereby, providing an increased sensitivity to stimulation by PKC in neutrophils of diabetic patients. In this study, PMA was added to both the diabetic and non-diabetic groups.

Apocynin, as expected, significantly inhibited the production of superoxide anion independent of the diabetic state. Apocynin acts by inhibiting



the translocation of p47phox to the cell membrane and preventing the assembly of the system, and it has been used extensively as a non-toxic inhibitor of NOX2. The clinical applicability of apocynin has been studied by several groups, who showed that apocynin efficiently decreased signs and symptoms of rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, atherosclerosis and asthma (Tang, Chen, Xiong, Hu, Wu, 2010). The mechanism of inhibition of apocynin is connected to its prior activation by peroxidase and its dimerization through its oxidation by myeloperoxidase (MPO). Some studies have shown that the apocynin dimer is more efficient than apocynin itself (de Almeida, Vilela, Condino-Neto, Ximenes, 2012), and others suggest that only the dimer is able to block the activity of NOX2 (Van den Worm et al., 2001). Our group previously demonstrated that diabetic animals have lower MPO activity than non-diabetic animals (de Souza Ferreira et al., 2012), which could explain the less pronounced effect of apocynin in the diabetic group (Figure 2).

**Figure 2.** Measurement of superoxide anion.



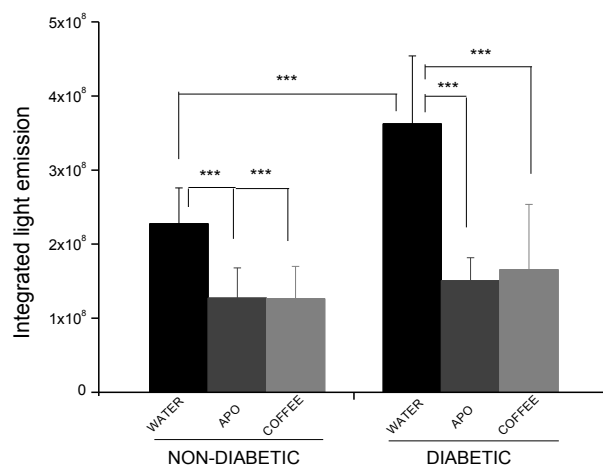
The values are presented as means  $\pm$  SD of the three experiments performed in triplicate of the  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  of cytochrome C reduction and  $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$  of catalase promoted by peritoneal neutrophils ( $1 \times 10^6$  cells per test) of rats stimulated with PMA ( $100 \text{ ng.ml}^{-1}$ ) from non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic treated with: water, APO or coffee and diabetic treated with: water, APO or coffee. \*\*\* $p < 0,001$ . APO apocynin.

The group treated with coffee also exhibited an inhibition of superoxide anion production, but this inhibition was less pronounced than that of apocynin and was only observed in diabetic animals. One of the most extensively studied and proven properties of coffee is its antioxidant activity related to natural phenolic compounds such as chlorogenic acid, caffeine and melanoidins (But & Sultn, 2011), which may contribute to its inhibitory effect.

The superoxide anion originates from other species, *e.g.*, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), which is formed from the spontaneous dismutation of superoxide anion and/or catalysis by the enzyme superoxide dismutase (SOD), HOCl (hypochlorous acid), which is formed by an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dependent reaction with chloride ions ( $\text{Cl}^-$ ) and MPO, and nitric oxide (NO), which is formed by the oxidation of L -arginine by iNOS (Bedar & Krause, 2007). We also assessed the

extracellular ROS production by chemiluminescence amplified by luminol. As observed in Figure 3, hyperglycemia increased the pool of ROS in neutrophils, and any of the above-mentioned species could contribute to the observed effect. Apocynin and coffee inhibited the production of ROS by neutrophils, and this effect was more evident in diabetic animals. The inhibitory effect of apocynin on ROS production is well described. As for coffee, the works are often in conflict. Numerous papers describe the antioxidant properties of coffee, while others show the opposite effect (Wu, Huang, Lin, Hiang, Yen, 2011). However, little is known regarding its anti-oxidative mechanism in the modulation of key cellular processes. Here, we observed that coffee reduced ROS production. Related to this point, the increased expression and activity of the antioxidant enzymes SOD, catalase and GPx in the livers of rats was recently described (Vicente, Ishimoto, Torres, 2014). Neutrophils also express these enzymes, which could contribute to the reduction of ROS that was observed in the group treated with coffee. Furthermore, it has been described that caffeic acid reduced the activity of the GTPase protein Rac1 accompanied by a decrease in NOX2 regulation (Xu et al., 2005).

**Figure 3.** Measurement of the pool of reactive oxygen species.



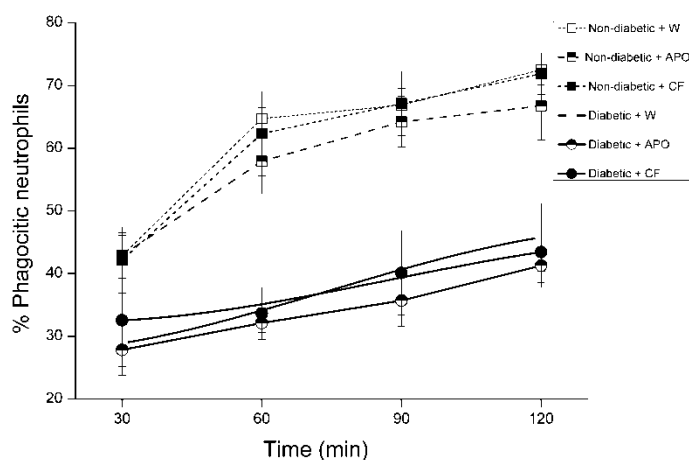
The values are presented as means  $\pm$  SD of the three experiments performed in triplicate of the integrated area of light emission obtained for the oxidation of luminol ( $1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) promoted by peritoneal neutrophils ( $1 \times 10^6$  cells per test) of rats stimulated with PMA ( $53 \text{ ng.ml}^{-1}$ ) from non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic treated with: water, APO or coffee and diabetic treated with: water, APO or coffee. \*\*\* $p < 0,001$ . APO apocynin.

NOX2 plays an important role in the antimicrobial response of the body by the generation of ROS. Thus, the phagocytic and killing activities of peritoneal neutrophils toward *C. albicans* were evaluated in this study. *C. albicans* is an opportunistic pathogen that can cause mucocutaneous, gastrointestinal and systemic infections, especially in immunocompromised and neutropenic patients. Moreover, candidiasis is a common infectious condition in diabetic patients (Díaz, Bravo, Samper, Garcia, Barrera, 2011).

The phagocytosis and killing of *C. albicans* by peritoneal neutrophils from diabetic animals were significantly impaired relative to those of neutrophils from non-diabetic animals (Figure 4 and 5), as described in our earlier work (de Souza Ferreira et al., 2012). Chronic hyperglycemia causes glycation of the

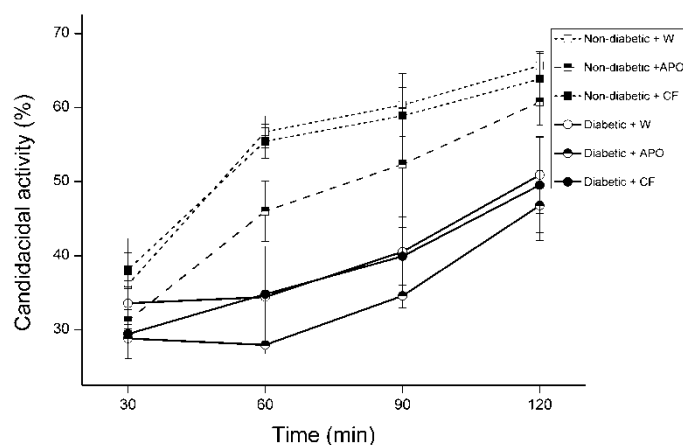
membranes of leukocytes in diabetics, which results in the loss of granulocyte functions, such as chemotaxis, diapedesis, phagocytosis and bactericidal action. These data demonstrate that the hyperglycemic state adversely affects the phagocytic and killing activities of peritoneal neutrophils exposed to *C. albicans*. It is known that the addition of ROS and proteins in the phagosome, such as lysozyme, neutral and acid proteases, phospholipases and MPO, also play an important role in the killing of pathogens. It has been shown that animals that are deficient in cathepsin G and elastase but produce superoxide anion normally are less resistant to infection by *Staphylococcus aureus* and *C. albicans* (Thevenod, 2008).

**Figure 4:** Effect of beverage coffee and APO on the ability of neutrophils to phagocytosis *C. albicans*.



Neutrophils were incubated with opsonized yeast *C. albicans* for 30, 60, 90 and 120 min, and the percentage of neutrophils that phagocytized one or more yeast *C. albicans* (phagocytic neutrophils %) was determined from non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic treated with: water, APO or coffee and diabetic treated with: water, APO or coffee. The values are presented as means  $\pm$  SD of the three experiments performed in triplicate. W water; APO apocynin; CF coffee.

**Figure 5:** Effect of beverage coffee and APO on the killing of *C. albicans*.



Neutrophils were incubated with opsonized yeast *C. albicans* for 30, 60, 90 and 120 min, and then, killing ability (candidacidal activity %) was assessed. Suspension of *C. albicans* without neutrophils from non-diabetic and diabetic groups. Non-diabetic treated with: water, APO or coffee and diabetic treated with: water, APO or coffee. Values are presented as mean  $\pm$  standard error of three experiments performed in triplicate. W water; APO apocynin; CF coffee.

Despite the reduced generation of ROS in the diabetic and non-diabetic groups, coffee did not affect the ability of neutrophils to phagocytose or kill in our model (Fig. 4 and 5). Information related to the effects of coffee on the body's defense mechanism toward pathogens are scarce. Experimental evidence indicates that phenolic compounds can regulate cellular processes that lead to the inflammatory response and can increase defense or not cause any type of effect (Alia, Horcajo, Bravo, Goya, 2003). This controversy indicates that the response to the activity of these defenses depends on the etiology of oxidative stress, the experimental protocol, the antioxidant defense in question and the type and source of dietary antioxidant. Many of the physiological benefits of coffee that have been attributed to multiple and important functions related to

the ability of phenolics to bind to cell receptors and membrane transporters and influence gene expression, signaling and cell adhesion mechanisms may exert a direct (eliminating ROS) or indirect (by increasing the activity or expression of antioxidant enzymes, activating mechanisms of immune defense) effect (Vicente, Ishimoto, Torres, 2014).

In this study, we used apocynin to test its effect on the microbicidal ability of neutrophils and compared its effect with the possible antioxidant effect of coffee. As observed in Figure 3, apocynin was effective in inhibiting the production of superoxide anion and, consequently, the ROS pool. As noted in Figure 5, apocynin, at the dose and treatment conditions that were used here, did not interfere with the phagocytic ability of these cells toward *C. albicans*. However, at 60 and 90 minutes, a small decrease in neutrophil microbicidal capacity of animals treated with apocynin occurred, most likely due to the decreased ROS produced by these cells. Stolk et al. (1994) reported that apocynin did not interfere with the PMN defense because it did not affect phagocytosis or intracellular killing of *Staphylococcus aureus* (Stolk, Hiltermann, Dijkman, & Verhoeven, 1994). In this study, we observed an inhibitory effect of apocynin toward the microbicidal ability of neutrophils only in the diabetic group (Figure 5). As stated earlier, diabetic animals had lower MPO activity, which compromises apocynin dimer formation and, hence, its activity.

It is worth noting that coffee contains many bioactive components, including chlorogenic acid and caffeine, which are cited as the main compounds responsible for its antioxidative action. The levels of these components may be high or low, depending on the species of coffee and the type of treatment (roasting process, procedure for extraction and other variables), which modifies the physicochemical properties of the coffee and, consequently, the effects that were described in other studies.

#### 4. CONCLUSIONS

Our data show that intake of coffee did not affect the glycemic profile of non-diabetic or diabetic animals. However, coffee reduced the generation of ROS in non-diabetic and diabetic animals and did not affect neutrophil phagocytosis or killing against *C. albicans*. Treatment with apocynin decreased the production of superoxide anion by NOX2 in neutrophils from non-diabetic and diabetic rats, though, this effect was less pronounced in diabetics. In addition, the apocynin decreased the killing capacity of neutrophils from non-diabetic animals against *C. albicans*. This effect was not observed in diabetic animals, most likely because of decreased expression and activity of MPO, which is an important enzyme for the action of apocynin.

#### **Acknowledgments**

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG, Minas Gerais, Brazil) and CAPES for financial support.

#### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflict of interest.



## REFERENCES

Alia, M., Horcajo, C., Bravo, L., Goya, L. (2003). Effect of grape antioxidant Dietary fiber on total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutr Res.* 23:1251-1267.

American Diabetes Association. (2013). Position statement: standards of medical care in diabetes-2013. *Diabetes Care*; 36.Suppl.1: S11-66.

Bedard, K.; Krause, K. H. (2007).The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. rev.*, Bethesda, v. 87, pt.1, p. 245-313.

Butt, M. S, Sultan, M.T. (2011) Coffee and its consumption: Benefits and risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*51: 363-373.

Camargo, M. C. R., Toledo, M. C. F., Farah, H. G. (1998). Caffeine daily intake from dietary sources in Brazil. *Food Additives and Contamants*, London, v. 16, n. 1, p. 79-87.

Chaves, D. S., Costa, S. S., Almeida, A. P., Frattani, F., Assafim, M., Zingali, R. B. (2010). Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. *Quim Nova*, Vol. 33, No. 1, 172-180.

de Almeida, A. C., Vilela, M. M. S., Condino-Neto, A., Ximenes, V. F. (2012). The Importance of Myeloperoxidase in Apocynin-Mediated NADPH Oxidase Inhibition International Scholarly Research Network- ISRN *Inflammation*. ID 260453, 7 pages.

de Souza Ferreira, S. C., Araújo, T. H., Ângelo, M. L., Pennacchi, P. C., Okada, S. S., Paula, F. B. A., Migliorini, S., Rodrigues, M. R. (2012). Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. *Cell Biochem Funct*, 30: 604-610.

Díaz, M. S., Bravo, L. L. M., Samper, J. M. C., García, A. B., Barrera, F. C. (2011). Prevención de La diabetes mellitus 2. *37(9)*: 496-3.

Duarte, S. M. S., Abreu, C. M. P., Menezes, H. C., Santos, M. R., Gouvêa, C. M. C. P. (2005). Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciência Tecnol Alime* 25: 387-393.

Ionoguchi T. R., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J. R., Heath, W., King, G. L. (1992). Preferential elevation of protein Kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (22): 11059-11063.

Islam, L.N., Nabi, A. H. M. N. (2003). Endotoxins of Enteric Pathogens Modulate the Functions of Human Neutrophils and Lymphocytes. *J Biochem Mol Biol*; 36: 565–571.

Jones, O. T., Hancock, T. (1994). Assays of plasma membrane NADPH oxidase. *Methods Enzymol*; 233: 222–229.

Kempf, K., Rose, B., Herder, C., Haastert, B., Fusbahn-Laufenburg, Reifferscheid, A., Scherbaum, W. A., Kolb, H., Martin, S. (2007). The metabolic syndrome sensitizes leukocytes for glucose-induced immune gene expression. *J Mol Med.* 85: 389-396.

Koya, D., King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes, New York*, v. 47, pt. 6, p. 859-866.

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

Marcucci, C. T., Benassi, M. T., Almeida, M. B., Nixdorf, S. L. (2013). Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros. *Quím. Nova* vol.36 n°. 4 São Paulo.

Muriel, P. and Arauz, J. (2010). Coffee and liver diseases. *Fitoterapia.* 81, 5, 297-305.

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

Patel, D. K, Kumar, R., Laloo D., Hemalath, S. (2012). Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asia Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 411:420.

R Core Team. (2013). *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Roales-Nieto, J. G., San Pedro, E. M., Luciano, A. G., Coronado, J. L. B. (2004). Efectos del consumo de café para la salud cardiovascular, la diabetes y el desarrollo de câncer. *Psicothema* Vol. 16, nº 4, pp. 531-547.

Rodrigues, M. R., Rodrigues, D., Russo, M., Campa, A. (2002). Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun*; 292: 869-873.

Shen, G. X. (2010). Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *J Physiol Pharmacol, Canada*, v. 88, pt. 3, p. 241-248.

Soo Min, N., Lee, M. Y., Koh, J. H., Park, J. H., Shin, J. Y., Shin, Y. G., Koh, S. B., Lee, E. Y., Chung, C. H. (2009). Effects of NADPH oxidase inhibitor on diabetic nephropathy in OLETF rats: The role of reducing oxidative stress in its protective property. *Diabetes res. clin. pract.*, Amsterdam, v. 83, n.2, p. 176-182.

Souza, I. P., Kang, H. C., Nardinelli, L., Borelli, P. (2001). Desnutrição protéica: efeito sobre o espriamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. *Braz J Pharm Sci*; 37: 143–151.

Stolk, T. J., Hiltermann, J. H., Dijkman, and Verhoeven, A. J. (1994). Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 11, no. 1, pp. 95–102,

Stoppa, G. R., Cesquini, M., Roman, E. A., Ogo, S. H., Torsoni, M. A. (2006). Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. *Life Sciences, Oxford*, v. 78, n. 12, p. 1352-1361.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*; 50: 537-546.

Tang, J. L., Chen, W. P. Y., Xiong, P. F., Hu, Wu, L. D. (2010). The anti-inflammatory effects of apocynin, inhibitor of NADPH oxidase, contrasting hyaluronic acid on articular cartilage during the development of osteoarthritis in a rabbit model. *Biomed. Pharmacother. Sep 21*. [Epub ahead of print].

Thallas-Bonke, V., Thorpe S. R., Coughlan, M. T., Fukami, K., Yap, F. Y., Sourris, K. C., Penfold, S. A., Bach, L. A., Cooper, M. E., Forbes, J. M. (2008). Inhibition of NADPH Oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- $\alpha$ -dependent pathway. *Diabetes, New York*, v. 57, n.2, p. 460-469.

Thévenod, F. (2008). Pathophysiology of diabetes mellitus type: 2 Roles of obesity, insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Front Diabetes Basel Karger*. 19:1-18.

Van den Worm E., Beukelman C. J., Van den Berg A. J., Kroes B. H., Labadie R. P., Van Dijk, H. (2001). Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur J Pharmacol* .433: 225-230.

Van Dijk, A. E., Olthof, M. R., Meeuse, J. C., Seebus, E., Heine, R. J., and van Damm, R. M. (2009). Acute Effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care*. [In Press]. Jun;32(6):1023-5.

Vicente, S. J. V., Ishimoto, E. Y., Torres, E. A. S. F. (2014). Coffee Modulates Transcription Factor Nrf2 and Highly Increases the Activity of Antioxidant Enzymes in Rats. *J. Agric. Food Chem.* 62, 116–122.

Volz, N., Boettler, U., Winkler, S., Teller, N., Schwarz, C., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Haupt, L., Griffiths, L. R., Stiebitz, H., Bytof, G., Lantz, I., Lang, R., Hofmann, T., Somoza, V., Marko, D. (2012). Effect of coffee combining green coffee bean constituents with typical roasting products on the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 9631-9641.

Wu, C-H., Huang, H-W., Lin, J-A., Hiang, S-M., Yen, G-C. (2011) The proglycation effect of caffeic acid leads to the elevation of oxidative stress and inflammation in monocytes, macrophages and vascular endothelial cells. *Journal of Nutrition Biochemistry* 22; 585-595.

Xu, J. W., Ikeda, K., Kobayakawa, A., Ikami, T., Kayano, Y., Mitani, T., Yamori, Y. (2005). Downregulation of Rac1 activation by caffeic acid in aortic smooth muscle cells. *Life Sciences*. 2861-2872.

Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai S., Petrova, R. G., Abedin, M. J., Li, H., Yasui, K., Takeuchi, M., Makita, Z., Takasawa, S., Okamoto, H., Watanabe, T., Yamamoto H. (2003). Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and

pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem j.*, London, v. 370, pt. 3, p. 1097-1109.

Yoshinari, O., Takenake, A., & Igarashi, K. (2013). Trigonelline Ameliorates Oxidative Stress in type 2 Diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Med Food* 16(1), 34-41.

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

## APÊNCIDES

### APÊNDICE A - RELATÓRIO DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

#### ARTIGO 1 – Ingestion of coffee (*Coffea Arabica* L.) reduces advanced glycation end product (AGEs) formation and platelet aggregation in diabetic rats

##### PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADOS - AGES (UA/g proteína)

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes	1	0.39559	0.39559	1289.46	0.0000e+00
Inibidor	2	0.11862	0.05931	193.33	0.0000e+00
Diabetes*Inibidor	2	0.04067	0.02034	66.29	1.5098e-17
Residuo	78	0.02393	0.00031		
Total	83	0.57881			

CV = 13.77 %

Desdobrando Diabetes dentro de cada nível de Inibidor

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Inibidor	2	0.11862	0.05931	193.3326	0
Inibidor:Diabetes água	1	0.29305	0.29305	955.22	0
Inibidor:Diabetes AMG	1	0.07385	0.07385	240.7322	0
Inibidor:Diabetes café	1	0.07634	0.07634	248.8497	0
Residuo	78	0.02393	0.00031		
Total	83	0.57881	0.00697		

Diabetes dentro do nível água de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos	Tratamentos	Médias
a	Sim	0.2537
b	Não	0.05195556

Diabetes dentro do nível AMG de Inibidor

Teste de Tukey



```
-----
Grupos Tratamentos Médias
a      Sim      0.1263857
b      Não      0.02238182
-----
```

Diabetes dentro do nível café de Inibidor

```
-----
Teste de Tukey
-----
```

```
Grupos Tratamentos Médias
a      Sim      0.1641
b      Não      0.0513
-----
```

Desdobrando Inibidor dentro de cada nível de Diabetes

```
-----
Quadro da análise de variância
-----
```

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Diabetes	1	0.39559	0.39559	1289.4645	0
Diabetes:Inibidor não	2	0.00629	0.00314	10.2475	1e-04
Diabetes:Inibidor sim	2	0.15301	0.07650	249.3721	0
Residuo	78	0.02393	0.00031		
Total	83	0.57881	0.00697		

Inibidor dentro do nível não de Diabetes

```
-----
Teste de Tukey
-----
```

```
Grupos Tratamentos Médias
a      água      0.05195556
a      café3     0.0513
b      AMG      0.02238182
-----
```

Inibidor dentro do nível sim de Diabetes

```
-----
Teste de Tukey
-----
```

```
Grupos Tratamentos Médias
a      água1     0.2537
b      café3     0.1641
c      AMG2     0.1263857
-----
```

**CREATININA (mg/dL)**

Quadro da análise de variância

```

-----
GL          SQ          QM          Fc          Pr>Fc
Diabetes    1 0.47086 0.47086 25.4030 0.00000
Inibidor    2 0.02472 0.01236  0.6667 0.51629
Diabetes*Inibidor 2 0.00376 0.00188  0.1015 0.90360
Residuo     78 1.44577 0.01854
Total       83 1.94511
-----

```

CV = 22.23 %

Interação não significativa: analisando os efeitos simples

Diabetes Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

```

a      sim      0.6725727
b      não      0.5192727
-----

```

Inibidor

De acordo com o teste F, as médias desse fator são estatisticamente iguais.

```

Níveis Médias
1  água 0.5892000
2  AMG 0.6209973
3  café 0.6300914
-----

```

**UREIA (mg/dL)**

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes	1	106616	106616	1017.99	0.000000
Inibidor	2	385	192	1.84	0.165968
Diabetes*Inibidor	2	1331	665	6.35	0.002779
Residuo	78	8169	105		
Total	83	116500			

CV = 12.41 %

Desdobrando Diabetes dentro de cada nível de Inibidor

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Inibidor	2	384.9821	192.4911	1.838	0.166
Inibidor:Diabetes água	1	41596.5811	41596.5811	397.1746	0
Inibidor:Diabetes AMG	1	44075.2999	44075.2999	420.842	0
Inibidor:Diabetes café	1	22159.0793	22159.0793	211.5805	0
Residuo	78	8169.0352	104.7312		
Total	83	116500.2355	1403.6173		

Diabetes dentro do nível água de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	114.2086
b	1	38.2

Diabetes dentro do nível AMG de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	114.7278
b	1	34.38182

Diabetes dentro do nível café de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	103.0115
b	1	42.24

Desdobrando Inibidor dentro de cada nível de Diabetes

-----  
 Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Diabetes	1	106615.5185	106615.5185	1017.9917	0
Diabetes:Inibidor não	2	323.5021	161.7510	1.5444	0.2199
Diabetes:Inibidor sim	2	1392.1798	696.0899	6.6464	0.0022
Residuo	78	8169.0352	104.7312		
Total	83	116500.2355	1403.6173		

-----  
 Inibidor dentro do nível não de Diabetes

De acordo com o teste F, as médias desse fator são estatisticamente iguais.

	Níveis	Médias
1	1	38.20000
2	2	34.38182
3	3	42.24000

-----  
 Inibidor dentro do nível sim de Diabetes

-----  
 Teste de Tukey

Grupos	Tratamentos	Médias
a	2	114.7278
a	1	114.2086
b	3	103.0115

-----

**HbA1c (%)**

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes	1	2305.28	2305.28	2874.06	0.0000e+00
Inibidor	2	84.03	42.02	52.38	3.8000e-15
Diabetes*Inibidor	2	57.93	28.96	36.11	7.9338e-12
Residuo	78	62.56	0.80		
Total	83	2509.81			

CV = 5.78 %

Desdobrando Diabetes dentro de cada nível de Inibidor

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Inibidor	2	84.03251	42.01626	52.3827	0
Inibidor:Diabetes água	1	1092.87360	1092.87360	1362.5133	0
Inibidor:Diabetes AMG	1	486.69120	486.69120	606.7703	0
Inibidor:Diabetes café	1	800.41500	800.41500	997.8977	0
Residuo	78	62.56390	0.80210		
Total	83	2509.80617	30.23863		

Diabetes dentro do nível água de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	20.97273
b	1	8.6525

Diabetes dentro do nível AMG de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	17.46111
b	1	9.018182

Diabetes dentro do nível café de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	20.86
b	1	9.31

Desdobrando Inibidor dentro de cada nível de Diabetes

-----  
 Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Diabetes	1	2305.28326	2305.28326	2874.0553	0
Diabetes:Inibidor não	2	2.39077	1.19539	1.4903	0.2316
Diabetes:Inibidor sim	2	139.56825	69.78412	87.0016	0
Residuo	78	62.56390	0.80210		
Total	83	2509.80617	30.23863		

-----  
 Inibidor dentro do nível não de Diabetes

De acordo com o teste F, as médias desse fator são estatisticamente iguais.

	Níveis	Médias
1	1	8.652500
2	2	9.018182
3	3	9.310000

-----  
 Inibidor dentro do nível sim de Diabetes

-----  
 Teste de Tukey

Grupos	Tratamentos	Médias
a	1	20.97273
a	3	20.86
b	2	17.46111

-----

**AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA (%)**

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes	1	5616.3	5616.3	884.40	0.0000e+00
Inibidor	2	6279.3	3139.6	494.40	0.0000e+00
Diabetes*Inibidor	2	1284.9	642.4	101.16	2.1507e-22
Residuo	78	495.3	6.4		
Total	83	13675.7			

CV = 3.6 %

Desdobrando Diabetes dentro de cada nível de Inibidor

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Inibidor	2	6279.2743	3139.63714	494.4025	0
Inibidor:Diabetes água	1	2599.2000	2599.20000	409.2992	0
Inibidor:Diabetes AMG	1	4353.0129	4353.01293	685.4743	0
Inibidor:Diabetes café	1	182.4441	182.44408	28.7297	0
Residuo	78	495.3286	6.35037		
Total	83	13675.7258	164.76778		

Diabetes dentro do nível água de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	85.8
b	1	66.8

Diabetes dentro do nível AMI de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	68.25
b	1	43

Diabetes dentro do nível café de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	75.71429
b	1	70.2

Desdobrando Inibidor dentro de cada nível de Diabetes

-----  
 Quadro da análise de variancia  
 -----

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Diabetes	1	5616.2548	5616.25475	884.3986	0
Diabetes:Inibidor não	2	4773.9297	2386.96485	375.8783	0
Diabetes:Inibidor sim	2	2790.2128	1395.10640	219.6891	0
Residuo	78	495.3286	6.35037		
Total	83	13675.7258	164.76778		

-----  
 Inibidor dentro do nível não de Diabetes  
 -----

Teste de Tukey

-----  
 Grupos Tratamentos Médias

a	3	70.2
b	1	66.8
c	2	43

-----  
 Inibidor dentro do nível sim de Diabetes  
 -----

Teste de Tukey

-----  
 Grupos Tratamentos Médias

a	1	85.8
b	3	75.71429
c	2	68.25

-----



**LEUCOCITOS (mm<sup>3</sup>)**

Quadro da análise de variancia

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes	1	1988828	1988828	33.124	0.00000
Inibidor	2	1333485	666742	11.105	0.00006
Diabetes*Inibidor	2	107786	53893	0.898	0.41172
Residuo	78	4683314	60042		
Total	83	8113413			

CV = 4.4 %

Interacao nao significativa: analisando os efeitos simples

Diabetes

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	não	5761.732
b	sim	5446.669

Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	AMG	5673.695
a	água	5627.552
b	café	5382.143

**HEMACIAS ( $\times 10^{12}$  L)**

Quadro da análise de variância

---

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes	1	0.0048	0.004824	0.02060	0.88623
Inibidor	2	0.4219	0.210930	0.90084	0.41041
Diabetes*Inibidor	2	0.1625	0.081230	0.34692	0.70795
Residuo	78	18.2636	0.234149		
Total	83	18.8527			

---

CV = 5.53 %

Interacao nao significativa: analisando os efeitos simples

Diabetes

De acordo com o teste F, as médias desse fator sao estatisticamente iguais.

Niveis	Médias
1 não	8.762045
2 sim	8.746528

---

Inibidor

De acordo com o teste F, as médias desse fator sao estatisticamente iguais.

Niveis	Médias
1 água	8.813333
2 AMG	8.655532
3 café	8.792400

---

**HEMOGLOBINA (g/dL)**

Quadro da análise de variancia

---

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes	1	0.031	0.0309	0.0424	0.83739
Inibidor	2	1.705	0.8526	1.1719	0.31519
Diabetes*Inibidor	2	7.289	3.6444	5.0091	0.00898
Residuo	78	56.749	0.7276		
Total	83	65.774			

---

CV = 4.96 %

Desdobrando Diabetes dentro de cada nível de Inibidor

Quadro da análise de variancia

---

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Inibidor	2	1.70517	0.85259	1.1719	0.3152
Inibidor:Diabetes água	1	1.96356	1.96356	2.6988	0.1044
Inibidor:Diabetes AMG	1	0.16580	0.16580	0.2279	0.6344
Inibidor:Diabetes café	1	5.18795	5.18795	7.1307	0.0092
Residuo	78	56.74927	0.72755		
Total	83	65.77412	0.79246		

---

Diabetes dentro do nível água de Inibidor

De acordo com o teste F, as médias desse fator são estatisticamente iguais.

	Níveis	Médias
1	1	16.74444
2	2	17.26667

---

Diabetes dentro do nível AMG de Inibidor

De acordo com o teste F, as médias desse fator são estatisticamente iguais.

	Níveis	Médias
1	1	17.03750
2	2	17.19333

---

Diabetes dentro do nível café de Inibidor

Teste de Tukey

---

Grupos	Tratamentos	Médias
a	1	17.95714
b	2	17.02727

---

Desdobrando Inibidor dentro de cada nível de Diabetes

-----  
 Quadro da análise de variancia  
 -----

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Diabetes	1	0.03085	0.03085	0.0424	0.8374
Diabetes:Inibidor não	2	8.51044	4.25522	5.8487	0.0043
Diabetes:Inibidor sim	2	0.48356	0.24178	0.3323	0.7183
Residuo	78	56.74927	0.72755		
Total	83	65.77412	0.79246		

-----  
 Inibidor dentro do nível não de Diabetes  
 -----

Teste de Tukey

-----  
 Grupos Tratamentos Médias

a	3	17.95714
b	2	17.0375
b	1	16.74444

-----  
 Inibidor dentro do nível sim de Diabetes

De acordo com o teste F, as médias desse fator são estatisticamente iguais.

	Níveis	Médias
1	1	17.26667
2	2	17.19333
3	3	17.02727

-----

**HEMATOCRITO (%)**

Quadro da análise de variancia

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes	1	38.36	38.363	6.2396	0.01460
Inibidor	2	2.11	1.055	0.1717	0.84259
Diabetes*Inibidor	2	22.81	11.404	1.8548	0.16331
Residuo	78	479.57	6.148		
Total	83	542.85			

CV = 5.21 %

Interacao nao significativa: analisando os efeitos simples

Diabetes

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	sim	48.15419
b	não	46.77045

Inibidor

De acordo com o teste F, as médias desse fator são estatisticamente iguais.

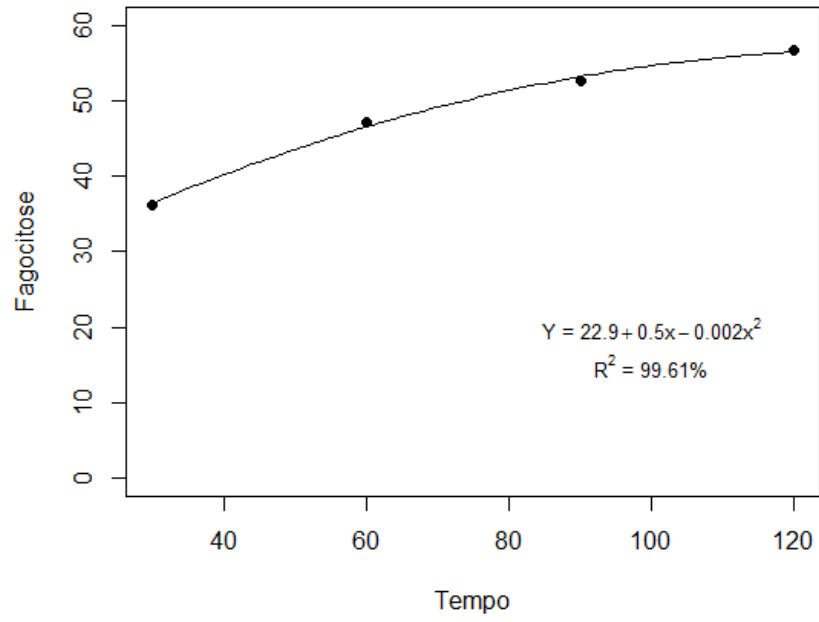
Niveis	Médias
1	água 47.63667
2	AMG 47.42845
3	café 47.79055

## ARTIGO 2 - Coffee reduces NOX2 activity and ROS release by peritoneal neutrophils from rats

### FAGOCITOSE (%)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIABETES	1	20524.975559	20524.975559	190.562	0.0000
INIBIDOR	2	318.940982	159.470491	1.481	0.2589
DIABETES*INIBIDOR	2	-4.890666600E+0001	-2.44533330E+0001	-0.227	1.0000
erro 1	15	1615.610360	107.707357		
TEMPO	3	9183.065866	3061.021955	175.600	0.0000
erro 2	125	2178.971124	17.431769		
Total corrigido		148	33772.657224		
CV 1 (%) =		21.72			
CV 2 (%) =		8.74			
Média geral:		47.7777181	Número de observações:		149
Teste Tukey para a FV DIABETES					
Tratamentos		Médias	Resultados do teste		
Diab. sim		36.119467	a1		
Diab. não		59.593514	a2		
Teste Tukey para a FV INIBIDOR					
Tratamentos (D x ND)		Médias	Resultados do teste		
APO		45.701224	a1		
café		48.587755	a1		
água		48.994510	a1		
Teste Tukey para a FV TEMPO					
Tratamentos		Médias	Resultados do teste		
30		36.228293	a1		
60		47.195556	a2		
90		52.584444	a3		
120		56.706667	a4		
Regressão para tempo					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	22.916436	1.90742280	12.014	0.0000	
b1	0.507957	0.05800357	8.757	0.0000	
b2	-0.001901	0.00038065	-4.995	0.0000	
R^2 = 99.61%					



**KILLING (%)**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIABETES	1	7775.184414	7775.184414	80.520	0.0000
INIBIDOR	2	1186.249243	593.124621	6.142	0.0113
DIABETES*INIBIDOR	2	16.480143	8.240071	0.085	0.9186
erro 1	15	1448.436242	96.562416		
TEMPO	3	10457.492459	3485.830820	202.026	0.0000
erro 2	125	2156.794788	17.254358		

Total corrigido 148 23040.637289

CV 1 (%) = 22.06

CV 2 (%) = 9.33

Média geral: 44.5432886 Número de observações: 149

## Teste Tukey para a FV DIABETES

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
Diab. sim	37.367867	a1
Diab. não	51.815676	a2

## Teste Tukey para a FV INIBIDOR

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
APO	40.538571	a1
café	46.106122	a2
água	46.889412	a2

## Teste Tukey para a FV TEMPO

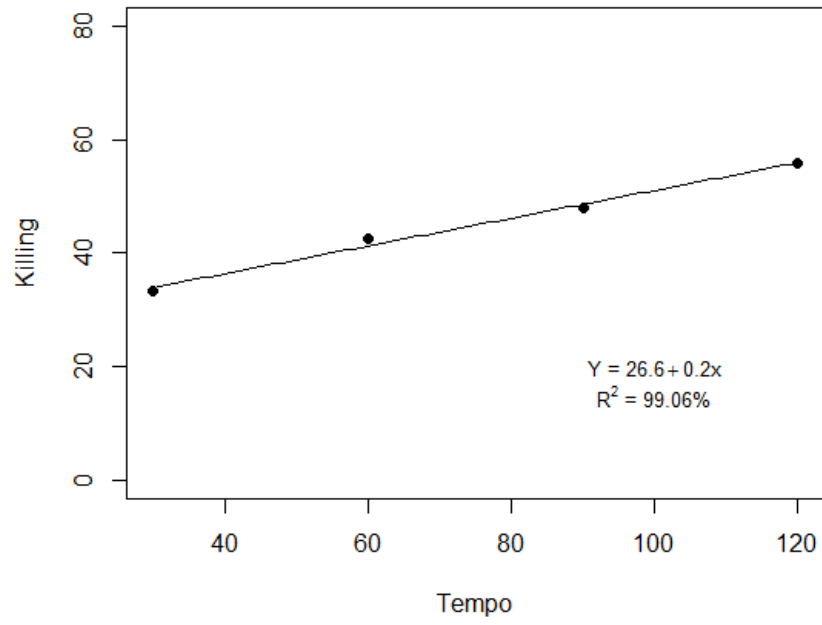
Tratamentos	Médias	Resultados do teste
30	33.241951	a1
60	42.583333	a2
90	48.008611	a3
120	55.908889	a4

## Regressão para a TEMPO

Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t
b0	26.579173	0.83487301	31.836	0.0000
b1	0.244754	0.01016175	24.086	0.0000

R<sup>2</sup> = 99.06%





**ENSAIO DO CITOCROMO C (ânion superóxido uM/min)**

Quadro da análise de variância

```

-----
          GL          SQ          QM          Fc  Pr>Fc
Diabetes (DxND)  1 6.7000e-14 6.7300e-14  0.467 0.49639
Inibidor        2 3.1310e-11 1.5655e-11 108.685 0.00000
Diabetes*Inibidor 2 5.5200e-12 2.7600e-12  19.161 0.00000
Resíduo         73 1.0515e-11 1.4400e-13
Total           78 4.7412e-11
-----

```

CV = 10.24 %

Desdobrando Diabetes dentro de cada nível de Inibidor

Quadro da análise de variância

```

-----
          GL  SQ  QM          Fc  Pr.Fc
Inibidor          2  0  0 108.6846    0
Inibidor:Diabetes água  1  0  0  3.5694 0.0628
Inibidor:Diabetes APO  1  0  0 20.8604    0
Inibidor:Diabetes café  1  0  0 14.3786 3e-04
Resíduo          73  0  0
Total            78  0  0
-----

```

Diabetes dentro do nível água de Inibidor

De acordo com o teste F, as medias desse fator são estatisticamente iguais.

```

-----
      Níveis      Médias
1      (ND) 1 4.576667e-06
2      (D)  2 4.309444e-06
-----

```

Diabetes dentro do nível APO de Inibidor

Teste de Tukey

```

-----
Grupos Tratamentos Médias
a      (D)  2      3.186667e-06
b      (ND) 1      2.479e-06
-----

```

Diabetes dentro do nível café de Inibidor

-----  
 Teste de Tukey  
 -----

Grupos Tratamentos Médias

a	(ND) 1	3.998e-06
b	(D) 2	3.402143e-06

-----  
 Desdobrando Inibidor dentro de cada nível de Diabetes  
 -----

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Diabetes	1	0	0	0.4673	0.4964
Diabetes:Inibidor não D	2	0	0	86.6663	0
Diabetes:Inibidor sim D	2	0	0	41.1797	0
Resíduo	73	0	0		
Total	78	0	0		

-----  
 Inibidor dentro do nível NÃO de Diabetes  
 -----

Teste de Tukey

-----  
 Grupos Tratamentos Médias

a	1 (água)	4.576667e-06
b	3 (café)	3.998e-06
c	2 (APO)	2.479e-06

-----  
 Inibidor dentro do nível SIM de Diabetes  
 -----

Teste de Tukey

-----  
 Grupos Tratamentos Médias

a	1 (água)	4.309444e-06
b	3 (café)	3.402143e-06
b	2 (APO)	3.186667e-06

-----

**QUIMILUMINESCÊNCIA (Área integrada)**

Quadro da análise de variância

```

-----
                GL          SQ          QM          Fc          Pr>Fc
Diabetes (DxND)  1 1.0037e+17 1.0037e+17  55.631 1.0000e-10
Inibidor        2 4.9827e+17 2.4913e+17 138.080 0.0000e+00
Diabetes*Inibidor 2 4.7332e+16 2.3666e+16  13.117 1.3591e-05
Resíduo         73 1.3171e+17 1.8043e+15
Total           78 7.7768e+17
-----

```

CV = 20.54 %

Desdobrando Diabetes dentro de cada nível de Inibidor

Quadro da análise de variância

```

-----
                GL          SQ          QM          Fc          Pr.Fc
Inibidor        2 4.982677e+17 2.491338e+17 138.08      0
Inibidor:Diabetes água  1 1.310291e+17 1.310291e+17  72.6216      0
Inibidor:Diabetes apo  1 3.899557e+15 3.899557e+15   2.1613 0.1458
Inibidor:Diabetes café  1 9.458031e+15 9.458031e+15   5.242 0.0249
Resíduo         73 1.317118e+17 1.804272e+15
Total           78 7.776848e+17 9.970318e+15
-----

```

Diabetes dentro do nível ÁGUA de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

```

a      2 (D)      362477818
b      1 (ND)      227576033
-----

```

Diabetes dentro do nível APO de Inibidor

De acordo com o teste F, as medias desse fator são estatisticamente iguais.

```

Níveis          Médias
1      1 (ND)      125079369
2      2 (D)      150573018
-----

```

Diabetes dentro do nível café de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

```

a      2      165522314
b      1      125255991
-----

```

Desdobrando Inibidor dentro de cada nível de Diabetes

-----  
 Quadro da análise de variância  
 -----

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Diabetes	1	1.003728e+17	1.003728e+17	55.6307	0
Diabetes:Inibidor não (D)	2	7.865619e+16	3.932809e+16	21.7972	0
Diabetes:Inibidor sim (D)	2	4.669440e+17	2.334720e+17	129.3996	0
Resíduo	73	1.317118e+17	1.804272e+15		
Total	78	7.776848e+17	9.970318e+15		

-----  
 Inibidor dentro do nível NÃO de Diabetes  
 -----

Teste de Tukey  
 -----

Grupos Tratamentos Médias

a	1	(água)	227576033
b	3	(café)	125255991
b	2	(APO)	125079369

-----  
 Inibidor dentro do nível SIM de Diabetes  
 -----

Teste de Tukey  
 -----

Grupos Tratamentos Médias

a	1	(água)	362477818
b	3	(café)	165522314
b	2	(APO)	150573018

-----

**HbA1C (%)**

Quadro da análise de variância

```

-----
                GL      SQ      QM      Fc      Pr>Fc
Diabetes (DxND)  1 2823.09 2823.09 2661.66 0.00000
Inibidor        2   1.71   0.86   0.81 0.45021
Diabetes*Inibidor 2   0.93   0.47   0.44 0.64545
Resíduo        73  77.43   1.06
Total          78 2903.16
-----

```

CV = 6.43 %

Interação não significativa: analisando os efeitos simples

Diabetes

Teste de Tukey

```

-----
Grupos Tratamentos Médias
a      sim (D)      20.9617
b      não (ND)     8.784375
-----

```

Inibidor

De acordo com o teste F, as medias desse fator são estatisticamente iguais.

```

-----
Níveis Médias
1  água 16.10000
2  APO 16.26800
3  café 15.69167
-----

```

**LEUCÓCITOS (mm<sup>3</sup>)**

Quadro da análise de variância

---

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes (DxND)	1	1346977	1346977	18.6266	0.00005
Inibidor	2	1008100	504050	6.9702	0.00170
Diabetes*Inibidor	2	48152	24076	0.3329	0.71790
Resíduo	73	5278972	72315		
Total	78	7682201			

---

CV = 4.86 %

Interação não significativa: analisando os efeitos simples

Diabetes

Teste de Tukey

---

Grupos	Tratamentos	Médias
a	não(D)	5696.844
b	sim(D)	5430.851

---

Inibidor

Teste de Tukey

---

Grupos	Tratamentos	Médias
a	água	5657
ab	APO	5542.4
b	café	5386.625

---

**HEMÁCIAS ( $\times 10^{12}$  L)**

Quadro da análise de variância

---

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes	1	0.3286	0.32862	1.6018	0.209674
Inibidor	2	1.2639	0.63194	3.0802	0.051968
Diabetes*Inibidor	2	0.6441	0.32207	1.5698	0.215019
Residuo	73	14.9767	0.20516		
Total	78	17.2133			

---

CV = 5.19 %

---

 Interação não significativa: analisando os efeitos simples
 

---

## Diabetes

De acordo com o teste F, as médias desse fator são estatisticamente iguais.

Níveis	Médias
1 não(D)	8.645000
2 sim(D)	8.776383

---

## Inibidor

De acordo com o teste F, as medias desse fator são estatisticamente iguais.

Níveis	Médias
1 água	8.813333
2 APO	8.538000
3 café	8.803333

---



**Hemoglobina (g/dL)**

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Diabetes (DxND)	1	5.108	5.1082	7.1753	0.00913
Inibidor	2	1.649	0.8244	1.1581	0.31979
Diabetes*Inibidor	2	12.998	6.4991	9.1290	0.00029
Residuo	73	51.970	0.7119		
Total	78	71.725			

CV = 4.9 %

Desdobrando Diabetes dentro de cada nível de Inibidor

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Inibidor	2	1.64889	0.82445	1.1581	0.3198
Inibidor:Diabetes água	1	1.97192	1.97192	2.7699	0.1003
Inibidor:Diabetes apo	1	11.01073	11.01073	15.4664	2e-04
Inibidor:Diabetes café	1	5.04680	5.04680	7.0891	0.0095
Residuo	73	51.96964	0.71191		
Total	78	71.72486	0.91955		

Diabetes dentro do nível água de Inibidor

De acordo com o teste F, as medias desse fator são estatisticamente iguais.

Níveis	Médias
1	1 (ND) 16.74333
2	2 (D) 17.26667

Diabetes dentro do nível APO de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos	Tratamentos	Médias
a	1 (ND)	18.06
b	2 (D)	16.70533

Diabetes dentro do nível café de Inibidor

Teste de Tukey

Grupos	Tratamentos	Médias
a	1 (ND)	17.958
b	2 (D)	17.02786

Desdobrando Inibidor dentro de cada nível de Diabetes

-----  
 Quadro da análise de variância  
 -----

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Diabetes	1	5.10819	5.10819	7.1753	0.0091
Diabetes:Inibidor não	2	12.06636	6.03318	8.4746	5e-04
Diabetes:Inibidor sim	2	2.58068	1.29034	1.8125	0.1705
Resíduo	73	51.96964	0.71191		
Total	78	71.72486	0.91955		

-----  
 Inibidor dentro do nível NÃO de Diabetes  
 -----

Teste de Tukey  
 -----

Grupos Tratamentos Médias

a	2	(APO)	18.06
a	3	(café)	17.958
b	1	(água)	16.74333

-----  
 Inibidor dentro do nível SIM de Diabetes

De acordo com o teste F, as medias desse fator são estatisticamente iguais.

	Níveis	Médias
1	1	17.26667
2	2	16.70533
3	3	17.02786

-----

**Hematócrito (%)**

Quadro da análise de variância

```

-----
          GL      SQ      QM      Fc      Pr>Fc
Diabetes      1  78.81  78.813  13.1016  0.00054
Inibidor      2   3.56   1.779   0.2957  0.74493
Diabetes*Inibidor  2  32.50  16.250   2.7013  0.07383
Resíduo      73 439.13   6.015
Total        78 554.00
-----

```

CV = 5.15 %

Diabetes

Teste de Tukey

```

-----
Grupos Tratamentos Médias
a      sim      48.41277
b      não      46.37812
-----

```

Inibidor

De acordo com o teste F, as medias desse fator são estatisticamente iguais.

```

Níveis Médias
1  água 47.63333
2  APO 47.31600
3  café 47.81667
-----

```

**APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO**

**Plant Foods Human Nutrition, v. 68, p.268-273, September 2013.**

**The Effects of the Decaffeination of Coffee Samples on Platelet Aggregation  
in Hyperlipidemic Rats**

**ABSTRACT**

The effect of coffee on cardiovascular diseases is still controversial. It is known that the process of decaffeination may influence the chemical constitution and, therefore, the biological effects of coffee. This study thus evaluated the effects of decaffeination on the levels of total phenols and chlorogenic acids in *Coffea arabica* L. samples, as well as the effects of ingesting both integral and decaffeinated coffee on the lipid profile and hemostatic and hematological parameters in normal and hyperlipidemic rats. Samples of integral and decaffeinated lyophilized coffee (*Coffea arabica* L., planted in Brazil) were used for chemical analysis (total phenols, chlorogenic acid and caffeine contents). For the bioassays, coffee beverages were prepared with non-lyophilized samples (10 % w/v) and were filtered and administered to animals by gavage (7.2 mL/kg/day) over 30 days. On the 31st day after beginning the treatment with coffee beverages, hyperlipidemia was induced to the animals by administering Triton WR-1339 (300 mg/kg body weight). On day 32, blood was taken to determine the lipid profile, platelet aggregation, prothrombin time, partially activated thromboplastin time and hemogram. The contents of both phenolic compounds and chlorogenic acid in the integral coffee beverage were significantly lower than those in the decaffeinated coffee beverage. The animals treated with Triton WR-1339 presented a mixed hyperlipidemia. Although the decaffeination process caused a relative increase

in total phenols and chlorogenic acids, the coffee drinks were unable to change the lipid profile or the hemostatic and hematological parameters in the studied animals.

**Keywords:** Decaffeination . Coffee . Platelets . Aggregation . Hyperlipidemia.

## 1. INTRODUCTION

Coffee is widely consumed by all social classes as an international dietary habit. Among the various bioactive substances present in the beverage, caffeine and polyphenols stand out [1]. Studies have shown that the consumption of products with a high level of phenols may help reduce the risk of developing coronary artery disease (CAD), which has been identified as the leading cause of morbidity and mortality in industrialized societies [2].

In different populations, there are well-established correlations between atherosclerosis, the major risk factor for CAD [3], and both serum lipids and cholesterol retention in the arterial intima. The activation of inflammatory cells and platelets, as well as the interactions between vascular elements and lipoproteins, play an important role in the atherosclerosis process, establishing links among inflammation, thrombosis, and atherogenesis [4].

Though coffee is an important source of chlorogenic acids (CGA) in the human diet, its effects on cardiovascular function are not yet fully understood. Some authors have reported that moderate coffee consumption could reduce CAD risk, which is mainly justified due to the high content of phenolic compounds found in coffee drinks [5]. However, other studies have shown that the caffeine and chlorogenic acids present in coffee beverages can contribute to high blood pressure and high plasma levels of homocysteine, which are considered to be risk factors for cardiovascular diseases [2]. Thus, although there is no evidence showing that moderate coffee consumption (3–5 cups daily) is harmful to an individual's health. It has been recommended that some

population subgroups that are more sensitive to the effects of caffeine should avoid consuming such caffeinated drinks [2]. Nevertheless, it is known that caffeine extraction using dichloromethane can result in the loss of other components, including chlorogenic acids, which could affect the biological activity of a beverage [6]. Although dichloromethane offers accumulative toxicity risk, the residual content of this compound does not have any risk to the decaffeinated coffee consumers' health [7]. Thus, caffeine extraction using dichloromethane has been one of the most frequently used methods for coffee decaffeination in Brazil [6]. Therefore, this study aims to determine the effects of coffee decaffeination on the lipid profile and the hemostatic and hematological parameters in hyperlipidemic rats.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Preparation and Characterization of Integral and Decaffeinated Coffee Samples

Samples of coffee (*Coffea arabica* L., planted in Brazil) were provided by Cocam Industry (Catanduva-SP, Brazil). To obtain the decaffeinated coffee, a portion of the coffee samples was submitted to a complete decaffeination process using dichloromethane, according to U.S. Food and Drug Administration's recommendation (residual dichloromethane content less than 10 ppm in decaffeinated coffee). Samples (500 g) of integral and decaffeinated coffee were then roasted (roaster model Probatino - Leogap, Brazil) to an average degree of roasting. The roasted beans were finely ground (20 mesh) in an electric mill (Pinhalense, ML-1, Brazil), packaged in polyethylene and aluminum sacs, sealed and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. The color of the samples was determined visually and using a colorimeter (Chomameter- 2 Reflectance, Minolta, Osaka, Japan) coupled to a data processor (OP-300) and expressed in scale parameters developed by the Commission Internationale d'Eclairage  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  color space coordinates. Both decaffeinated and integral coffee were roasted to the same degree. Coffee beverages were prepared at a 10 % (w/v) concentration. The coffee powder was put on a paper filter funnel (Whatman no. 3, General Electric Company), and water at  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  was poured over the powder [8]. These beverage samples were lyophilized to perform the chemical analyses. For the bioassays, the drinks were always prepared at the time of administration to the animals.

## 2.2. Determination of Bioactive Compounds in the Beverages

The total phenolic content was determined with the Folin-Ciocalteu method, using tannic acid as the standard [9]. To determine the caffeine and CGA contents, hot water extraction procedures were used according to Lima et al. [9] with a dilution of 0.5 g/100 mL in distilled water and analyzed using high-performance liquid chromatography (Chromatograph ShimadzuM10AVP, Japan, with a reversed-phase Shimadzu C-18 column, 100 mm length×0.3mmID, Japan). The analysis conditions used were 1ml/min flow rate, immobile phase, with methanol, water and acetic acid (20:80:1, v/v/v) at room temperature. The peak responses were measured at 272 nm, and the quantification of the compounds was obtained by comparing the area of the component peak in the sample with the area of the peak corresponding to the external standard of caffeine and caffeoylquinic acid (Sigma, USA).

## 2.3. Administration of Coffee Beverages and Induction of Hyperlipidemia

Twelve-week-old male Wistar rats from the animal house of the Federal University of Alfenas, weighing 320±20 g, were maintained at a temperature of 23 °C, with a light–dark period of 12 h, and received commercial feed and water ad libitum during the entire experimental period. The procedures were performed according to the ethical principles for experiments with animals adopted by the Brazilian College of Animal Experiments and approved by the Ethics Committee of Animal Research of the Federal University of Lavras, protocol n° 046/2009. Filtered coffee beverages were administered to animals by gavage for a period of 30 days at a dose of 7.2 mL/kg/day, which is equivalent to the daily human consumption of eight 50-mL cups of coffee. The control group received the same dosage of water. On the 31st day after the start of treatment



with coffee beverages, hyperlipidemia was intraperitoneally induced, administering Triton WR-1339 (Tyloxapol, Sigma Aldrich) dissolved in 0.9%NaCl to fasting animals at a dosage of 300 mg/kg body weight [10]. Control animals received 0.9 % (p/v) NaCl intraperitoneally.

#### 2.4. Experimental Design

After 1 week of acclimatization, 30 animals were divided into the following six groups (n=5): animals treated with distilled water and 0.9 % saline (C); animals treated with Triton WR-1339 (H); animals treated with integral coffee and 0.9 % NaCl (CI); animals treated with decaffeinated Arabica coffee and 0.9 % NaCl (DC); animals treated with whole Arabica coffee and Triton WR-1339 (HI); and animals treated with decaffeinated Arabica coffee and Triton WR-1339 (HD). On day 32, the animals, which had been fasted for 12 h, were intramuscularly anesthetized with ketamine (70 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg). Blood was taken by puncturing the abdominal aorta and distributed into siliconized tubes without additives, tubes containing ethylene diaminetetraacetic acid and tubes containing sodium citrate. Animals were then euthanized by cervical dislocation.

#### 2.5. Hemostatic Parameters

Platelet aggregation was assessed in aliquots of plasma that was rich in platelets, according to Baldissera-Jr.'s method [11], using 1  $\mu$ M adenosine diphosphate as an agonist in a dual channel aggregometer (Qualitem) standardized at 37 °C. Blood clotting was measured in the plasma obtained with

sodium citrate by determining the prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT), according to Quick's and Thomson's methods, respectively [12].

## 2.6. Lipid Profile and Hematologic Parameters

The serum lipid profile was assessed through the determination of total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides using enzymatic methods [13]. Hematological blood samples, collected in tubes containing ethylene diaminetetraacetic acid, were processed in an Analyzer Counter 19 (Wiener Laboratories, Argentina, Rosario, 2007–2009) to determine 19 hematological parameters.

## 2.7. Statistical Analysis

The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation; they were also submitted to one-way analysis of variance and compared using the Scott-Knott test at 5 % significance. Analyses were performed using the statistical program SISVAR (system for analysis of variance).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

According to Table 1, the caffeine content in the integral coffee beverage is close to the values reported in other studies that used Brazilian coffee. Moreover, the observed values for the decaffeinated coffee drink are consistent with those recommended by Brazilian legislation [14].

The content of total phenolic compounds in the integral coffee beverage was significantly lower than the value obtained for the decaffeinated coffee drink. Likewise, the total content of CGA was also significantly lower in samples of the integral coffee beverage than in samples of the decaffeinated coffee beverage (Table 1).

The effects of the decaffeination process on phenolic compounds, particularly on CGA in coffee, are controversial in the scientific literature [6, 9]. Part of this controversy can be attributed to several factors, including the variety, the processing, and roasting of the analyzed coffee samples. In this study, the drinks were prepared with the same variety and cultivar of coffee. Furthermore, it is known that the decaffeination process can lead to a loss of mass in the coffee [6], which could contribute to the relative increases in the levels of total phenolic compounds and CGA found in the decaffeinated coffee beverage compared to the integral one.

The treatment of animals with Triton WR-1339 induced a mixed hyperlipidemia in those animals of groups H, HI and HD, but the intake of coffee drinks did not modify the serum lipid profiles (Table 2).

Several studies have been conducted to evaluate the effects of drinking coffee on the lipid profile, both in animals and in human beings, but the results remain controversial [15–17]. These differences may be attributed, at least in part, to variations in the methods of the preparation of coffee beverages as well as to the variations of the experimental models [18, 19].

In the present study, the coffee drinks were prepared and filtered according to the traditions of the Brazilian population. It is known that when coffee beverages are filtered with this method, the lipid fraction that remains on the surface of the aqueous beverage is completely retained on the filter, which could explain the differences between our results and those observed in other studies [18].

**Table 1.** Levels of caffeine, total phenols and total chlorogenic acids detected in the integral and decaffeinated coffee beverages

Coffee drink	Bioactive compounds			Total CGA (mg/mL)
	Caffeine (mg/mL)	Total phenols (mg gallic acid eq/mL)	Total	
Integral coffee	0,76±0,01 <sup>A</sup>	6,55±0,040 <sup>A</sup>	0,582±0,007 <sup>A</sup>	
Decaffeinated coffee	0,05±0,01 <sup>B</sup>	6,89±0,020 <sup>B</sup>	0,748±0,005 <sup>B</sup>	

The results represent the mean ± standard deviation (n=5). Different capital letters within each column indicate significance levels: P<0.05. CGA chlorogenic acids.

However, hyperlipidemia was induced in animals by the administration of Triton WR-1339, which is a nonionic detergent capable of inhibiting lipoprotein lipase and producing acute hyperlipidemia [19]. This animal model is often used for several objectives, particularly for screening natural or chemical hypolipidemic compounds [20]. Our results thus suggest that the intake of coffee beverages, either decaffeinated or integral, may not be effective in improving the lipid profile when associated with the reduced catabolism of triglyceride-rich lipoproteins.

**Table 2.** Lipid profile determined in the serum of animals

Lipid profile	Groups					
	C	CI	DC	H	HI	HD
CT (mg/dl)	66.6±9.9 <sup>A</sup>	68.8±12.2 <sup>A</sup>	75.98±6.0 <sup>A</sup>	171.8±12.0 <sup>B</sup>	162.1±10.0 <sup>B</sup>	154.3±15.1 <sup>B</sup>
HDL-C (mg/dl)	25.1±4.0 <sup>A</sup>	26.0±5.0 <sup>A</sup>	29.0±2.6 <sup>A</sup>	54.3±14.4 <sup>B</sup>	74.1±18.0 <sup>B</sup>	65.0±15.6 <sup>B</sup>
TG (mg/dl)	62.0±15.7 <sup>A</sup>	60.3±16.7 <sup>A</sup>	69.8±17.8 <sup>A</sup>	1.946.5± 412.6 <sup>B</sup>	1.339.5± 391.9 <sup>B</sup>	1.547.5± 212.3 <sup>B</sup>

The results represent the mean ± standard deviation of 5 determinations per treatment. Different capital letters in the same row indicate significance at  $P < 0.05$

C controls, CI animals treated with integral coffee, DC animals treated with decaffeinated coffee, H animals treated with TritonWR 1339, HI animals treated with Triton WR 1339 and integral coffee, HD animals treated with Triton WR 1339 and decaffeinated coffee, TC total cholesterol, HDL-C HDL cholesterol, TG triglycerides

Platelet aggregation increased significantly in animals with hyperlipidemia (Table 3), suggesting that the increase in the concentration of cholesterol-rich lipoproteins may contribute to an increase in the sensitivity of platelets to the agonist adenosine diphosphate [4].

Data from literature have shown that certain phenolic compounds present in food and beverages may reduce platelet aggregation regardless of their effects on the lipid profile [21, 22]. Polagruto et al. [21] demonstrated a decrease in the platelet reactivity of male smokers after the acute consumption of a grape-seed extract that is rich in flavanol. Natella et al. [22] observed that drinking coffee decreased platelet aggregation and induced a significant increase in the phenolic acid concentration in human platelets. However, our results showed that treating animals with integral and decaffeinated coffee drinks did not induce significant changes in the platelet aggregation of the studied rats regardless of treatment group (Table 3). This disparity could be attributed to the differences in the contents, profiles and bioavailability of the polyphenols present in the analyzed foods, beverages or extracts [23].

**Table 3.** Hemostatic and hematological parameters of the rats in different treatment groups

Parameter	Groups					
	C	CI	DC	H	HI	HD
Hem (X10 <sup>12</sup> /L)	8.03±0.09	7.99±0.29	8.14±0.20	8.02±0.14	8.19±0.46	8.10±0.21
Hb (g/dL)	15.18±0.31	13.84±1.57	14.72±0.46	14.62±0.37	14.68±0.76	14.62±0.55
Ht (%)	45.70±3.5	44.50±1.28	46.20±1.27	47.20±3.76	45.44±1.45	44.02±1.62
MCV (fL)	58.08±4.38	56.32±0.50	55.16±1.40	55.54±0.67	53.62±0.87	54.24±1.56
MCH (pg)	18.66±0.47	16.94±3.33	17.98±0.69	18.34±0.43	17.72±0.41	18.04±0.55
MCHC (%)	31.34±3.58	30.80±3.28	32.60±0.38	32.34±0.86	33.30±0.18	32.46±1.94
Leuk (X10 <sup>9</sup> /L)	4.74±1.08	5.98±1.30	6.26±0.79	8.80±2.88	7.12±1.13	9.94±2.69
Plat (X10 <sup>9</sup> /L)	749.20±100.81	888.40±120.32	986.60±59.68	872.20±134.95	1016.80±109.60	973.80±324.52
PA (%)	61.57±7.11	62.3±10.33	61.6±16.5	86.6±3.64	77.6±10.33	71.85±11.52
APTT (min)	29.58±0.97	34.20±3.45	30.70±2.3	34.48±0.92	29.98±3.6	33.42±4.41
PT (min)	7.28±0.27	7.76±0.66	7.14±0.53	7.08±0.20	6.92±0.19	7.06±1.11

The results represent the mean ± standard deviation for five determinations per treatment

C controls, CI animals treated with whole coffee, DC animals treated with decaffeinated coffee, H animals treated with Triton WR 1339, HI animals treated with Triton WR 1339 and whole coffee, HD animals treated with Triton WR 1339 and decaffeinated coffee, Hem red blood cells, Hb hemoglobin, Ht hematocrit, MCV mean corpuscular volume, MCH mean cell hemoglobin, MCHC mean cell hemoglobin concentration, Leuk leukocytes, Plat platelets, APTT activated partial thromboplastin time, PT prothrombin time, PA platelet aggregation

Although the role of platelets in blood hemostasis is undoubted, it is known that platelet aggregation is only one of the parameters used to evaluate primary hemostasis [24]. PT and APTT were determined to evaluate the effects of coffee intake on secondary hemostasis in hyperlipidemic rats. It was observed that neither hyperlipidemia nor treating animals with different coffee beverages was able to change the activity of either extrinsic (factor VII) or intrinsic factors (factors VIII, IX, XI, and XII) of coagulation (Table 3).

It is known that phenolic compounds can bind to Fe (II), thus forming complexes that can interfere with iron absorption in the gastrointestinal tract, which could lead to iron deficiency anemia [25, 26]. However, the ingestion of integral and decaffeinated coffee drinks did not affect the hematological parameters of the rats of the different groups (Table 3), suggesting that coffee consumption is not capable of inducing changes in the hemoglobin levels of rats with a balanced diet.

A limitation of this study could be the fact that the obtained results cannot necessarily be extrapolated to other experimental models, e.g., humans. Our research group will therefore perform further studies. Conversely, we emphasize some of the strengths of this study. The coffee drinks were prepared with the same variety and cultivar of coffee according to the tradition of the Brazilian population. Although there are some reports on the effects of coffee drinking on hemostatic and hematological parameters [16, 22], information related to the effects of the decaffeination of coffee on these parameters is scarce in the scientific literature. Moreover, many of these studies were performed in vitro and were simplified to be extrapolated to the body. Thus, the results of this study are relevant to the safety of coffee consumption. Such safety is important because coffee is a beverage that is widely consumed by different populations around the world and because approximately 10 % of coffee drinkers consume decaffeinated coffee [27].

#### **4. CONCLUSIONS**

The decaffeination process brought about chemical changes in the filtered coffee beverage, leading to a relative increase in total phenols and chlorogenic acids. Regardless of the decaffeination process and the contents of the analyzed bioactive compounds, the intake of coffee drinks did not affect the lipid profile, the platelet aggregation or the PT and APTT in normal and hyperlipidemic rats.



## **5. ABBREVIATIONS**

CAD: Coronary artery disease; CGA: Chlorogenic acids; C: Control animals; CI: Animals treated with integral coffee; DC: Animals treated with decaffeinated coffee; H: Animals treated with Triton WR 1339; HI: Animals treated with Triton WR 1339 and integral coffee; HD: Animals treated with Triton WR 1339 and decaffeinated coffee; PT: Prothrombin time; APTT: Activated partial thromboplastin time; HDL: High density lipoprotein; SISVAR: System for analysis of variance; PA: Aggregation platelet.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the FAPEMIG and CNPq.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

## REFERENCES

1. Esquivel P, Jiménez VM (2012) Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res Int* 46:488–495
2. Riksen NP, Rongen GA, Smits P (2009) Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: implications for coronary heart disease. *Pharmacol Ther* 121:185–191
3. Kathiresan S, Srivastava D (2012) Genetics of human cardiovascular disease. *Cell* 148:1242–1257
4. Colas R, Sassolas A, Guichardant M, Cugnet-Anceau C, Moret M, Moulin P, Calzada LC (2011) LDL from obese patients with the metabolic syndrome show increased lipid peroxidation and activate platelets. *Diabetologia* 54:2931–2940
5. Andersen LF, Jacobs DR Jr, Carlsen MH, Blomhoff R (2006) Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 83:1039–1046
6. Toci A, Farah A, Trugo LC (2006) Effect of decaffeination using dichloromethane on the chemical composition of arabica and robusta raw and roasted coffees. *Quim Nova* 29(5):965–971
7. Ramalakshmi K, Raghavan B (1999) Caffeine in coffee its removal. Why and how? *Crit Rev Food Sci Nutr* 39(5):441–456
8. Duarte SMS, Abreu CMP, Menezes HC, Santos MR, Gouvêa CMCP (2005) Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciência Tecnol Aliment* 25:387–393
9. Lima AR, Pereira RGFA, Abrahão SA, Duarte SMS, Paula FBA (2010) Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. *Quím Nova* 33(1):20–24

10. Mathur KS, Singhal SS, Sharma RD (1964) Effect of bengal gram on experimentally induced high levels of cholesterol in tissues and serum in albino rats. *J Nutr* 84(8):201–204
11. Baldissera-Jr L, Monteiro PF, Mello GC, Morganti RP, Antunes E (2010) Platelet adhesion and intracellular calcium levels in antigenchallenged rats. *Pulmonary Pharmacol Therapeut* 23:327–333
12. Walker HK, Hall WD, Hurst JW (1990) *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Butterworths, Boston
13. Burtis CA, Ashwood E (2008) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company, Philadelphia
14. Nogueira M, Trugo LC (2003) Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Ciênc Tecnol Aliment* 23(2):296–299
15. Choi EY, Parki SY, Cho YO (2011) Freeze-dried instant coffee can promote the activities of antioxidant enzymes and induce weight loss but also aggravate the plasma cholesterol profile in rats. *Nutrition* 27:1202–1205
16. Duarte SMS, Abreu CMP, Menezes HC, Paula FBA, Pereira RGFA, Gouvêa CMCP (2009) Efeito da bebida de café descascado sobre a atividade antioxidante, os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos. *Ciênc Tecnol Aliment* 29(4):703–708
17. Carvalho DC, Brigagão MRPL, Santos MH, Paula FBA, Paiva AG, Azevedo L (2011) Organic and conventional *Coffea arabica* L.: a comparative study of the chemical composition and physiological, biochemical and toxicological effects in Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr* 66:114–121
18. Lima FA, Sant’Ana AEG, Ataíde TR, Omena CMB, Menezes MES, Vasconcelos SML (2010) Coffee and human health: a focus on the substances of the beverage related to cardiovascular disease. *Rev Nutr* 23(6):1063–1073

19. Sato K, Akiba Y, Kimura S, Horiguchi M (1995) Species differences between chicks and rats in inhibition of lipoprotein hydrolysis by Triton WR-1339. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 112(3):315–319
20. Harnafi H, Caid HS, Bouanani NH (2008) Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Food Chem* 108:205–212
21. Polagruto JA, Gross HB, Kamangar F, Kosuna K, Sun B, Fujii H, Keen CL, Hackman RM (2007) Platelet reactivity in male smokers following the acute consumption of a flavanol-rich grapeseed extract. *J Med Food* 10:725–730
22. Natella F, Nardini M, Belelli F, Pignatelli P, Di Santo S, Ghiselli A, Violi F, Scaccini C (2008) Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *Brit J Nutr* 100:1276–1282
23. Paredes-López O, Cervantes-Ceja ML, Vigna-Pérez M, Hernández- Pérez T (2010) Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life—A review. *Plant Foods Hum Nutr* 65:299–308
24. Bhagavan NV, Ha CE (2011) *Essentials of Medical Biochemistry with Clinical Cases*, 1st edn. Elsevier, Maryland Heights
25. Yun S, Zhang T, Li M, Chen B, Zhao G (2011) Proanthocyanidins inhibit iron absorption from soybean (*Glycine max*) seed ferritin in rats with iron deficiency anemia. *Plant Foods Hum Nutr* 66:212–217
26. Mennen LI, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A (2005) Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr* 81(1):326S–329S
27. Associação Brasileira da Indústria de Café (2012) *Curiosidades*. <http://www.abic.com.br>. Accessed 12 January 2012