

# DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E NÍVEIS DE MINERAIS SANGUÍNEOS EM RATOS APÓS INGESTÃO DIÁRIA DE CAFÉ E REFRIGERANTES À BASE DE COLA E GUARANÁ.

## AUTORES

**Amaro Ilídio Vespasiano SILVA**

Docente da PUC-MG

**Francisco HAITER-NETO**

Docente da FOP-UNICAMP

**Mário Jefferson Quirino LOUZADA**

Docente da FOA-UNESP

**Plauto Christopher Aranha WATANABE**

Docente da FORP-USP

**Maria Beatriz Carrazzone Cal ALONSO**

Docente do curso de Tecnologia em Radiologia da UNILAGO

## RESUMO

O objetivo neste estudo foi determinar os efeitos da ingestão diária de café e refrigerantes à base de cola e guaraná na densidade mineral óssea (DMO) e nos níveis sanguíneos de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) em ratos machos e fêmeas. Os ratos Wistar de sessenta dias de idade foram divididos em quatro grupos de acordo com o líquido testado: grupo controle (água), grupo cola, grupo guaraná e grupo café. Após 48 dias, todos os animais foram sacrificados, o sangue foi coletado para análises bioquímicas e os fêmures dissecados e posteriormente submetidos à avaliação da DMO por meio da absorciometria de Raios X de energia dupla. Foi observado que todos os animais ganharam peso durante a experimento. O líquido que teve maior consumo foi a cola enquanto o de menor consumo foi o café. Em relação às medidas de DMO, alterações estatisticamente significantes foram encontradas apenas nas fêmeas do grupo do café. Em relação à bioquímica do sangue, os machos apresentaram os níveis mais elevados de Ca sérico entre os grupos. Enquanto os níveis de P apresentaram-se semelhantes entre os grupos para as fêmeas, os machos do grupo do guaraná apresentaram níveis significativamente mais baixos de P. A ingestão de café produziu um aumento significativo nos níveis de Mg independentemente do sexo. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a ingestão diária de café pode levar à diminuição da DMO em fêmeas e que o consumo habitual de café e de refrigerantes à base de cola e guaraná podem induzir mudanças nos níveis de minerais sanguíneos essencialmente relacionados ao metabolismo ósseo.

## PALAVRAS - CHAVE

Densidade mineral óssea, metabolismo ósseo, fraturas, cafeína, refrigerantes

Os ossos são estruturas vascularizadas e inervadas altamente sensíveis às alterações ambientais e que apresentam uma capacidade de regeneração formidável. Como um tecido dinâmico, reorganiza-se constantemente por ciclos de reabsorção e formação - um processo conhecido como remodelação óssea (1-4). O processo de remodelação óssea garante a substituição do osso antigo ou danificado, permitindo a sua adaptação às forças mecânicas por exemplo (5).

A matriz óssea inorgânica, responsável pela dureza e força do tecido, é composta principalmente de fosfatos de cálcio e representa aproximadamente dois terços do peso total do esqueleto. O esqueleto é um reservatório vivo de cálcio (Ca) e está diretamente envolvido com a homeostase do mineral no organismo. O Ca é um nutriente essencial para a boa saúde óssea, sendo extremamente importante para a prevenção e tratamento da osteoporose (7). Em ação conjunta o magnésio (Mg), sua presença e concentração no organismo torna-se essencial para a homeostase de Ca e fósforo (P), possibilitando a fixação de cálcio no esqueleto e ajudando na manutenção da força óssea (3,4). A ingestão de níveis adequados desses minerais através de dieta rotineira ou por meio de suplementos dietéticos é necessária para aumentar a densidade mineral óssea em indivíduos mais jovens, para que a perda óssea seja minimizada durante o avanço da idade (8).

É sabido que uma boa nutrição é essencial para a manutenção do metabolismo ósseo normal (9-11) e foi relatado já que várias substâncias alimentares podem acelerar ou diminuir a remodelação óssea (12,13). A cafeína, por exemplo, leva à perda de Ca e promove alterações no desenvolvimento ósseo normal e ainda tem sido discutido que o consumo excessivo de refrigerantes à base de cola (que geralmente contém cafeína) podem reduzir a DMO e conseqüentemente levar à disfunção renal (14-16).

Embora os efeitos da cafeína sobre o metabolismo ósseo sejam ainda controversos, muitos estudos demonstraram uma associação entre o consumo de cafeína e reduções significativas na DMO, juntamente com diminuição da absorção de Ca, com conseqüente aumento do risco de fratura e também aumento da prevalência de doenças periodontais (14-18). Tem sido relatado que a cafeína pode afetar a expressão do receptor de vitamina D, atrapalhando as atividades osteoblásticas e ainda, uma associação de seu consumo excessivo com osteoporose foram sugeridos (19). Ainda assim, os efeitos reais dos refrigerantes à base de cola e do café sobre o metabolismo ósseo e sua relação com os níveis séricos de Ca, P e Mg continuam sendo uma questão de intenso debate (4,14,18,20). Nesse contexto, o guaraná, também se destaca como um componente importante da dieta, uma vez que possui cafeína na sua composição e que no seu caso, é conhecida como guaraná. Mesmo ainda não havendo relatos na literatura a respeito da relação do guaraná com possíveis efeitos prejudiciais aos ossos, aventamos a hipótese de que ele também pode interferir no metabolismo ósseo e dos minerais essenciais, assim como ocorre com o café e refrigerantes à base de cola. Soma-se ainda ao fato de ser uma bebida tipicamente brasileira e popular, amplamente consumida no Brasil por indivíduos de todas as faixas etárias.

Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos da ingestão diária de café, e refrigerantes à base de cola e guaraná na DMO e nos níveis sanguíneos de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) em ratos machos e fêmeas.

## **2. Metodologia**

### **2.1 ANIMAIS E DIETA**

Foram utilizados 80 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, com peso corporal variando de 250 a 300 g) neste estudo. Os ratos foram fornecidos e alojados na instalação institucional de cuidados com os animais (temperatura, 22-25 ° C, ciclo leve, 12 horas, umidade relativa 30-60%). As diretrizes institucionais para o bem-estar dos animais foram seguidas e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê institucional de Cuidados e Uso Animal (Protocolo nº 2458-1 / 2011, FOP / UNICAMP, Brasil). Os animais foram distribuídos aleatoriamente para um dos quatro grupos (n = 20 cada grupo, 10 fêmeas e 10 machos) da seguinte forma:

- Grupo Controle, alimentado com dieta padrão e água ad libitum;
- Grupo Cola, alimentado com dieta padrão, água e refrigerante à base de cola (Coca-Cola <sup>TM</sup>, The Coca-Cola Company, Atlanta, GA) ad libitum;
- Grupo Guaraná, alimentado com dieta padrão, água e refrigerante à base de guaraná (Guaraná Antartica®, AMBEV, PLC, São Paulo, SP, Brasil) ad libitum;
- Grupo Café: alimentado com dieta padrão, água e café não adoçado (Utam Tradicional, Utam PLC, Ribeirão Preto, SP, Brasil) ad libitum. O café foi preparado na proporção de seis colheres de sopa de pó por dois litros de água;

O estudo teve a duração de 48 dias, com os animais pesados semanalmente. Nos grupos de experiências (cola, guaraná e café), os animais tiveram a opção de consumir a água ou o líquido teste. Em cada uma das gaiolas da experiência, os recipientes com água e o respectivo líquido de teste foram colocados em cantos opostos e alternados todas as manhãs para evitar a memória da localização do objeto. O volume do líquido consumido (água para todos os grupos e teste de líquido para grupos de experiências) foi registrado diariamente. Todos os líquidos foram colocados em recipientes de 500 mL.

Todos os animais foram pesados antes do sacrifício. Após a decapitação, o sangue foi coletado imediatamente. O fêmur esquerdo foi removido, limpo de tecidos moles e fixado individualmente com 10% de formalina tamponada (Indalabor, Minas Gerais, Brasil).

## **2.2 BIOQUÍMICA DO SANGUE**

Os níveis séricos de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) foram medidos através de um método colorimétrico utilizando um kit comercial (Labtest Diagnostic Systems Ltd., Belo Horizonte, MG, Brasil), conforme relatado anteriormente (15).

## **2.3 DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO)**

A DMO femoral foi avaliada através de absorciometria de Raios X de dupla energia ou DXA scan (DPX-Alpha Lunar®, fornecido gentilmente pelo Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal - FOA / UNESP). As imagens foram adquiridas com o fêmur imerso em água deionizada a uma profundidade de 2 cm para simular os tecidos moles. Após a varredura, as epífises femorais proximais foram selecionadas para o cálculo da DMO (g / cm), área (cm<sup>2</sup>) e conteúdo mineral ósseo (CMO) (g) demonstrado nas Figuras 1 e 2.

## **2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados numéricos foram analisados estatisticamente com SPSS para Windows versão 11.0 (Chicago, IL, EUA). Teste ANOVA multifatorial e o teste de Tukey foram utilizados para comparar os grupos

com  $p < 0,05$  considerado como estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como média e Desvio Padrão  $\pm$  (DP).

### 3.RESULTADOS

Nos três grupos experimentais (dos líquidos testados), os animais de ambos os sexos apresentaram-se visivelmente mais agitados durante todo o experimento quando comparados aos animais dos grupos controle. Todos os animais ganharam peso e o aumento variou de acordo com o líquido testado (Tabela 1). Os animais no grupo do café ganharam mais peso (39,52% para machos e 27,81% para fêmeas) em comparação com outros grupos.

Quanto ao consumo dos líquidos, os machos ingeriram uma quantidade significativamente maior do líquido teste quando comparado às fêmeas no grupo da cola, enquanto as fêmeas do grupo controle consumiram a maior quantidade de água. Para os grupos do café e guaraná, o consumo foi semelhante para ambos os sexos (Tabela 2).

As fêmeas apresentaram os menores valores da DMO quando comparadas aos machos em todos os grupos experimentais. Apenas as fêmeas do grupo do café apresentaram uma redução significativa da DMO em comparação com o grupo controle (Tabela 3).

Os níveis de Ca tenderam a ser mais baixos nos machos, mas não atingiram significância estatística em nenhum grupo (Tabela 4). Os níveis de P foram mais baixos nos machos do grupo do guaraná em comparação com todas as combinações experimentais, enquanto os valores das fêmeas foram semelhantes em todos os grupos (Tabela 5). Não houve diferença estatística nos níveis de Mg em ambos os sexos, mas mesmo sem a relevância estatística, níveis mais elevados de Mg foram observados no grupo do café em comparação com os grupos de refrigerantes à base de cola e grupo controle (Tabela 6).

### 4.DISSCUSSÃO

O consumo excessivo de café tem sido associado a um aumento significativo do risco de fraturas ósseas, bem como desenvolvimento de osteoporose, doença periodontal, perda óssea em torno de implantes dentários e até atrasos no processo de remodelação óssea (18,21,22). As evidências apontam para a cafeína como a substância responsável por estes efeitos deletérios (23). Tem sido relatado que a ingestão da cafeína é potencialmente prejudicial para a fisiologia do metabolismo ósseo, como demonstrado in vivo (com o aumento da excreção urinária de cálcio) e in vitro (inibindo a proliferação de células semelhantes a osteoblastos) (21). Ainda assim, os efeitos da ingestão do café no metabolismo ósseo permanecem controversos (4,15,16,24).

Outra questão importante trata dos efeitos da ingestão excessiva de refrigerantes à base de cola no metabolismo ósseo e no metabolismo do cálcio (14,20,25). Curiosamente, a literatura possui uma lacuna de estudos que avaliem mudanças ósseas consequentes ao consumo excessivo de refrigerantes à base de guaraná, que contém cafeína, chamada de guaráina, na sua composição. Considerando a tendência crescente e mundial de aumento do consumo de café e bebidas industrializadas por crianças, adolescentes e adultos, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações na DMO, bem como nos níveis séricos de Ca, P e Mg em ratos que foram submetidos à dieta diária de café e refrigerantes à base de cola e guaraná.

O consumo diário e excessivo de café / cafeína foi relatado como a causa de efeitos adversos graves em ratos machos, ou seja, redução da DMO, redução do volume ósseo e atraso na reparação óssea (15). Os valores de DMO encontrados no presente estudo coincidem com os descritos anteriormente (15) além disso, parece que existe algum grau de dimorfismo sexual, pois nossos resultados mostraram que a ingestão de café resultou em diminuições significativas dos valores de DMO em ratas - mas isso não foi observado nos machos. Da mesma forma, as diminuições na DMO foram identificadas em ratos e ratas que receberam bebidas com cola (20,26). Novamente, nossos resultados demonstraram que o consumo de refrigerante à base de cola resultou em menores valores de DMO, independentemente do sexo - mas no nosso estudo, curiosamente o declínio foi estatisticamente significativo em ratas apenas.

Foram estabelecidos valores de DMO de referência para *rattus norvegicus albinus* masculino e feminino de diferentes idades e, ao comparar os achados, verificou-se que ratos adultos jovens (ou seja, dois meses de idade) apresentam composições esqueléticas diferentes em gênero, com fêmeas apresentando os menores valores de DMO (27). Enquanto também empregamos animais jovens (adultos saudáveis) neste estudo, os valores de DMO encontrados para os grupos controles de machos e fêmeas foram semelhantes aos apresentados pela literatura. A DMO diminuiu nas fêmeas, em oposição aos machos, apenas quando os líquidos de teste foram consumidos (café, cola e guaraná), sugerindo um efeito nocivo do café e dos refrigerantes à base de cola e guaraná na DMO. Nossos resultados corroboram outros relatos de diminuição da DMO após o consumo de café e de refrigerante à base de cola (15,16,20), enquanto ainda apoiamos outro estudo que não encontrou alterações de DMO em camundongos quando o café foi administrado (24).

Nossos resultados sugerem que a cafeína presente no café e nos refrigerantes pode ser um fator responsável pela redução da DMO nas fêmeas. Apesar de a DMO diminuir nos machos em valores absolutos, não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes; ressaltamos que, atendendo às baixas concentrações utilizadas, qualquer alteração, por menor que seja, pode ser clinicamente significativa (4,16). Acreditamos que períodos mais longos de consumo dos líquidos de teste poderiam interferir nos resultados, reforçando assim a necessidade de mais estudos sobre o assunto em questão.

As mudanças nos níveis de Ca podem reduzir o estresse e o módulo de elasticidade dos ossos (28,29). De fato, os animais tratados com café apresentaram níveis mais baixos de cálcio sérico e propriedades mecânicas femorais mais pobres, reforçando a relação entre o consumo de café e as alterações do tecido ósseo (29). Os níveis aumentados de Ca urinário e plasmático foram acompanhados de diminuição de DMO em ratos tratados com café em estudo prévio, implicando uma relação inversa entre DMO e níveis de Ca (15). No presente estudo, os níveis de Ca apresentaram-se com valores mais elevados para os machos e sem diferenças em todos os grupos dos líquidos testados. Consequentemente, as diferenças de DMO não foram encontradas nos ratos machos. Nós postulamos dessa maneira que, uma amostra maior (maior número de animais) seria capaz de produzir alterações estatisticamente significativas na DMO para eles.

Em se tratando do mineral Fósforo (P), sabemos que está presente em altas concentrações nos ossos e dentes e é essencial para a rigidez do tecido ósseo. A literatura demonstra que níveis séricos de P mais elevados já foram observados em ratos machos que consumiram bebida à base de cola, e ainda à presença de danos renais histologicamente evidentes (20) nesses animais. Sugeriu-se que as bebidas com cafeína e cola causam disfunção renal, o que dificulta a absorção de Ca e, em última instância, levando à redução da DMO. No presente estudo, diferenças significativas nos níveis de P foram encontradas apenas no grupo do guaraná. Nas fêmeas, o guaraná reduziu os níveis séricos de P, sugerindo assim, que o guaraná pode afetar o metabolismo ósseo, quer pelo aumento da excreção de P, quer pela diminuição da absorção do mesmo. Se

assim for, essa visão seria de grande valor para a fisiologia humana, pois os altos níveis de P esgotariam as reservas de Ca e conseqüentemente enfraqueceriam o esqueleto.

Já para o mineral Magnésio (Mg), sua presença é de extrema importância para a absorção de Ca e P, pois é ele quem permite a ligação do Ca ao osso. Portanto, é crucial para a manutenção da integridade óssea. No presente estudo, não foi possível observar diferenças de gênero nos níveis séricos de Mg como outros estudos já relataram previamente (20). Esses autores observaram aumento dos níveis séricos de Mg e explicaram o achado como consequência da disfunção renal e aumento da reabsorção óssea. Contudo, no nosso estudo, foi observado que o grupo de café apresentou os maiores níveis séricos de Mg.

Em relação ao consumo de água, observou-se que diminuiu nos três grupos experimentais, independentemente do gênero. A água foi fornecida para todos os grupos com a finalidade de simular os padrões de consumo humano. O consumo de água nos grupos do café, cola e guaraná foi estatisticamente inferior ao dos respectivos líquidos de teste, ratificando uma preferência pelas bebidas testadas, fato este que também já foi confirmado por outros estudos prévios (20,25). O açúcar contido em refrigerantes pode explicar o maior consumo em comparação com o café, que escolhemos deixar sem açúcar.

No geral, os machos apresentaram maior peso corporal médio e não houve variações significativas entre os grupos de animais do mesmo gênero. Este achado indica que os líquidos do experimento não afetam o peso corporal e estão de acordo com estudos prévios (24). Outros, no entanto, descobriram que os refrigerantes de cola administrados aos animais machos levaram ao ganho de peso, enquanto nas fêmeas isso levou a perda de peso (20). A variação do peso entre gêneros pode ser explicada por fatores fisiológicos. Enquanto os machos tendem a ganhar peso na idade adulta, as fêmeas ganham peso mais tardiamente, devido a fatores hormonais. No início do estudo, os animais tinham 60 dias de idade (adultos jovens) e, portanto, aumentaram a massa corporal ao longo do experimento e portanto, conseguimos explicar esse ganho de peso como sendo um fator fisiológico (27).

Embora não tenha sido relacionado ao propósito deste estudo, observou-se que os machos e fêmeas nos grupos de líquidos teste eram mais ativos e mais visivelmente estressados quando comparados aos grupos controle. Isso pode ser explicado devido às alterações endócrinas que ocorrem em resposta à cafeína presente no café, bem como nas bebidas à base de cola e guaraná (30). Estudo prévio encontrou aumentado dos níveis séricos de estradiol e testosterona secundária ao consumo de cafeína (31). Para esses autores, a adenosina é um depressor do Sistema nervoso central (SNC), enquanto que a ligação da cafeína aos receptores de adenosina estimula o SNC.

O presente estudo traz resultados interessantes e que contribuem dessa forma para a compreensão dos efeitos dos líquidos testados, café e refrigerantes à base de cola e guaraná no metabolismo ósseo representado por variações nos valores de DMO e também alterações nos níveis séricos de minerais essenciais nesse processo. Ressaltamos que o presente estudo possui limitações que devem ser levadas em consideração, tais como o número de animais do experimento e o tempo de administração dos líquidos testados, assim como outros parâmetros bioquímicos importantes também deveriam ser avaliados, tais como estradiol, testosterona e níveis de hormônio paratireóide. Ressaltamos ainda que os exames histopatológicos renais, a histomorfometria óssea, bem como os marcadores séricos e rotativos urinários também são de interesse nos estudos sobre metabolismo ósseo e que podem nos fornecer dados importantes.

## **5.CONCLUSÃO**

O presente estudo acrescenta-se ao conjunto de evidências que demonstram que o consumo de café reduz a DMO em ratas, o que poderia aumentar o risco de fraturas ósseas nas mesmas. Além disso, nossas descobertas sobre a bioquímica no sangue nos permitem concluir que mudanças nos minerais relacionados ao metabolismo ósseo podem ocorrer e, portanto, devem ser consideradas se houver história de excesso de café e de refrigerantes à base de cola e guaraná.

## REFERÊNCIAS

White SC, Rudolph DJ. **Alterations of the trabecular pattern of the jaws in patients with osteoporosis.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;88:628-35.

Lu PZ, Lai CY, Chan WH. **Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts.** Int J Mol Sci. 2008;9:698-718.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. **Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.** J Bone Miner Res. 1987;2:595-610.

Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Sun SC, Chen SC. **Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis.** J Orthop Surg Res. 2006;1:7.

Raisz LG. **Physiology and pathophysiology of bone remodeling.** Clin Chem. 1999;45:1353-8.

Fishbein L. **Multiple sources of dietary calcium-some aspects of its essentiality.** Regul Toxicol Pharmacol. 2004;39:67-80.

Delmas PD. **Treatment of postmenopausal osteoporosis.** Lancet. 2002;359:2018-26.

Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC. **Role of Ca(2+) and vitamin D in the prevention and treatment of osteoporosis.** Pharmacol Ther. 2002;93:37-49.

Heaney RP. **Bone health.** Am J Clin Nutr. 2007;85:300S-3S.

Prentice A, Schoenmakers I, Laskey MA, de Bono S, Ginty F, Goldberg GR. **Nutrition and bone growth and development.** Proc Nutr Soc. 2006;65:348-60.

Sarazin M, Alexandre C, Thomas T. **Influence on bone metabolism of dietary trace elements, protein, fat, carbohydrates, and vitamins.** Joint Bone Spine. 2000;67:408-18.

Devlin H, Sloan P. **Early bone healing events in the human extraction socket.** Int J Oral Maxillofac Surg. 2002;31:641-5.

Johnell O, Kanis JA. **An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures.** Osteoporos Int. 2006;17:1726-33.

- Hallstrom H, Byberg L, Glynn A, Lemming EW, Wolk A, **Michaelsson K. Long-term coffee consumption in relation to fracture risk and bone mineral density in women.** Am J Epidemiol. 2013;178:898-909.
- Lacerda SA, Matuoka RI, Macedo RM, Petenusci SO, **Campos AA, Brentegani LG. Bone quality associated with daily intake of coffee: a biochemical, radiographic and histometric study.** Braz Dent J. 2010;21:199-204.
- Santos MP, Pagani JCM, Silva TD, Garcia JAD, Romão MOC, Fernandes GJM, et al. **Effects of coffee (Coffea arabica) consumption on the femoral morphology and biomechanics in rats.** J Morphol Sci. 2014;31:42-7.
- Massey LK, Whiting SJ. **Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone.** J Nutr. 1993;123:1611-4.
- Hallstrom H, Wolk A, Glynn A, Michaelsson K. **Coffee, tea and caffeine consumption in relation to osteoporotic fracture risk in a cohort of Swedish women.** Osteoporos Int. 2006;17:1055-64.
- Rapuri PB, Gallagher JC, Nawaz Z. **Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)2D3 stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells.** J Steroid Biochem Mol Biol. 2007;103:368-71.
- Ogur R, Uysal B, Ogur T, Yaman H, Oztas E, Ozdemir A, et al. **Evaluation of the effect of cola drinks on bone mineral density and associated factors.** Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2007;100:334-8.
- Kamagata-Kiyoura Y, Ohta M, Cheuk G, Yazdani M, Saltzman MJ, Nakamoto T. **Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells (UMR106-01).** J Periodontol. 1999;70:283-8.
- Andrade AR, Sant'Ana DC, Mendes JA, Jr., Moreira M, Pires GC, Santos MP, et al. **Effects of cigarette smoke inhalation and coffee consumption on bone formation and osseous integration of hydroxyapatite implant.** Braz J Biol. 2013;73:173-7.
- Johnell O, Gullberg B, Kanis JA, Allander E, Elffors L, Dequeker J, et al. **Risk factors for hip fracture in European women: the MEDOS Study. Mediterranean Osteoporosis Study.** J Bone Miner Res. 1995;10:1802-15.
- Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, et al. **Effect of coffee consumption on bone metabolism.** Bone. 2001;28:332-6.
- Heaney RP, Rafferty K. **Carbonated beverages and urinary calcium excretion.** Am J Clin Nutr. 2001;74:343-7.
- Garcia-Contreras F, Paniagua R, Avila-Diaz M, Cabrera-Munoz L, Martinez-Muniz I, Foyo-Niembro E, et al. **Cola beverage consumption induces bone mineralization reduction in ovariectomized rats.** Arch Med Res. 2000;31:360-5.
- Apolinário-Coêlho JC. **Parâmetros biofísicos, bioquímicos e imunohistoquímicos de fêmures de Rattus norvegicus albinus em diferentes idades para padronização de valores de referência estática e dinâmica.** Araçatuba: Paulista State University; 2013.

Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Klein L. **Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone.** *J Bone Joint Surg Am.* 1975;57:956-61.

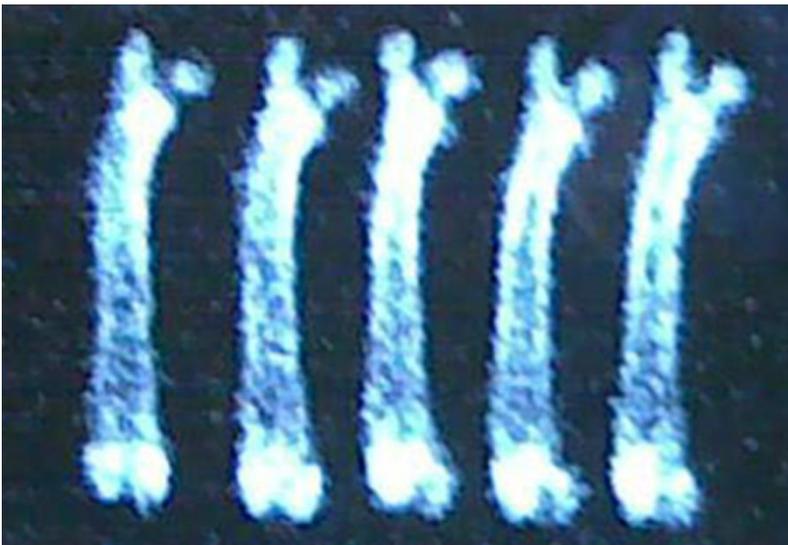
Soares EA, Nakagaki WR, Garcia JA, Camilli JA. **Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in low-density lipoprotein receptor gene knockout mice.** *J Bone Miner Metab.* 2012;30:419-25.

Conlisk AJ, Galuska DA. **Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women?** *Prev Med.* 2000;31:562-8.

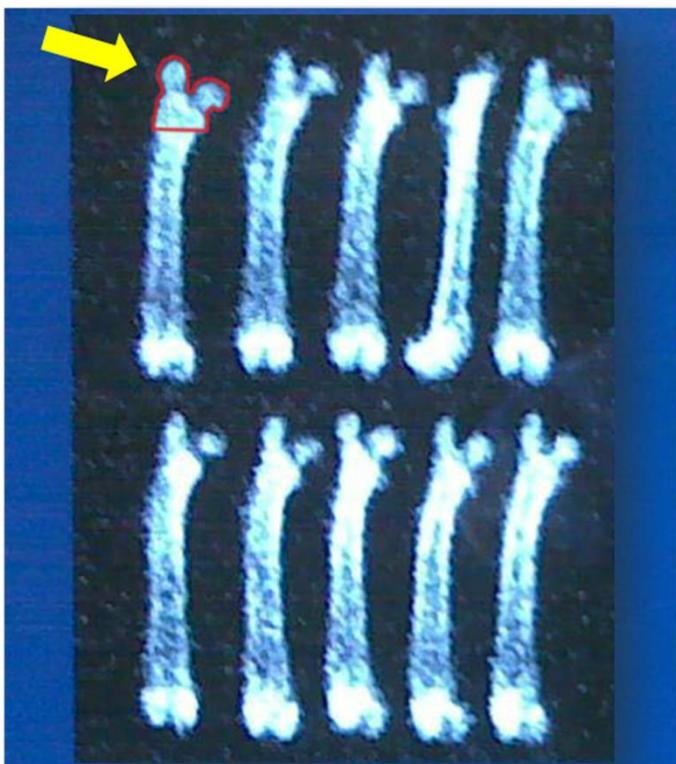
Celec P, Behuliak M. **Behavioural and endocrine effects of chronic cola intake.** *J Psychopharmacol.* 2010;24:1569-72.

## FIGURAS

Método de análise da Densidade Mineral Óssea por meio da Densitometria óssea.



**Figura 1:** Cada fêmur foi escaneado por meio da absorciometria de Raios X de energia dupla (DPX-Alpha Lunar®).



**Figura 2:** Após a varredura, as epífises femorais proximais foram selecionadas para o cálculo da densidade mineral óssea (DMO, g / cm), área (cm<sup>2</sup>) e conteúdo mineral ósseo (CMO, g) (indicado pela seta).

## TABELAS

**Tabela 1.** Ganho de peso ao final do experimento.

	Ganho de peso (%)	
	Machos	Fêmeas
Cola	39,06	23,06
Guaraná	36,45	25,90
Café	39,52	27,81
Controle	38,76	26,52

**Tabela 2.** Médias (± DP) do consumo dos líquidos.

Machos		Fêmeas	
Líquido testado	Água	Líquido testado	Água

Cola	467.68 ± 56.33 <sup>Ab</sup>	105.52 ± 53.65 <sup>Bc</sup>	441.41 ± 28.22 <sup>Bc</sup>	98.85 ± 54.69 <sup>Ac</sup>
Guaraná	453.07 ± 27.21 <sup>Ab</sup>	96.25 ± 49.29 <sup>Cd</sup>	457.29 ± 27.82 <sup>Aa</sup>	76.98 ± 52.13 <sup>Cd</sup>
Café	177.29 ± 80.49 <sup>Ad</sup>	153.13 ± 57.38 <sup>Cd</sup>	188.75 ± 137.03 <sup>Ad</sup>	138.13 ± 63.11 <sup>Cd</sup>
Controle		213.90 ± 65.16 <sup>Cd</sup>		302.50 ± 58.76 <sup>Cd</sup>

Letras diferentes (maiúsculas, horizontalmente e minúsculas na vertical) são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

**Tabela 3. Médias (± DP) da densidade mineral óssea (g/cm<sup>2</sup>).**

	Machos	Fêmeas
Cola	0,25 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>Ba</sup>
Guaraná	0,26 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>Ba</sup>
Café	0,25 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>Bb</sup>
Controle	0,25 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>Aa</sup>

Letras diferentes (maiúsculas, horizontalmente e minúsculas na vertical) são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

**Tabela 4. Médias (± DP) para os níveis de Cálcio.**

	Machos	Fêmeas
Cola	10,25 ± 0,34 <sup>Aa</sup>	10,06 ± 0,24 <sup>Ba</sup>
Guaraná	10,31 ± 0,36 <sup>Aa</sup>	10,36 ± 0,38 <sup>Ba</sup>
Café	10,56 ± 0,23 <sup>Aa</sup>	10,13 ± 0,33 <sup>Ba</sup>
Controle	10,42 ± 0,35 <sup>Aa</sup>	9,92 ± 0,59 <sup>Ba</sup>

Letras diferentes (maiúsculas, horizontalmente e minúsculas na vertical) são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

**Tabela 5. Médias (± DP) para os níveis de Fósforo (mg/dl).**

	Machos	Fêmeas

Cola	4.42 ± 1.19 <sup>Aa</sup>	4.04 ± 0.52 <sup>Aa</sup>
Guaraná	2.09 ± 0.88 <sup>Bc</sup>	3.66 ± 0.54 <sup>Aa</sup>
Café	3.10 ± 1.18 <sup>Abc</sup>	3.87 ± 0.74 <sup>Aa</sup>
Controle	4.28 ± 0.85 <sup>Aab</sup>	4.08 ± 0.96 <sup>Aa</sup>

Letras diferentes (maiúsculas, horizontalmente e minúsculas na vertical) são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

**Tabela 6. Médias (± DP) para os níveis de Magnésio (mg/dl).**

	Machos	Fêmeas
Cola	2,66 ± 0,58 <sup>Ab</sup>	2,22 ± 0,19 <sup>Ab</sup>
Guaraná	2,60 ± 0,52 <sup>Aab</sup>	2,69 ± 0,39 <sup>Aab</sup>
Café	2,96 ± 0,41 <sup>Aa</sup>	2,82 ± 0,34 <sup>Aa</sup>
Controle	2,37 ± 0,26 <sup>Ab</sup>	2,21 ± 0,56 <sup>Ab</sup>

Letras diferentes (maiúsculas, horizontalmente e minúsculas na vertical) são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).