



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

DEBORA DUARTE MOREIRA

**AVALIAÇÃO ÓSSEA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS
SUBMETIDAS À DIETA DE CAFÉ E REFRIGERANTES ASSOCIADA
À TRATAMENTO COM CÁLCIO E ALENDRONATO**

**BONE EVALUATION OF OVARIECTOMIZED RATS SUBMITTED TO
DIET WITH COFFEE AND SOFT DRINKS ASSOCIATED WITH
CALCIUM AND ALENDRONATE TREATMENT**

Piracicaba

2018

DEBORA DUARTE MOREIRA

**AVALIAÇÃO ÓSSEA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS
SUBMETIDAS À DIETA DE CAFÉ E REFRIGERANTES ASSOCIADA
À TRATAMENTO COM CÁLCIO E ALENDRONATO**

**BONE EVALUATION OF OVARIECTOMIZED RATS SUBMITTED TO
DIET WITH COFFEE AND SOFT DRINKS ASSOCIATED WITH
CALCIUM AND ALENDRONATE TREATMENT**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Radiologia Odontológica, na Área de Concentração Radiologia Odontológica

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Oral Radiology, in Oral Radiology Area.

Orientadora: Solange Maria de Almeida Boscolo

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Debora Duarte Moreira e orientada pela Profa. Dra. Solange Maria de Almeida Boscolo.

Piracicaba

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

M813a Moreira, Debora Duarte, 1986-
Avaliação óssea de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta de café e refrigerantes associada a tratamento com cálcio e alendronato / Debora Duarte Moreira. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Solange Maria de Almeida Boscolo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Densidade óssea. 2. Densitometria. 3. Café. 4. Refrigerantes. 5. Alendronato. I. Almeida, Solange Maria de, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Bone evaluation of ovariectomized rats submitted to diet with coffee and soft drinks associated with calcium and alendronate treatment

Palavras-chave em inglês:

Bone density

Densitometry

Coffee

Soft drinks

Alendronate

Área de concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Doutora em Radiologia Odontológica

Banca examinadora:

Solange Maria de Almeida Boscolo [Orientador]

Laura Ricardina Ramirez Sotelo

Maria Beatriz Carrazzone Cal Alonso

Anne Caroline Costa Oenning

Gláucia Maria Bovi Ambrosano

Data de defesa: 20-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Radiologia Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 20 de Fevereiro de 2018, considerou a candidata DEBORA DUARTE MOREIRA aprovada.

PROF^ª. DR^ª. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA BOSCOLO

PROF^ª. DR^ª. LAURA RICARDINA RAMÍREZ SOTELO

PROF^ª. DR^ª. MARIA BEATRIZ CARRAZZONE CAL ALONSO

PROF^ª. DR^ª. ANNE CAROLINE COSTA OENNING

PROF^ª. DR^ª. GLÁUCIA MARIA BOVI AMBROSANO

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais que sempre me incentivaram a nunca desistir dos meus sonhos e me apoiaram incansavelmente durante toda essa jornada.

Agradecimentos Institucionais

À **Universidade Estadual de Campinas**, na pessoa do Prof. Dr. José Tadeu Jorge (Reitor).

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, na pessoa do Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques (Diretor).

À **Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba FMV/UNESP**, na pessoa do Prof. Dr. Max José de Araújo Faria Júnior (Diretor).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela concessão da bolsa DS (Demanda Social).

Agradecimentos Especiais

A Deus,

Por iluminar, guiar meus passos e tornar tudo isso possível nunca me deixando sozinha, desprotegida ou desamparada tanto nos bons momentos como naqueles mais difíceis.

À Prof. Dra. e Orientadora Solange Maria de Almeida Boscolo,

Professora Solange, mais uma etapa chega ao fim e eu só tenho a agradecer por ter sido orientada por você. Lá em 2007, nas minhas primeiras aulas de radiologia te conheci, te admirei e me inspirei em você e no professor Frab. Anos depois tive certeza de que queria seguir carreira acadêmica e que seria em Radiologia, e ser a sua orientada foi um presente para mim! Pessoa excepcional, de um coração gigante e uma paciência maior ainda. Me apoiou em momentos muito difíceis, me dando o carinho como de uma mãe. Posso dizer que “puxou pouco minha orelha” embora eu merecesse algumas vezes, porque se nem eu aguento o meu jeito atrapalhado, imagino você - deve ter tido vontade de me matar algumas vezes -. Mas eu tentei fazer o meu melhor e senti muita confiança da senhora para comigo. Agradeço imensamente por toda a paciência, exemplo, ensinamentos, sugestões e apoio. Com certeza, sem você nada disso teria sido possível. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Glaucia Maria Bovi Ambrosano,

Agradeço por toda a sua participação na minha formação, que começou na graduação, passou pelo mestrado sob sua orientação e chegou até o doutorado com muita ajuda e muita paciência para esclarecer as minhas inúmeras dúvidas sobre estatística. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Laura Ricardina Ramírez-Sotello,

Laura, você é uma pessoa inexplicável. Tão doce, tão meiga e tão guerreira. Sempre disposta a ajudar, ensinar, contribuir e sempre com aquele sorriso no rosto. Como são boas as lembranças que tenho da nossa convivência e como fiquei feliz de poder ter você presente na minha defesa. Espero que você alcance todos os seus objetivos e tenha muito sucesso na sua vida, pois você merece muito.

À Profa. Dra. Anne Caroline Costa Oenning,

A primeira coisa que pensei de você foi que você era modelo, depois vi que embora tivesse talento para tal, não era, e que na verdade seu talento é ser extremamente inteligente, determinada, responsável, divertida e com um coração enorme. Te admiro desde o primeiro dia que te vi e tento me inspirar em você. Muito obrigada por ter sido peça fundamental durante todos os meus anos de pós-graduação. Te desejo mais e mais sucesso sempre.

À Profa. Dra. Monikelly do Carmo Chagas do Nascimento,

Se tinha uma pessoa que eu adorava conversar na época do mestrado, essa pessoa era você. Extremamente divertida e engraçada, sempre tinha alguma história para contar. Te admiro muito pela profissional e mãe que você se tornou e torço para que você tenha cada vez mais sucesso. Obrigada por fazer parte desse momento tão importante na minha vida.

Aos membros suplentes da banca de defesa, Profa. Dra. Ana Claudia Rossi, Profa. Dra. Maria Beatriz Alonso e Prof. Dr. Amaro Ilídio Vespasiano Silva,

Agradeço por terem aceito prontamente o convite para participar desse momento e contribuir com sua experiência.

Ao Prof. Dr. Yuri Nejaim,

Agradeço primeiramente pela sua contribuição direta neste trabalho com as suas sugestões no exame de qualificação, e agradeço principalmente por toda a amizade e companheirismo em todo o tempo depois que nos conhecemos. Você é um grande amigo que vou levar para sempre e que admiro demais por toda a sua perseverança, esforço, inteligência, paciência e principalmente pelo seu enorme coração. Não conheço ninguém que seja tão querido por outras pessoas como você, e não é à toa. Posso dizer com toda a certeza que você é único. Torço demais pelo seu sucesso em todos os quesitos da vida, pois você merece demais. Obrigada por tudo sempre!

Ao Prof. Dr. Matheus Lima de Oliveira,

Minha admiração por você começou também lá em 2007, quando você era aluno de mestrado e eu de graduação. Desde aquela época notei o quanto você era inteligente e talentoso quando o assunto era ensinar e essa admiração só cresceu com o tempo até que você se tornou professor da FOP/UNICAMP. Peço desculpas se em alguns momentos falei ou agi com uma informalidade incompatível com a relação professor-aluna, porém acima de tudo, eu te considero aquele amigo engraçado, divertido e que por diversas vezes já tinha me escutado falar besteiras. Mas quero que saiba que sempre te respeitei e aprendi muito com você, e sou eternamente grata por isso. Obrigada por confiar em mim e pelas considerações no exame de qualificação.

À Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite,

Agradeço pela contribuição tão importante no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo,

Posso mesmo dizer que sou uma pessoa de sorte, pois tive muitas aulas na graduação com esse magnífico professor e de quebra, convivi durante 6 anos de mestrado e doutorado com ele. Professor Frab, o senhor sem dúvida é o “*Hors Concours*” da Radiologia Odontológica, e como pessoa, não fica atrás. É de um carinho, atenção e cuidado inigualáveis. Agradeço por todas as conversas e por todo o ensinamento transmitido. E precisamos comer um bacalhau juntos, quem sabe um dia na “terrinhá”.

À Profa. Dra. Deborah Queiroz de Freitas França

Te admiro pela sua humildade, perseverança, inteligência, carinho e atenção com todos. Sempre indo atrás dos seus sonhos, tenho certeza que você será cada vez mais bem sucedida. Obrigada por todo apoio de sempre, por acreditar e confiar em mim, sempre te levarei no coração com boas lembranças.

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto

Agradeço por todo o conhecimento transmitido, por todas as broncas dadas que com certeza contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional. Admiro muito o seu trabalho e te levo como exemplo de alguém que ama a Radiologia Odontológica.

À secretária Luciane Sattolo, e aos técnicos e funcionários da clínica de Radiologia Odontológica da FOP, Waldeck Moreira, Fernando Andrade e Sarah Bacchim,

Obrigada por momentos de descontração, risadas, boas conversas e acima de tudo de muito trabalho. Sem vocês, nada funcionaria corretamente.

Aos professores Mário Jefferson Quirino Louzada, Cinthia Pereira Machado Tabchoury, Francisco Carlos Groppo e Fernanda Klein Marcondes

Por me auxiliarem em etapas do trabalho e por esclarecerem diversas dúvidas durante a sua elaboração.

Ao meu pai Manuel Moreira Baptista,

Não tenho palavras para agradecer todo incentivo, auxílio e companheirismo nessa jornada. Houveram alguns desentendimentos que tenho certeza que doeram tanto em você como em mim, mas nosso amor de pai e filha falou mais alto e você voltou a acompanhar tudo de perto sempre torcendo pelo meu sucesso e me confortando nos momentos de tristeza, desespero e agonia. Você foi muito importante em todas as etapas e essa vitória com certeza pertence não só a mim, mas a nós dois. Muito obrigada por tudo.

À minha mãe Lourdes de Fátima Duarte Machado,

Outra pessoa ímpar na minha vida que me apoiou e se preocupou muito comigo em mais essa etapa. Mesmo de longe, me escutava por horas no telefone contando as minhas angústias, sofreu junto comigo nas fases mais difíceis e me deu o apoio necessário para eu ter certeza que conseguiria vencer sem me deixar desistir. Essa vitória também é sua. Muita obrigada.

Aos meus irmãos Daniela Duarte Moreira e André Duarte Moreira,

Muito obrigada por sempre me apoiarem e torcerem por mim. Tenho muito orgulho dos dois e sei que vocês terão muito sucesso.

Aos meus familiares,

Em especial às minhas avós **Maria Rodrigues Moreira e Fernanda Duarte Machado** e aos meus avôs **Elísio Fernandes Batista Vermelho e Mário Machado** pelo exemplo de pessoas trabalhadoras e guerreiras e por todo amor e carinho comigo.

Às amigas,

Hellen Christina Silva, Márcia Regina Leite de Carvalho, Stéphanie Nara Randi Bassani, Tenile Mitie Ishiko e Natália Fontanelo Furlan pela amizade, apoio, incentivo e companheirismo nessa etapa tão importante da minha vida.

Ao meu namorado Jefferson Leitão,

Por todo apoio e paciência com o stress frequente causado por uma defesa de doutorado mesmo sem entender muito bem o motivo disso tudo. Obrigada por me fazer rir quando estou nervosa, por me dar carinho quando estou triste, por me abraçar quando preciso de colo e por me fazer massagem depois de horas na frente do computador. Te amo.

À amiga Amanda Farias Gomes,

Minha migles que aguenta todas as minhas reclamações, que passou a ser mais “durona” depois de conviver comigo, mas que tem um coração do tamanho do mundo, uma inteligência infinita, uma beleza que irrita e uma falta de paciência característica. Ela tentou me tornar uma pessoa mais doce, mais educada, mais esperta com a célebre frase “Amiga, me ajuda a te ajudar”, em algumas situações funcionou, em outras, nem tanto, mas sigo tentando. De uma coisa eu tenho certeza, aprendi muito com você, falo da sua exigência consigo mesma, mas não fico atrás, falo da sua falta de controle em situações estressantes, mas quase arranco os cabelos quando algo não dá certo e assim vamos seguindo nos entendendo e nos ajudando nessa vida louca da pós-graduação. Obrigada Amadinha, tenho muito orgulho de você, menina de ouro.

À amiga Raquel Werczler Queiroz de Castro,

Nossa convivência na FOP foi relativamente breve, mas muito importante. De repente, quando percebi, éramos amigas. Você me entendia, me apoiava, desabafava e com esse seu jeitinho meigo, delicado, parece boazinha, mas esconde um leão aí dentro, e foi com isso que me identifiquei. Kekel é sem igual, aquele tipo de pessoa que eu não posso ver chorar ou triste, que sou capaz de matar os responsáveis por cada uma das lágrimas, tenho vontade de cuidar dela, mas aí vem ela toda forte e militar e é quem cuida da gente. Você me enche de orgulho. Muito sucesso sempre e obrigada por todo apoio.

Aos amigos Amaro Vespasiano Silva, Débora de Melo Távora e Gina Roque-Torres

Obrigada por todo apoio em todas as fases desse trabalho, pelas infinitas horas de biotério, por todos os finais de semana dedicados aos cuidados dos animais, por terem aguentado meus vários momentos de stress (que eu juro que tentava controlar), por todas as gaiolas lavadas, enfim, por todo o trabalho que tivemos juntos e que sem vocês, eu jamais teria sido capaz. Desejo a vocês cada vez mais sucesso, me orgulho muito em ver os três trilhando belos caminhos.

Ao amigo Leonardo Vieira Peroni,

Obrigada por todos os momentos de diversão, risadas e descontração e por ser um ótimo copiloto até Curitiba.

Ao amigo Neiandro Galvão,

Obrigada pela companhia do almoço, por sua sinceridade extrema e por ser tão querido comigo.

Aos amigos que ajudaram em algum momento no biotério,

Henrique Maia Martins, Karla Faria Vasconcelos, Amanda Farias Gomes, Polyane Mazucatto Queiroz, Eliana Dantas e Rafaela Argento, a ajuda de vocês foi valiosa e imprescindível.

Aos amigos de pós-graduação,

Amanda Candemil, Ana Caroline Brito, Bernardo Freire, Carolina Valadares, Carlos Lima, Daniele Manhães Caldas, Danieli Moura Brasil, Eduarda Helena Nascimento, Eliana Dantas, Frederico Sampaio, Gabriella Rezende, Gustavo Santaella, Gustavo Nascimento, Helena Aguiar, Henrique Maia Martins, Hugo Gaêta, Karla Rovaris, Larissa Lagos, Larissa Moreira, Liana Matos Ferreira, Luciana Jácome, Luciano Cano, Manuella Belém, Mariana Nadaes, Mariane Michels, Mayra Yamasaki, Nicolly Oliveira Santos, Phillipe Nogueira, Polyane Queiroz, Priscila Azeredo, Priscila Peyneau, Rafaela Argento, Roberto Juns, Rocharles Fontenele, Saulo Leonardo, Sérgio Lins de Azevedo Vaz, Taruska Ventorini Vasconcelos, Tiago Nascimento, Thiago Gamba, Thiago Oliveira, e Victor Aquino pelo aprendizado e convívio diário.

A todos os funcionários da FOP, especialmente à Vanessa e à Lu da limpeza,

Por manterem a FOP como um ambiente de excelência para nosso trabalho.

Resumo

O consumo de refrigerantes tem aumentado consideravelmente. No Brasil, os mais consumidos são aqueles à base de cola e guaraná. Outra bebida bastante consumida é o café. Todas essas bebidas têm sido associadas a efeitos adversos no osso, como por exemplo, a diminuição da densidade mineral óssea (DMO) e, conseqüentemente, a um aumento do risco de fraturas, principalmente em mulheres na fase pós menopausa que são as mais susceptíveis a sofrerem com a osteoporose. Quando instalada a doença, o tratamento mais comumente utilizado é aquele com bisfosfonatos. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do consumo de bebidas à base de cola, guaraná e cafeína na densidade mineral óssea, resistência óssea e níveis séricos de cálcio e fósforo em ratas ovariectomizadas e ainda avaliar o efeito do tratamento com alendronato de sódio e solução de cálcio nas possíveis alterações causadas. Para tanto, foram utilizadas 91 ratas fêmeas, sendo 84 ovariectomizadas, divididas em 13 grupos cuja dieta consistiu de água, cola, guaraná ou café e sendo tratadas com alendronato ou solução de cálcio, durante 50 dias. Após esse período as ratas foram sacrificadas para análises da DMO, resistência óssea e de cálcio e fósforo séricos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial (4x3+1) com tratamento adicional em nível de significância de 5%. Foi observada diminuição estatisticamente significativa da DMO no grupo OVX Cola, sem diminuição estatisticamente significativa de resistência à fratura em relação ao grupo Controle OVX. Os grupos OVX Café e OVX Guaraná apresentaram aumento estatisticamente significativo da DMO em relação ao grupo Controle, porém, não foi observada diferença estatística significativa nos demais testes. Quando administrado o Alendronato de sódio foi possível observar aumento estatisticamente significativo da DMO do grupo Controle OVX e do grupo OVX Cola e diminuição estatisticamente significativa na DMO, na dosagem de cálcio e fósforo séricos do grupo OVX Café, além de diminuição significativa da resistência a fratura no grupo OVX Guaraná. Quando administrada a solução de cálcio, houve aumento significativo na DMO apenas no grupo OVX Cola e diminuição significativa nas dosagens de cálcio e fósforo séricos no grupo OVX Café. Foi possível concluir que se pode sugerir uma relação entre alteração óssea e consumo de refrigerantes à base de cola em ratas ovariectomizadas e que essas alterações podem ser atenuadas realizando-se o tratamento com alendronato de sódio ou solução de cálcio. Ainda, que o consumo de café ou refrigerantes à base de guaraná parecem não estar associados a alterações ósseas e nesses casos, o tratamento com as substâncias administradas não surtiu efeito positivo, apresentando efeito maléfico quando associado ao consumo de café.

Palavras-chave: Densidade Óssea, Densitometria, Café, Refrigerantes, Alendronato

Abstract

The consumption of carbonated beverages worldwide has increased considerably in recent years. In Brazil, the most consumed beverages are soft drinks based on cola and on guarana, and there is also a high consumption of coffee. These beverages have been associated with adverse bone effects, such as decreased bone mineral density (BMD) and consequently, increased fracture risk, mainly in post-menopausal women, who are more susceptible to develop osteoporosis. In the presence of this disease, the most common treatment is performed with the use of bisphosphonates. Hence, the aim of these study was to evaluate the effect of cola, guarana and caffeine beverages on bone mineral density, bone strength and serum levels of calcium and phosphorus in ovariectomized rats; in addition, it was aimed to assess the effect of treatments with sodium alendronate and with a calcium solution over the possibly induced bone alterations. 91 female rats were selected and 84 was ovariectomized; after that, they were divided into 13 groups based on the consumption of water, cola, guarana or caffeine and on the treatment with sodium alendronate or calcium solution. At the end of a 50 days period, the animals were sacrificed and the analyses of BMD, bone strength, and serum levels of calcium and phosphorus were performed. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) with factorial design (4x3+1) and to additional treatment with a significance level of 5%. It was observed a statistically significant decrease in the BMD, without a statistically significant reduction in the fracture resistance, in the OVX Cola group when compared to the Control OVX group. The OVX Coffee and OVX Guarana groups showed a statistically significant increase in the BMD when compared to the OVX Control group, but no significant differences were observed in the other analyses performed. When sodium alendronate was administered, it was observed a statistically significant increase in Control OVX and OVX Cola groups BMD; however, there was a significant decrease in the OVX Coffee group BMD and serum levels of calcium and phosphorus, and a significant decrease in the bone strength in the OVX Guarana group. Regarding the administration of the calcium solution, there was a statistically significant increase in the BMD in the OVX Cola group only, and significantly decrease in serum levels of calcium and phosphorus in the OVX Coffee group. As a conclusion, a relationship between bone alteration in ovariectomized rats and cola-based soft drinks may be suggested; also, the bone alterations can be attenuated by treatment with sodium alendronate or calcium solution. In addition, the consumption of coffee and guarana-based soft drinks seemed not to be associated with bone alterations, and treatment with the administered substances had no positive effects, showing a maleficent effect when associated with coffee consumption.

Keywords: Bone Density, Densitometry, Coffee, Carbonated Beverages, Alendronate.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 ARTIGO – Versão em Português: Efeito de uma dieta à base de cola, guaraná e cafeína em ratas ovariectomizadas e tratadas com cálcio e alendronato.	20
2.1 ARTIGO – Versão em Inglês: Effect of a diet based on cola, guaraná and caffeine in ovariectomized rats submitted a calcium and alendronate treatment.	37
3 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS*	55
APÊNDICE 1	58
ANEXO 1 – Comprovante de submissão do artigo ao periódico.....	68
ANEXO 2 – Comitê de Ética em Pesquisa.	69

1 INTRODUÇÃO

Os ossos são estruturas inervadas e irrigadas que sob o menor estímulo podem sofrer reabsorção, possuindo, entretanto, grande capacidade de regeneração. Como é um tecido vivo e dinâmico, se renova permanentemente durante a vida toda, sendo esse sistema de “construção e destruição” denominado de remodelação óssea. Pode-se observar que uma mudança contínua ocorre em todos os ossos ao longo da vida, sendo que acontecem em ciclos e são devido à maior ou menor atividade dos grupos de osteoblastos e osteoclastos. Os osteoclastos desse modo, aparecem na superfície do osso e realizam a reabsorção, processo no qual os cristais de fosfato de cálcio são removidos do osso para serem absorvidos pelo sangue. Logo após esta fase, temos uma nova formação óssea pelos osteoblastos. Este processo de remodelação é fisiológico e é utilizado pelos ossos do organismo para a manutenção da massa óssea esquelética. Porém, se a intensidade da atividade osteoclástica for maior do que a osteoblástica, ocorrerá um desequilíbrio no metabolismo ósseo, tornando-o enfraquecido e podendo levar à quadros de redução de DMO, osteopenia ou osteoporose (Guyton, 1988; Kuroda *et al.*, 2003).

A osteoporose é uma doença esquelética caracterizada por comprometimento da resistência óssea que predispõe à um aumento do risco de fraturas e está associada a dois fatores: DMO e qualidade óssea (Jiang *et al.*, 2008; Supplee *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2014)

Com o aumento da expectativa de vida e conseqüente maior número de idosos, a osteoporose tem se tornado um problema de saúde pública, uma vez que esta gera uma maior predisposição a fraturas no quadril, podendo levar a morte ou a cuidados especiais durante longos períodos (García-Contreras *et al.*, 2000; Tucker *et al.*, 2006; Williams, 2007; Liu *et al.*, 2011; Supplee *et al.*, 2011; Folwarczna *et al.*, 2014; Herrero e Pico 2016). As mulheres são mais afetadas pela osteoporose do que os homens, principalmente após a menopausa devido à atrofia dos ovários e conseqüente diminuição do estrógeno circulante, uma vez que o estrógeno é responsável por proteger a massa óssea por inibir as substâncias parácrinas que promovem a perda óssea, principalmente o hormônio da paratireoide (PTH) (García-Contreras *et al.*, 2000; Kuroda *et al.*, 2003; Tucker *et al.*, 2006; Supplee *et al.*, 2011; Herrero e Pico 2016; Mohamed *et al.*, 2017).

Além da idade e do sexo, outros fatores têm sido frequentemente associados à osteoporose como raça, história familiar, tabagismo, peso, estilo de vida sedentário, deficiência de cálcio e vitamina D, dietas hiper-proteicas, consumo de álcool, bebidas carbonatadas como refrigerantes, principalmente aqueles contendo cola em sua composição e café (García-

Contreras *et al.*, 2000; Kinney e Fitzpatrick, 2002; Tucker *et al.*, 2006; Ogur *et al.*, 2007; Williams, 2007; Teófilo *et al.*, 2010; Lacerda *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Supplee *et al.*, 2011; Folwarczna *et al.*, 2014; Paccou *et al.*, 2015; Herrero e Pico 2016).

O consumo de refrigerantes tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e, com isso, uma ampla variedade de sabores e composições encontram-se disponíveis no mercado mundial. Especificamente no Brasil, os refrigerantes mais consumidos são os produzidos à base de cola e de guaraná (Schimpl *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2015). Alguns autores consideram que ambas as bebidas oferecem risco à saúde, uma vez que possuem cafeína e/ou ácido fosfórico em sua formulação. (García-Contreras *et al.*, 2000; Kinney e Fitzpatrick, 2002; Tucker *et al.*, 2006; Ogur *et al.*, 2007; Williams, 2007; Liu *et al.*, 2011; Supple *et al.*, 2011; Schimpl *et al.*, 2013; Mingori *et al.*, 2016). Além dos refrigerantes, outra bebida consumida em larga escala é o café, o qual também apresenta cafeína em sua composição (Liu *et al.*, 2011; Jimenéz-Zamora *et al.*, 2015).

Estudos têm afirmado que bebidas contendo cafeína e ácido fosfórico são responsáveis por efeitos adversos no osso, provocando muitas vezes a diminuição na densidade mineral óssea (DMO), e aumento no risco de fraturas. (García-Contreras *et al.*, 2000; Kinney e Fitzpatrick, 2002; Tucker *et al.*, 2006; Ogur *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011; Supple *et al.*, 2011; Folwarczna *et al.*, 2014). A redução da DMO em indivíduos que consomem grandes quantidades de refrigerantes pode ocorrer devido à uma interferência na absorção intestinal e na reabsorção renal tubular de cálcio provocada pelo ácido fosfórico, o que contribui para um desequilíbrio dos hormônios responsáveis pela remodelação óssea, principalmente o hormônio da paratireoide, o que pode acentuar a reabsorção óssea e levar até a quadros de osteoporose (García-Contreras *et al.*, 2000; Kinney e Fitzpatrick, 2002; Tucker *et al.*, 2006; Ogur *et al.*, 2007).

Em relação ao café, Rapuri *et al.*, 2001, indicaram que a ingestão de grandes quantidades de cafeína pode acelerar a perda óssea na região da coluna vertebral em mulheres na pós-menopausa e Liu *et al.*, 2011, sugeriram em seu estudo que a cafeína é capaz de reduzir a densidade mineral óssea em ratos em crescimento, estimulando a atividade osteoclástica, já que aumenta significativamente a diferenciação de células osteoclásticas da medula óssea hematopoiética. Embora alguns estudos tenham encontrado associação entre consumo de cafeína e alterações ósseas, outros autores afirmam não existir tal relação, principalmente

quando ocorre a ingestão de quantidades recomendadas de cálcio (Sakamoto *et al.*, 2001; Heaney, 2002).

Outro fator associado ao alto consumo de bebidas carbonatadas e cafeína com alterações ósseas é a diminuição do consumo de leite, bebida que possui grande quantidade de cálcio em sua composição, o que impede que substâncias como o ácido fosfórico afetem o metabolismo ósseo, visto que evidências sugerem que dietas contendo cálcio e vitamina D e atividade física frequente são muito importantes para manutenção da saúde óssea (Kinney e Fitzpatrick, 2002, Tucker *et al.*, 2006, Ogur *et al.*, 2007, Supple *et al.*, 2011).

García-Contreras *et al.*, em 2000, realizaram um estudo visando avaliar a relação entre o consumo de refrigerantes à base de cola e a densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas e concluíram que o alto consumo desse tipo de refrigerante tem potencial de reduzir a densidade mineral óssea. Resultado semelhante ao encontrado no estudo de Tucker *et al.*, em 2006, que relacionou o consumo de bebidas carbonatadas com diminuição da DMO e verificou uma significativa associação negativa em mulheres que consumiam bebidas contendo cola em sua composição, porém não houve relação entre diminuição da DMO e consumo de outras bebidas carbonatadas. Como observado no estudo realizado em 2011 por Supplee *et al.*, onde não foram encontradas alterações significativas entre o consumo de refrigerantes e aumento do risco de osteoporose em mulheres no período pós menopausa.

Lacerda *et al.*, em 2010, evidenciaram que o consumo diário de café/cafeína foi responsável por efeitos adversos graves no metabolismo de ratos machos, incluindo o aumento dos níveis de cálcio no plasma e na urina, diminuição da densidade mineral óssea e redução do volume ósseo com consequente atraso no processo de reparação óssea.

Sabe-se que a nutrição é um fator modificador importante no desenvolvimento e manutenção da massa óssea. Autores tem afirmado que o consumo de vegetais, óleo de oliva, suco de laranja, frutas, colágeno, soja e chá são benéficos na prevenção da osteoporose (Herrero e Pico, 2016). Porém, quando instalada a osteoporose, existe a necessidade de tratamento com medicamentos e Yano *et al.*, afirmam que evidências clínicas sugerem que tanto o alendronato como o residronato diminuem o risco de fratura e a perda de massa óssea (Yano *et al.*, 2014), embora outros estudos mais recentes tenham observado associação entre uso de bisfosfonatos e diminuição da resistência óssea ou fraturas atípicas do fêmur (McClung *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015, Jin *et al.*, 2017). Mohamed *et al.*, em 2017, afirmam que os bisfosfonatos são considerados como a primeira linha de tratamento da osteoporose e atuam inibindo a enzima

farnesil pirofosfato sintase da via do mevalonato, impedindo assim a biossíntese de compostos isoprenóides, que são essenciais para a atuação dos osteoclastos.

Porém, com o advento de tais medicamentos para o controle da osteoporose, as pessoas passaram a dar menos importância para o consumo de alimentos contendo cálcio e vitamina D. Esses nutrientes são extremamente importantes para a manutenção óssea, uma vez que a deficiência na ingestão de cálcio tem sido considerado um dos maiores fatores de risco para a osteoporose, já que pode causar hiperparatireoidismo secundário com a falta de homeostase do cálcio sanguíneo; conseqüentemente, ocorre a reabsorção do cálcio do osso com perda óssea resultante e aumento do risco de fraturas (Cho *et al.*, 2008; Saini *et al.*, 2017).

Frente ao aumento no consumo de refrigerantes e de café e da sua associação com alterações ósseas, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do consumo de bebidas à base de cola, guaraná e café na DMO, resistência óssea e nos níveis séricos de cálcio e fósforo de ratas ovariectomizadas e ainda avaliar o efeito do tratamento com alendronato de sódio e solução de cálcio nas possíveis alterações causadas.

2 ARTIGO – Versão em Português: Efeito de Uma Dieta à Base de Cola, Guaraná e Cafeína em Ratas Ovariectomizadas e Tratadas com Cálcio e Alendronato.

A versão em inglês desse artigo, intitulado “*Effect of a diet based on cola, guarana and caffeine in ovariectomized rats submitted calcium and alendronate treatment*”, foi submetida, no dia 23 de janeiro de 2018, à apreciação (Anexo 1), visando à publicação, ao periódico Journal of Oral Science. A estruturação do artigo baseou-se nas “Instruções aos autores” preconizadas pela editora do periódico.

Original Article

Effect of a diet based on cola, guarana and caffeine in ovariectomized rats submitted calcium and alendronate treatment.

Debora Duarte Moreira¹, Amaro Ilidio Vespasiano Silva², Débora de Melo Távora³, Gina Délia Roque-Torres⁴, Cinthia Pereira Machado Tabchoury⁵, Solange Maria de Almeida Boscolo⁶

1 - DDS, MSc, PhD student, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

2 - DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Pontifícia Universidade Católica, Belo Horizonte, MG, Brazil.

3 – DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza, Fortaleza, CE, Brazil.

4 - DDS, MSc, PhD, Research Associate, Center of Dental Research, Loma Linda University, Loma Linda, CA, USA.

5 - DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Physiological Science, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

6 - DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Corresponding author:

Debora Duarte Moreira

E-mail address: dededm@hotmail.com

Av. Limeira, 901, Areião - Piracicaba, SP – Brazil, 13414-903

Phone: 55 19 21065227

RESUMO

Objetivo: O consumo de refrigerantes tem sido associado a alterações ósseas. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de bebidas à base de cola, guaraná e cafeína no osso e os efeitos do tratamento com Alendronato de Sódio e Solução de Cálcio em ratas ovariectomizadas.

Metodologia: 91 ratas foram ovariectomizadas, e divididas em 13 grupos consumindo água e bebidas à base de cola, guaraná ou cafeína e tratadas com alendronato de sódio ou solução de cálcio. Foram feitas as análises da densidade mineral óssea (DMO), teste de resistência à fratura e análise de cálcio e fósforo séricos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial (4x3+1) com tratamento adicional em nível de significância de 5%.

Resultados: Foi observada diminuição significativa da DMO no grupo OVX Cola. Os grupos OVX Café e OVX Guaraná apresentaram aumento significativo da DMO. A administração de alendronato de sódio promoveu aumento significativo da DMO nos grupos Controle OVX e OVX Cola, enquanto que a administração de cálcio apenas promoveu aumento no grupo OVX Cola.

Conclusões: Nosso estudo sugere que a qualidade óssea é influenciada apenas pelo consumo de bebida à base de cola. O tratamento com alendronato de sódio ou solução de cálcio se mostrou eficaz em casos de consumo de cola e causou diminuição da qualidade óssea quando associado com guaraná e café.

Palavras-chave: Densidade Óssea, Densitometria, Cafeína, Refrigerantes, Alendronato.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, têm se dado atenção especial à osteoporose que tem se tornado uma doença cada vez mais comum, devido ao aumento da expectativa de vida. Essa é uma doença que favorece o aumento de fraturas no quadril, podendo levar à morte ou a cuidados especiais durante longos períodos (1-7). As mulheres são as mais afetadas por tal doença, principalmente após a menopausa devido à atrofia dos ovários e consequente diminuição do estrógeno circulante (1,2,5,7-10).

Além da idade e do sexo, outros fatores têm sido frequentemente associados à osteoporose como raça, história familiar, tabagismo, peso, estilo de vida sedentário, deficiência de cálcio e vitamina D, dietas hiper-proteicas, consumo de álcool, bebidas carbonatadas como refrigerantes, principalmente aqueles contendo cola em sua composição e alto consumo de café (1-4,6,7,11-15).

Quando instalada a osteoporose, existe a necessidade de tratamentos visando minimizar os danos causados, e os bisfosfonatos como alendronato e residronato têm sido apontados como eficazes na diminuição do risco de fratura e perda de massa óssea, sendo considerados tratamentos de primeira linha para a osteoporose (10,16). Em contrapartida, outros estudos têm observado associação entre uso de bisfosfonatos e diminuição da resistência óssea ou fraturas atípicas do fêmur (17-19).

O consumo de cálcio e vitamina D são de extrema importância para manutenção da massa óssea e a deficiência na ingestão de cálcio tem sido considerado um dos maiores fatores de risco para desenvolvimento da osteoporose. (20,21).

Tem-se observado um grande aumento no consumo de refrigerantes de diversas marcas e sabores. No Brasil, os refrigerantes mais consumidos são aqueles produzidos à base de cola e guaraná (22,23) e além dos refrigerantes outra bebida mundialmente consumida em larga escala é o café (4,24). Essas bebidas possuem em sua composição cafeína e/ou ácido fosfórico que têm sido associados à efeitos adversos no osso como diminuição na densidade mineral óssea (DMO), e aumento no risco de fraturas. (1,2,4-6,11,12).

O ácido fosfórico presente principalmente em bebidas à base de cola parece estar associado à uma interferência na absorção intestinal de cálcio, o que leva à um desequilíbrio do hormônio da paratireoide (PTH) podendo aumentar ainda mais os níveis de osteoporose (1,2,11,12). E a cafeína foi associada em alguns estudos como de Rapuri *et al.*, com diminuição da DMO na

região da coluna vertebral em mulheres no período pós menopausa (25) e à redução da DMO em ratos em crescimento devido à um aumento na atividade osteoclástica (4).

Em contrapartida, alguns estudos não encontraram associação entre consumo de refrigerantes, principalmente aqueles que não são à base de cola, com diminuição da DMO ou osteoporose (2,5) e em outros estudos não foi encontrada associação entre consumo de café e perda óssea em ratos (26), principalmente em indivíduos que ingerem as quantidades recomendadas de cálcio (27).

Frente ao aumento no consumo de refrigerantes e de café e da sua relação com alterações ósseas negativas, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do consumo de bebidas à base de cola, guaraná e cafeína na DMO, resistência óssea e nos níveis séricos de cálcio e fósforo de ratas ovariectomizadas e ainda avaliar o efeito do tratamento com alendronato de sódio e solução de cálcio nas possíveis alterações causadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa animal sob protocolo número 3647-1.

Para a realização deste estudo, foram utilizadas 91 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus Albinus, Wistar*) com 90 dias de vida e peso variando de 250-300 gramas, procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Durante toda a pesquisa, os animais foram mantidos em caixas padrão, em temperatura entre 22-25 °C, umidade de 30-60% e ciclos de 12 horas dia e 12 horas noite, e alimentados com ração *ad libitum* e 500 ml de água por dia.

Aos 90 dias de vida, todos os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia sendo que sete deles, pertencentes ao grupo Controle Absoluto, foram submetidos apenas ao procedimento *sham* que consistiu na exposição sem remoção dos ovários (28).

Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram separados aleatoriamente em 13 grupos, de acordo com a bebida e/ou tratamento administrados, contendo 7 animais em cada, como apresentado no quadro 1.

Quadro 1: Separação dos grupos utilizados no trabalho.

Grupo	Procedimento Cirúrgico	Tratamento	Substâncias administradas
Controle Absoluto	----	----	Água
Controle OVX	Ovariectomia	----	Água
OVX Cola	Ovariectomia	----	Água + Cola
OVX Guaraná	Ovariectomia	----	Água + Guaraná
OVX Café	Ovariectomia	----	Água + Café
OVX Alendronato	Ovariectomia	Alendronato	Água
OVX Ale Cola	Ovariectomia	Alendronato	Água + Cola
OVX Ale Guarana	Ovariectomia	Alendronato	Água + Guaraná
OVX Ale Café	Ovariectomia	Alendronato	Água + Café
OVX Cálcio	Ovariectomia	Cálcio	Água
OVX Cálcio Cola	Ovariectomia	Cálcio	Água + Cola
OVX Cálcio Guaraná	Ovariectomia	Cálcio	Água + Guaraná
OVX Cálcio Café	Ovariectomia	Cálcio	Água + Café

Após 45 dias do procedimento de ovariectomia, deu-se início à administração das bebidas. Cada gaiola utilizada na pesquisa possuía dois bebedouros, um contendo 500 ml de água e o outro contendo 500 ml da bebida da dieta selecionada para cada grupo específico.

As bebidas à base de cola, guaraná e café adoçado foram administradas durante 50 dias para cada grupo e os bebedouros foram colocados um ao lado do outro, sendo sua posição invertida diariamente a fim de não induzir o consumo da mesma solução. A cada troca, foi medido o volume de líquido para ser determinada a média consumida por cada grupo. Todos os animais foram pesados semanalmente durante todo o tempo de consumo das bebidas para avaliar perda e/ou ganho de peso.

No momento do início da administração das bebidas, iniciou-se também a administração de xarope de alendronato de sódio (5,0 mg/kg) e de uma solução de cálcio (16,0mg/kg) três vezes por semana pelo método de gavagem. Nos demais grupos que não estavam incluídos nos grupos de tratamento, foi realizado o procedimento de gavagem *sham*.

Após 50 dias de administração das bebidas à base de cola, guaraná e café e dos tratamentos, todos os animais foram sacrificados pelo método de decapitação, podendo-se assim fazer a

coleta de sangue de cada um deles, o qual foi centrifugado imediatamente para separação do plasma sanguíneo e posterior análise bioquímica. Além disso, os fêmures direito e esquerdo foram dissecados e armazenados em formol tamponado a 10%, Formol 10%® (Indalabor, Minas Gerais, Brasil).

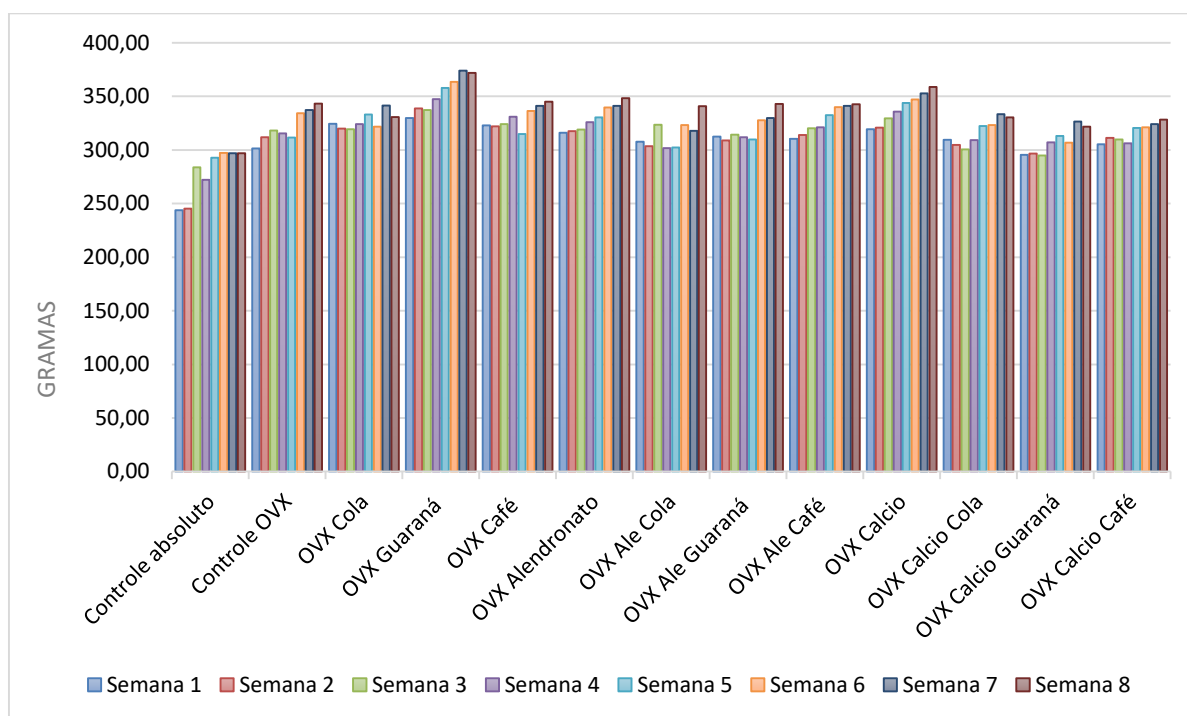
Foram utilizados três diferentes métodos de avaliação das amostras:

1. Análise da densidade mineral óssea por meio do exame de densitometria óssea: os fêmures esquerdos foram escaneados no densitômetro de dupla emissão de Raios X (DXA) DPX-Alpha, Lunar® (GE Healthcare, Madison, WI, EUA) imersos em água para simulação de tecido mole. As imagens obtidas foram avaliadas no software do próprio aparelho que permitiu a seleção da área total de interesse do fêmur e assim calcular a DMO em g/cm²;
2. Análise da resistência óssea realizada na máquina de ensaios mecânicos Instron 4411 (Instron Corporation, Canton, MA, EUA): o fêmur direito foi posicionado paralelo à base de apoio, sendo aplicada uma carga perpendicular à diáfise com velocidade de 1,3mm/min até que ocorresse a fratura e a força máxima exercida pudesse ser medida em Newtons (N);
3. Análise bioquímica do plasma utilizando-se o Kit Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) para dosagem das concentrações de cálcio e fósforo sérico e posterior mensuração da absorvância das soluções com auxílio do espectrofotômetro digital DU 800 (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, EUA).

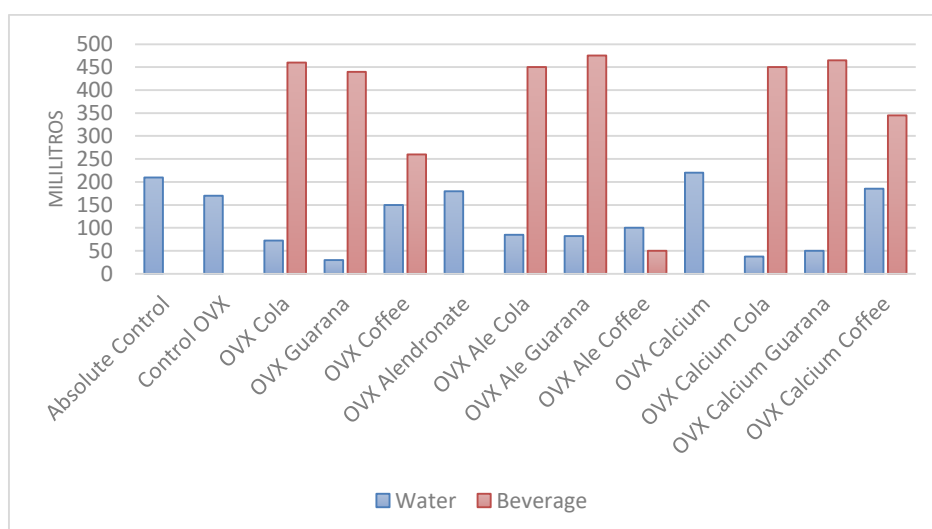
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial (4x3+1) com tratamento adicional em nível de significância de 5% para avaliar o efeito das diferentes bebidas e dos diferentes tratamentos aplicados em ratas ovariectomizadas.

RESULTADOS

O gráfico 1 mostra a variação semanal da massa das ratas, sendo que foi observado um maior ganho numérico no grupo de ratas que consumiram refrigerante à base de guaraná sem nenhum outro tratamento.

Gráfico 1. Variação de massa das ratas semanalmente.

O Gráfico 2 mostra a média de consumo de cada bebida durante o tempo de administração por cada grupo.

Gráfico 2. Média do consumo diário de cada bebida por cada grupo.

Ovariectomia:

Foi possível observar diferença estatística significativa em relação ao teste de densitometria (Tabela 1) e ao teste de dosagem de cálcio e fósforo no plasma sanguíneo (tabela 3) entre o

Grupo Controle absoluto e Controle OVX, sendo que os grupos submetidos à remoção dos ovários apresentaram menores valores para densitometria e dosagem de fósforo e maiores valores para dosagem de cálcio plasmático.

Densitometria:

Os animais do grupo Controle OVX apresentaram valores significativamente menores (0,172) em relação ao grupo controle absoluto (0,251) para o teste de densitometria. O grupo OVX Cola (0,151) apresentou valores de DMO significativamente menores, tanto em relação ao Controle OVX (0,172) como em relação aos grupos OVX Guaraná (0,242) e OVX Café (0,232), que não apresentaram diferença entre si. Apenas os animais do grupo OVX Guaraná (0,242) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Controle absoluto (0,251) e ainda apresentaram maiores valores de densitometria quando comparados aos grupos Controle OVX (0,172) e Cola (0,151). (Tabela 1).

Quando administrado Alendronato de Sódio, observou-se um aumento significativo na DMO nos grupos Controle OVX (0,233) e OVX Cola (0,246). Entretanto, houve uma redução no grupo OVX Guaraná (0,240) e no grupo OVX Café (0,202), sendo a redução nesse último grupo, de maneira significativa (Tabela 1).

A administração de Cálcio não resultou em alteração significativa na densitometria óssea nos grupos Controle OVX (0,159), OVX Guaraná (0,235) e OVX Café (0,227), mas aumentou significativamente os valores de densitometria no grupo OVX Cola (0,240) (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão das variáveis analisadas em função do tratamento em relação à densitometria.

Grupo	Tratamento		
	Nenhum	Alendronato	Calcio
		Densitometria (g/cm ²)	
Controle OVX	*0,172 (0,013) Bb	*0,233 (0,011) Aa	*0,159 (0,012) Bb
OVX Cola	*0,151 (0,015) Bc	0,246 (0,008) Aa	0,240 (0,006) Aa
OVX Guaraná	0,242 (0,011) Aa	0,240 (0,011) Aa	0,235 (0,009) Aa
OVX Café	*0,232 (0,013) Aa	*0,202 (0,010) Bb	*0,227 (0,011) Aa
Controle Absoluto	0,251 (0,008)		

*Difere do grupo controle absoluto ($p \leq 0,05$). Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical para cada variável) diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Análise da Resistência Óssea:

Quando avaliada a força necessária para fraturar o osso, o que indica a resistência óssea, observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos Controle

Absoluto (132,62), Controle OVX (144,42), OVX Cola (122,40) e OVX Café (149,60). Porém, a força necessária para causar fratura no grupo OVX Guaraná (169,85) foi maior em relação a todos os grupos, sendo estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle Absoluto e OVX Cola (Tabela 2).

Nos animais que receberam Alendronato de Sódio e Solução de Cálcio, houve um aumento significativo da resistência óssea à fratura em relação ao grupo Controle absoluto. No entanto, em animais que ingeriram Café e Cola, a administração desses tratamentos não resultou em mudança significativa na força necessária para provocar a fratura em relação ao grupo Controle absoluto. Nos animais que ingeriram bebida à base de Guaraná, a administração de Alendronato exigiu menor força para provocar fratura, e a administração de Cálcio não alterou de forma significativa a força necessária para fratura em relação aos demais grupos que ingeriram Guaraná (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio padrão das variáveis analisadas em função do tratamento em relação à análise da resistência óssea.

Grupo	Tratamento		
	Nenhum	Alendronato	Calcio
		Fratura (N)	
Controle OVX	144,42 (9,829) Aab	*160,89 (17,345) Aa	*166,66 (5,933) Aa
OVX Cola	122,40 (16,540) Ab	140,93 (14,666) Aa	141,97 (15,792) Aab
OVX Guaraná	*169,85 (11,593) Aa	142,09 (7,696) Ba	149,61 (10,023) ABab
OVX Café	149,60 (20,285) Aa	147,58 (12,196) Aa	136,31 (15,792) Ab
Controle Absoluto	132,62 (20,074)		

*Difere do grupo controle absoluto ($p \leq 0,05$). Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical para cada variável) diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Análises Bioquímicas:

Cálcio

A administração das diferentes bebidas não alterou de forma significativa os valores de cálcio sérico no plasma (calcemia) em relação ao grupo Controle OVX. No entanto, os animais do grupo OVX Café apresentaram índices de calcemia superiores em relação aos animais dos demais grupos (Tabela 3).

Tanto a administração de Alendronato quanto de Solução de Cálcio, resultaram em um aumento da calcemia do grupo Controle OVX. Porém, em animais dos grupos OVX Cola e OVX Guaraná, a administração de Alendronato e de Cálcio não alterou a calcemia. Nos

animais do grupo OVX Café, houve uma redução significativa nos níveis de cálcio no plasma sanguíneo quando administrada a substância de tratamento, tanto para o Alendronato, quanto para o Cálcio (Tabela 3).

Fósforo

Entre os animais que foram submetidos à ovariectomia, não foi observada diferença significativa do grupo Controle OVX em relação aos grupos teste (OVX Cola, OVX Guaraná e OVX Café) (Tabela 3).

A administração de Alendronato não resultou em diferença significativa no nível de fósforo em relação ao grupo Controle OVX, independente da bebida ingerida pelos animais. Quando administrado Cálcio, foi observado um aumento significativo no nível de fósforo plasmático em relação ao grupo Controle OVX, mas não em relação ao grupo que recebeu tratamento com Alendronato (Tabela 3).

Tanto a administração de Alendronato como de Cálcio no grupo OVX Café, provocaram uma diminuição significativa nos níveis de fósforo plasmático em relação ao grupo Café que não recebeu qualquer tratamento (Tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis analisadas em função do tratamento em relação à análise das dosagens de cálcio e fósforo.

Grupo	Tratamento		
	Nenhum	Alendronato Dosagem Ca	Calcio
Controle OVX	*0,337 (0,045) Bab	*0,464 (0,048) Aa	*0,476 (0,050) Aa
OVX Cola	*0,304 (0,016) Ab	*0,312 (0,020) Ab	*0,297 (0,030) Ab
OVX Guaraná	*0,330 (0,058) Ab	*0,296 (0,023) Ab	*0,298 (0,017) Ab
OVX Café	*0,399 (0,056) Aa	*0,319 (0,048) Bb	*0,292 (0,030) Bb
Controle Absoluto	0,137 (0,054)		
		Dosagem P	
OVX Controle	*0,373 (0,004) Ba	*0,412 (0,067) ABa	0,506 (0,054) Aa
OVX Cola	*0,417 (0,040) Aa	*0,389 (0,058) Aa	*0,394 (0,068) Ab
OVX Guaraná	*0,425 (0,103) Aa	*0,377 (0,048) Aa	*0,368 (0,057) Ab
OVX Café	0,496 (0,104) Aa	*0,343 (0,049) Ba	*0,336 (0,024) Bb
Controle Absoluto	0,559 (0,098)		

*Difere do grupo controle absoluto ($p \leq 0,05$). Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical para cada variável) diferem entre si ($p \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

O modelo experimental de ratas ovariectomizadas tem sido considerado um dos melhores modelos para estudar a osteoporose já que a remoção dos ovários induz a perda de DMO

devido à deficiência de estrogênio, uma vez que este hormônio é responsável por proteger a massa óssea inibindo as substâncias parácrinas que promovem a reabsorção óssea, principalmente o hormônio da paratireoide (PTH) (8-10,30) como observado no presente estudo onde o grupo submetido à ovariectomia (Controle OVX) apresentou menores valores de densitometria e dosagem de fósforo e maiores valores para dosagem de cálcio plasmático do que aquele não submetido à tal procedimento (Controle absoluto), fatores que sugerem a indução da perda mineral óssea.

Os animais foram submetidos à dieta contendo bebidas à base de cola, guaraná e café que são bebidas amplamente consumidas e que têm sido associadas ao aumento da perda de densidade mineral óssea e de diminuição da resistência óssea devido à presença de cafeína e/ou ácido fosfórico na sua composição (1,2,4-6,11,12,25).

Os resultados do presente estudo sugerem a partir da análise do fêmur pelo DXA que o consumo de bebidas à base de cola tem potencial de diminuir a DMO resultado que corrobora com estudos encontrados na literatura (1,2,12). Acredita-se que isso ocorra devido à presença de ácido fosfórico nesse tipo de bebida e não em outras, já que esse componente parece estar associado à interferência na absorção intestinal e na reabsorção renal tubular de cálcio, o que contribui para um desequilíbrio do hormônio da paratireoide, levando à reabsorção óssea para que seja reestabelecida a homeostase da concentração de cálcio sérico (1,2,12), como observado no presente estudo, onde não foi observada alteração na concentração de cálcio sérico entre o grupo OVX Cola e Controle OVX, portanto, embora tenha havido à diminuição da DMO devido à um aumento na reabsorção óssea, no momento da análise do cálcio sérico, foi observada a homeostase.

Outro componente presente na bebida à base de cola que também tem sido associado à diminuição da DMO é a cafeína, que por sua vez estimula a diferenciação de células osteoclásticas e conseqüentemente a sua atividade (1,4,6,12). Porém, no estudo de Tucker *et al.* também foi observada diminuição da DMO em mulheres que consumiram cola descafeínada e tal associação não foi observada quando foi feito o ajuste para o consumo apenas de cafeína, sugerindo que a cafeína não está diretamente associada à diminuição da DMO, o que também foi observado no estudo de Supplee *et al.* (2,5). No presente estudo, os resultados encontrados sugerem que a bebida à base de guaraná e o café que são bebidas que não contém ácido fosfórico, embora contenham cafeína em sua composição não causaram alteração na DMO em ratas ovariectomizadas.

Além disso, foi observado que o grupo que consumiu guaraná obteve valores de DMO próximos àqueles obtidos no grupo controle absoluto sem apresentar diferença significativa, e quando realizada a análise de resistência óssea, a força necessária para causar fratura no grupo OVX Guaraná foi significativamente maior em relação ao grupo Controle absoluto. Fato que pode ter ocorrido devido à uma maior massa corpórea das ratas que consumiram bebidas à base de guaraná quando comparados a outros grupos, concordando com os resultados obtidos por Supplee *et al.* que encontraram associação entre aumento do índice de massa corpórea e diminuição dos índices de osteoporose em mulheres no período pós menopausa que faziam consumo de algum tipo de refrigerante regularmente. Embora o aumento no índice de massa corpórea possa ser um fator protetor para a DMO ele está diretamente associado a outros fatores de risco à saúde como diabetes e doenças cardiovasculares (5).

Ainda, foi possível observar durante a manipulação que principalmente os animais dos grupos que consumiam bebidas à base de guaraná eram os mais agitados, o que pode estar associado a melhores valores de DMO já que estímulo por atividade física tem sido associado a aumento da DMO (5,7).

Quando administrado o Alendronato de sódio, cuja função é inibir a ação dos osteoclastos, houve um aumento significativo na densitometria óssea nos grupos Controle OVX e OVX Cola, grupos esses que haviam apresentado os menores valores de DMO. Porém, resultou em redução significativa na densitometria óssea nos animais do grupo OVX Café o que pode ser explicado devido à uma redução de aproximadamente 60% na biodisponibilidade do Alendronato quando esse é ingerido juntamente com café, como observado no estudo de Gertz *et al.* (30). Ainda, foi observada necessidade de menor força aplicada para promover a fratura óssea nos animais que consumiram bebida à base de guaraná e foram tratados com alendronato de sódio. Levando-se em consideração que os animais que consumiram esse tipo de bebida e não receberam nenhum tratamento apresentaram melhora nos parâmetros ósseos avaliados, pode se associar o tratamento com alendronato de sódio a fraturas atípicas do fêmur e até à uma diminuição da resistência óssea, como relatado por outros estudos (17,18,19).

Embora tenha sido encontrada diferença estatística significativa na DMO quando comparados os grupos Controle OVX e OVX Cola, não foi observada diferença significativa em relação à essa mesma comparação no teste de fratura, isso pode ter ocorrido devido à uma perda de densidade mineral óssea insuficiente para provocar diminuição da resistência óssea.

Porém, quando foi avaliada a resistência óssea em ratas ovariectomizadas sendo tratadas com alendronato ou solução de cálcio, foi observada necessidade de maior força para provocar fratura do fêmur quando comparado ao grupo controle absoluto, resultado que corrobora com os achados de Jiang *et al.* que sugerem que animais tratados com esses tipos de medicamento apresentaram uma melhora na resistência óssea. (30).

Nos animais do grupo OVX Café, houve uma redução significativa estatisticamente nos níveis de cálcio no plasma sanguíneo quando administrada a substância de tratamento, tanto para o Alendronato, quanto para o Cálcio. Esse fato pode ser explicado devido à atuação de outros mecanismos não avaliados no presente estudo, como por exemplo a excreção renal de cálcio aumentada quando do consumo de cafeína (5).

A análise dos resultados do presente estudo mostra que os efeitos de bebidas à base de cola, guaraná e café no metabolismo ósseo permanecem controversos (1,2, 4-6,11,12), não se sabendo exatamente se o componente causador dessas alterações é a cafeína, presente em todas as bebidas (1,4,6,12), ou o ácido fosfórico presente apenas na bebida à base de cola (1,2,12). Entretanto, existe um potencial de que bebidas contendo cola em sua composição podem causar alterações ósseas negativas em ratas fêmeas ovariectomizadas.

Em relação aos tratamentos testados, também foram encontrados efeitos controversos, embora tenha sido observado aumento de densidade mineral óssea quando estes foram associados aos grupos com qualidade óssea prejudicada. Para elucidar essas questões, são necessários trabalhos futuros que avaliem outros fatores como tempo de administração das bebidas e dos tratamentos, e outras análises que justifiquem os resultados encontrados.

CONCLUSÃO

Em conclusão, com base na configuração experimental utilizada e considerando as limitações descritas acima, sugere-se haver relação entre alteração óssea e consumo de refrigerante à base de cola; nesse caso, o tratamento com alendronato de sódio ou solução de cálcio resultou em melhora da qualidade óssea. O consumo de café ou de refrigerante à base de guaraná não causou alteração óssea significativa, e quando associado ao tratamento com alendronato de sódio apresentou diminuição nos valores de DMO para os animais que consumiram café e diminuição na resistência à fratura para os animais que consumiram guaraná.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores negam quaisquer conflitos de interesse relacionados à este estudo.

REFERÊNCIAS

1. García-Contreras F, Paniagua R, Avila-Díaz M, Cabrera-Muñoz L, Martínez-Muñíz I, Foyo-Niembro E, Amato D. (2000) Cola beverage consumption induces bone mineralization reduction in ovariectomized rats. *Archives of Medical Research* 31, 360-365.
2. Tucker KL, Morita K, Qiao N, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP. (2006) Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr* 84, 936-42.
3. Williams KB. (2007) Bone density and consumption of cola beverages. *Journal of Dental Hygiene* 82(1), 1-4.
4. Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. (2011) Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *Journal of Orthopaedic Research* 29, 954-960.
5. Supplee JD, Duncan GE, Bruemmer B, Goldberg J, Wen Y, Henderson JA. (2011) Soda intake and osteoporosis risk postmenopausal American-Indian women. *Public Health Nutrition* 14(11), 1900-1906.
6. Folwarczna J, Zych M, Nowinska B, Pytlik M, Janas A. (2014) Unfavorable effect of trigonelline, an alkaloid present in coffee and fenugreek, on bone mechanical properties in estrogen-deficient rats. *Mol Nutr Food Res* 58, 1457-1464.
7. Herrero S e Pico Y. (2016) Can a healthy life prevent us from post-menopausal osteoporosis? Myths and truths. *PharmaNutrition* 4, 45-53.
8. Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, Aoki K, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. (2003) Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Diseases* 9, 24-28.

9. Silverthorn DU, Ober WC, Garrison CW, Silverthorn AC. (2003) Equilíbrio Energético, Metabolismo e Crescimento. Fisiologia Humana uma abordagem integrada 2ª edição. São Paulo, Editora Manole 21, 639-684.
10. Mohamed MT, Abuelezz SA, Atalla SS, Aziz LFAE, Gorge SS. (2017) The anti-osteoporotic and anti-atherogenic effects of alendronate and simvastatin in ovariectomized rats fed high fat diet: A comparative study of combination therapy versus monotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89, 1115-1124.
11. Kinney MAO e Fitzpatrick LA. (2002) Does consumption of cola beverages cause bone fractures in children? *Mayo Clin Proc* 77, 1005-1006.
12. Ogur R, Uysal B, Ogur T, Yaman H, Oztas E, Ozdemir A, Hasde M. (2007) Evaluation of the effect of cola drinks on bone mineral density and associated factors. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 100, 334-338.
13. Teófilo JM, Leonel DV, Lamano T. (2010) Cola beverage consumption delays alveolar bone healing: a histometric study in rats. *Braz Oral Res* 24(2), 177-181.
14. Lacerda SA, Matuoka RI, Macedo RM, Petenusci SO, Campos AA, Brentegani LG. (2010) Bone quality associated with daily intake of coffee: A biochemical, radiographic and histometric study. *Braz Dent J* 21(3), 199-204.
15. Paccou J, Edwards MH, Ward K, Jameson K, Moon R, Dennison E, Cooper C. (2015) Relationships between bone geometry, volumetric bone mineral density and bone microarchitecture of the distal radius and tibia with alcohol consumption. *Bone* 78, 122-129.
16. Yano T, Yamada M, Konda T, Shiozaki M, Inoue D. (2014) Residronate improves bone architecture and strength faster than alendronate in ovariectomized rats on a low-calcium diet. *J Bone Miner Metab* 32(6), 653-659.
17. McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison S, Dian L, Hanley DA, Kendler DL, Yuen CK, Lewiecki M. (2013) Bisphosphonate Therapy for Osteoporosis: Benefits, Risks, and Drug Holiday. *The American Journal of Medicine* 126, 13-20.
18. Liu L, Li Chunyan L, Yang P, Zhu J, Gan D, Bu L, Zhang M, Sheng C, Li H, Qu S. (2015) Association between alendronate and atypical femur fractures: a meta-analysis. *Endocrine*

Connections 4, 58-64.

19. Jin A, Cobb J, Hansen U, Bhattacharya R, Reinhard C, Vo N, Atwood R, Li J, Karunaratne A, Wiles C, Abel R. (2017) The effect of long-term bisphosphonate therapy on trabecular bone strength and microcrack density. *Bone Joint Res* 6, 602-609.
20. Cho K, Cederholm T, Lökk J. (2008) Calcium intake in elderly patients with hip fractures. *Food & Nutrition Research*, doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1654.
21. Saini AK, Dawe EJC, Thompson SM, Rosson JW. (2017) Vitamin D and calcium supplementation in elderly patients suffering fragility fractures; the road not taken. *The Open Orthopaedics Journal* 11, 1230-1235.
22. Schimpl FC, Silva JF, Gonçalves JFC, Mazzafera P. (2013) Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology* 150, 14-31.
23. Marques LLM, Panizzon GP, Aguiar BAA, Simionato AS, Cardozo-Filho L, Andrade G, Oliveira AG, Guedes TA, Mello JCP. (2016) Guaraná (*Paullinia Cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chemistry* 212, 703-711.
24. Jiménez-Zamora A, Pastoriza S, Rufián-Henares JA. (2015) Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *Food Science and Technology* 61, 12-18.
25. Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. (2001) Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr* 74, 694-700.
26. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, Yukawa S. (2001) Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone* 28, 332-336.
27. Heaney RP. (2002) Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1263-1270.
28. Gomes CC, Freitas DQ, Araújo AMM, Ramízes- Sotelo LR, Yamamoto-Silva FP, Silva BSF, Távora DM, Almeida SM. (2017) Effect of Alendronate on Bone Microarchitecture in Irradiated Rats With Osteoporosis: Micro-CT and Histomorphometric Analysis. *J Oral Maxillofac Surg* ?, 1-10.

29. Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M, Gunji A, Hakozaiki k, Akimoto Y, Fujii A. (2008) Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab* 26, 130-137.
30. Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Freeman A, Quan H, Lasseter KC, Mucklow JC, Porras AG. (1995) Studies of the oral bioavailability of alendronate. *Clin Pharmacol Ther* 58, 288-298.

2.1 ARTIGO – Versão em Inglês: Effect of a diet based on cola, guarana and caffeine in ovariectomized rats submitted calcium and alendronate treatment.

A versão em inglês desse artigo, intitulado “*Effect of a diet based on cola, guarana and caffeine in ovariectomized rats submitted calcium and alendronate treatment*”, foi submetida, no dia 23 de janeiro de 2018, à apreciação (Anexo 1), visando à publicação, ao periódico Journal of Oral Science. A estruturação do artigo baseou-se nas “Instruções aos autores” preconizadas pela editora do periódico.

Original Article

Effect of a diet based on cola, guarana and caffeine in ovariectomized rats submitted a calcium and alendronate treatment.

Debora Duarte Moreira¹, Amaro Ilidio Vespasiano Silva², Débora de Melo Távora³, Gina Délia Roque-Torres⁴, Cinthia Pereira Machado Tabchoury⁵, Solange Maria de Almeida Boscolo⁶

1 - DDS, MSc, PhD student, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

2 - DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Pontifícia Universidade Católica, Belo Horizonte, MG, Brazil.

3 – DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza, Fortaleza, CE, Brazil.

4 - DDS, MSc, PhD, Research Associate, Center of Dental Research, Loma Linda University, Loma Linda, CA, USA.

5 - DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Physiological Science, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

6 - DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Corresponding author:

Debora Duarte Moreira

E-mail address: dededm@hotmail.com

Av. Limeira, 901, Areião - Piracicaba, SP – Brazil, 13414-903

Phone: 55 19 21065227

ABSTRACT

Objective: Consumption of soft drinks has been associated with bone alterations. The aim of this study was to evaluate the effect of cola, guarana, and caffeine beverages in the bone and the effect of treatment with sodium alendronate and calcium solution in ovariectomized rats.

Methodology: 91 rats were ovariectomized and divided into 13 groups that consumed water, cola, guarana or coffee beverages and were treated by alendronate or calcium. The analysis of bone mineral density (BMD), bone strength and serum levels of calcium and phosphorus was performed. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) with factorial design (4x3+1) with additional treatment at a significance level of 5%.

Results: A significant decrease of BMD in the OVX cola group was observed. The OVX coffee and OVX guarana groups showed a significant increase of BMD. The treatment with sodium alendronate promoted a significant increase of BMD in the control OVX and OVX cola groups, while calcium solution only increases the OVX cola group.

Conclusions: Our study suggested that the bone quality was negatively influenced by the consumption of cola. The sodium alendronate or calcium solution treatment was effective in cases of consumption of cola soft drink and caused a decrease in the bone quality when associated with guarana and coffee.

Key words: Bone Density, Densitometry, Caffeine, Soft drinks, Alendronate.

INTRODUCTION

Recently, special attention has been paid to the osteoporosis that has become an increasingly common disease, due to increased life expectancy. The osteoporosis, favors the increase of fractures in the hip, which can lead to death or special care for long periods (1-7). Women get more affected by this disease, especially after menopause, due to atrophy of the ovaries and consequent decrease of circulating estrogen (1,2,5,7-10).

Besides age and sex, other factors have been often associated with osteoporosis such as race, family history, smoking, weight, sedentary lifestyle, calcium and vitamin D deficiency, hyperprotein diets, alcohol consumption, carbonated beverages such as soft drinks; especially those has cola in their composition; and high coffee consumption (1-4,6,7,11-15).

When osteoporosis is installed, treatments are needed in order to minimize the caused damage. Bisphosphonates, such as alendronate and residronate have been shown to be effective in reducing the risk of fracture and bone mass loss and are considered first-line treatments for osteoporosis (10,16). In contrast, other studies have observed an association between the use of bisphosphonates and decrease of bone strength or atypical femur fractures (17-19).

Calcium and vitamin D consumptions are very important for the maintenance of bone mass and deficiency in calcium intake, which has been considered one of the major risk factors for the development of osteoporosis. (20,21).

It has been observed a large increase in soft drinks consumption of different brands and flavors. In Brazil, the soft drinks most consumed are those made by cola and guarana (22,23), and besides the soft drinks another large-scale drink worldwide consumed is coffee (4,24). These beverages have caffeine and / or phosphoric acid in their composition, which have been associated with adverse effects in the bone such as the decreased of bone mineral density (BMD), and increased risk of fractures (1,2,4-6,11,12).

Phosphoric acid present mainly in soft drinks made by cola seems to be associated with an interference with intestinal calcium absorption, which leads to an imbalance of the parathyroid hormone (PTH) increasing osteoporosis levels (1,2,11,12). Caffeine was associated in some studies such as Rapuri *et al.*, with decreased of BMD in the spine region in postmenopausal period (25), as well as in the reduction of BMD in growing rats due to an increase in the osteoclastic activity (4).

On the other hand, some studies did not find an association between soft drink consumption, especially those not cola based, with decreased of BMD or osteoporosis (2,5). In others, no association was found between coffee consumption and bone loss in rats (26), especially if there is an ingestion of recommended amounts of calcium (27).

Ahead the increase of soft drinks and coffee consumption and its relation with negative bone alterations, the aim of this study was to evaluate the effect of cola, guarana, and caffeine beverages on BMD, bone strength, serum levels of calcium and phosphorus in ovariectomized rats, as well as to evaluate the effect of the treatment by sodium alendronate and calcium solution over the possible induced bone alterations.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Committee on Animal Research and Ethics under the protocol number 3647-1. 91 female rats (*Rattus norvegicus* Albinus, Wistar) with 90 days of life and weight ranging from 250-300 grams were used. Throughout all the study, the animals were kept in standard boxes, with a temperature between 22-25 °C, humidity of 30-60% and under a 12 –h light-dark cycle, and fed with food *ad libitum* and consumption of 500 ml of water per day.

At 90 days, total ovariectomy were performed in all the animals, with exception of seven of them. These last, belonging to the absolute control group, were performed only the *sham* procedure, which consisted of exposure of the ovaries without removal (28).

After performing the surgical procedure, the animals were randomly divided into thirteen groups, according to the drink and/or treatment, with seven animals each, as shown in Figure 1.

Figure 1: Groups used in the study

Group	Surgical procedure	Treatment	Administered substances
Absolute Control	----	----	Water
Control OVX	Ovariectomy	----	Water
OVX Cola	Ovariectomy	----	Water + Cola
OVX Guarana	Ovariectomy	----	Water + Guarana
OVX Coffee	Ovariectomy	----	Water + Coffee
OVX Alendronate	Ovariectomy	Alendronate	Water
OVX Ale Cola	Ovariectomy	Alendronate	Water + Cola
OVX Ale Guarana	Ovariectomy	Alendronate	Water + Guarana
OVX Ale Coffee	Ovariectomy	Alendronate	Water + Coffee
OVX Calcium	Ovariectomy	Calcium	Water
OVX Calcium Cola	Ovariectomy	Calcium	Water + Cola
OVX Calcium Guarana	Ovariectomy	Calcium	Water + Guarana
OVX Calcium Coffee	Ovariectomy	Calcium	Water + Coffee

After 45 days of the ovariectomy, the administration of the beverages was started. Each cage used in the survey had two bottles, one containing 500 ml of water and the other containing 500 ml of the selected beverage for each specific group.

The beverages based on cola, guarana and coffee were administered during 50 days for each group and the bottles were placed next to each other, and their position inverted daily in order to not induce the consumption of the same beverage. At each exchange, the volume of liquid was measured to determine the mean consumed by each group. All animals were weighed weekly during the beverages consumption to assess loss and/or gain of weight.

At the same time of the beverages administration was started, the sodium alendronate syrup (5.0 mg/kg) and the calcium solution (16.0 mg/kg) were administrated three times per week by the gavage procedure. In the other groups that were not included in the treatment groups, the *sham* gavage procedure was performed.

After 50 days of administration of the beverages based on cola, guarana and caffeine, all animals were sacrificed by the decapitation method. At this moment, the blood was collected from each of them, which was centrifuged immediately to separation the blood plasma for the

subsequent biochemical analysis. In addition, the right and left femurs were dissected and stored in 10% buffered formol® (Indalabor, Minas Gerais, Brazil).

Three different methods of sample evaluation were performed:

1. Bone mineral density analysis by bone densitometry examination: the left femurs were scanned by the dual energy x-Ray absorptiometry (DXA) DPX-Alpha, Lunar® (GE Healthcare, Madison, WI, USA), submerged in water to soft tissue simulation. The images were evaluated in the own software of the device, which allowed the selection of the region of interest and thus calculate the BMD in g/cm²;
2. Analysis of bone strength in the Instron device (Instron Corporation, Canton, MA, USA): the right femur was positioned parallel to the base of support, then a perpendicular load was applied in the diaphysis at speed of 1.3mm/min until fracture occurred, and the maximum force exerted were measured in Newtons (N);
3. Plasma Biochemical analysis using the Bioclin Kit (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brazil) for the determination of calcium and phosphorus serum concentrations and subsequent measurement of the absorbance of the solutions using the DU 800 digital spectrophotometer (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA).

The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) with factorial design (4x3+1) and to additional treatment at a significance level of 5% to evaluate the effect of the different beverages and treatments applied in ovariectomized rats.

RESULTS

Figure 2 shows the weekly variation of the mass rats, and a higher numerical gain was observed in the group that consumed beverages based on guarana without treatment.

Figure 2. Weekly mass variation of rats.

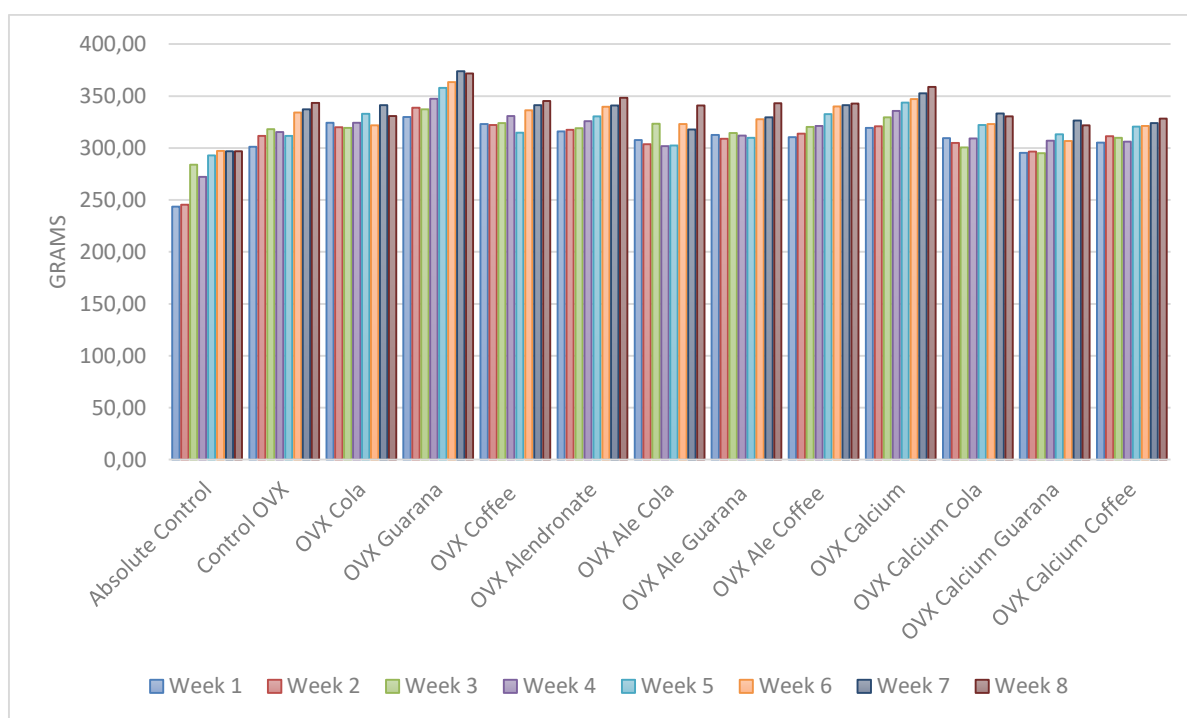
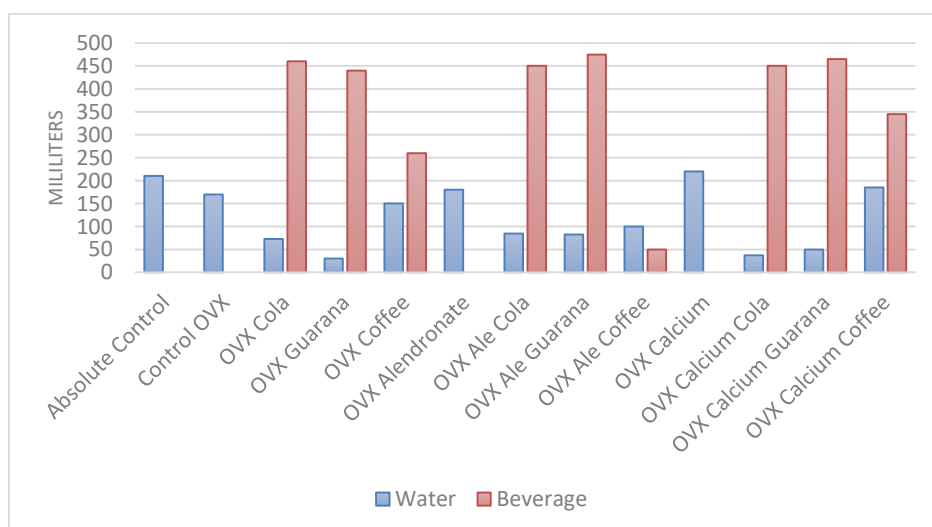


Figure 3 shows the mean consumption of each beverage during the time of administration by each group.

Figure 3. Mean daily consumption of each beverage per group.



Ovariectomy:

It was possible observe a statistically significant difference in relation to the densitometry test (Table 1) and to the calcium and phosphorus serums levels in the plasma blood (Table 3) between the Absolute Control and Control OVX group, with the groups submitted to the ovariectomy procedure showing lower values in the densitometry and phosphorus serum level, as well as higher values for calcium serum level.

Densitometry:

The Control OVX group presented significantly lower values (0.172) compared to the Absolute Control group (0.251) by the densitometry test. The OVX Cola group had significantly lower BMD values (0.151), both in relation to Control OVX (0.172), OVX Guaraná (0,242) and OVX Coffee (0,232) groups, those 3 groups presented no significant difference between them. Only the OVX Guaraná group (0.242) did not showed a significant difference compared to the Absolute Control group (0.251), also this one had a higher values in the densitometry test when compared to Control OVX (0.172) and OVX Cola (0.151) groups. (Table 1).

It was observed in the sodium alendronate groups, a significant increase of BMD in the Control OVX (0.233) and OVX Cola (0.246) groups. Meanwhile, a decrease of BMD was observed in the OVX Guarana (0.240) and OVX Coffee (0.202) groups, in this latter one presented in a significant way (Table 1).

Calcium administration did not result in significant alterations in bone densitometry in the Control OVX (0.159), OVX Guarana (0.235) and OVX Coffee (0.227) groups, however a significant increase of the values was observed in the OVX Cola group (0.240) (Table 1).

Table 1. Mean and standard deviation of the analyzed variables as a function of treatment in relation to densitometry.

Group	Treatment		
	None	Alendronate	Calcium
		Densitometry (g/cm ²)	
Control OVX	*0,172 (0,013) Bb	*0,233 (0,011) Aa	*0,159 (0,012) Bb
OVX Cola	*0,151 (0,015) Bc	0,246 (0,008) Aa	0,240 (0,006) Aa
OVX Guarana	0,242 (0,011) Aa	0,240 (0,011) Aa	0,235 (0,009) Aa
OVX Coffee	*0,232 (0,013) Aa	*0,202 (0,010) Bb	*0,227 (0,011) Aa
Absolute Control	0,251 (0,008)		

*Differs from the absolute control group ($p \leq 0,05$). Means followed by distinct letters (horizontal uppercase and vertical lowercase for each variable) differ from each other ($p \leq 0,05$).

Analysis of Bone Strength:

In the analyze of the strength needed to produce bone fracture, which indicates bone strength, was observed no significant statistical difference between the Absolute Control (132.62), Control OVX (144.42), OVX Cola (122.40) and OVX Coffee (149,60) groups. However, the strength in the OVX Guarana group (169.85) was higher compared to all groups, being statistically significant in relation to the Absolute Control group (Table 2).

In animals treated with sodium alendronate and calcium solution, was observed a significant increase in bone resistance to fracture compared to the resistance in the Absolute Control group. Meanwhile, in animals with consumption of coffee and cola, these treatments did not result in a significant alteration in bone strength to promote fracture compared to the Absolute Control group. Finally, the OVX Guarana group with administration of alendronate required less strength above the bone to cause fracture, and those with calcium solution did not significantly alter the strength required to promote fracture in relation to the other groups with consumption of Guarana. (Table 2).

Table 2. Mean and standard deviation of the analyzed variables as a function of the treatment in relation to bone strength.

Group	Treatment		
	None	Alendronate	Calcium
	Fracture (N)		
Control OVX	144,42 (9,829) Aab	*160,89 (17,345) Aa	*166,66 (5,933) Aa
OVX Cola	122,40 (16,540) Ab	140,93 (14,666) Aa	141,97 (15,792) Aab
OVX Guarana	*169,85 (11,593) Aa	142,09 (7,696) Ba	149,61 (10,023) ABab
OVX Coffee	149,60 (20,285) Aa	147,58 (12,196) Aa	136,31 (15,792) Ab
Absolute Control	132,62 (20,074)		

* Differs from the absolute control group ($p \leq 0,05$). Means followed by distinct letters (horizontal upcase and vertical lowercase for each variable) differ from each other ($p \leq 0,05$).

Biochemical Analysis:

Calcium

The administration of the different beverages did not significantly alter the calcemia in relation to the Control OVX group. Nevertheless, the OVX Coffee group had higher calcemia indices compared to the other groups (Table 3).

The administration of alendronate and calcium solution produced an increase of the calcemia of the Control OVX group. However, in the OVX Cola and OVX Guaraná groups the

administration of alendronate and calcium solutions did not change the calcemia. Lately, the OVX Coffee group presented lower calcium levels in blood plasma when administered the treatment substances like an alendronate or calcium solution. (Table 3).

Phosphorus

Among the animals undergoing ovariectomy, the control OVX group did not present significant difference compared to the test groups (OVX cola, OVX guarana and OVX coffee) (Table 3).

The administration of Alendronate did not result in a significant difference in the phosphorus level compared to the Control OVX group, independent of the beverages consumption by the animals. When administered the calcium solution, a significant increase of phosphorus level in the blood plasma was observed compared to the control OVX group, but not in relation to the Alendronate group (Table 3).

Both the alendronate and calcium solution administration in the OVX coffee group produced a significant decrease of phosphorus levels in the blood plasma compared to the OVX coffee group that did not received any treatment (Table 3).

Table 3. Mean and standard deviation of the analyzed variables as a function of the treatment in relation to the analysis of the calcium and phosphorus levels.

Group	Treatment		
	None	Alendronate Calcium Level	Calcium
Control OVX	*0,337 (0,045) Bab	*0,464 (0,048) Aa	*0,476 (0,050) Aa
OVX Cola	*0,304 (0,016) Ab	*0,312 (0,020) Ab	*0,297 (0,030) Ab
OVX Guarana	*0,330 (0,058) Ab	*0,296 (0,023) Ab	*0,298 (0,017) Ab
OVX Coffee	*0,399 (0,056) Aa	*0,319 (0,048) Bb	*0,292 (0,030) Bb
Absolute Control	0,137 (0,054)		
		Phosphorus Level	
Control OVX	*0,373 (0,004) Ba	*0,412 (0,067) ABa	0,506 (0,054) Aa
OVX Cola	*0,417 (0,040) Aa	*0,389 (0,058) Aa	*0,394 (0,068) Ab
OVX Guarana	*0,425 (0,103) Aa	*0,377 (0,048) Aa	*0,368 (0,057) Ab
OVX Coffee	0,496 (0,104) Aa	*0,343 (0,049) Ba	*0,336 (0,024) Bb
Absolute Control	0,559 (0,098)		

* Differs from the absolute control group ($p \leq 0,05$). Means followed by distinct letters (horizontal uppercase and vertical lowercase for each variable) differ from each other ($p \leq 0,05$).

DISCUSSION

The experimental model of ovariectomized rats has been considered one of the best models to study osteoporosis since ovarian removal induces the loss of BMD due to estrogen deficiency.

This hormone is responsible for protecting bone mass by inhibiting paracrine substances, that promote bone resorption, especially the parathyroid hormone (PTH) (8-10,30) as observed in the present study where the group which had ovariectomy (Control OVX group) presented lower values of BMD and phosphorus level and higher calcium levels in the blood plasma when compared to those who did not undergo to this procedure (Absolute Control group), factors that suggest the induction of bone mineral loss.

The animals with consumption of beverages made by cola, guarana and coffee, which are widely consumed beverages and that have been associated with increased loss of bone mineral density and decrease in bone strength due to the presence of caffeine and/or phosphoric acid in their composition (1,2,4-6,11,12,25).

The analysis on the femur performed by the DXA in the present study suggest, the consumption of beverages as the cola has the potential to decrease the BMD which is corroborate in several studies found in the literature (1,2,12). Presumably, it occurs due to the presence of phosphoric acid in this type of beverage and not in others. This component is associated with interference in intestinal absorption and renal tubular reabsorption of calcium, which contributes to an imbalance of the parathyroid hormone, leading to a bone resorption due to the reestablished of the homeostasis of the serum calcium level (1,2,12), as observed in the present study, which it was not observed alteration in the serum calcium concentration between the OVX Cola group and Control OVX although there was a decrease in BMD due to an increase in bone resorption, at the time of serum calcium analysis, the homeostasis was observed.

Another component present in the cola-based beverage that also has been associated to the decrease of the BMD is the caffeine, which stimulates a differentiation of osteoclastic cells and consequently their activity (1,4,6,12). However, Tucker *et al.* also observed decrease of the BMD in women who consumed decaffeinated cola, and this association was not observed when adjusting the consumption of only caffeine, suggesting caffeine is not directly associated with decreased of the BMD, which was also observed by Supplee *et al.* (2,5). The results in the present study suggest that the guarana and coffee, which are beverages that do not contain phosphoric acid, although they have caffeine in their composition, did not cause alteration of the BMD in ovariectomized rats.

In addition, it was demonstrated that the OVX Guarana group had the BMD values close to those obtained in the Absolute Control group without significant difference, and when

performed the bone strength analysis, the force required to promote fracture in the OVX Guarana group was significantly higher compared to the Absolute Control group. This was probably due to a higher body mass of the rats that consumed guarana when compared to other groups, agreeing with the results obtained by Supplee *et al.* who found an association between increased body mass index and decreased osteoporosis rates in postmenopausal women who regularly consumed some type of soft drink. Although the increase in body mass index may be as a protective factor for the BMD, it is directly associated with other health risk factors such as diabetes and cardiovascular diseases (5).

Moreover, it was possible to observe during the manipulation of the animals that the OVX Guarana group were the most excited, which may be associated with better BMD values since the stimulation by physical activity has been associated with an increase of the BMD (5,7).

Animals with sodium alendronate administration, whose function is to inhibit the action of osteoclasts, had a significant increase in bone densitometry in the Control OVX and OVX Cola groups, which had been showed lowest BMD values without treatment. However, was observed a significant reduction in bone densitometry in the OVX Coffee group, which can be explained by approximately 60% of reduction in the bioavailability of alendronate when it is ingested together with coffee, as indicated in the study by Gertz *et al.* (30). In addition, it was observed less strength needed to promote bone fracture in OVX Guarana group undergoing alendronate sodium treatment. Taking into account that the animals that consumed these type of beverages and without treatment had an improvement in the evaluated bone parameters, it can be associate alendronate sodium treatment with atypical fractures of the femur, as well as decreases in the bone resistance, as reported in other studies (17,18,19).

Although a significant statistical difference was found on BMD when comparing the Control OVX and OVX Cola groups, no significant difference was observed in relation to the same comparison in the fracture test, this may have occurred due to a loss of bone mineral density insufficient to cause decrease of bone strength.

However, when the bone strength was evaluated in ovariectomized rats under alendronate or calcium solution treatment, it was observed a necessity of greater force to cause femur fracture when compared to the Absolute Control group. Result that corroborates with the findings of Jiang *et al.*, which suggest that animals treated with these types of drugs showed an improvement in bone strength. (30).

In animals of the OVX Coffee group, there was a statistically significant reduction in blood plasma calcium levels when administrated the alendronate or calcium solution as a treatment. This fact can be explained by the performance of other mechanisms not evaluated in the present study, such as increased renal excretion of calcium during coffee consumption (5).

The analysis of the results of the present study show that the effects of beverages based on cola, guarana, and coffee on bone metabolism remain controversial (1,2,4-6,11,12), we do not know exactly whether the causative component of these alterations is caffeine, present in all beverages (1,4,6,12), or phosphoric acid present only in the cola drink (1,2,12), there is a potential that beverages containing cola in their composition may cause negative bone changes in ovariectomized female rats.

Regarding the treatments, controversial effects were also found, although an increase in bone mineral density was observed when these were associated with groups with impaired bone quality. In order to elucidate these issues, future work is needed to evaluate other factors such as time of administration of the drinks and treatments, and other analyzes that justify the results found.

CONCLUSION

In conclusion, based on the experimental setup used and considering the limitations as described above, the experimental results showed that there is a relationship between bone alteration and cola consumption; in this case alendronate sodium or calcium solution treatment may result in improvement of bone quality. The consumption of coffee or guarana did not cause significant bone alteration, and when they are associated with sodium alendronate treatment presented a decrease in BMD values for the coffee consumers and a decrease in bone strength for the guarana consumers.

CONFLICT OF INTEREST

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

REFERENCES:

1. García-Contreras F, Paniagua R, Avila-Díaz M, Cabrera-Muñoz L, Martínez-Muñíz I, Foyo-Niembro E, Amato D. (2000) Cola beverage consumption induces bone mineralization reduction in ovariectomized rats. *Archives of Medical Research* 31, 360-365.
2. Tucker KL, Morita K, Qiao N, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP. (2006) Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr* 84, 936-42.
3. Williams KB. (2007) Bone density and consumption of cola beverages. *Journal of Dental Hygiene* 82(1), 1-4.
4. Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. (2011) Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *Journal of Orthopaedic Research* 29, 954-960.
5. Supplee JD, Duncan GE, Bruemmer B, Goldberg J, Wen Y, Henderson JA. (2011) Soda intake and osteoporosis risk postmenopausal American-Indian women. *Public Health Nutrition* 14(11), 1900-1906.
6. Folwarczna J, Zych M, Nowinska B, Pytlik M, Janas A. (2014) Unfavorable effect of trigonelline, an alkaloid present in coffee and fenugreek, on bone mechanical properties in estrogen-deficient rats. *Mol Nutr Food Res* 58, 1457-1464.
7. Herrero S e Pico Y. (2016) Can a healthy life prevent us from post-menopausal osteoporosis? Myths and truths. *PharmaNutrition* 4, 45-53.
8. Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, Aoki K, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. (2003) Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Diseases* 9, 24-28.
9. Silverthorn DU, Ober WC, Garrison CW, Silverthorn AC. (2003) Equilíbrio Energético, Metabolismo e Crescimento. *Fisiologia Humana uma abordagem integrada 2ª edição*. São Paulo, Editora Manole 21, 639-684.
10. Mohamed MT, Abuelezz SA, Atalla SS, Aziz LFAE, Gorge SS. (2017) The anti-

- osteoporotic and anti-atherogenic effects of alendronate and simvastatin in ovariectomized rats fed high fat diet: A comparative study of combination therapy versus monotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89, 1115-1124.
11. Kinney MAO e Fitzpatrick LA. (2002) Does consumption of cola beverages cause bone fractures in children? *Mayo Clin Proc* 77, 1005-1006.
 12. Ogur R, Uysal B, Ogur T, Yaman H, Oztas E, Ozdemir A, Hasde M. (2007) Evaluation of the effect of cola drinks on bone mineral density and associated factors. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 100, 334-338.
 13. Teófilo JM, Leonel DV, Lamano T. (2010) Cola beverage consumption delays alveolar bone healing: a histometric study in rats. *Braz Oral Res* 24(2), 177-181.
 14. Lacerda SA, Matuoka RI, Macedo RM, Petenusci SO, Campos AA, Brentegani LG. (2010) Bone quality associated with daily intake of coffee: A biochemical, radiographic and histometric study. *Braz Dent J* 21(3), 199-204.
 15. Paccou J, Edwards MH, Ward K, Jameson K, Moon R, Dennison E, Cooper C. (2015) Relationships between bone geometry, volumetric bone mineral density and bone microarchitecture of the distal radius and tibia with alcohol consumption. *Bone* 78, 122-129.
 16. Yano T, Yamada M, Konda T, Shiozaki M, Inoue D. (2014) Residronate improves bone architecture and strength faster than alendronate in ovariectomized rats on a low-calcium diet. *J Bone Miner Metab* 32(6), 653-659.
 17. McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison S, Dian L, Hanley DA, Kendler DL, Yuen CK, Lewiecki M. (2013) Bisphosphonate Therapy for Osteoporosis: Benefits, Risks, and Drug Holiday. *The American Journal of Medicine* 126, 13-20.
 18. Liu L, Li Chunyan L, Yang P, Zhu J, Gan D, Bu L, Zhang M, Sheng C, Li H, Qu S. (2015) Association between alendronate and atypical femur fractures: a meta-analysis. *Endocrine Connections* 4, 58-64.
 19. Jin A, Cobb J, Hansen U, Bhattacharya R, Reinhard C, Vo N, Atwood R, Li J, Karunaratne A, Wiles C, Abel R. (2017) The effect of long-term bisphosphonate

- therapy on trabecular bone strength and microcrack density. *Bone Joint Res* 6, 602-609.
20. Cho K, Cederholm T, Lökk J. (2008) Calcium intake in elderly patients with hip fractures. *Food & Nutrition Research*, doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1654.
 21. Saini AK, Dawe EJC, Thompson SM, Rosson JW. (2017) Vitamin D and calcium supplementation in elderly patients suffering fragility fractures; the road not taken. *The Open Orthopaedics Journal* 11, 1230-1235.
 22. Schimpl FC, Silva JF, Gonçalves JFC, Mazzafera P. (2013) Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology* 150, 14-31.
 23. Marques LLM, Panizzon GP, Aguiar BAA, Simionato AS, Cardozo-Filho L, Andrade G, Oliveira AG, Guedes TA, Mello JCP. (2016) Guaraná (*Paullinia Cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chemistry* 212, 703-711.
 24. Jiménez-Zamora A, Pastoriza S, Rufián-Henares JA. (2015) Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *Food Science and Technology* 61, 12-18.
 25. Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. (2001) Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr* 74, 694-700.
 26. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, Yukawa S. (2001) Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone* 28, 332-336.
 27. Heaney RP. (2002) Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1263-1270.
 28. Gomes CC, Freitas DQ, Araújo AMM, Ramízes- Sotelo LR, Yamamoto-Silva FP, Silva BSF, Távora DM, Almeida SM. (2017) Effect of Alendronate on Bone Microarchitecture in Irradiated Rats With Osteoporosis: Micro-CT and Histomorphometric Analysis. *J Oral Maxillofac Surg* ?, 1-10.
 29. Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M, Gunji A, Hakozaki k, Akimoto Y, Fujii A. (2008) Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible

and femur of osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab* 26, 130-137.

30. Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Freeman A, Quan H, Lasseter KC, Mucklow JC, Porras AG. (1995) Studies of the oral bioavailability of alendronate. *Clin Pharmacol Ther* 58, 288-298.

3 CONCLUSÃO

Foi possível concluir com o presente trabalho que pode se sugerir uma relação entre alteração óssea e consumo de refrigerante à base de cola em ratas ovariectomizadas e que essas alterações podem ser atenuadas realizando-se o tratamento com alendronato de sódio ou solução de cálcio que por sua vez promovem melhora na qualidade óssea. Ainda, que o consumo de café ou refrigerante à base de guaraná parecem não estar associados a alterações ósseas, podendo inclusive causar melhora na qualidade óssea como visto quando administrada a bebida à base de guaraná. Nesses casos onde não ocorreu alteração óssea, o tratamento com as substâncias administradas não surtiu efeito positivo, apresentando efeito maléfico quando associado ao consumo de café.

REFERÊNCIAS*

Cho K, Cederholm T, Lökk J. Calcium intake in elderly patients with hip fractures. *Food & Nutrition Research*. 2008. DOI: 10.3402/fnr.v52i0.1654.

Folwarczna J, Zych M, Nowinska B, Pytlik M, Janas A. Unfavorable effect of trigonelline, an alkaloid present in coffee and fenugreek, on bone mechanical properties in estrogen-deficient rats. *Mol. Nutr. Food Res*. 2014;58:1457-1464.

García-Contreras F, Paniagua R, Avila-Díaz M, Cabrera-Muñoz L, Martínez-Muñíz I, Foyo-Niembro E, Amato D. Cola beverage consumption induces bone mineralization reduction in ovariectomized rats. *Archives of Medical Research*. 2000; 31:360-365.

Guyton AC. *Metabolismo do Cálcio, Osso, Hormônio Paratireoideano e a Fisiologia do Osso. Fisiologia Humana 6ª edição*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988. Cap. 36 P. 484-497.

Heaney RP. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food and Chemical Toxicology*. 2002;40:1263-1270.

Herrero S e Pico Y. Can a healthy life prevent us from post-menopausal osteoporosis? Myths and truths. *PharmaNutrition*. 2016;4:45-53.

Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M, Gunji A, Hakozaiki k, Akimoto Y, Fujii A. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab*. 2008;26:130-137.

Jiménez-Zamora A, Pastoriza S, Rufián-Henares JA. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *Food Science and Technology*. 2015;61:12-18.

Jin A, Cobb J, Hansen U, Bhattacharya R, Reinhard C, Vo N, Atwood R, Li J, Karunaratne A, Wiles C, Abel R. The effect of long-term bisphosphonate therapy on trabecular bone strength and microcrack density. *Bone Joint Res*. 2017;6:602-609.

Kinney MAO e Fitzpatrick LA. Does consumption of cola beverages cause bone fractures in children? *Mayo Clin Proc*. 2002; 77:1005-1006.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors – Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, Aoki K, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Diseases*. 2003;9:24-28.
- 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(3):199-204.
- Liu L, Li Chunyan L, Yang P, Zhu J, Gan D, Bu L, Zhang M, Sheng C, Li H, Qu S. Association between alendronate and atypical femur fractures: a meta-analysis. *Endocrine Connections*. 2015;4:58-64.
- Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *Journal of Orthopaedic Research* 2011;29:954-960.
- Marques LLM, Panizzon GP, Aguiar BAA, Simionato AS, Cardozo-Filho L, Andrade G, Oliveira AG, Guedes TA, Mello JCP. Guaraná (*Paullinia Cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2016;212:703-711.
- McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison S, Dian L, Hanley DA, Kendler DL, Yuen CK, Lewiecki M. Bisphosphonate Therapy for Osteoporosis: Benefits, Risks, and Drug Holiday. *The American Journal of Medicine*. 2013;126:13-20.
- Mingori MR, Heimfarth L, Ferreira CF, Gomes HM, Moresco KS, Delgado J, Roncato S, Zeidán-Chuliá F, Gelain DP, Moreira JCF. Effect of *Paullinia cupana* mart. Commercial extract during the aging of middle age *Wistar* rats: Differential effects on the hippocampus and striatum. *Neurochem Res*. 2017;42:2257-2273.
- Mohamed MT, Abuelezz SA, Atalla SS, Aziz LFAE, Gorge SS. The anti-osteoporotic and anti-atherogenic effects of alendronate and simvastatin in ovariectomized rats fed high fat diet: A comparative study of combination therapy versus monotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;89:1115-1124.
- Ogur R, Uysal B, Ogur T, Yaman H, Oztas E, Ozdemir A, Hasde M. Evaluation of the effect of cola drinks on bone mineral density and associated factors. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2007;100:334-338.

- Paccou J, Edwards MH, Ward K, Jameson K, Moon R, Dennison E, Cooper C. Relationships between bone geometry, volumetric bone mineral density and bone microarchitecture of the distal radius and tibia with alcohol consumption. *Bone*. 2015;78:122-129.
- Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:694-700.
- Saini AK, Dawe EJC, Thompson SM, Rosson JW. Vitamin D and calcium supplementation in elderly patients suffering fragility fractures; the road not taken. *The Open Orthopaedics Journal*. 2017;11:1230-1235.
- Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, Yukawa S. Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone*. 2001;28:332-336.
- Schimpl FC, Silva JF, Gonçalves JFC, Mazzafera P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;150:14-31.
- Silverthorn Silverthorn DU, Ober WC, Garrison CW, Silverthorn AC. Equilíbrio Energético, Metabolismo e Crescimento. *Fisiologia Humana uma abordagem integrada 2ª edição*. São Paulo, Editora Manole, 2003. Cap. 21 P. 639-684.
- Supplee JD, Duncan GE, Bruemmer B, Goldberg J, Wen Y, Henderson JA. Soda intake and osteoporosis risk postmenopausal American-Indian women. *Public Health Nutrition* 2011;14(11):1900-1906.
- Teófilo JM, Leonel DV, Lamano T. Cola beverage consumption delays alveolar bone healing: a histometric study in rats. *Braz Oral Res*. 2010;24(2):177-181.
- Tucker KL, Morita K, Qiao N, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP. Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr* 2006;84:936-42.
- Williams KB. Bone density and consumption of cola beverages. *Journal of Dental Hygiene*. 2007;82(1):1-4.
- Yano T, Yamada M, Konda T, Shiozaki M, Inoue D. Residronate improves bone architecture and strength faster than alendronate in ovariectomized rats on a low-calcium diet. *J Bone Miner Metab*. 2014;32(6):653-659.

APÊNDICE 1

METODOLOGIA DETALHADA

O projeto da presente pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP, sob protocolo de número 3647-1 (Anexo 2).

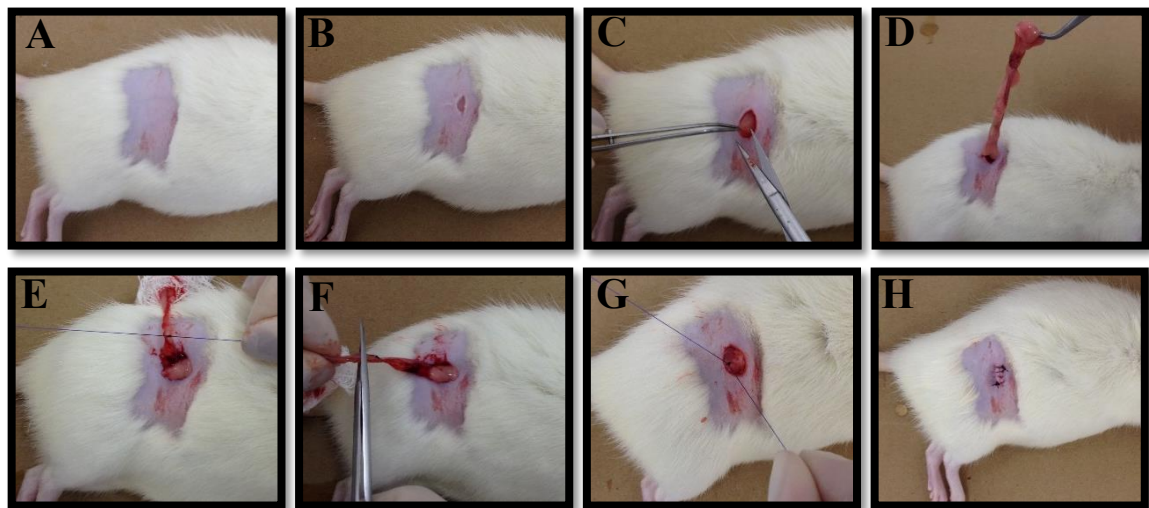
Para a realização deste estudo, foram utilizadas 91 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus Albinus, Wistar*) com 90 dias de vida e peso variando de 250-300 gramas, procedentes do Biotério Central da Unicamp. Durante toda a pesquisa, os animais foram mantidos em caixas padrão de policarbonato, estas com dimensões de 40 x 32 x 17 cm, submetidos à temperatura de 22-25 °C, umidade de 30-60% e ciclos de 12 horas dia e 12 horas noite e alimentados com ração padrão *ad libitum* e 500 ml de água por dia.

OVARIECTOMIA (OVX)

Aos 90 dias, todos os animais foram pesados e, em seguida, anestesiados via intramuscular com 0,1 mg/kg de solução de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® Agribands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil) e 0,05 mg/kg de solução de Cloridrato de Xylasina (Rompum®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). Após tricotomia da região abdominal bilateral e antissepsia local com álcool iodado, foram realizadas as incisões cutâneas e musculares bilaterais em sentido longitudinal, na região da última costela e próxima ao nível do rim, sendo o tecido muscular divulsionado para exposição dos ovários e realizada a homeostasia por meio da ligação da parte superior do tubo uterino com auxílio de fio de sutura 3.0 (Ethicon, Johnson do Brasil S.A., São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida foram excecionados os ovários e a gordura circundante. A musculatura e a pele foram então suturadas com fio Mononylon 4.0 (Ethicon, Johnson do Brasil S.A., São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 1). Os animais receberam 1mg/kg de antibiótico por via intramuscular (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Laboratório FORT DODGE Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil).

Figura 1. Cirurgia de ovariectomia. A – Tricotomia da região abdominal lateral; B – Incisão cutânea; C – Incisão muscular; D – Exposição do ovário; E – Ligação do tubo uterino; F – Excisão do ovário; G – Sutura muscular; H - Sutura cutânea.

Apêndice 1



GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após a realização da cirurgia de ovariectomia, os animais foram separados aleatoriamente em 13 grupos, de acordo com a bebida e/ou tratamento administrados, contendo 7 animais em cada, como apresentado no quadro 1 a seguir:

Quadro 1: Separação dos grupos utilizados no trabalho.

Grupo	Procedimento Cirúrgico	Tratamento	Substâncias administradas
Controle Absoluto	----	----	Água
Controle OVX	Ovariectomia	----	Água
OVX Cola	Ovariectomia	----	Água + Cola
OVX Guaraná	Ovariectomia	----	Água + Guaraná
OVX Café	Ovariectomia	----	Água + Café
OVX Alendronato	Ovariectomia	Alendronato	Água
OVX Ale Cola	Ovariectomia	Alendronato	Água + Cola
OVX Ale Guarana	Ovariectomia	Alendronato	Água + Guaraná
OVX Ale Café	Ovariectomia	Alendronato	Água + Café
OVX Cálcio	Ovariectomia	Cálcio	Água
OVX Cálcio Cola	Ovariectomia	Cálcio	Água + Cola
OVX Cálcio Guaraná	Ovariectomia	Cálcio	Água + Guaraná
OVX Cálcio Café	Ovariectomia	Cálcio	Água + Café

Cada grupo recebeu um tipo de tratamento diferente, sendo eles:

- Grupo 1 (controle absoluto): animais que não foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e nem a qualquer tipo de tratamento ou substância testada;
- Grupo 2 (controle OVX): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, porém que não foram submetidos a qualquer tratamento ou substância testada;
- Grupo 3 (OVX Cola): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, que não foram submetidos a nenhum tratamento, porém foram submetidos à dieta diária com bebida à base de cola - Coca-Cola® (Coca-Cola Company, Atlanta);
- Grupo 4 (OVX Guaraná): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, que não foram submetidos a nenhum tratamento, porém foram submetidos à dieta diária com bebida à base de guaraná - Guaraná Antarctica® (Antarctica, Manaus);
- Grupo 5 (OVX Café): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, que não foram submetidos a nenhum tratamento, porém foram submetidos à dieta diária com bebida à base de café - Três Corações® (Grupo Três Corações, Brasil);
- Grupo 6 (OVX Alendronato): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, e a tratamento com 5,0 mg/kg corpóreo de alendronato de sódio 3 vezes por semana, sem introdução de nenhuma substância testada;
- Grupo 7 (OVX Alendronato Cola): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, a tratamento com 5,0 mg/kg corpóreo de alendronato de sódio 3 vezes por semana e à dieta diária com bebida à base de cola - Coca-Cola® (Coca-Cola Company, Atlanta);
- Grupo 8 (OVX Alendronato Guaraná): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, a tratamento com 5,0 mg/kg corpóreo de alendronato de sódio 3 vezes por semana e à dieta diária com bebida à base de guaraná - Guaraná Antarctica® (Antarctica, Manaus);
- Grupo 9 (OVX Alendronato Café): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, a tratamento com 5,0 mg/kg corpóreo de alendronato de sódio 3 vezes por semana e à dieta diária com bebida à base de café - Três Corações® (Grupo Três Corações, Brasil);

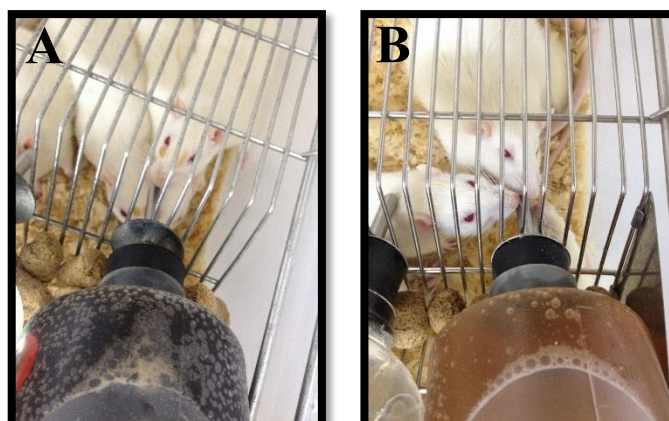
Apêndice 1

- Grupo 10 (OVX Cálcio): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, e a tratamento com 1,8 ml/kg corpóreo de solução de cálcio 3 vezes por semana, sem introdução de nenhuma substância testada;
- Grupo 11 (OVX Cálcio Cola): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, e a tratamento com 1,8 ml/kg corpóreo de solução de cálcio 3 vezes por semana e à dieta diária com bebida à base de cola - Coca-Cola® (Coca-Cola Company, Atlanta);
- Grupo 12 (OVX Cálcio Guaraná): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, e a tratamento com 1,8 ml/kg corpóreo de solução de cálcio 3 vezes por semana e à dieta diária com bebida à base de guaraná - Guaraná Antarctica® (Antarctica, Manaus);
- Grupo 13 (OVX Cálcio Café): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, e a tratamento com 1,8 ml/kg corpóreo de solução de cálcio 3 vezes por semana e à dieta diária com bebida à base de café - Três Corações® (Grupo Três Corações, Brasil).

ADMINISTRAÇÃO DAS BEBIDAS

Após 45 dias do procedimento de ovariectomia, deu-se início à administração das bebidas. Cada gaiola utilizada na pesquisa possuía dois bebedouros, um contendo 500 ml de água e o outro contendo 500 ml da bebida da dieta selecionada para cada grupo específico. As bebidas à base de cola, guaraná e café foram administradas durante 50 dias para cada grupo e os bebedouros foram colocados um ao lado do outro sendo sua posição invertida diariamente a fim de não induzir o consumo da mesma solução (Figura 2). A cada troca, foi medido o volume de líquido para ser determinada a média consumida por cada grupo. Todos os animais foram pesados semanalmente durante todo o tempo de consumo das bebidas para avaliar perda e/ou ganho de peso.

Figura 2. Consumo das bebidas. A – Consumo da bebida à base de cola; B – Consumo da bebida à base de guaraná.



CONSTITUIÇÃO DAS BEBIDAS ADMINISTRADAS

A bebida à base de cola administrada foi a Coca-Cola® (Coca-Cola Company, Atlanta) que possui em sua constituição água gaseificada, açúcar, extrato de noz de cola, cafeína com concentração de 103 mg/L, corante caramelo IV, acidulante ácido fosfórico e aroma natural.

A bebida à base de guaraná testada foi o Guaraná Antarctica® (Antarctica, Manaus), com composta de água gaseificada, açúcar, extrato de guaraná onde é encontrada a cafeína na forma de guaraína com uma concentração de 96 mg/L, corante caramelo IV, acidulante ácido cítrico, conservantes e aromatizante.

O café administrado foi o Café Três Corações® (Grupo Três Corações, Brasil), possuindo vitaminas, aminoácidos, minerais e cafeína com concentração de 700 mg/L em sua composição. Para preparo da bebida, foi utilizada a proporção de 100 gramas de pó por litro de água e 50 gramas de açúcar por litro de café.

ADMINISTRAÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO E DA SOLUÇÃO DE CÁLCIO

No momento do início da administração das bebidas, iniciou-se também para determinados grupos a administração de alendronato de sódio e de uma solução de cálcio três vezes por semana. Nos animais pertencentes aos grupos OVX Alendronato, OVX Alendronato Cola, OVX Alendronato Guaraná e OVX Alendronato Café, foram administrados 5,0 mg/kg de xarope de alendronato de sódio manipulado. Para os animais pertencentes aos grupos OVX Cálcio, OVX Cálcio Cola, OVX Cálcio Guaraná e OVX Cálcio Café, foram administrados 16,0 mg/kg de solução de cálcio manipulado. A administração de ambas as substâncias foi realizada via enteral, utilizando-se uma agulha de gavagem que permite depositar os líquidos diretamente no estômago dos animais. Nos demais grupos que não estavam incluídos nos grupos de tratamento, foi realizado o procedimento de gavagem *sham* (Figura 3).

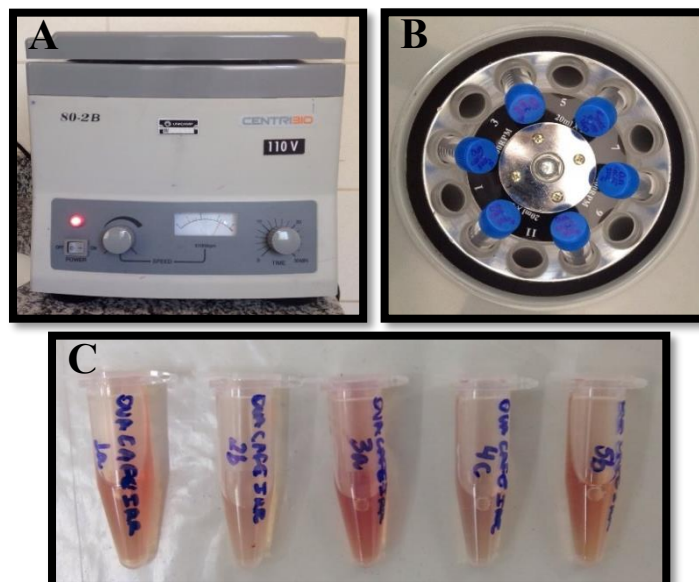
Figura 3. Procedimento de gavagem para administração dos medicamentos.



OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Após 50 dias de administração das bebidas à base de cola, guaraná e café, todos os animais foram sacrificados pelo método de decapitação com guilhotina e o sangue de cada um deles foi colhido imediatamente em tubos heparinizados. Esses tubos foram centrifugados à uma velocidade de 3200 rpm durante 20 minutos para promover a separação do plasma sanguíneo que foi armazenado em micro tubos tipo Eppendorf® (Figura 3) e congelado para posterior análise bioquímica. Além disso, os fêmures direito e esquerdo foram deslocados, removidos e dissecados com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 Solidor® (Solidor, São Paulo, Brasil) e armazenados em recipientes de vidro individuais, contendo formol tamponado a 10%, Formol 10%® (Indalabor, Minas Gerais, Brasil).

Figura 3. Centrifugação do sangue. A – Centrífuga; B – Amostras dispostas antes da centrifugação; C – Micro tubos contendo o plasma.



MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS

No presente estudo, foram utilizados três diferentes métodos de avaliação das amostras:

1. Análise da densidade mineral óssea (Densitometria Óssea), sendo utilizado para tal análise o densitômetro de dupla emissão de raios X (DXA), DPX-Alpha, Lunar[®] (GE Healthcare, Madison, WI, EUA).
2. Análise da resistência óssea utilizando-se para tal a máquina de ensaios mecânicos Instron 4411 (Instron Corporation, Canton, MA, EUA);
3. Análise bioquímica do plasma utilizando-se o Kit Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) em conjunto com um espectrofotômetro digital DU 800 (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, EUA).

DENSITOMETRIA ÓSSEA

Para análise da densidade mineral óssea (DMO), os fêmures esquerdos de cada animal, após dissecados, foram escaneados utilizando-se o densitômetro de dupla emissão de raios X (DXA), DPX-Alpha, Lunar[®] (GE Healthcare, Madison, WI, EUA), pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FOA/UNESP, com o software especial para animais de pequeno porte que foi calibrado diariamente, de acordo com as recomendações do fabricante. As imagens foram adquiridas por meio do escaneamento dos fêmures que foram colocados sempre na mesma posição em um recipiente de plástico contendo dois cm de água, para simulação dos tecidos moles (Figura 4). Após o escaneamento de todos os fêmures, foram realizadas as análises dos exames utilizando a ferramenta de seleção da região de interesse do mesmo software utilizado na aquisição das imagens. Essa ferramenta permitiu selecionar todo o osso do fêmur para que pudesse ser medido o valor da área estudada em cm², o conteúdo mineral ósseo em gramas (g) e com isso ser calculado o valor da densidade mineral óssea (DMO) em g/cm² (Figura 5).

Apêndice 1

Figura 4. Densitômetro de dupla emissão de raios X (DXA), DPX-Alpha, Lunar® (GE Healthcare, Madison, WI, EUA). A – Densitômetro; B – Posicionamento das peças em recipiente plástico submersas em água.



Figura 5. Software para animais de pequeno porte do densitômetro de dupla-emissão de raios X (DXA), DPX-Alpha, Lunar® (GE Healthcare, Madison, WI, EUA) com delimitação da região de interesse do fêmur e valores obtidos.

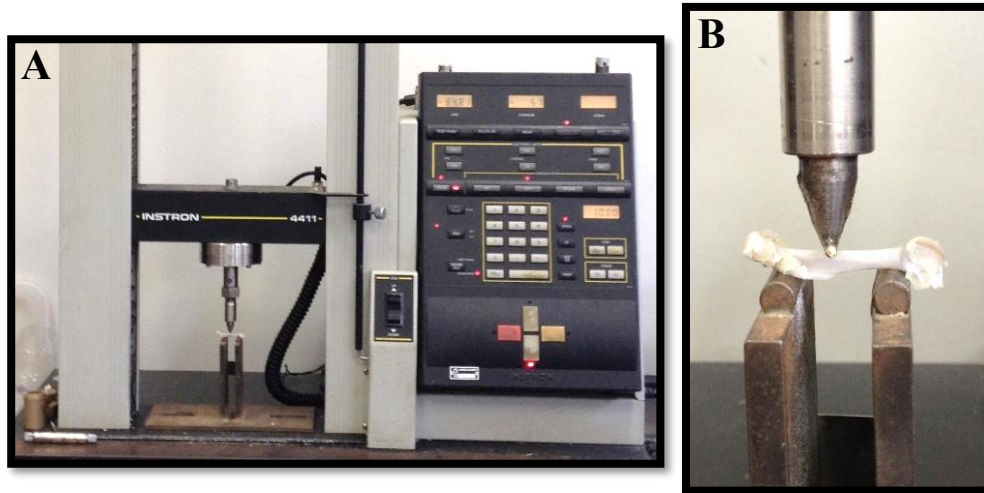


ANÁLISE DA RESISTÊNCIA ÓSSEA

Para análise da resistência óssea, os fêmures direitos de cada animal foram submetidos ao ensaio de resistência à flexão de três pontos numa máquina universal de ensaios mecânicos Instron 4411 (Instron Corporation, Canton, MA, EUA). Cada amostra foi posicionada sempre da mesma maneira sobre dois suportes metálicos, com distância de 20 mm entre eles para que pudessem sofrer a carga aplicada perpendicularmente sobre a diáfise do

fêmur com velocidade de 1,3 mm/min, até que ocorresse a fratura. A força máxima exercida sobre o fêmur para provocar a sua ruptura completa foi expressa em Newtons (N) (Figura 6).

Figura 6. – A - Máquina de ensaio universal Instron 4411 (Instron Corporation, Canton, MA, EUA); B – Posicionamento do fêmur.



ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para realização das análises bioquímicas, o plasma previamente isolado e congelado, foi submetido à testes de dosagem com o Kit Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) para obtenção das concentrações de cálcio e fósforo sérico com auxílio de um espectrofotômetro digital DU 800 (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, EUA).

Cálcio

A análise da quantidade de cálcio presente no plasma sanguíneo, foi realizada com auxílio do Kit Bioclin Cálcio Arsenazo III Ref.:K051-2 (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) pelo método de espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 640nm como recomendado pelo fabricante, e com isso, a absorbância da solução pôde ser medida.

Fósforo

A análise da quantidade de fósforo presente no plasma sanguíneo, foi realizada com auxílio do Kit Bioclin Fósforo Ref.: K020-1 (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) pelo método de espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 340nm como recomendado pelo fabricante, e com isso, a absorbância da solução pôde ser medida.

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial (4x3+1) com tratamento adicional em nível de significância de 5% para avaliar o efeito das diferentes bebidas e dos diferentes tratamentos aplicados em ratas ovariectomizadas.

ANEXO 1 – Comprovante de submissão do artigo ao periódico

Journal of Oral Science - Manuscript ID JOS-18-0022



Journal of Oral Science <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Hoje, 18:29

Você ▾



Responder ▾

24-Jan-2018

Dear Ms. Moreira:

Your manuscript entitled "Effect of a diet based on cola, guarana and caffeine in ovariectomized rats submitted a calcium and alendronate treatment." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Oral Science.

Your manuscript ID is JOS-18-0022.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/josnusd> and edit your user information as appropriate.



You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/josnusd>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Oral Science.

Sincerely,

Editorial Office
Journal of Oral Science
jos@nihon-u.ac.jp

ANEXO 2 – Comitê de Ética em Pesquisa.

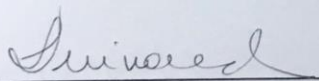
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Avaliação da qualidade óssea em ratas Wistar ovariectomizadas submetidas à dieta diária com café e refrigerantes à base de cola e guaraná, registrada com o nº 3647-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Débora Duarte Moreira, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 19 de janeiro de 2015.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/2015-11/2015
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/2015-07/2015
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / Wistar
No. de animais:	147
Peso / Idade:	90 dias / 250g
Sexo:	Fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

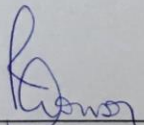
A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 25 de maio de 2016.



Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

2ª. VIA



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>