

MÁRCIO JOSÉ MARTINS RABELO

**EFEITO DO CAFÉ E DA CAFEÍNA NA MODULAÇÃO DO REFLEXO
MANDIBULAR DE ABERTURA DA BOCA EM RATOS ANESTESIADOS**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2012

MÁRCIO JOSÉ MARTINS RABELO

**EFEITO DO CAFÉ E DA CAFEÍNA NA MODULAÇÃO DO REFLEXO
MANDIBULAR DE ABERTURA DA BOCA EM RATOS ANESTESIADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA – DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

MÁRCIO JOSÉ MARTINS RABELO

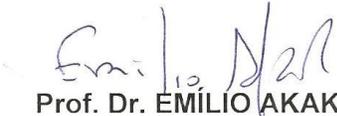
**EFEITO DO CAFÉ E DA CAFEÍNA NA MODULAÇÃO DO REFLEXO
MANDIBULAR DE ABERTURA DA BOCA EM RATOS ANESTESIADOS**

TESE APROVADA EM 20 DE DEZEMBRO DE 2012

COMISSÃO EXAMINADORA

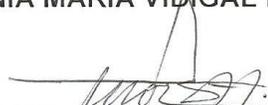

Prof. Dr. ALMIR DE SOUSA MARTINS


Prof. Dr. DAVID LEE NELSON


Prof. Dr. EMÍLIO AKAKI


Prof. Dr. MÁRCIO FLÁVIO DUTRA MORAES
Co-Orientador


Profa. Dra. VIRGINIA MARIA VIDIGAL FERNANDES


Prof. Dr. TASSO MORAES E SANTOS
Orientador

À minha esposa Madalena

Aos meus filhos Luisa e Flávio

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Tasso Moraes e Santos

Ao Professor Márcio Flávio Dutra Moraes

Ao Professor Roberto Gonçalves Junqueira

Aos professores e colegas do Departamento de Ciência de Alimentos

Aos professores e colegas do Núcleo de Neurociências

A Maria Adelaide Fernandes e ao José Batista Viturino, pela ajuda na manutenção dos animais utilizados nos experimentos

A Isabela Starling, minha ex-aluna de iniciação científica

Aos meus pais Américo e Geny

À Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais na pessoa do seu Magnífico Reitor Dom Joaquim Giovanni Mol Guimarães, e dos professores:

Paulo Roberto de Sousa

Sergio de Moraes Hanriot

Raul de Barros Neto

Rubens Menezes dos Santos

Félix Araujo de Sousa

Franca Arenare Jeunon

Aos demais amigos/colegas do Departamento de Odontologia da PUC Minas, que de alguma maneira me apoiaram nessa empreitada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	08
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. Café	17
2.1.1. Café e componentes.....	18
2.2. Cafeína	19
2.2.1. Cafeína e adenosina.....	21
2.2.2. Cafeína e dopamina.....	22
2.2.3. Cafeína e adrenalina.....	22
2.2.4. Cafeína e serotonina.....	23
2.3. Reflexos protetores do sistema nervoso	23
2.3.1. Reflexo miotático (estiramento) mandibular ou mental.....	24
2.3.2. Reflexo proprioceptivo e nociceptivo de abertura da boca.....	26
2.4. Eletrobiogênese	27
2.4.1. Eletromiografia.....	27
2.4.2. Estimulação elétrica.....	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Protocolo experimental	30
4.1.1 Animais.....	30
4.2. Material	32
4.2.1. Caracterização do café.....	32
4.2.2. Caracterização da cafeína.....	32
4.2.3. Equipamentos utilizados para eletrofisiologia.....	33
4.2.4. Softwares utilizados para eletrofisiologia.....	34
4.3. Métodos	35
4.3.1. Extração do café.....	35
4.3.2. Preparo das dietas.....	35
4.4. Procedimentos para validação do método	36
4.4.1. Eletroestimulador.....	36
4.4.2. Experimentos preliminares para validação do método.....	36
4.4.2.1. Preparação, estimulação e registros do EMG no músculo digástrico e avaliação do RAB.....	37
4.4.2.2. Procedimento de registro de EMG.....	38
4.4.2.3. Medidas realizadas.....	38
4.4.2.4. Primeiro grupo (controle x mepivacaína).....	38
4.4.2.5. Segundo grupo (controle x clipagem).....	39

4.5. Experimentos dos oito grupos de animais	41
4.5.1. Preparação, estimulação e registros do EMG no digástrico e avaliação do RAB.....	41
4.5.2. Procedimentos de registro do EMG.....	43
4.5.3. Eletrofisiologia e análise do sinal.....	43
4.6. Análise estatística dos dados.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1. Efeito da ingestão de café e cafeína no consumo diário de ração, e sobre a massa corporal dos animais do grupo crônico.....	49
5.2. Efeito da ingestão de café e cafeína no consumo diário de ração, e sobre a massa corporal dos animais do grupo agudo.....	50
5.3. Avaliação do RAB.....	52
5.3.1. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a amplitude do RAB.....	53
5.3.2. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a latência do primeiro pico do RAB.....	54
5.3.3. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a latência para início do RAB.....	55
5.3.4. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a máxima inclinação do RAB	56
5.3.5. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre o tempo da máxima inclinação do RAB.....	57
5.3.6. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a duração do RAB.....	58
5.3.7. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a energia período controle do RAB.....	59
5.3.8. Efeito da suplementação da dieta com café ou cafeína sobre a energia do período de análise do RAB.....	60
5.3.9. Efeito da suplementação da dieta com café ou cafeína sobre o RAB dos animais do grupo crônico.....	61
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química de grãos de café (arábica e robusta) crus e torrados (g/100g base seca).....	18
-----------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do reflexo mental.....	25
Figura 2	Representação do RAB.....	26
Figura 3	Estação de trabalho dos experimentos realizados no NNC/ICB/UFGM.....	33
Figura 4	Representação gráfica da média dos estímulos, e da média das contrações do músculo digástrico, antes e após a anestesia por mepivacaína para o rato 1 - Primeiro grupo.....	39
Figura 5	Representação gráfica dos estímulos médios e das contrações médias do músculo digástrico antes e após a clipagem para o rato 1- Segundo grupo.....	40
Figura 6	Representação gráfica da média das contrações do músculo digástrico antes e após a clipagem, para todos os animais do segundo grupo.....	41
Figura 7	Etapas do experimento com o animal.....	42
Figura 8	Gráfico Mesh tridimensional representativo do sinal EMG bruto.....	44
Figura 9	Representação gráfica da média dos estímulos e da média das contrações do músculo digástrico durante 5 minutos.....	45
Figura 10	Representação gráfica da média das inclinações das amplitudes.....	45
Figura 11	Representação gráfica dos oito parâmetros analisados....	46
Figura 12	Representação gráfica de todas as ondas registradas durante 5 minutos antes da clipagem da língua, de um experimento.....	47
Figura 13	Representação gráfica de todas as ondas registradas durante um minuto após a clipagem da língua.....	47
Figura 14	Representação gráfica da média (promediação) das ondas registradas durante 5 minutos antes da clipagem da língua.....	47
Figura 15	Representação gráfica da média (promediação) de todas as ondas registradas durante um minuto após a clipagem da língua.....	48
Figura 16	Consumo diário médio de ração dos grupos de ratos G1, G2 e G3.....	49
Figura 17	Efeito da dieta controle sobre a massa corporal dos ratos	50
Figura 18	Consumo diário médio de dieta controle dos grupos G4, G5, G6, G7 e G8, antes dos experimentos.....	51
Figura 19	Efeito da dieta controle sobre a massa corporal dos ratos	

	dos grupos G4, G5, G6, G7 e G8, antes dos experimentos (grupo agudo).....	51
Figura 20	Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, e do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre a amplitude do RAB nos oito grupos.....	53
Figura 21	Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e do efeito da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre o valor da latência do primeiro pico do RAB nos oito grupos.....	54
Figura 22	Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre a latência para o início do RAB nos oito grupos.....	55
Figura 23	Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre a máxima inclinação do RAB dos oito grupos.....	56
Figura 24	Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre o tempo da máxima inclinação do RAB dos oito grupos.....	57
Figura 25	Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína sobre a duração do RAB nos oito grupos.....	58
Figura 26	Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína sobre a energia do período controle do RAB nos oito grupos.....	59
Figura 27	Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína sobre a energia do período de análise do RAB nos oito grupos.....	60
Figura 28	Efeito da suplementação da dieta com café ou cafeína sobre o RAB dos animais do grupo crônico - dados brutos.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria do Café
ACG	Ácidos clorogênicos
ACh	Acetilcolina
°C	Graus centígrados ou Celsius
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
Cm	Centímetros
DC	Depois de Cristo
ECG	Eletrocardiograma
EEG	Eletroencefalograma
EMG	Eletromiografia
FFT	Fast Fourier Transformer - Análise de Fourier
Fig.	Figura
G	Grama
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Hz	<i>Hertz</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
JOR	Jaw opening reflex
Ltda	Limitada
MATLAB	MATrix LABoratory
Mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por kilograma
MG	Minas Gerais
ml	Mililitros
Mm	Milímetros

Ms	Milisegundos
mV	Milivolts
NA	Noradrenalina
NNC	Núcleo de Neurociências
P.A.	Pressão arterial
PCPA	Para-clorofenilalanina
PUC Minas	Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
RAB	Reflexo de abertura da boca
SP	São Paulo
SNC	Sistema nervoso central
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UK	United Kingdom
V	Volts
5-HT	Serotonina

RESUMO

O café é uma bebida largamente utilizada pela população em geral e tem na sua complexa composição mais de 600 elementos. A cafeína, um dos muitos componentes do café, atua produzindo alterações em atividades motoras. As atividades moto-neuronais incluem os reflexos mandibulares: o reflexo miotático mandibular ou mental, e o reflexo de abertura da boca (RAB). O presente estudo tem como objetivo investigar o efeito da ingestão crônica e aguda do café e da cafeína sobre as respostas do RAB em ratos anestesiados. Para isso, oito grupos de ratos foram alimentados durante 140 dias com diferentes dietas: a) grupo 1: dieta controle; b) grupo 2: dieta controle suplementada com cafeína; c) grupo 3: dieta controle suplementada com café; d) grupo 4: dieta controle mais gavagem água destilada; e) grupo 5: dieta controle mais gavagem cafeína; f) grupo 6: dieta controle mais gavagem café; g) grupo 7: dieta controle mais injeção intra-venosa (i.v.) salina; h) grupo 8: dieta controle mais injeção i.v. cafeína. As respostas eletromiográficas do músculo digástrico, que representa o RAB, foram avaliadas perante estímulos elétricos. Foram analisados oito parâmetros das respostas eletromiográficas: 1) amplitude; 2) latência do primeiro pico; 3) latência para o início; 4) máxima inclinação; 5) tempo para a máxima inclinação; 6) duração; 7) energia do período controle; 8) energia do período de análise do RAB. Os resultados indicaram que, na ingestão crônica e na ingestão aguda de café e de cafeína não houve diferença significativa entre os grupos, portanto não exerceram função moduladora no RAB.

Palavras chave: café, cafeína, reflexos mandibulares, reflexo de abertura da boca, RAB, rato.

ABSTRACT

Coffee is a beverage widely used by the general population, and it has a complex composition with more than 600 constituents. Caffeine, one of coffee's many components, acts by producing changes in motor activity. Prior studies have shown that jaw reflexes and activity patterns of the jaw muscles were modulated in the presence of jaw muscle pain. There are no studies comparing the modulatory effects on the jaw reflexes influenced by coffee and caffeine diet. To investigate these effects, eight groups of male rats were fed for approximately during 140 days with different diets: a) group 1: control diet; b) group 2: caffeine diet; c) group 3: coffee diet; d) group 4: control diet plus gavage of distilled water; e) group 5: control diet plus gavage of caffeine solution; f) group 6: control diet plus gavage of coffee solution; g) group 7: control diet plus injection i.v. saline solution ; h) group 8: control diet plus injection i.v. caffeine solution. This study investigated the electromyography responses of the digastric muscle elicited by orofacial electrical stimulation. To evoke the nociceptive jaw opening reflex (JOR), an electrical stimulation of the tongue was conducted. Eight parameters of the JOR were measured and analyzed: 1. amplitude (value of the first peak); 2. latency of the first peak; 3. latency of the begin of contraction; 4. maximum inclination; 5. time of the maximum inclination; 6. duration; 7. energy of the control period; 8. energy of the analysis period. The results suggest that chronic and acute intake of caffeine and coffee do not influence the response of the JOR.

Keywords: coffee, caffeine, jaw reflexes, jaw opening reflex, JOR, rat.

1. INTRODUÇÃO

O café é considerado um dos mais complexos alimentos no que diz respeito à composição química, tendo sido identificados mais de 600 componentes em sua estrutura (CLARKE & MACRAE, 1987). Bebida de grande popularidade consumida mundialmente movimenta um comércio global com recursos superiores a dez bilhões de dólares, e depois da água é o líquido mais ingerido pela população mundial (BUTT & SULTAN, 2011). De acordo com pesquisas realizadas em 2011 pela Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC), 94% dos brasileiros acima de 15 anos consumiram café, num total de 81 litros/ano por habitante.

Muitas pesquisas têm demonstrado que a cafeína, um dos principais constituintes do café, provoca várias respostas celulares e farmacológicas num largo espectro de sistemas biológicos, como estimulação do sistema nervoso central (SNC) e atividade motora (FREDHOLM & LINDSTROM, 1999), melhora do desempenho cognitivo (RIEDEL et al., 1995; SCHOLEY & KENNEDY, 2004; NOSCHANG et al., 2009), entre outros.

A cafeína é largamente utilizada como componente de vários medicamentos e alimentos, e é considerado o estimulante mais usado no mundo ocidental. Vários outros alimentos como chocolate, chá, guaraná, refrigerantes com sabor de cola e bebidas energéticas contêm metilxantinas, cujos principais compostos são a cafeína e a teofilina. Assim como as anfetaminas e a cocaína, as metilxantinas são fármacos estimulantes do SNC (RANG et al., 2004).

A ação da cafeína acontece, principalmente, pelo bloqueio dos receptores de adenosina, ou seja, a cafeína age como antagonista desses receptores. A adenosina é produzida por neurônios no cérebro e tem a função de regular a produção de neurotransmissores. Sem uma regulação adequada, vai haver maior liberação de serotonina, envolvida com a inibição de reflexos (FREDHOLM & LINDSTROM, 1999), e maior produção de catecolaminas como dopamina e adrenalina, além da acetilcolina, (FILLENZ, 1990; COOPER et al., 1996).

Dentre os reflexos protetores dos mamíferos, o reflexo miotático ou mentual, controla o tônus muscular dos músculos elevadores da mandíbula (OKESON, 2008). Os reflexos miotático e o RAB ajudam a evitar danos aos dentes, aos músculos da mastigação e às articulações temporomandibulares (KATAKURA & CHANDLER, 1991). Dentre os músculos elevadores da mandíbula, o músculo masseter é considerado representativo no reflexo miotático, e dentre os músculos abaixadores da mandíbula, o músculo digástrico é considerado representativo no RAB (OKESON, 2008).

No presente estudo foi abordado o efeito do café, como alimento funcional, e da cafeína sobre a modulação do RAB. Para este propósito, foram utilizados oito grupos de ratos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos, com objetivo de avaliar a resposta eletromiográfica do músculo digástrico, em ratos anestesiados, provocada pela estimulação elétrica da língua de animais tratados e não tratados com cafeína e café. Objetivou-se testar a hipótese de que o consumo crônico e agudo de café e cafeína modularia o RAB.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Café

O café é uma das bebidas mais populares do mundo sendo produzida por um arbusto da família das *rubiacae* e do gênero *coffea*. A planta *coffea* é originária da Etiópia, sendo amplamente cultivada em países tropicais (SILVA, 1999).

O café já é conhecido no Oriente Médio há mais de mil anos, principalmente na região de Kafa, a qual deu origem à denominação café. Entretanto, o primeiro registro comprovado de sua existência ocorreu por volta do século XV, no ano de 1400 depois de Cristo (DC). Os árabes foram os primeiros a cultivar o café e a usá-lo como bebida, por isso o nome científico *coffea arabica* (SINDICAFE, 2005).

Existem aproximadamente 60 espécies de café, sendo pelo menos dez espécies cultivadas para obtenção de grãos. As variedades mais comercializadas são: robusta e arábica. A *coffea robusta* é a de variedade forte, amarga e perfumada, possuindo maior conteúdo de cafeína. Já a espécie *coffea arabica* possui um aroma suave, e dela obtém-se uma bebida de melhor qualidade, fina e requintada. Do ponto de vista comercial, 70% do café tratado são do tipo arábica, e os 30% restantes são do tipo robusta (SINDICAFE, 2005).

O Brasil e a Colômbia são os principais produtores de café da América do Sul e responsáveis por 80% da produção mundial (ABIC, 2011). O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, sendo Minas Gerais o estado responsável por 50% da produção nacional (PEREIRA, 1997). A primeira estimativa de produção de café para 2012 indica que o país deverá colher entre 41,89 e 44,73 milhões de sacas (ABIC 2011).

O café tem grande importância na economia mundial, seu mercado movimentava anualmente recursos na ordem de 15 bilhões de dólares. O café é a planta mais consumida no mundo e o segundo maior produto de mercado, depois do petróleo. Este produto ocupa um lugar de significativa importância na balança comercial (ABIC, 2011).

2.1.1. Café e componentes

O café é uma mistura de diferentes compostos, desde substâncias de baixo peso molecular, como alcalóides (cafeína), minerais, monossacarídeos, lipídeos, ácidos orgânicos, água, até polímeros bem definidos como proteínas e polissacarídeos (CLARKE & MACRAE, 1989).

Em ordem de abundância, os valores aproximados dos constituintes solúveis em água presente no café torrado (tabela 1) arábica e robusta (base seca) são: polissacarídeos 24,0-39,0%; lipídeos 14,5-20,0%; proteínas 13,0-15,0%; minerais 3,5-4,5%; ácidos clorogênicos totais (ACG) 1,2-2,3%; ácidos alifáticos 1,0-1,5%; cafeína 1%; oligossacarídeos 0,0-0,35% (CLARKE & MACRAE, 1989). O conteúdo de cafeína dos grãos de café varia segundo a espécie. A espécie robusta contém maior quantidade de cafeína (2%) do que a espécie arábica que possui apenas 1 % (CLARKE & MACRAE, 1989).

Tabela 1 - Composição química de grãos de café (arábica e robusta) crus e torrados (g/100g base seca).

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

Fonte: CLARKE & MACRAE (1989)

Com relação às espécies e a qualidade da bebida, sabe-se que o café arábica apresenta concentrações mais elevadas de sacarose, lipídeos e trigonelina, sendo considerado de melhor qualidade, enquanto que as variedades de café robusta são tidos como de menor qualidade e com maiores teores de compostos fenólicos e cafeína (CLARKE & MACRAE, 1989).

Os componentes nitrogenados presentes no café são todos aqueles compostos que contêm nitrogênio orgânico ou inorgânico. Dentre os compostos nitrogenados destacam-se a cafeína, a trigonelina, as proteínas, os aminoácidos, as aminas e alguns compostos voláteis (SMITH, 1989). Existem muitos estudos epidemiológicos a respeito dos efeitos do extrato do café torrado, isto é, bebidas do café (TANAKA et al., 1998; NURMINEN e et al., 1999).

Alguns constituintes do café têm sido sugeridos como quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos. Os ácidos clorogênicos (ACG) constituem os principais compostos fenólicos antioxidantes do café (NATELLA et al, 2002; MONTEIRO & TRUGO, 2005). O caveol e o cafestol, constituintes do café, exercem efeito protetor antimutagênico e anticarcinogêncio (CAVIN et al., 2003). O consumo do café está associado à redução de câncer de boca, faringe e esôfago, mesmo entre fumantes e usuários de bebidas alcoólicas (NAGANUMA et al., 2008).

O café contribui para a redução do estresse, atuando como um estimulador do sistema nervoso central (YAMATO, 2002).

Estudos feitos com café descafeinado sugerem um efeito anti-diabético do café pela redução da produção de açúcar pelo fígado (VITRAC et. al., 2010; HO et al., 2012).

O café tem entre os seus constituintes substâncias derivadas do ácido clorogênico, os dicinamoquinídeos, que tem a capacidade de elevar os níveis extracelulares de adenosina, contrapondo aos efeitos estimulantes da cafeína (DE PAULIS, 2002).

2.2. Cafeína

O constituinte do café mais conhecido é a cafeína, devido às suas propriedades farmacológicas. É um alcalóide farmacologicamente ativo pertencente ao grupo das xantinas, altamente resistente ao calor, inodoro e com sabor amargo bastante característico que contribui de forma importante para o sabor e aroma do café (MONTEIRO & TRUGO, 2005). Durante o processo de torração, as perdas de cafeína são relativamente modestas (CLARKE & MACRAE, 1989).

Também considerada um estimulante que age no SNC e a substância psicoativa mais utilizada no mundo ocidental, a cafeína é consumida moderadamente pela maioria da população (DESLANDEZ, 2005).

A cafeína é absorvida no sangue e tecidos corporais 5 minutos após a ingestão, sendo que em aproximadamente trinta minutos, sua concentração alcança o pico máximo no sangue, apresentando uma meia-vida de aproximadamente quatro horas. É altamente lipossolúvel e por isso atravessa a barreira hematoencefálica rapidamente, o que leva ao pico de concentração no cérebro em apenas alguns minutos após a sua ingestão. Os níveis cerebrais permanecem estáveis por no mínimo uma hora, com uma eliminação lenta de 3 a 4 horas, ou mais (NEHLIG et al., 1992).

O chá é outro alimento incluído no grupo dos que contêm cafeína. Pesquisas realizadas no Japão sugerem que o chá verde, largamente consumido naquele país, induz a agradáveis sensações mentais (SHIMBO et al., 2005).

Uma estimativa de 60% dos refrigerantes vendidos nos Estados Unidos contém cafeína, que entra na composição como aromatizante. Um estudo feito por KEAST & RIDDELL (2007) sugere que a cafeína não tem função de aromatizante, mas induz a um desejo fisiológico e psicológico de consumir a bebida.

Estudos demonstram que os níveis de cafeína consumidos têm efeitos positivos no comportamento, enquanto seu consumo excessivo pode causar problemas, especialmente em indivíduos sensíveis à substância (SMITH, 2002). Fatores comportamentais, de desenvolvimento e genéticos influenciam na tolerância e sensibilidade à cafeína (GOODMAN & GILMAN, 1985). Estudos sugerem que a cafeína diminui o desempenho prejudicial produzido pela fadiga, por uma noite de trabalho e pela privação do sono, aumenta o estado de alerta e a ansiedade, e melhora a atenção e a recuperação da memória (SMITH, 2002). A cafeína melhora a velocidade e acuidade das tarefas cognitivas e aumenta a capacidade de um indivíduo estar alerta (KOHLENER et al., 2006). Benefícios de desempenho atribuído à cafeína incluem resistência física, redução da fadiga e aumento da agilidade mental e concentração (HECKMAN et al, 2010).

Resultados de pesquisa sugerem um possível efeito sinérgico entre características de personalidades associadas com o alerta do SNC e os efeitos de

vigilância promovidos pela cafeína (KILGORE et al., 2006). Muitas pessoas reduzem voluntariamente o consumo de cafeína porque ela piora a qualidade do sono (RETEY et al., 2007).

Segundo FREDHOLM & LINDSTROM (1999) a cafeína antagoniza os efeitos da adenosina, uma substância química produzida no cérebro. A ação primária da cafeína é bloquear receptores de adenosina, isso leva a um segundo efeito muito importante sobre muitas classes de neurotransmissores incluindo adrenalina, dopamina, serotonina (5-HT), acetilcolina, glutamato e gama-aminobutírico (GABA), influenciando um grande número de diferentes funções fisiológicas (FREDHOLM & LINDSTROM, 1999). A cafeína tem grande variedade de efeitos sobre a função cerebral, atuando como um estimulador do SNC (YAMATO et al., 2002).

2.2.1. Cafeína e adenosina

A adenosina, produzida no cérebro, se liga aos receptores de adenosina. Existem quatro tipos principais de receptores de adenosina: alfa 1 e 2, beta 1 e 2. Estes receptores estão envolvidos na inibição da liberação de neurotransmissores, incluindo noradrenalina, serotonina e acetilcolina (FILLENZ et al., 1990; COOPER et al., 1996).

A adenosina se comporta como uma molécula de sinalização extracelular, influenciando a transmissão sináptica, sem ser um neurotransmissor, isto é, modula a atividade do sistema nervoso em nível celular pré-sinápticamente, inibindo ou facilitando a liberação de transmissores, e pós-sinápticamente, hiperpolarizando ou despolarizando neurônios, e/ou exercendo efeitos não-sinápticos, como nas células da glia. Sendo assim, a adenosina pertence ao grupo dos neuromoduladores (RIBEIRO et al., 2003). Junto a esses efeitos neuromoduladores diretos, a adenosina tem também ações indiretas no sistema nervoso, demonstrado por estudos das interações entre receptores. É proposto que a adenosina aja como um ajuste fino, fazendo parte de uma sofisticada relação entre seus próprios receptores e receptores de outros neurotransmissores e neuromoduladores (SEBASTIÃO et al., 2000).

A cafeína é capaz de bloquear os efeitos da adenosina nos receptores A1 e A2A em baixas concentrações, alcançadas após o consumo de uma única xícara de café.

Porém, efeitos celulares da cafeína no cérebro, somente ocorrem em concentrações bem mais altas do que as obtidas no consumo humano normal de cafeína. Por exemplo, para inibir a quebra de nucleotídeos, via inibição de fosfodiesterases, são necessárias concentrações 20 vezes maiores do que as doses usuais de consumo humano; e para mobilizar depósitos de cálcio intracelular, concentrações 100 vezes maiores são necessárias (FREDHOLM & LINDSTROM, 1999).

O bloqueio de receptores A1 e A2A de adenosina foi atribuído primeiramente aos efeitos psicoestimulantes da cafeína, mas estudos têm demonstrado que os efeitos excitatórios parecem ser devidos preferencialmente ao bloqueio dos receptores A2A (DALL'IGNA et al., 2003; HUANG et al., 2005; FERRE et al., 2008).

O papel da adenosina no SNC é agir como um regulador da atividade central, diminuindo os disparos neuronais e inibindo a liberação de vários neurotransmissores, como, dopamina, 5-HT, GABA, acetilcolina (ACh) e noradrenalina (NA) através dos receptores pré-sinápticos (SMITH, 2002).

2.2.2. Cafeína e dopamina

Há vários estudos mostrando que a cafeína aumenta a liberação da dopamina. GARRET & GRIFFITHS (1997) revendo evidências da função da dopamina nos efeitos da cafeína. Eles concluíram que o aumento da liberação da dopamina provocado pela cafeína é devido a uma ação indireta nos receptores de dopamina, que são antagonistas secundários de receptores de adenosina.

2.2.3. Cafeína e adrenalina

Estudos sugerem que a cafeína aumenta a quantidade de adrenalina e noradrenalina secretada pela medula adrenal (PAPADELIS et al., 2003) e aumenta a razão de síntese e *turnover* de noradrenalina central no córtex cerebral, conseqüentemente aumentando os níveis de estimulação e vigiância (SMITH et al., 2003).

2.2.4. Cafeína e serotonina

Os efeitos da cafeína são principalmente atribuídos a sua interação com o sistema serotoninérgico, pois ela aumenta a concentração de serotonina nos neurônios serotoninérgicos (BERKOWITZ & SPECTOR, 1973). A cafeína aumenta também a concentração de serotonina na região do tronco encefálico que tem projeções excitatórias para os motoneurônios espinhais (WALTON, 2002).

Foi estudado o efeito dos bloqueadores adrenérgicos alfa e beta, da para-clorofenilalanina (PCPA), antagonista da serotonina, na atividade locomotora estimulada pela cafeína, em camundongos. Os resultados sugerem que o efeito excitatório central da cafeína é provavelmente mediado, pela serotonina (ESTLER, 1973).

A cafeína provoca várias respostas celulares e farmacológicas num largo espectro de sistemas biológicos, como estimulação do SNC e atividade motora reflexa (FREDHOLM & LINDSTROM, 1999). É sugerido que 5-HT exerce uma ação facilitatória no reflexo mentual (RIBEIRO et al., 1991). GURA et al. (1989) deduziram que a serotonina contribui para a inibição do RAB, pela estimulação da substância cinzenta peri-aqueductal e núcleo dorsal (ESTLER, 1973).

2.3 Reflexos protetores do sistema nervoso

Os seres vivos devem se ajustar ao meio ambiente para sobreviver. Para isto, três propriedades das suas células são importantes: irritabilidade, condutibilidade e contratilidade. A irritabilidade ou excitabilidade permite a uma célula detectar as modificações do meio ambiente. Quando uma célula é sensível a um estímulo, ela reage a este estímulo, dando origem a um impulso que é conduzido através do seu protoplasma (condutibilidade) determinando uma resposta. Nos humanos, os neurônios são as células especializadas em irritabilidade ou excitabilidade, e condutibilidade. A resposta destas duas propriedades pode ser, por exemplo, encurtamento de células

musculares (contratilidade) para fugir de um estímulo nocivo com finalidade protetora, quando o estímulo se inicia em um segmento e a resposta se faz em outro, um arco reflexo (MACHADO, 2002).

Os reflexos mandibulares são importantes mecanismos neuronais que controlam os movimentos da mandíbula em várias funções orais tais como ingestão, digestão e vocalização. Existem dois tipos de reflexos mandibulares: o reflexo mental e o RAB. O primeiro é evocado pela ativação dos mecanorreceptores não nociceptivos dos músculos levantadores da mandíbula. O segundo é evocado pela ativação dos receptores orofaciais nociceptivos e não nociceptivos (LUND, 1983).

O RAB é um reflexo trigemino-trigeminal do tronco-encefálico que pode ser evocado por estímulos elétricos, térmicos e mecânicos na região orofacial (CHIANG et al., 1991; TAKEDA et al., 1998; GEAR et al., 1999; ELLRICH et al., 2001; ULUCAN et al., 2003). Os aferentes trigeminais fazem sinapses nos neurônios sensoriais do complexo trigeminal medula-espinhal. Esses neurônios projetam-se bilateralmente para excitar os motoneurônios do músculo digástrico (KIDOKORO et al., 1968; TSAI et al., 1999).

Um conjunto diverso de sistemas sensoriais altamente especializados guia as respostas deste complexo sistema oromotor (DINARDO & TRAVERS, 1994).

2.3.1. Reflexo miotático (estiramento) mandibular ou mental

Reflexo proprioceptivo monossináptico

Este reflexo é pesquisado percutindo-se o mento de cima para baixo, estando a boca entreaberta. A resposta consiste no fechamento brusco da boca por ação dos músculos elevadores da mandíbula, em especial do masseter. As vias aferentes e eferentes se fazem pelo nervo trigêmeo. A percussão do mento estira os músculos elevadores, ativando os fusos neuromusculares aí localizados. Trata-se de um reflexo miotático de mecanismo semelhante ao reflexo patelar, uma vez que envolvem apenas dois neurônios, um do núcleo mesencefálico, outro do núcleo motor do trigêmeo. Este arco reflexo é importante, pois em condições normais mantém a boca fechada sem que seja necessária uma atividade voluntária para isto. Por ação da força da gravidade, o

queixo tende a cair, o que causa estiramento dos músculos elevadores da mandíbula, desencadeando-se o reflexo mental que resulta na contração destes músculos, mantendo a boca fechada (MACHADO, 2002). Os músculos relacionados a este reflexo são mantidos num estado médio de contração, chamado tônus muscular, que ocorre sem uma resposta específica do córtex e é muito importante para se determinar a posição de descanso da mandíbula (MILES, 2007) (Figura 1).

O reflexo miotático e o tônus muscular podem ser influenciados pelos centros nervosos superiores, por meio de um mecanismo complexo que aumenta a atividade eferente gama destes músculos (OKESON, 2008).

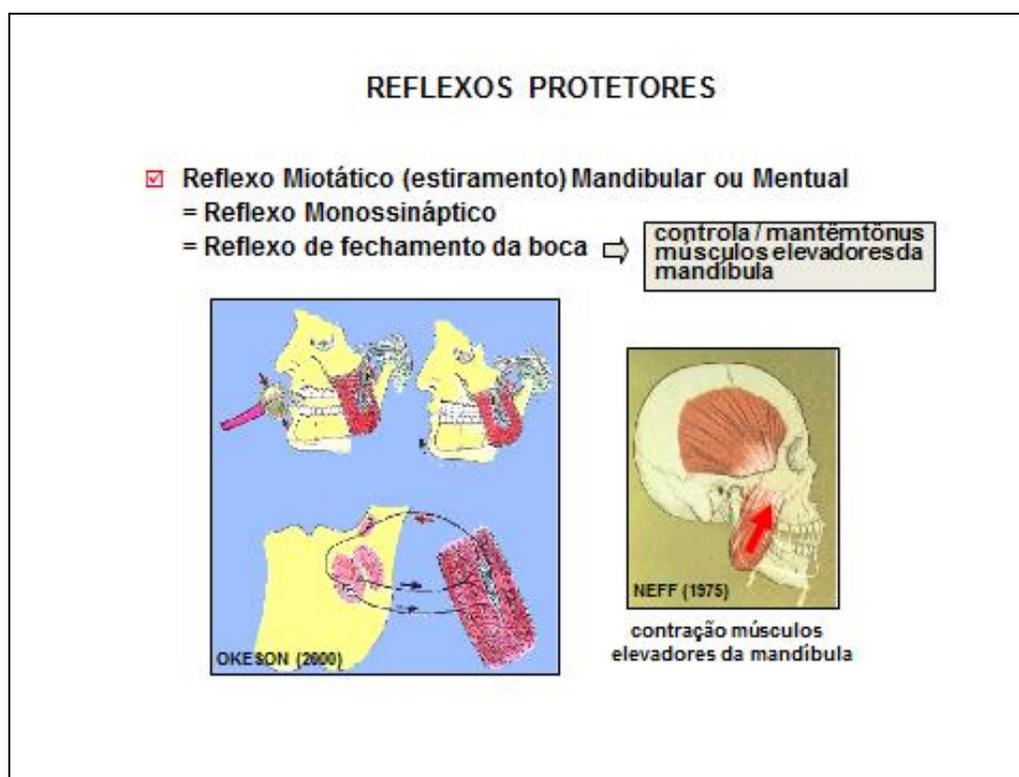


Figura 1 - Representação do reflexo mental. Este é ativado pela aplicação repentina de uma força para baixo no queixo, com um pequeno martelo de borracha. Resultado: contração do músculo masseter (em vermelho), isto evita estiramento e frequentemente gera uma elevação da mandíbula para ocluir os dentes. Trajeto: estiramento repentino do fuso neuromuscular aumenta impulso aferente do fuso. Os impulsos são encaminhados ao tronco encefálico por meio do núcleo mesencefálico do trigêmeo. As fibras aferentes fazem sinapse no núcleo motor do trigêmeo com os neurônios motores eferentes alfa, que os conduzem de volta as fibras extrafusais do músculo elevador que foi estirado. A informação reflexa enviada às fibras extrafusais é para contrair. Observe a presença das fibras eferentes gama. O estímulo delas pode causar contração das fibras intrafusais e dessa forma sensibilizar o

fuso para um estiramento repentino (de Sessle BJ: Mastication, swallowing, and related activities. In Roth GI, Calmes R, editors: Oral Biology, St Louis, 1981, Mosby, p.57).

2.3.2. Reflexo proprioceptivo e nociceptivo de abertura da boca

Reflexo polissináptico

O RAB é um arco reflexo protetivo, nociceptivo ou flexor, polissináptico, ativado por estímulo nocivo iniciado a partir do dente, ligamento periodontal e estruturas orais. As fibras do nervo aferente primário conduzem a informação para o núcleo do trato espinhal do trigêmeo, onde elas fazem sinapse com interneurônios, que enviam informação para o núcleo motor do trigêmeo. Em seguida duas ações distintas ocorrem: 1. interneurônios excitatórios são estimulados, dirigindo-se aos neurônios eferentes, no núcleo motor do nervo trigêmeo, dos músculos de abertura da boca, induzindo-os à contração; 2. grupo de interneurônios inibidores, constituindo o núcleo supratrigeminal, é ativado e dedicado à inibição dos músculos elevadores da mandíbula (OKESON, 2008) (Figura 2).

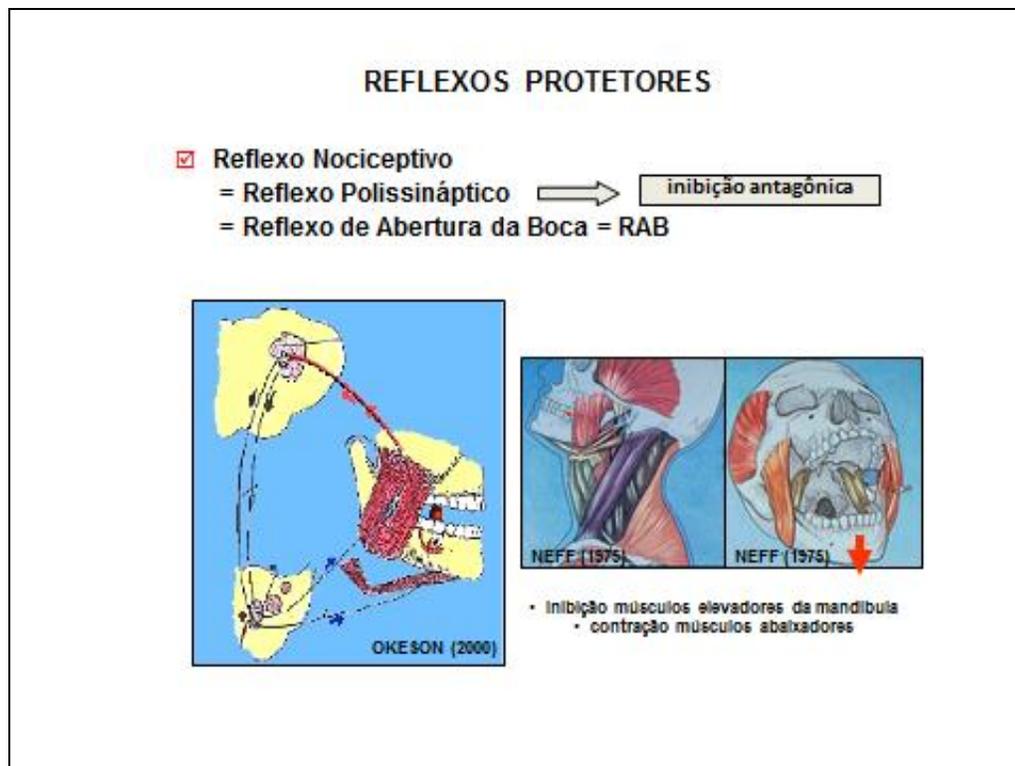


Figura 2 – Representação do RAB. Este reflexo é ativado pela repentina mordida num objeto

resistente. O estímulo nocivo é iniciado a partir do dente e do ligamento periodontal ao serem estressados. As fibras nervosas aferentes levam o impulso ao núcleo do trato espinhal do trigêmeo. Os neurônios aferentes estimulam tanto os interneurônios excitatórios como os inibidores. Os interneurônios fazem sinapse com os neurônios eferentes no núcleo motor do trigêmeo. Os interneurônios inibidores fazem sinapse com as fibras eferentes que se dirigem aos músculos elevadores. A mensagem é para interromper a contração. Os interneurônios excitatórios fazem sinapse com os neurônios eferentes que inervam os músculos depressores da mandíbula, levando-os a sua contração e abertura da boca, o que faz com que se afastem do estímulo nocivo (OKESON, 2008).

2.4. Eletrobiogênese

Uma característica dos organismos vivos é a resposta ativa a estímulos externos, esta resposta depende basicamente da geração e transmissão dos sinais elétricos nestes organismos (KANDEL et al., 2003).

2.4.1. Eletromiografia

Uma característica dos organismos vivos é a resposta ativa a estímulos externos, esta resposta depende basicamente da geração e transmissão dos sinais elétricos nestes organismos (KANDEL et al., 2003).

A eletromiografia (EMG) é o monitoramento da atividade elétrica de origem muscular, refletindo o acoplamento entre a contração muscular e o potencial elétrico.

Pode ser dividida em dois tipos:

1. eletromiografia de profundidade - eletrodos são colocados no interior do músculo, em contato direto com as fibras musculares, avaliando a atividade elétrica local;

2. eletromiografia de superfície - eletrodos são colocados na superfície do músculo, sob a pele, sendo capaz de captar a soma da atividade elétrica das fibras musculares ativas.

A eletromiografia pode ser:

1. monopolar, onde um eletrodo é colocado sobre o feixe muscular de interesse e o outro eletrodo (chamado de referência) é colocado num ponto não afetado pela

atividade do feixe muscular de interesse. Mede-se a diferença de potencial elétrico entre estes dois pontos;

2. bipolar, onde se tem dois eletrodos registrando a região de interesse e um terceiro eletrodo chamado terra, colocado em um local não afetado pela atividade. Mede-se, portanto a diferença de potencial entre estes eletrodos tomando como referência o eletrodo terra (AGUIRRE, 2004).

Como em diversas outras aplicações, os sinais coletados podem estar repletos de ruídos que mascaram o sinal, inclusive ruídos vindos da rede elétrica. Desta forma o emprego de filtros analógicos é peça fundamental para o emprego bem sucedido da técnica. Uma boa forma de reduzir os efeitos do ruído é efetuar média de dados correspondentes a repetidos ensaios, processo esse conhecido como promediação. Este processo é comum em técnicas de potenciais evocados (AGUIRRE, 2004).

2.4.2. Estimulação elétrica

O estímulo aplicado pelo eletroestimulador, através de um eletrodo bipolar deve ser monofásico e de baixa frequência, capaz de deflagrar respostas estáveis, mas sem causar facilitação ou depressão sináptica (SELIG & MALENKA, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da ingestão crônica e aguda do café, como alimento funcional, sobre a modulação do RAB, em ratos adultos anestesiados.

3.2 Objetivos específicos

1. avaliar o consumo crônico e agudo de ração controle, ração adicionada de café e ração adicionada de cafeína, pelos animais experimentais;
2. avaliar o ganho de peso semanal dos animais alimentados com as diferentes dietas;
3. Estimular o músculo digástrico e avaliar os parâmetros eletromiográficos nos animais submetidos às diferentes dietas e nos animais administrados por gavagem extrato de café e solução de cafeína e de animais injetados com solução de cafeína:
 - a) Amplitude;
 - b) Latência do primeiro pico;
 - c) Latência para o início;
 - d) Máxima inclinação;
 - e) Tempo para a máxima inclinação;
 - f) Duração;
 - g) Energia do período controle;
 - h) Energia do período de análise.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Protocolo experimental

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA / UFMG) sob o protocolo 272/2008.

4.1.1. Animais

Ratos da raça Wistar, da colônia do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG, foram acasalados e, durante o período de gestação, receberam dieta composta de ração de biotério (Labina, Purina, produzida no estado de São Paulo, Brasil), enriquecida com 20% de ração para cães (Kanina, Purina, produzida no estado de São Paulo, Brasil), com a finalidade de adequar o suprimento lipídico e protéico da ração. Ao nascimento, os filhotes foram agrupados em número de oito por mãe, mantendo-se o maior número possível de machos. Após o desmame, que se deu aos 21 dias de vida, os machos foram acondicionados em gaiolas individuais e separados aleatoriamente em oito grupos experimentais:

- Grupo1 (n=6) – Grupo dieta controle (G1). Os animais receberam dieta composta de ração de biotério enriquecida com ração para cães, fornecida ad libitum;
- Grupo 2 (n=6) – Grupo dieta suplementada com cafeína (G2). Os animais receberam dieta composta de ração de biotério enriquecida com ração para cães, adicionada de 0.08% de cafeína, fornecida ad libitum;
- Grupo 3 (n=6) – Grupo dieta suplementada com café (G3). Os animais receberam dieta composta de ração de biotério enriquecida com ração para cães, adicionada de extrato de café a 6%, fornecida ad libitum;

- Grupo 4 (n=6) – Grupo dieta controle salina para gavagem (G4). Os animais receberam dieta composta de ração de biotério enriquecida com ração para cães e, por gavagem, 2,3 mililitros (ml) de solução salina, uma hora antes do registro do reflexo;
- Grupo 5 (n=6) – Grupo dieta controle café para gavagem (G5). Os animais receberam dieta composta de ração de biotério enriquecida com ração para cães e, por gavagem, 2,3 ml de extrato de café a 6%, uma hora antes do registro do reflexo;
- Grupo 6 (n=6) – Grupo dieta controle cafeína para gavagem (G6). Os animais receberam dieta composta de ração de biotério enriquecida com ração para cães e, por gavagem, 2,3 ml de cafeína 0.08%, uma hora antes do registro do reflexo;
- Grupo 7 (n=6) – Grupo dieta controle para salina injetável (G7). Os animais receberam dieta composta de ração de biotério enriquecida com ração para cães e, por injeção i.v., 0,3 ml de solução salina, uma hora antes do registro do reflexo;
- Grupo 8 (n=6) – Grupo dieta controle para cafeína injetável (G8). Os animais receberam dieta composta de ração de biotério enriquecida com ração para cães e, por injeção i.v., 0,3 ml de cafeína a 0,08%, uma hora antes do registro do reflexo.

Todos os grupos receberam água ad libitum e foram pesados semanalmente. A ingestão da dieta controle e experimental foi monitorada semanalmente. Estes procedimentos foram realizados até que os animais completassem a idade de 20 semanas, quando foram realizados os experimentos.

4.2. Material

Centrífuga refrigerada Hitachi modelo CR21 (Hitachinaka, Japão); micro-moinho tipo Willye Tecnal, modelo Te-648 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil); estufa de esterilização e secagem com circulação de ar forçada e termômetro digital Nova Ética, modelo 420D (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). Balança digital, Sartorius, AG Gottingen, modelo BP 2100, fabricada na Alemanha. Gaiolas para ratos de polipropileno, com 41,4 centímetros (cm) de comprimento, 34,4 cm de largura, e 16,8 cm de profundidade. Tampas de gaiola de aramado, tipo comedouro, com 41 cm de comprimento, por 34 cm de largura. Frascos de vidro, com 500 ml de capacidade, bicos de aço inoxidável para os frascos de vidro, com oito cm de comprimento. Cânula metálica de gavagem curva, com sete cm de comprimento.

4.2.1. Caracterização do café

O café utilizado foi da espécie *coffea arabica*, torrado a uma temperatura de 160°C em tempo aproximado de 13 minutos na classificação 45 ideal para consumo. A classificação dos pontos de torra foi realizada com auxílio de discos colorimétricos AGTRON/SCAA, de acordo com os padrões utilizados pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC). A amostra utilizada foi do tipo exportação, grão sem defeito, granulação média e de processo de preparo natural de bebida mole. O teor de cafeína presente no pó de café foi de 12,5 mg cafeína/g de café (1,25%).

4.2.2. Caracterização da cafeína

A cafeína utilizada foi a cafeína anidra pró-análise a 0,08%, adquirida da, Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda -Diadema - São Paulo, Brasil.

Para melhorar a solubilidade da cafeína, utilizou-se o ácido cítrico pró-análise monohidratado, adquirido da Vertec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil.

4.2.3. Equipamentos utilizados para eletrofisiologia

- a. Um eletroestimulador de corrente constante, modelo DS3, da Digitimer Research Instruments Ltd; fabricado na Inglaterra (Figura 3).
- b. Um condicionador de sinais marca Cyberamp, modelo 380, da Axon Instruments Inc; fabricado nos Estados Unidos (Figura 3).
- c. Uma placa conversora analógico-digital, modelo DAQ 6023E, da National Instruments Electronics Workbench Group Inc, fabricada nos Estados Unidos (Figura 3).
- d. Um computador de registro, padrão IBM-PC, placa mãe Pentium MMX, processador AMDK 6.300, disco rígido com 4 GB, fabricado no Brasil (Figura 3).



Figura 3 – Estação de trabalho dos experimentos realizados no NNC/ICB/UFMG.

Equipamentos utilizados: 1. eletroestimulador de corrente constante, modelo DS3, fabricado pela Digitimer Research Instruments Ltd; 2. condicionador de sinais, marca Cyberamp, modelo 380, fabricado pela Axon Instruments Inc; 3. placa conversora analógico-digital, modelo DAQ 6023E, da National Instruments Electronics Workbench Group Inc; 4. computador de registro, padrão IBM-PC, placa mãe Pentium MMX, processador AMDK 6.300, disco rígido com 4 GB, fabricado no Brasil.

Instruments Inc; 3. placa conversora analógico-digital, modelo DAQ 6023E, fabricada pela National Instruments Electronics Workbench Group Inc acoplada no computador; 4. computador de registro, padrão IBM-PC, placa mãe Pentium MMX, processador AMDK6.300, disco rígido com 4 GB.

4.2.4. Softwares utilizados para eletrofisiologia

- a. Software Kananda, desenvolvido no Núcleo de Neurociências da Universidade Federal de Belo Horizonte, Brasil;
- b. Programa MATLAB (MATrix LABoratory), The Mathworks Inc, versão 7.10.0.499 – R.2010a, desenvolvido nos Estados Unidos.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Extração do café

A extração do café foi realizada de acordo com VITORINO et al. (2001) com algumas modificações. Um volume de 100 ml de água destilada foi aquecido em chapa elétrica até 90°C e vertido lentamente sobre 6 g de café a 6%, da amostra do café moído. Após agitação por 2 minutos, a suspensão foi resfriada em banho à temperatura ambiente por 10 minutos. O extrato foi então centrifugado (Centrifuga Hitachi, Hitachinaka, Japão) a 27 g por 10 min a 10°C. O sobrenadante foi coletado em uma proveta e o volume completado para 100 ml.

4.3.2. Preparo das dietas

As rações Labina e Kanina foram previamente moídas (moinho de facas Marconi, modelo 6294, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e misturadas numa proporção de 4:1, ou seja, 80 g de ração para ratos e 20 g de ração para cães. A cada 90 g desta mistura foram adicionadas 100 ml de uma solução contendo 4% de gelatina em pó (Fabricante Gelita, fornecida pelo LabSynth - Produtos para Laboratório Ltda, São Paulo, Brasil), 1% de amido de milho e 5% de açúcar cristal, previamente dissolvidos, recebendo o nome de dieta controle. A dieta suplementada com café teve a dieta controle como base, porém 100 ml do extrato de café a 6% foram utilizados para o preparo da solução contendo gelatina, amido e açúcar. Do mesmo modo, a dieta suplementada com cafeína teve a dieta controle como base, porém a essa foi adicionada 0,08% de cafeína (valor correspondente ao teor de cafeína presente na dieta com café). Depois de adequadamente homogeneizada, a massa resultante foi cortada em pequenos pedaços e secada a 60°, em estufa de secagem com circulação forçada de ar (Nova Ética, modelo 420 D, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil).

Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais que possuíam bebedouros de vidro, onde era colocada a água. As gaiolas eram equipadas com

tampas onde era colocada a ração, de maneira que o animal tivesse acesso à mesma.

4.4. Procedimentos para validação do método

4.4.1. Eletroestimulador

Inicialmente foi desenvolvido um eletroestimulador no NNC, controlado pelo computador, utilizando-se o programa Adobe Audition, programado para dar um estímulo elétrico de 50 volts (V) a cada segundo, com frequência de um hertz (Hz) e com duração de 0,1 ms. A alimentação foi feita por seis baterias de nove volts, e mais duas faziam o aparelho funcionar.

Um novo eletroestimulador foi usado em seguida, o qual não necessitava de ligação com o computador para funcionar, programado com os mesmos parâmetros do primeiro. Trata-se de um eletroestimulador de corrente constante, marca Digitimer, modelo DS3.

4.4.2. Experimentos preliminares para validação do método

Inicialmente os experimentos foram feitos com eletrodos, colocados na comissura labial e nos dentes inferiores dos animais. Depois, os eletrodos passaram a ser colocados na língua dos ratos. Esta modificação visou garantir que o que estava sendo registrado eram realmente o estímulo e as contrações do músculo digástrico.

Foram utilizados dois grupos com quatro ratos fêmeas da raça Wistar, cada um com aproximadamente 12 semanas, com peso de 280 a 450 gramas, com idade de 12 a 20 semanas de vida. Foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Cada animal foi controle de si próprio.

4.4.2.1. Preparação, estimulação e registros do EMG no músculo digástrico e avaliação do RAB

Os ratos receberam anestesia geral, sendo a Uretana 140 mg/ml (1 ml por 100 g de peso corporal) o anestésico utilizado, aplicação via intraperitoneal.

Uma incisão foi feita ao longo do aspecto ventral da mandíbula, para instalação dos eletrodos, no músculo digástrico direito, para a avaliação do RAB. Estes eletrodos bipolares foram confeccionados usando-se agulhas gengivais de aço inoxidável, de 5 cm de comprimento, marca comercial Unoject (Figura 7). Para eletromiografia bipolar, duas agulhas foram ferulizadas com acrílico auto-polimerizável mantendo uma distância paralela de quatro milímetros (mm). A estimulação elétrica consistiu de 10 pulsos retangulares monofásicos de 0,1 milissegundos (ms) de duração em uma voltagem de 50 V com 1 Hz de frequência, feita com dois eletrodos de aço presos a língua do animal ferulizados e distantes entre si 4 mm. Um terceiro eletrodo, o terra, foi introduzido no membro dianteiro esquerdo (Figura 7).

Para a realização dos registros, os animais foram colocados em posição supina, sobre uma bolsa de água quente, para manter a temperatura corporal de 37°C (Figura 7).

Para expressar o RAB, as respostas eletromiográficas do músculo digástrico direito foram registradas, usando-se um eletrodo, introduzido cirurgicamente dentro do músculo. As respostas evocadas foram amplificadas e filtradas. Dois registros iniciais (valores básicos do reflexo) foram obtidos.

Em seguida a língua do animal foi anestesiada usando-se, o cloridrato de mepivacaína 3%, anestésico local sem vaso constritor, na proporção de 0,1 ml por 100 g de peso corporal.

Os registros foram feitos durante cinco minutos, antes da aplicação de anestesia na língua, e um minuto depois da língua anestesiada.

Subseqüentemente, as respostas eletromiográficas do músculo digástrico foram analisadas.

4.4.2.2. Procedimento de registro de EMG

Os registros foram realizados sempre nos mesmos horários, ou seja, das 8h00 às 14h00. Os canais de registro foram: 1. contrações do músculo digástrico(EMG); 2. estímulo elétrico; 3. eletrocardiograma (ECG).

Foi utilizada uma placa conversora analógica – digital (A/D) mo. O programa para a aquisição de sinais foi o NNC-DAQ 6023E, da National Instruments, Inc. A amplificação final foi de 10.000 vezes. Foi utilizado também o condicionador de sinais Cyberamp 380, com ganho de 10, um eletroestimulador, desenvolvido no NNC e um computador de registro.

4.4.2.3. Medidas realizadas

Foram avaliadas a latência, a duração e a amplitude do RAB, pela resposta miogênica do músculo digástrico, dos grupos experimentais. Esta avaliação foi feita usando-se o programa MATrix LABoratory (MAT-LAB).

4.4.2.4. Primeiro grupo (controle x mepivacaína)

A representação gráfica dos estímulos médios feitos no experimento de um dos animais pode ser vista na figura 4. Pode-se observar a média das intensidades, das latências e das durações das contrações do músculo digástrico do mesmo rato antes e após a anestesia. Os estímulos médios estão representados pelos dois primeiros traços verticais. As contrações musculares se iniciam nos segundos traços verticais, o vermelho antes da anestesia, o azul depois da anestesia. As intensidades podem ser vistas pela altura destes traços verticais e podem ser medidas em milivolts (mV). As latências são as distâncias entre os traços verticais. As durações das contrações são representadas pelos vales que vão desde o início da latência até o término da curva. Tanto as latências como as durações podem ser medidas em segundos (s). Pode-se notar na figura 4 que a contração do músculo digástrico, diminuiu, mas não cessou totalmente, depois da aplicação de anestesia na língua.

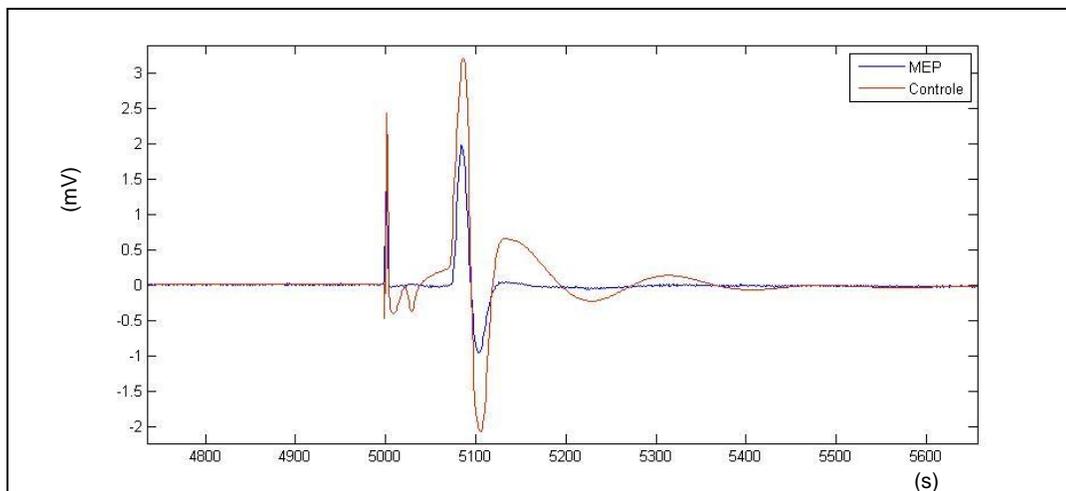


Figura 4 – Representação gráfica da média dos estímulos, e da média das contrações do músculo digástrico, antes e após a anestesia por mepivacaína para o rato 1 - Primeiro grupo. A média dos estímulos está representada pelos dois primeiros traços verticais (vermelho e azul). A média das contrações musculares se inicia nos segundos traços verticais, o vermelho antes da aplicação da anestesia, o azul depois da anestesia. As amplitudes podem ser vistas pela altura destes traços verticais e podem ser medidas em mV. As latências são as distâncias entre os traços verticais. A duração é representada pelo vale que vai desde o início da latência até o término da curva. Tanto as latências como as durações podem ser medidas em ms. Pode-se notar que a contração do músculo depois da anestesia diminuiu, mas não cessou totalmente.

Com o objetivo de interromper a comunicação neural da língua com o músculo digástrico, optou-se pela clipagem da região média da língua.

4.4.2.5. Segundo grupo (controle x clipagem)

Neste grupo foram feitos os mesmos procedimentos do grupo anterior, com exceção da anestesia, que foi substituída pela clipagem do terço médio da língua, utilizando-se uma pinça hemostática (Figura 5).

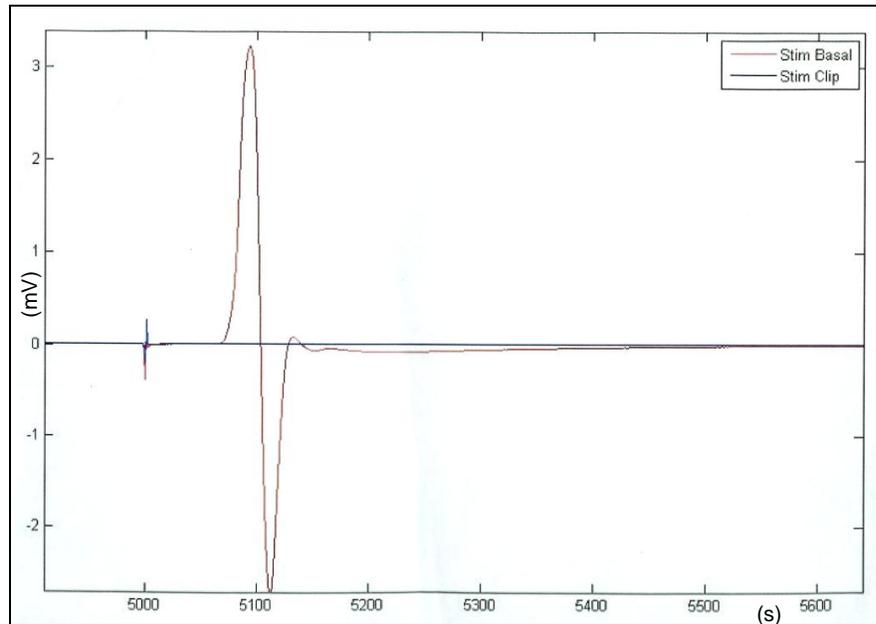


Figura 5 – Representação gráfica dos estímulos médios e das contrações médias do músculo digástrico antes e após a clipagem para o rato 1- Segundo grupo. A média dos estímulos está representada pelos dois primeiros traços verticais. A média das contrações musculares se inicia nos segundos traços verticais, o vermelho antes da anestesia, o azul depois da clipagem. As intensidades podem ser vistas pela altura destes traços verticais. As latências são as distâncias entre os traços verticais. As durações são os vales que vão desde o início da latência até o término da curva. Pode-se observar que as contrações musculares, depois da clipagem (representadas em azul) cessam totalmente.

Nota-se que depois da clipagem da língua, a contração do músculo digástrico (em azul) cessa totalmente (Figura 5).

Está representada na figura 6, a média das contrações do músculo digástrico, para todos os animais do grupo, pela qual se pode notar que as contrações cessam após a clipagem em todos os animais estudados do segundo grupo.

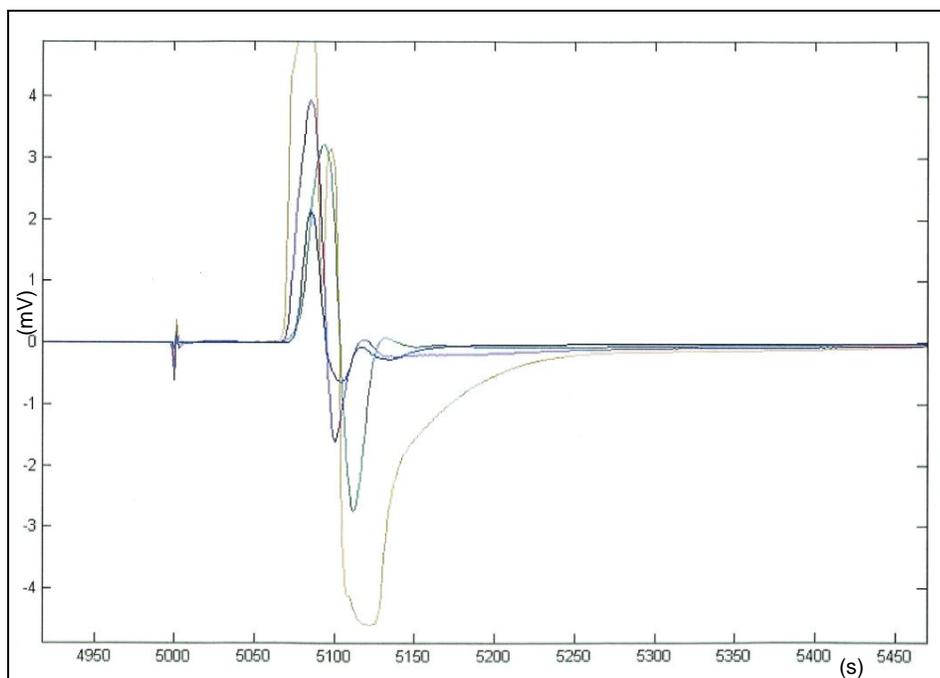


Figura 6 – Representação gráfica da média das contrações do músculo digástrico antes e após a clipagem, para todos os animais do segundo grupo. Representação gráfica está entremeada pela média dos estímulos, e das variáveis: duração, latência e amplitude, de todos os animais do segundo grupo (controle x clipagem).

4.5. Experimento nos oito grupos de animais

4.5.1. Preparação, estimulação e registros do EMG no músculo digástrico e avaliação do RAB

Os ratos foram anestesiados com Uretana (etil carbamato) 140 mg/ml. O anestésico foi administrado por via intraperitoneal, 1 ml por 100 g de peso.

Uma incisão foi feita ao longo do aspecto ventral da mandíbula, para instalação de dois eletrodos no músculo digástrico esquerdo, para registrar a contração muscular provocada pelo RAB. Estes eletrodos bipolares foram confeccionados usando-se agulhas gengivais de aço inoxidável, de cinco centímetros de comprimento, marca comercial Unoject (Figura 7). Para a eletromiografia bipolar, duas agulhas foram

ferulizadas com acrílico auto-polimerizável mantendo uma distância paralela de quatro mm.

A estimulação elétrica, feita com o eletroestimulador Digitimer, consistiu de 10 pulsos retangulares monofásicos de 0,1 ms de duração em uma voltagem de 50 V com 1 Hz de frequência, feita com dois eletrodos de aço presos a região anterior da língua do animal (Figura 7), ferulizados e distantes 4 mm entre si. Um terceiro eletrodo, o terra, foi introduzido no membro dianteiro esquerdo.

Para a realização dos registros, os animais foram colocados em posição supina, sobre uma bolsa elétrica de água quente, para manter a temperatura corporal de 37°C (Figura 7).



Figura 7 – Etapas do experimento com o animal. Procedimento cirúrgico para exposição do músculo digástrico e monitoramento do animal (ECG e EMG). Os dois eletrodos de estimulação foram colocados no terço anterior da língua do rato, mantido com a boca aberta pelo dispositivo metálico de abertura da boca. Os eletrodos para EMG foram colocados no músculo digástrico (feixe esquerdo) e o terra no membro dianteiro esquerdo. Pode-se observar também a clipagem da língua.

Para expressar o RAB, as respostas eletromiográficas do músculo digástrico foram registradas usando-se um eletrodo, introduzido cirurgicamente dentro do músculo (Figura 7). As respostas evocadas foram amplificadas e filtradas, pelo Cyberamp, Para cada registro do RAB, 300 respostas eletromiográficas sucessivas

foram medidas e representadas graficamente. O reflexo foi evocado e registrado durante 5 minutos para cada animal. Dois registros iniciais (valores básicos do reflexo) foram obtidos e as respostas eletromiográficas do músculo digástrico foram registradas.

Em seguida, usando-se uma pinça hemostática, a língua do animal foi clipada na região média, com o objetivo de bloquear a condução neural, e mais um minuto de gravação foi feito. Os registros foram feitos durante cinco minutos antes, e durante um minuto depois da língua clipada (Figura 7).

4.5.2. Procedimentos de registro do EMG

Os registros do EMG foram realizados sempre nos mesmos horários, ou seja, das 8:00 às 14:00 horas. Os canais de registro foram: 1. músculo digástrico (EMG); 2. estímulo elétrico; 3. ECG.

Depois de preparados, os animais passavam por um período de estabilização e, com os parâmetros cardiovasculares, pressão arterial (P.A.) estável, iniciaram-se os experimentos propriamente ditos. Cada experimento teve duração de 5 minutos. Os registros que apresentaram artefatos foram corrigidos de forma que fosse possível eliminar a interferência de ruídos sobre os parâmetros analisados.

4.5.3. Eletrofisiologia e análise do sinal

A etapa de processamento analógico consistiu de amplificação em filtragem do sinal - 0,1 a 10.000 Hz (Cyberamp 380, Axon Instruments). O sinal foi digitalizado a uma taxa de amostragem de 10000 Hz (National Instruments Inc., modelo NIDAQ 6023E) e a aquisição foi feita por meio do software Kananda. O processamento digital dos sinais foi realizado no software Matlab (The MathWorks Inc.), utilizando-se o algoritmo Fast Fourier Transform (FFT) para realização das análises de Fourier.

O RAB foi evocado e registrado durante cinco minutos, imediatamente depois da cirurgia. Depois a língua foi clipada e as contrações do músculo digástrico foram interrompidas, conforme podemos observar na figura 8.

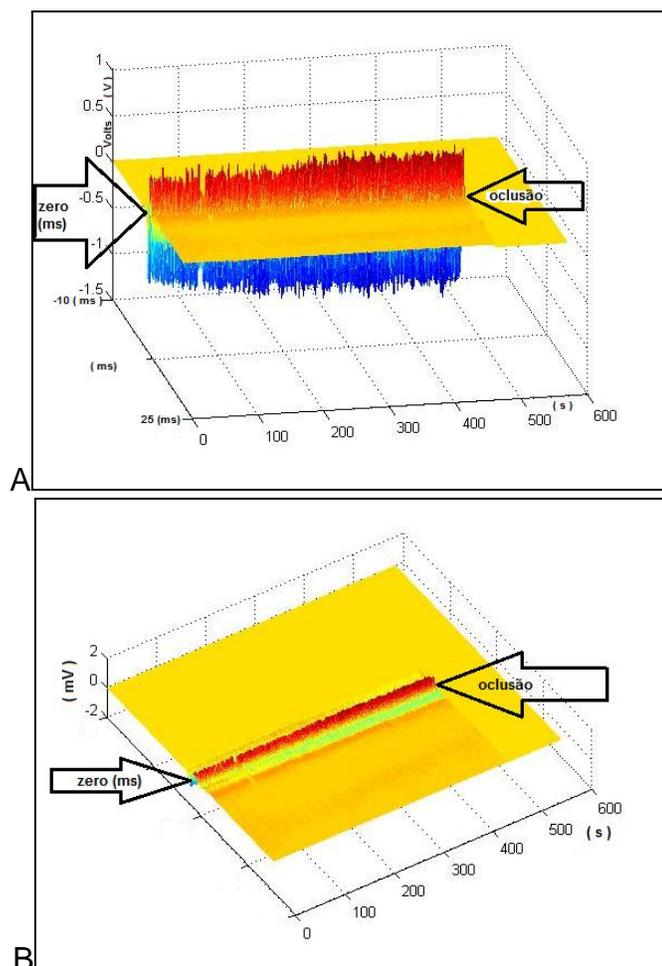


Figura 8 – Gráfico Mesh tridimensional representativo do sinal EMG bruto. **A.** Representação de um experimento com seus registros eletromiográficas dos estímulos elétricos e todas as contrações musculares durante 5 minutos, e mais um minuto pós-clipagem da língua do rato. **B.** As ondas eletromiográficas estão mostradas em vermelho e azul, as vermelhas são positivas, isto é, estão acima da linha base demonstrada em amarelo, e as azuis negativas, abaixo da mesma linha. O momento da clipagem está indicado pela seta (*occlusion*). Observa-se que após a clipagem não acontece nenhuma contração.

Inicialmente foram avaliadas a latência, a duração, e a amplitude (Figura 9), e em seguida a inclinação da amplitude (Figura 10) do RAB.

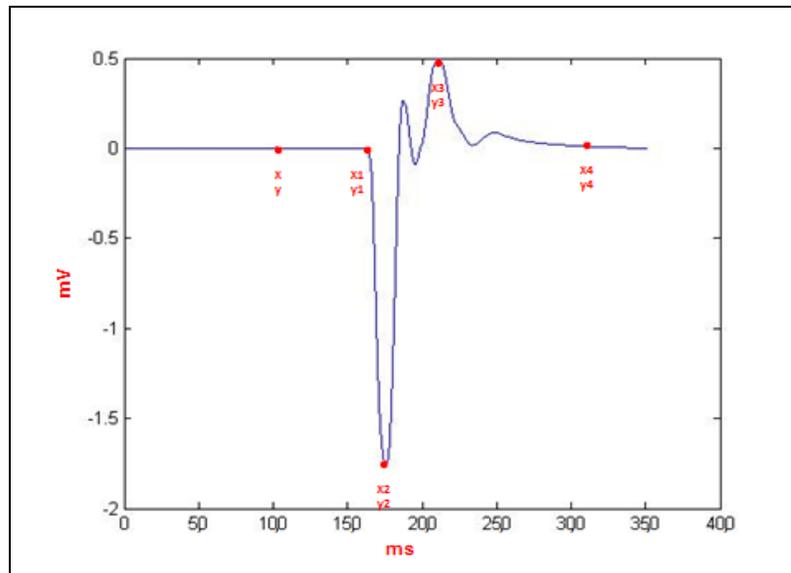


Figura 9 – Representação gráfica da média dos estímulos e da média das contrações do músculo digástrico durante 5 minutos. A média dos estímulos está representada pelos dois primeiros traços verticais. A amplitude pode ser vista pela altura dos traços verticais. A latência está representada pela distância entre os traços verticais. Pode-se ver a duração pelos vales que vão desde o início da latência até o término da curva. Estimulação = x, y ; Latência = $x_1 - x$; Amplitude = $y_2 - y_3$; Duração = $x_4 - x_1$.

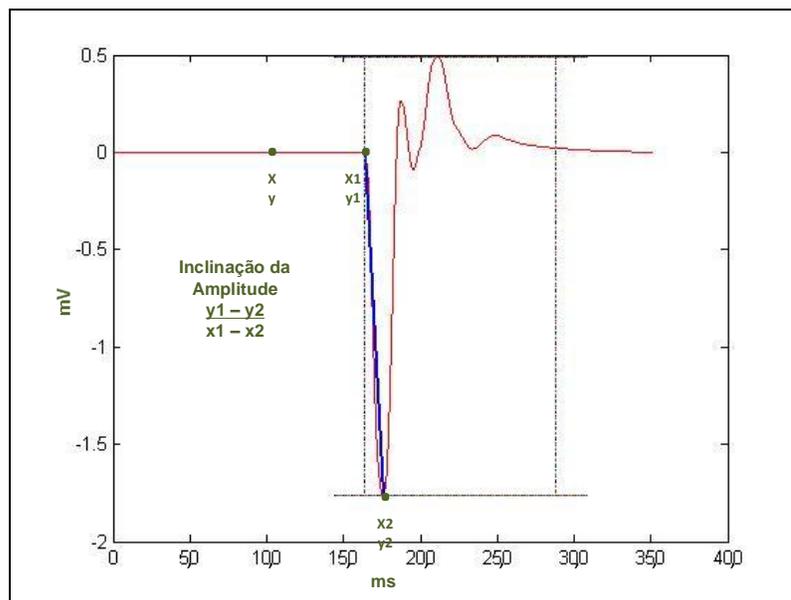


Figura 10 – Representação gráfica da média das inclinações das amplitudes. Foram calculadas da seguinte maneira: $\frac{y_1 - y_2}{x_1 - x_2}$, mostrada em azul.

$$x_1 - x_2$$

Em seguida, optou-se pela avaliação de um maior número de parâmetros (Figura 11): 1) amplitude (valor do primeiro pico); 2) latência do primeiro pico; 3) latência para o início; 4) máxima inclinação; 5) tempo para a máxima inclinação; 6) duração; 7) energia do período controle; 8) energia do período de análise do RAB; objetivando-se mais dados nos resultados. Estas avaliações foram também interpretadas usando-se o software MAT-LAB.

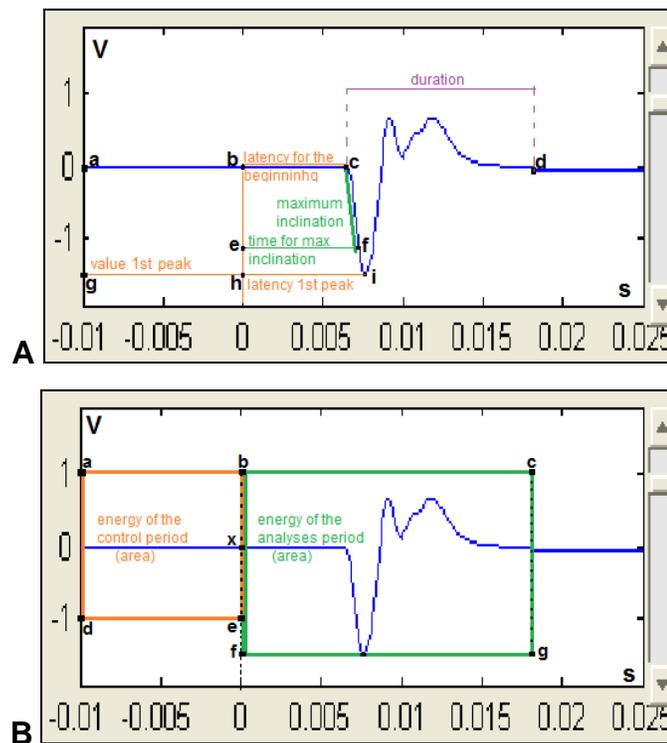


Figura 11 - Representação gráfica dos oito parâmetros analisados. A- Média dos estímulos está representada pela interseção da linha vertical no ponto b. Parâmetros: (1) amplitude pode ser vista pela altura da primeira linha vertical = ag; (2) latência do primeiro pico pode ser observada pela distância do estímulo até a parte mais baixa da curva, no plano horizontal = hi; (3) latência do começo é representada pela distância entre o estímulo até o começo da curva, no plano horizontal = bc; (4) máxima inclinação pode ser vista pela linha que passa através da curva descendente = cf; (5) tempo para máxima inclinação pode ser observado no plano horizontal = ef; (6) duração é a distância do começo da latência até o fim da curva, vista no plano horizontal = cd. **B-** Estímulo = x. Parâmetros: (7) energia do período controle é a área antes do estímulo =

abeda; (8) energia do período de análise é a área do estímulo até o termino do reflexo = bcgfb.

A análise dos dados foi feito nos resultados de todos os ratos. Podemos ver nas figuras 12, 13, 14 e 15, gráficos representativos de um dos animais.

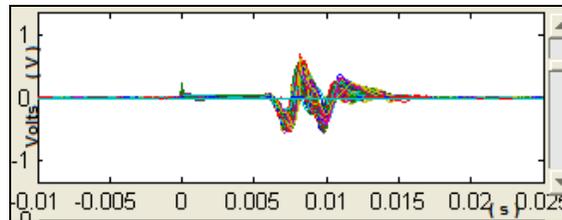


Figura 12 – Representação gráfica de todas as ondas registradas durante 5 minutos antes da clipagem da língua, de um experimento. As ondas registradas significam as contrações do músculo digástrico durante esse período.

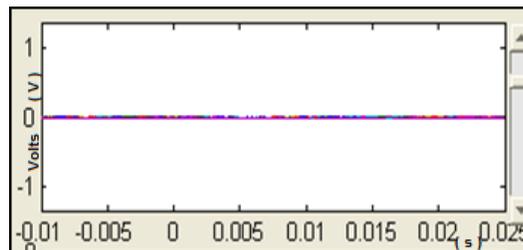


Figura 13 – Representação gráfica de todas as ondas registradas durante um minuto após a clipagem da língua. Observa-se a completa ausência de ondas, o que significa que as contrações do músculo digástrico durante esse período cessaram.

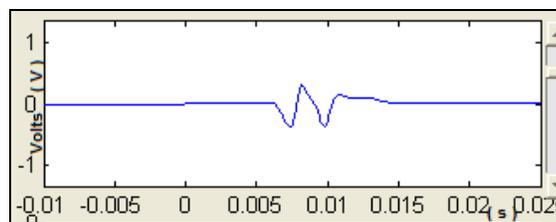


Figura 14 – Representação gráfica da média (promediação) das ondas registradas durante 5 minutos antes da clipagem da língua. Observa-se a média das contrações do músculo digástrico durante esse período.

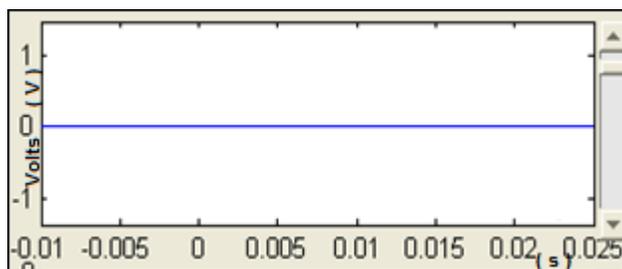


Figura 15 – Representação gráfica da média (promediação) de todas as ondas registradas durante um minuto após a clipagem da língua. Observa-se a completa ausência de ondas, o que significa que as contrações do músculo digástrico cessaram durante esse período.

Após os procedimentos experimentais, os animais foram sacrificados usando-se uma dose excessiva de uretana.

4.6. Análise estatística dos dados

Os resultados dos dados de consumo de dieta e ganho de peso dos animais foram analisados por Anova e comparação (pos-hoc) pelo teste de Duncan (DUNCAN, 1957).

O teste de frequência de distribuição Kruskal-Wallis e Dunn (GLANTZ, 2011) foi aplicado para analisar os resultados dos dados dos oito parâmetros aplicados na avaliação do RAB dos oito grupos de animais.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da ingestão de café e cafeína no consumo diário de ração, e sobre a massa corporal dos animais do grupo crônico

O consumo diário de ração recebido pelos grupos crônicos, G1, G2 e G3, está representado na figura 16. Os valores de consumo correspondem à média ingerida nas semanas indicadas, para cada grupo de seis ratos. Não foi observada diferença significativa entre os grupos que se alimentaram com dieta suplementada com café (6%) ou cafeína anidra (0,08%), quando comparados com o grupo que recebeu dieta controle, isto é, dieta sem suplementação ($P > 0,05$ – Teste de Duncan).

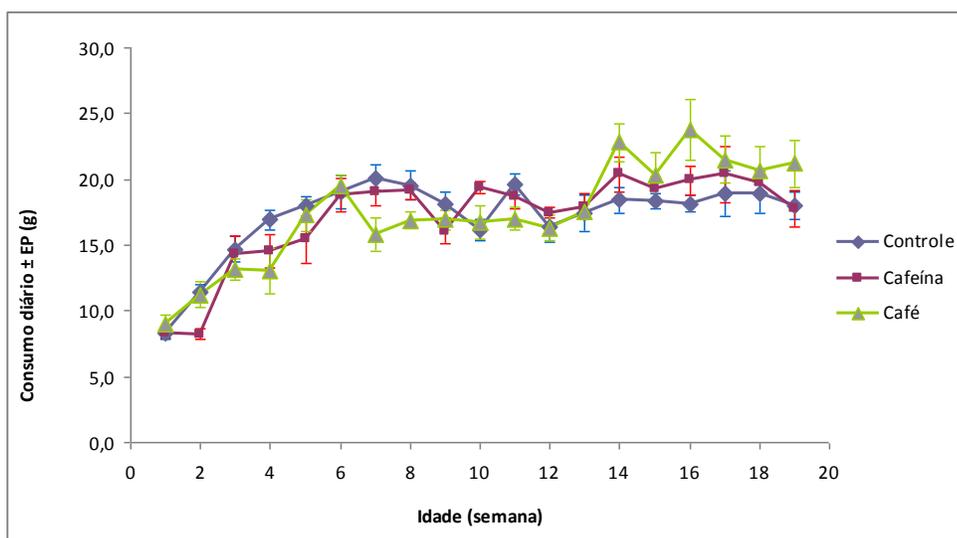


Figura 16 - Consumo diário médio de ração dos grupos de ratos G1, G2 e G3. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 6$). G1 grupo dieta controle; G2 grupo que recebeu dieta suplementada com cafeína anidra (0,08%); G3 grupo que recebeu dieta suplementada com café (6%). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de dieta suplementada e controle ($P > 0,05$ – Teste de Duncan).

Podemos observar na figura 17 os resultados da ingestão de café (6%) ou cafeína (0,08%) sobre a massa corporal dos animais. As massas corporais dos grupos

não foram alteradas pela adição de café ou cafeína na dieta ($P>0,05$ – Teste de Duncan).

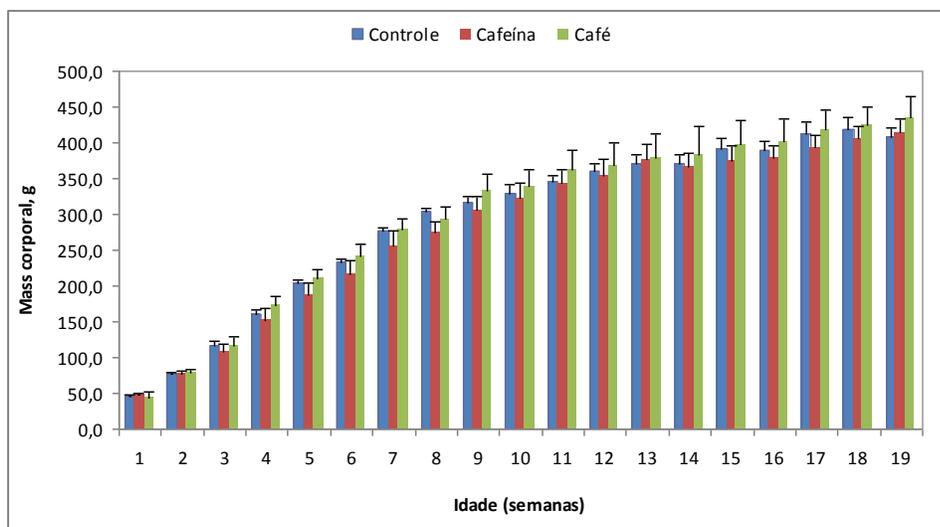


Figura 17 - Efeito da dieta controle sobre a massa corporal dos ratos. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 6$). G1 representa o grupo que recebeu dieta controle; G2 representa o grupo que recebeu dieta suplementada com cafeína anidra (0,08%); G3 indica o grupo que recebeu dieta suplementada com extrato de café (6%). Não foi encontrada diferença significativa na massa corporal entre os grupos que receberam dieta controle, dieta suplementada com cafeína (0,08%) ou com café (6%) ($P>0.05$ – Teste de Duncan).

5.2. Efeito da ingestão de café e cafeína no consumo diário de ração, e sobre a massa corporal dos animais do grupo agudo

Na figura 18 está representado o consumo diário de dieta controle recebido pelos ratos do grupo agudo (grupos G4, G5, G6, G7 e G8) antes dos experimentos, quando receberam gavagem de água, café ou cafeína, ou injeção i.v. de solução salina ou cafeína. Os valores de consumo correspondem à média ingerida nas semanas indicadas, para cada grupo de seis ratos. Os cinco grupos receberam a mesma dieta durante as vinte semanas, e como esperado, não foi observada diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$ – Teste de Duncan).

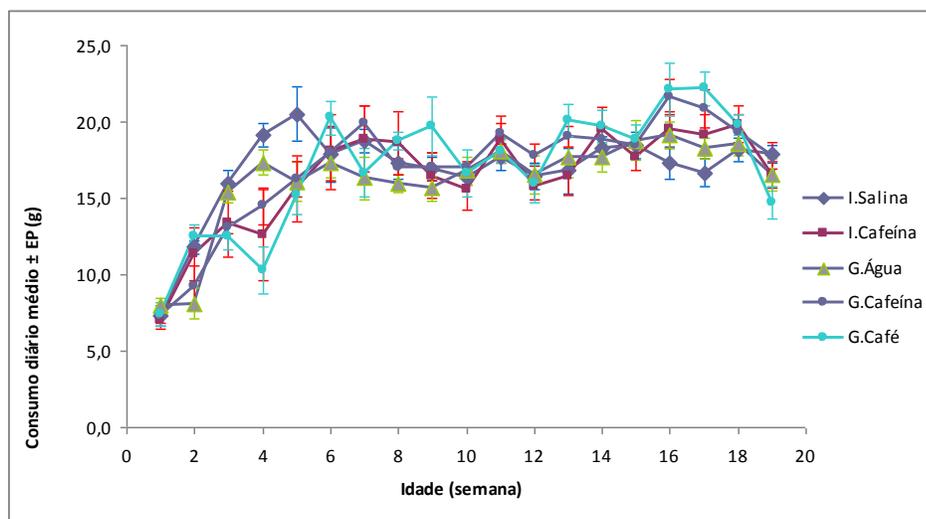


Figura 18 - Consumo diário médio de dieta controle dos grupos G4, G5, G6, G7 e G8, antes dos experimentos. Os valores são expressos como média \pm EPM (n =6). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$ – Teste de Duncan).

Podemos observar na figura 19 os resultados da ingestão de dieta controle sobre a massa corporal dos ratos dos grupos G4, G5, G6, G7 e G8 antes dos experimentos, quando receberam gavagem de água, café ou cafeína, ou injeção i.v. de solução salina ou cafeína. Os cinco grupos receberam a mesma dieta durante os 140 dias, e as massas corporais desses grupos não foram alteradas ($P > 0,05$ – Teste de Duncan).

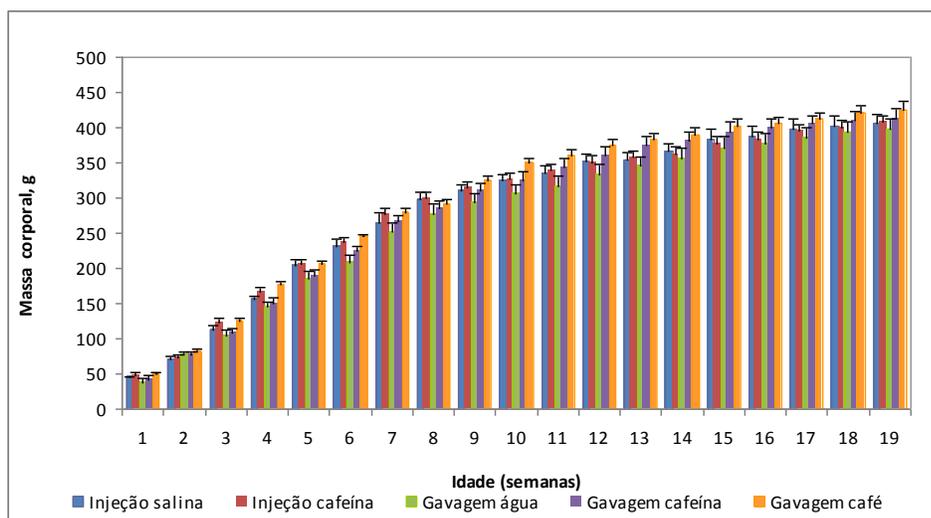


Figura 19 - Efeito da dieta controle sobre a massa corporal dos ratos dos grupos G4,

G5, G6, G7 e G8, antes dos experimentos (grupo agudo). Os valores são expressos como média \pm EPM (n =6). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$ – Teste de Duncan).

5.3. Avaliação do RAB

Análise do efeito da dieta suplementada com café ou cafeína (grupo crônico), e do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína (grupo agudo) sobre os oito parâmetros do RAB dos ratos nos oito grupos.

Durante os experimentos alguns grupos sofreram redução da amostra, ou por erro de leitura dos equipamentos, ou por óbito de alguns animais, especialmente no grupo agudo. As amostras de cada grupo ficaram assim representadas: a) grupo controle (n=5) que recebeu dieta controle; b) grupo cafeína (n=5) que recebeu dieta suplementada com cafeína anidra (0,08%); c) grupo café (n=6) que recebeu dieta suplementada com extrato de café (6%); d) grupo gavagem água (n=2) que recebeu dieta controle mais gavagem água; e) grupo gavagem cafeína (n=3) que recebeu dieta controle mais gavagem cafeína; f) grupo gavagem café (n=5) que recebeu dieta controle mais gavagem café; g) grupo injeção salina (n=3) que recebeu dieta controle mais injeção salina; h) grupo injeção cafeína (n=5) que recebeu dieta controle mais injeção cafeína.

5.3.1. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a amplitude do RAB

A figura 20 apresenta os resultados do efeito da suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%) dos animais do grupo crônico, e do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína nos animais do grupo agudo sobre a amplitude do RAB.

A suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%), assim como da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, não afetaram o valor da amplitude do RAB quando comparada ao grupo controle ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

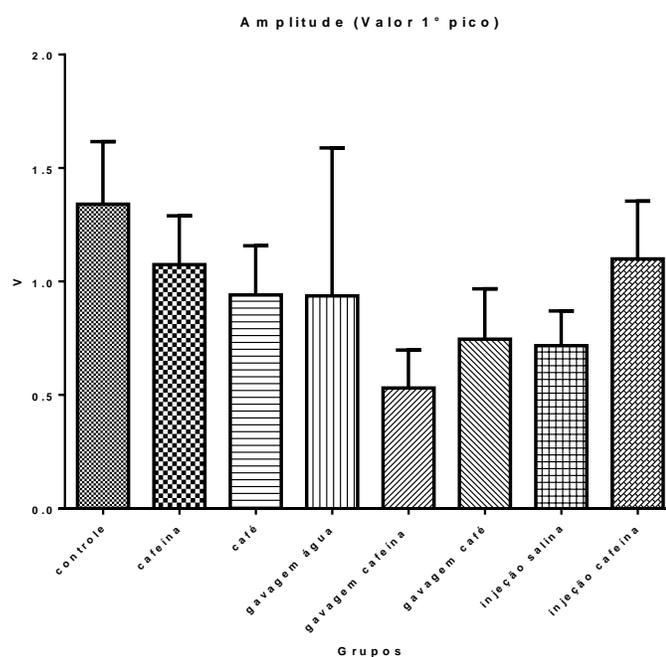


Figura 20 - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, e do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre a amplitude do RAB nos oito grupos. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 6$). Não foi encontrada diferença significativa no valor da amplitude do RAB entre os oito grupos ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

5.3.2. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a latência do primeiro pico do RAB

Estão representados na figura 21 os resultados do efeito da suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%) dos animais do grupo crônico, e do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína dos animais do grupo agudo sobre a latência do primeiro pico do RAB.

A suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%), da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, não afetaram a latência do primeiro pico do RAB, quando comparada ao grupo controle ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

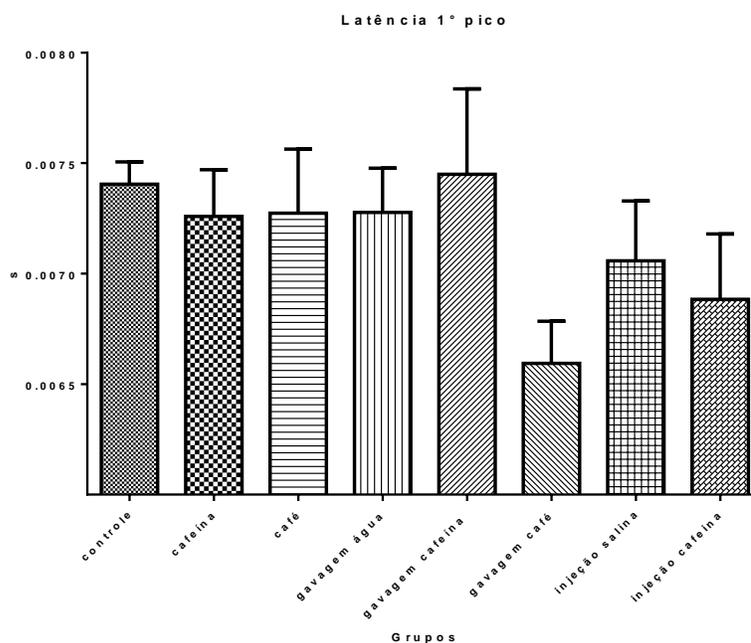


Figura 21 - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e do efeito da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre o valor da latência do primeiro pico do RAB nos oito grupos. Os valores são expressos como média ± EPM ($n = 6$). Não foi encontrada diferença significativa no valor da latência do primeiro pico do RAB entre os oito grupos ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

5.3.3. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a latência para início do RAB

Os resultados do efeito da suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%) dos animais do grupo crônico, e do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína dos animais do grupo agudo sobre a latência para o início do RAB estão demonstrados na figura 22.

A suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%), a gavagem de água, café ou cafeína, e a injeção i.v. de solução salina ou cafeína não afetaram o tempo da latência para o início do RAB quando comparada ao grupo controle ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

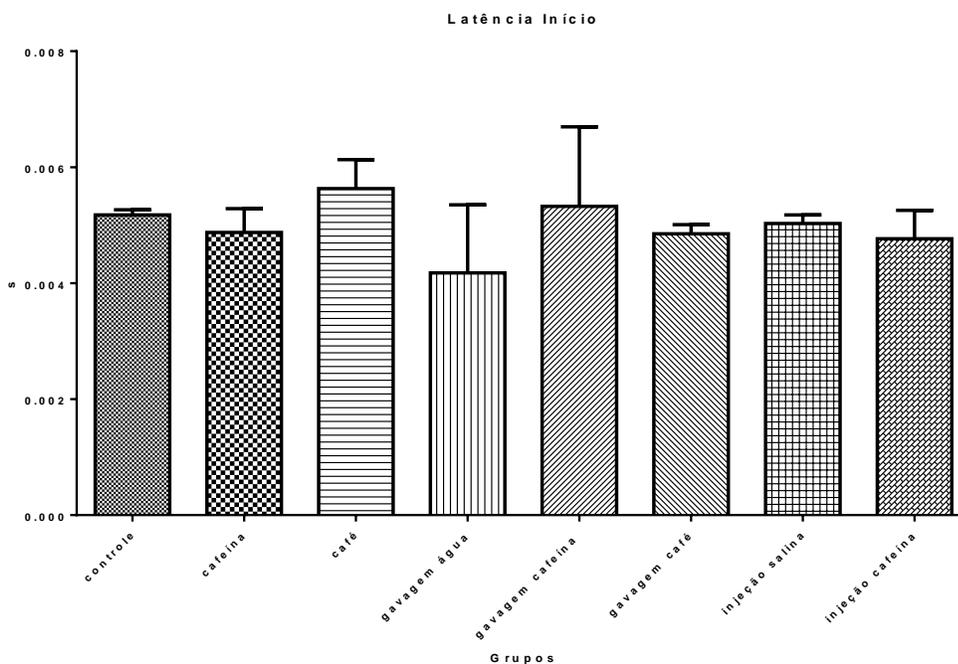


Figura 22 - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre a latência para o início do RAB nos oito grupos. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 6$). Não foi encontrada diferença significativa no valor da latência para o início do RAB entre os grupos ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

5.3.4. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a máxima inclinação do RAB

Os resultados do efeito da suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%) dos animais do grupo crônico, e do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína dos animais do grupo agudo sobre a máxima inclinação do RAB dos animais dos grupos crônico e agudo, estão demonstrados na figura 23.

A suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%), a gavagem de água, café ou cafeína, e a injeção i.v. de solução salina ou cafeína não afetaram a máxima inclinação do RAB quando comparada ao grupo controle ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

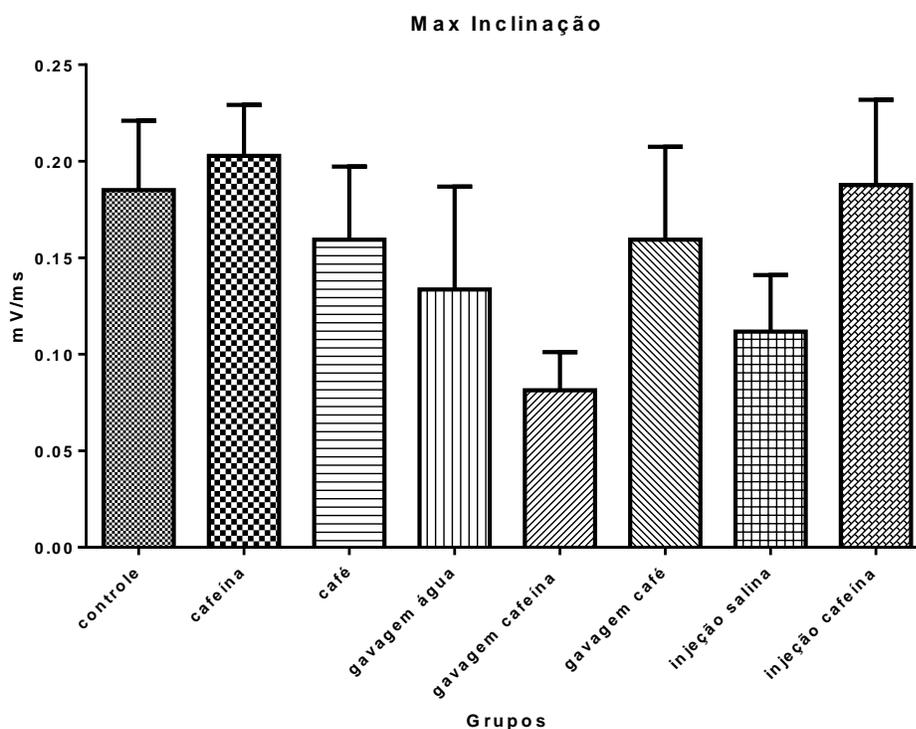


Figura 23 - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre a máxima inclinação do RAB dos oito grupos. Os valores são expressos como média ± EPM ($n = 6$). Não foi encontrada diferença significativa sobre a máxima inclinação do RAB entre os grupos ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

5.3.5. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre o tempo da máxima inclinação do RAB

Os resultados do efeito da suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%) dos animais do grupo crônico, do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína nos animais do grupo sobre o tempo da máxima inclinação do RAB, estão demonstrados na figura 24.

A suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%), a gavagem de água, café ou cafeína, e a injeção i.v. de solução salina ou cafeína, não afetaram o tempo da máxima inclinação do RAB quando comparada ao grupo controle ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

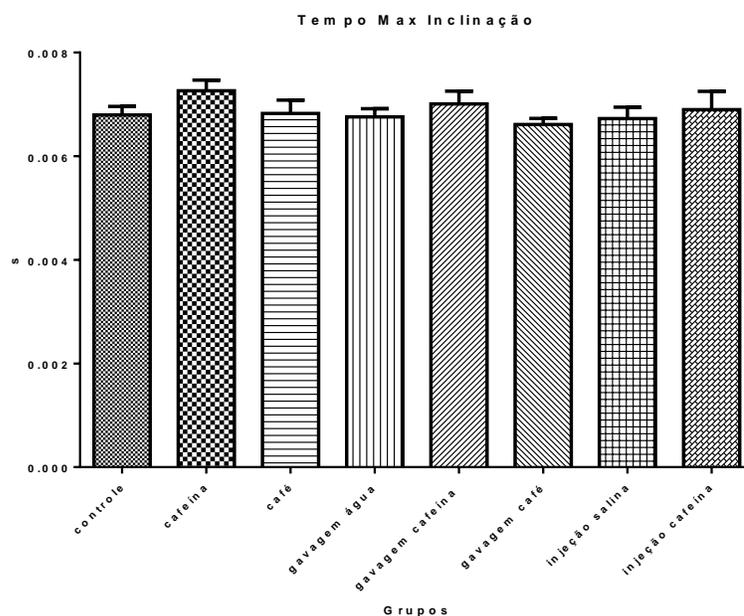


Figura 24 - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína, sobre o tempo da máxima inclinação do RAB dos oito grupos. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 6$). Não foi encontrada diferença significativa sobre o tempo da máxima inclinação do RAB entre os grupos ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

5.3.6. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a duração do RAB

Os resultados do efeito da suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%) dos animais do grupo crônico, do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína nos animais do grupo agudo sobre duração do RAB, estão demonstrados na figura 25.

A suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%), a gavagem de água, café ou cafeína, e a injeção i.v. de solução salina ou cafeína, não afetaram a duração do RAB quando comparada ao grupo controle ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

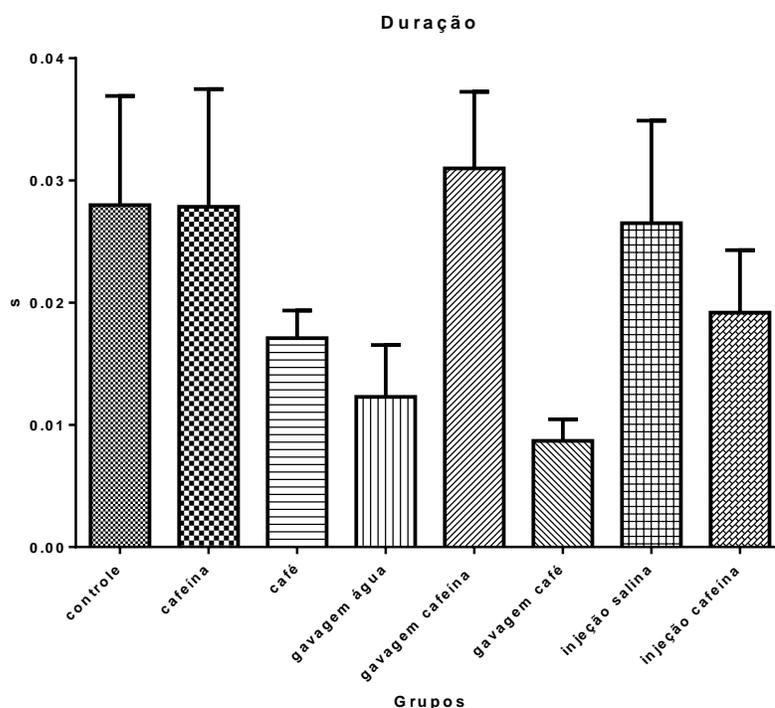


Figura 25 - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína sobre a duração do RAB nos oito grupos. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 6$). Não foi encontrada diferença significativa sobre a duração do RAB entre os grupos ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

5.3.7. Efeito da suplementação da dieta, da gavagem, e da injeção i.v. sobre a energia período controle do RAB

Os resultados do efeito da suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%) dos animais do grupo crônico, do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína nos animais do grupo agudo sobre a energia do período controle do RAB estão demonstrados na figura 26.

A suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%), a gavagem de água, café ou cafeína, e a injeção i.v. de solução salina ou cafeína, não afetaram a energia do período controle do RAB quando comparada ao grupo controle ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

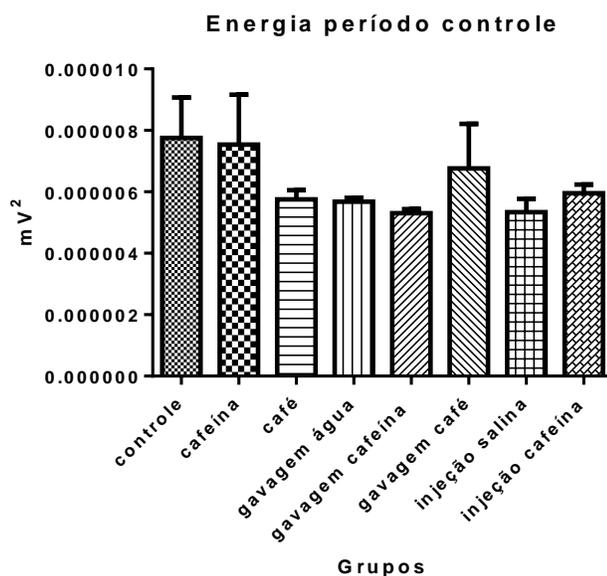


Figura 26 - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína sobre a energia do período controle do RAB nos oito grupos. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 6$). Não foi encontrada diferença significativa sobre a energia do período controle do RAB entre os grupos ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

5.3.8. Efeito da suplementação da dieta com café ou cafeína sobre a energia do período de análise do RAB

Os resultados do efeito da suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%) dos animais do grupo crônico, do efeito da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína nos animais do grupo agudo sobre a energia do período de análise do RAB, estão demonstrados na figura 27.

A suplementação da dieta com café (6%) ou cafeína (0,08%), a gavagem de água, café ou cafeína, e a injeção i.v. de solução salina ou cafeína, não afetaram a energia do período de análise do RAB quando comparada ao grupo controle ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

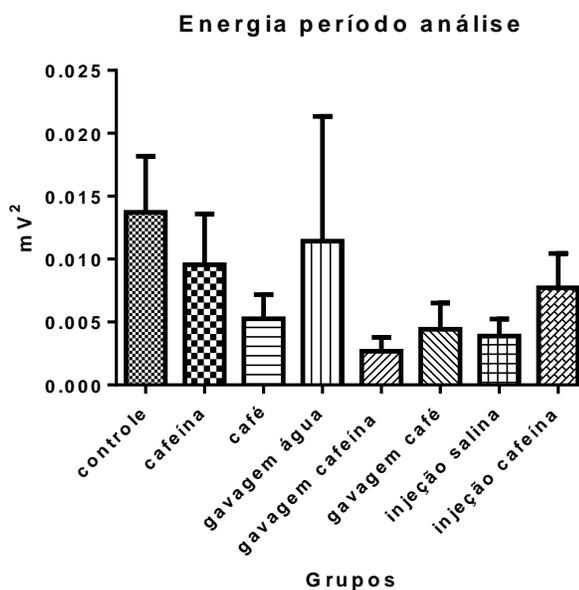


Figura 27 - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína, da gavagem de água, café ou cafeína, e da injeção i.v. de solução salina ou cafeína sobre a energia do período de análise do RAB nos oito grupos. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 6$). Não foi encontrada diferença significativa sobre a energia do período de análise do RAB entre os grupos. ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

5.3.9. Efeito da suplementação da dieta com café ou cafeína sobre o RAB dos animais do grupo crônico

O teste de frequência de distribuição Kruskal-Wallis e Dunn foi aplicado para analisar os dados brutos dos resultados dos oito parâmetros da avaliação do RAB do grupo crônico: G1 - grupo dieta controle, G2 - grupo dieta controle suplementada com 0,08% de cafeína, G3 - grupo dieta controle suplementada com extrato de café a 6%.

A figura 28 mostra esta análise, e demonstra a heterogeneidade dos grupos na distribuição dos dados. No gráfico de análise de amplitude (Figura 28A), o grupo da cafeína mostra uma tendência de se deslocar mais para a direita.

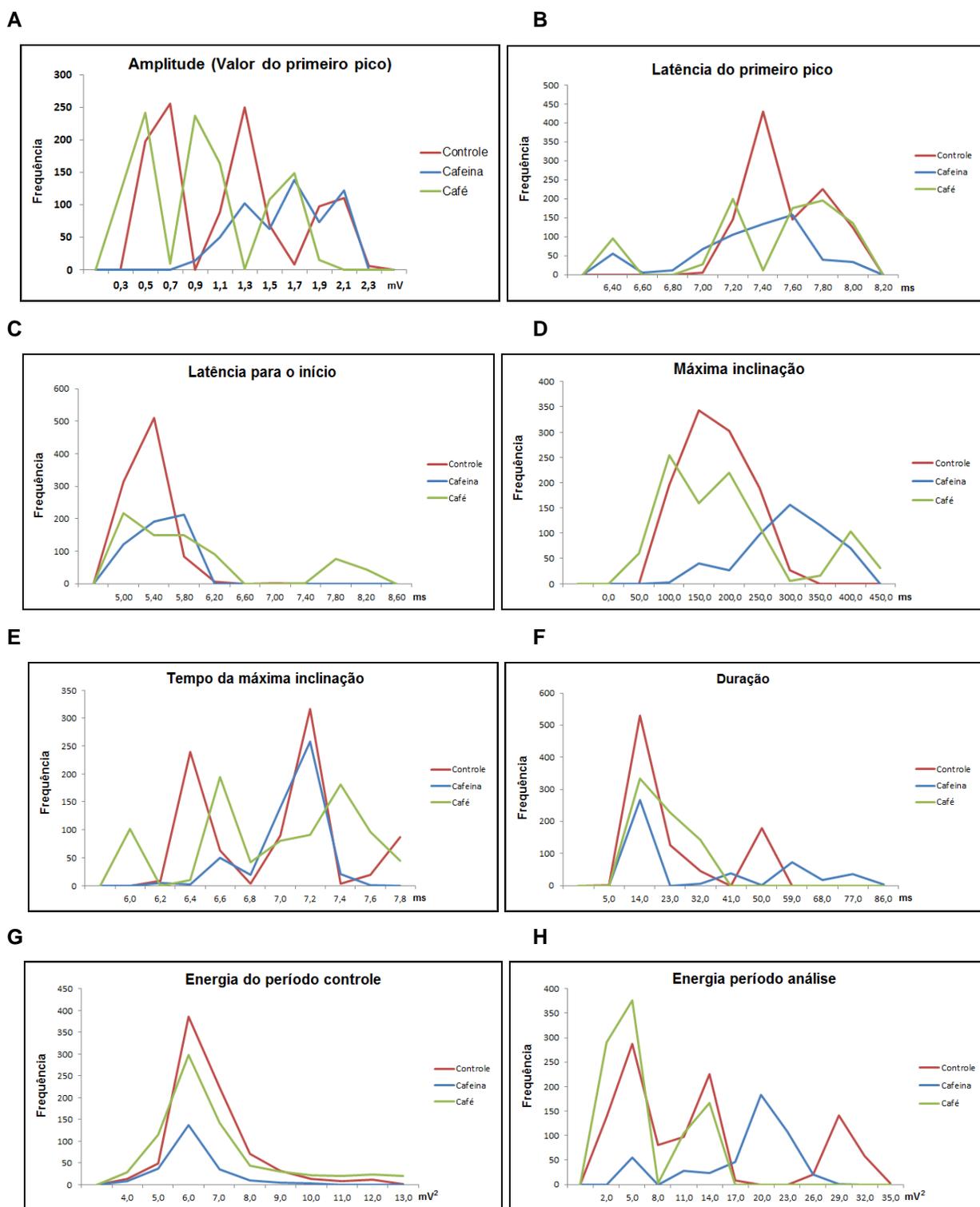


Figura - 28 – Efeito da suplementação da dieta com café ou cafeína sobre o RAB dos animais do grupo crônico - dados brutos. Os valores usados para esta análise (test por hoc) são os dados brutos em uma distribuição multimodal de polígonos de frequência ($P > 0.05$ – Teste de Dunn).

6. DISCUSSÃO

Um grupo de alimentos vem sendo estudado nos últimos anos, os chamados alimentos protetores (ABREU et al., 2011). Dentro desse grupo estão os alimentos funcionais, que ingeridos diariamente em determinadas quantidades trazem benefício à saúde, e mostram potencial para proteger ou modular o metabolismo do organismo de maneira favorável a redução de algumas doenças e a prevenção de doenças crônicas degenerativas como hipertensão, diabetes, coronariopatias e doenças neurodegenerativas. O café está classificado dentro da categoria destes alimentos funcionais (ANJO, 2004; ABREU et al, 2011).

Este trabalho pesquisou os efeitos do consumo crônico e moderado, e agudo do café e da cafeína, que é representativo do consumo humano geral. Para avaliar o efeito da ingestão crônica do café, um alimento funcional, e da cafeína sobre o RAB, os ratos receberam ração suplementada com 0,08% de cafeína, e ração suplementada com extrato de café a 6%, administradas diariamente ao longo da vida desses animais. As concentrações de 0,08% de cafeína e de 6% de café na dieta basearam-se em dados da literatura (HUBER et al., 2003; TURESKY et al., 2003).

As doses de café e cafeína utilizadas foram elevadas quando comparadas ao consumo humano diário. O consumo de cafeína estimado nestes animais foi de 75 mg/kg/dia, para o tratamento de café a 6%. Já o consumo estimado diário de cafeína em humanos que bebem de duas a quatro xícaras de café é de aproximadamente 8 mg cafeína/kg de peso corporal, e para fortes consumidores de café, a quantidade pode chegar a 15 mg/kg (TURESKY et al., 2003). Esta maior quantidade de café administrada aos animais justifica-se pelo metabolismo mais acelerado dos ratos (ABREU et al., 2011).

A adição de cafeína e café à ração não alterou a ingestão da dieta pelos animais, demonstrado pelo peso corporal semelhante entre os animais que receberam dieta controle e aqueles que receberam dieta suplementada com cafeína e café, estando de

acordo com estudos feitos anteriormente (ABREU et al., 2011) e confirmados neste estudo.

Existe um consenso de que o RAB é um reflexo trigemino-trigeminal do tronco cerebral, que pode ser provocado por estimulação elétrica, térmica e mecânica da região orofacial (CHIANG et al., 1991;. TAKEDA et al., 1998;. ELLRICH et al., 2001;. ULUCAN et al., 2003). Estudos demonstraram que há sinapse aferente trigeminal em neurônios sensoriais do complexo trigemino-espinhal, onde estes neurônios projetam bilateralmente para excitar motoneurônios do músculo digástrico (KIDOKORO et al, 1968; TSAI et al., 1999), e que pelo menos duas sinapses estão envolvidos no arco reflexo, quando o teste elétrico é aplicado, e causam uma sensação de picada dolorosa no homem, o que indica uma excitação de nociceptivos aferentes musculares que correspondem a fibras A alfa (BROMM & MEIER 1984;. KAUBE et al., 2000).

Os músculos da língua, usados para ativar o RAB, são inervados por motoneurônios do núcleo motor do hipoglosso (nervo craniano XII), e as fibras são completamente contidas dentro da língua e não ligadas a quaisquer estruturas ósseas (SOKOLOFF, 2004).

Cafeína, um dos muitos constituintes de café, induz um largo espectro de respostas celulares e farmacológicas no sistema nervoso central e estimulação da atividade motora, devido às suas propriedades farmacológicas. A ação da cafeína ocorre principalmente por meio de bloqueio dos receptores de adenosina, e a cafeína atua como um antagonista destes receptores (FREDHOLM & LINDSTROM, 1999). Existem componentes de café torrado, substâncias derivadas do ácido clorogênico, os dicinamoquinídeos, que têm potencial para aumentar os níveis extracelulares de adenosina, contrariando o efeito estimulante da cafeína (DE PAULIS et al., 2002). Isto pode explicar a heterogeneidade das respostas dos três grupos crônicos em seus dados brutos (Figura 28).

No presente estudo, os valores eletromiográficos da atividade muscular basal, nos grupos controle, G1 (controle crônico), G4 (gavagem água) e G7 (injeção salina) foram similares aos resultados encontrados na literatura (GOMEZ et al., 1998; VALLEJO et al., 1998).

Foram analisados os oito parâmetros das respostas eletromiográficas: amplitude;

latência do primeiro pico; latência para o início; máxima inclinação; tempo para a máxima inclinação; duração; energia do período controle; e energia do período de análise do RAB. Os grupos crônicos G2 (grupo cafeína) e G3 (grupo café), não apresentando nenhuma alteração se comparados ao grupo G1 (grupo controle).

Nos grupos G4, G5 e G6, animais que foram alimentados durante 20 semanas com dieta controle e receberam gavagem de água, cafeína a 0,08% e café a 6%, respectivamente, uma hora antes do experimento, os parâmetros analisados foram os mesmos do grupo anterior, não apresentaram nenhuma alteração se comparados ao grupo G1 (grupo controle).

Nos grupos G7 e G8, animais alimentados durante 20 semanas com dieta controle, receberam injeção i.v. de solução salina, injeção i.v. de cafeína a 0,08%, e injeção i.v. de café a 6%, respectivamente, os parâmetros analisados foram os mesmos dos grupos anteriores, não apresentando também nenhuma alteração se comparados ao grupo G1 (grupo controle).

A análise dos dados brutos dos grupos crônicos, G1, G2 e G3, demonstrou alguma alteração no efeito da ingestão de cafeína em dois parâmetros. A amplitude do grupo cafeína demonstrou uma tendência de se concentrar mais para a direita, comparada com os outros dois grupos (Figura 28A). Foi observada também no grupo café, no parâmetro duração, uma tendência de deslocamento para a esquerda, comparados com os dois outros grupos (Figura 28F). Consequentemente pode-se observar que esses resultados demonstraram uma tendência de influenciar a modulação do RAB, embora não tenha sido encontrada diferença estatística entre os grupos.

Os resultados deste trabalho reforçam o conceito do café como alimento funcional, uma vez que a ingestão crônica e moderada de café não influenciou a resposta do RAB.

Outro aspecto deve ser considerado, porque o estudo do RAB ajuda a compreender melhor a parafunção bruxismo (LAVIGNE et al., 2003). A ativação de mecanismos neuronais trigeminais pode aumentar o risco de danificar tecidos relacionados aos dentes, se o reflexo nociceptivo não for acionado adequadamente quando força excessiva na oclusão dos dentes ocorrerem. Um exemplo de força

excessiva é a parafunção de ranger ou apertar os dentes, o bruxismo (KUROSE et al., 2005). OHAYON et al. (2001) demonstraram que consumidores de cafeína estavam no grupo de alto risco de reportagem de bruxismo durante o sono, mas não especificaram a quantidade de cafeína ingerida. Extrapolando os resultados deste estudo para o bruxismo, já que a ingestão crônica moderada de cafeína e café não influenciou a resposta do RAB, então não facilita o bruxismo.

Independentemente da hipótese nula, os resultados deste estudo mostraram que a estimulação da musculatura oral (língua) em ratos com dieta contendo ingestão crônica e moderada de café e cafeína não modulam o RAB.

Portanto, seria interessante aprofundar os estudos dos efeitos da administração crônica de café e cafeína, alterando-se alguns parâmetros, como maiores doses/concentrações de café e de cafeína. Isto se justificaria pela utilização crescente pela população de doses cada vez maiores de café e de cafeína contida nos refrigerantes, e principalmente nas chamadas bebidas energéticas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho reforçam o conceito do café como alimento funcional, uma vez que a ingestão crônica e moderada de café, em ratos anestesiados, não influenciou a resposta do RAB.

Os resultados apresentados nesta tese demonstraram que a modulação do RAB não foi alterada pela ingestão de café ou cafeína, sob estimulação da musculatura oral de ratos anestesiados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC (Associação Brasileira da Indústria do Café) *Indicadores da Indústria de Café no Brasil*. ABIC 2011. Disponível em www.abic.com.br/estatisticas. html. Acesso dia 25/09/2011.
- ABREU R. V., SILVA-OLIVEIRA E. M., MORAES M. F. D., PEREIRA G. S., MORAES-SANTOS T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 99:659-64, 2011.
- AGUIRRE L. A. Introdução à Identificação de Sistemas: Técnicas Lineares e Não-Lineares Aplicadas a Sistemas Reais Cap.4, pg 180-2 Editora UFMG, Belo Horizonte, 2004.
- ANJO D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *J. Vasc. Br.*, 3:145-54, 2004.
- BERKOWITZ B., SPECTOR S. Effect of alfa and beta adrenergic blocking agents and para-chlorophenylalanine on morphine and caffeine-stimulated locomotor activity of mice. *Psychopharmacology*, 28:261-8, 1973.
- BROMM B., MEIER W. The intracutaneous stimulus: a new pain model for algometric studies. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, 6:405-10, 1984.
- BUTT M. S., SULTAN M. T. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51(4):363-73, 2011.
- CAVIN C., BEZENCON C., GUIGNARD G., SCHILTER B. Coffee diterpenes prevent benzopyrene genotoxicity in rat and human culture systems. *Biochem Biophys Res Commun*, 306:488-95, 2003.
- CHIANG C. Y., DOSTROVSKY J. O., SESSLE B. J. Periaqueductal gray matter and nucleus raphe magnus involvement in anterior pretectal nucleus-induced inhibition of jaw-opening reflex in rats. *Brain Res*, 544:71-8, 1991.

- CLARKE R. J.; MACRAE, R. *Coffee*. Vol 2: *Technology*, Amsterdam: Elsevier Applied Science, 321p, 1987.
- CLARKE R. J.; MACRAE, R. *Coffee: Chemistry*, 2^a ed., London: Elsevier Science Publishers Ltda. 1989.
- COOPER J. R., BLOOM F. E., ROTH R. H. *The biochemical basis of neuropharmacology*. Oxford University Press. New York; 3 ed, 1996.
- DALL'IGNA O. P., PORCIÚNCULA L. O., SOUZA D. O., CUNHA R. A., LARA D. R. Neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor blockade of β -amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol*, 138:1207-9, 2003.
- DE PAULIS T., SCHMIDT D. E., BRUCHEY A. K., KIRBY M. T., MCDONALD M. P., COMMERS P., LOVINGER D. M., MARTIN P. R. Dicinnamoylquinides in roasted coffee inhibit the human adenosine transporter. *Eur J Pharmacol*, 10:442(3):215-23, 2002.
- DESLANDEZ A. C., VEIGA H., CAGY M., PIEDADE R., POMPEU F., RIBEIRO P. Braz J. Effects of Caffeine on the electrophysiological, cognitive and motor responses of the central nervous system. *Méd Biol Res*, 38(7):1077-86, 2005.
- DINARDO L. A., TRAVERS J. B. Hypoglossal neural activity during ingestion and rejection in the awake rat. *J Neurophysiol*, 72(3):1181-91.1994.
- ELLRICH J., MESSLINGER K., CHIANG C. Y., HU J. W. Modulation of neuronal activity in the nucleus raphe magnus by the 5-HT(1)-receptor agonist naratriptan in rat. *Pain*, 90:227-31, 2001.
- ESTLER C. J. Effect of alfa and beta-adrenergic blocking agents and parachlorophenylalanine on morphine and caffeine stimulated locomotor activity of mice. *Psychopharmacology*, 28(3):261-8, 1973.
- FERRE S., CIRUELA F., BORYCZ J., SOLINAS M., QUARTA D., ANTONIOU K., QUIROZC; JUSTINOVA Z., LUIS C., FRANCO R., GOLDBERG S. R. Adenosine A1-A2A receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Front Biosci*, 1;13:2391-9, 2008.
- FILLENZ M. Noradrenergic neurons. *Cambridge University Press*. Cambridge, 1990.

- FREDHOLM B. B., LINDSTROM K. Autoradiographic comparison of the potency of several structurally unrelated adenosine receptor antagonists at adenosine A1 and A (2A) receptors. *Eur J Pharmacol*, 10:380(2-3):197-202, 1999.
- GARCIA-VALLEJO P., GOMEZ F. M., INFANTE C., GIRALT M. T. Chronic variable stress induces supersensitivity of central α_2 -adrenoceptors which modulate the jaw-opening reflex in the rat. *Brain Res*, 801:72-7, 1998.
- GARRETT, B. E., GRIFFITHS, R. R. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 57:533-41, 1997.
- GEAR R. W., ALEY K. O., LEVINE J. D. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci*, 19:7175-81, 1999.
- GLANTZ S. A. *Primer of biostatistics*. 4^a ed. New York: McCraw-Hill, 473 p, 1997.
- GOMEZ F. M., GARCIA-VALLEJO P., INFANTE C., MAGDALENO F., ARESO P. Repeated tail pinch leads to desensitization of postsynaptic α_2 -adrenoceptors which modulate the jaw-opening reflex in the rat. *Psychopharmacology*, 138:96-101, 1998.
- GOODMAN L. S., GILMAN A. C. Central Nervous System Stimulants: The Methyloxanthines. Rall, T.W. (ed.). In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. 7. New York, Macmillan Publishing, p.589-603, 1985.
- GURA E. V., YAKHNITSA V. A., LIMANSKII Y. P. Role of serotonergic system in inhibition of jaw-opening reflex induced by stimulation the midbrain central gray matter. *Neurophysiology*, 21;1:37-43, 1989.
- HECKMAN M. A., WEIL J., GONZALEZ DE MEJIA E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci*, 75(3):77-87, 2010.
- HO L., VARGHESE M., WANG J., ZHAO W., CHEN F., KNABLE L. A., FERRUZZI M., PASINETTI G. M. Dietary supplementation with decaffeinated green coffee improves diet-induced insulin resistance and brain energy metabolism in mice. *Nutr Neurosci*, 15(1):37-45, 2012.

- HUBER W. W., SCHARF G., NAGEL G., PRUSTOMERSKY S., SCHULTEHERMANN R., KAINA B. Coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol increase the activity of O-metilguanine-DNA methyltransferase in rat liver-comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutat Res*, 522:57-68, 2003.
- KANDEL E. R., SCHWARTZ J. H., JESSEL T. M. *Princípios de Neurociências*. Cap. 6, 7,8,9. Editora Manole Ltda, Rio de Janeiro, 4ª edição, 2003.
- KATAKURA N., CHANDLER S. H. Iontophoretic analysis of the pharmacological mechanisms responsible for initiation and modulation of trigeminal motoneuronal discharge evoked by intra-oral afferent stimulation. *Brain Res*, 549:66-77, 1991.
- KAUBE H, KATSARAVA Z, KAUFER T, DIENER H, ELLRICH J. A new method to increase nociception specificity of the human blink reflex. *Clin Neurophysiol*, 111:413-6, 2000.
- KEAST R. S., RIDDELL L. J. Caffeine as a flavor additive in soft-drinks. *Appetite*, 49(1):255-9, 2007.
- KIDOKORO Y., KUBOTA K., SHUTO S., SUMINO R. Reflex organization of masticatory muscles in the cat. *J Neurophysiol*, 31:695-708, 1968.
- KILGORE W. D., KILGORE D. B., GANESAN G., KRUGLER A. L., KAMIMORI G. H. Trait-anger enhances effects of caffeine on psychomotor vigilance performance. *Percept Mot Skills*, 103(3):883-6, 2006.
- KOHLER M., PAVY A., VAN DEN HEUVEL C. The effects of chewing versus caffeine on alertness, cognitive performance and cardiac autonomic activity during sleep deprivation. *J Sleep Res*, 15(4):358-68, 2006.
- KUROSE M., YAMAMURA K., NOGUCHI M., INOUE M., OOTAKI S., YAMADA Y. Modulation of jaw reflexes induced by noxious stimulation to the muscle in anesthetized rats. *Brain Res*, 11;1041(1):72-86, 2005.
- LAVIGNE G. J., ROMPRÉ P. H., MONTPLAISIR J. Sleep bruxism: validity of clinical research diagnostic criteria in a controlled polysomnographic study. *J Dent Res*, 75: 546-52, 1996.

- LAVIGNE G. J., KATO T., KOLTA A., SESSLE B. J. Neurobiological Mechanisms I. Involved in Sleep Bruxism. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14(1);30-46, 2003.
- LUND J. P. The importance of reflexes and their control during jaw movement. *Trends Neurosci*, 6:458-63, 1983.
- MACHADO A. B. M. *Neuroanatomia Funcional*. 2ª edição - São Paulo: Editora Atheneu, p.1-189, 2002.
- MILES T. S. Postural control of the human mandible. *Arch Oral Biol*, 52(4):347-52. Epub Jan 25, 2007.
- MONTEIRO M. C., TRUGO L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim Nova*, 28(4):637-41, 2005.
- NAGANUMA T., KURIYAMA S., KAKIZAKI M., SONE T., NAKAYA N., OHMORI-MATSUDA K., NISHINO Y., FUKAO A., TSUJI I. Coffee consumption and the risk of oral, pharyngeal, and esophageal cancers in Japan. The Miyagi Cohort Study. *Am J Epidemiol*, 168:1425-32, 2008.
- NATELLA F., NARDINI M., GIANNETTI I., DATTILO C., SCACCINI C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem*, 9;50(21):6211-6, 2002.
- NEFF P. A. Occlusion and function. Publisher: Neff, by Georgetown University School of Dentistry; 59p, 1975.
- NEHLIG A., DAVAL J. L., DEBRY G. Caffeine and the central nervous system: Mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res. Brain Res Rev*, 17:139-70, 1992.
- NOSCHANG C. G., KROLOW R., PETTENUZZO L. F., ÁVILA M. C., FACHIN A., ARCEGO D., TOIGO E. V. P., CREMA L. M., DIEHL L. A., VENDITE D., DALMAZ C. Interactions Between Chronic Stress and Chronic Consumption of Caffeine on the Enzymatic Antioxidant System. *Neurochem Res*, 34(9):1568-74, 2009.
- NURMINEN M. L., NIITTYNEN L., KORPELA R., VAPAATALO H. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *Eur J Clin Nutr*, 53:831-9, 1999.
- OHAYON M. M., LI K. K., GUILLEMINAULT.C. Risk factors for sleep bruxism in the

- general population. *Chest*, 119(1):53-61, 2001.
- OKESON J. P. Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão. 6^a ed. Trad. Miranda ME. São Paulo: Artes Médicas, 2008.
- PAPADELIS C., KOURTIDOU-PAPADELI C., VLACHOGIANNIS E., SKEPASTIANOS P., BAMIDIS P., MAGLAVERAS N., PAPPAS K. Effects of mental workload and caffeine on catecholamines and blood pressure compared to performance variations. *Brain Cogn*, 51(1):143–54, 2003.
- RANG H. P., DALE M. M., RITTER J. M., MOROE P. K. Efeitos nocivos dos fármacos. In: RANG, H. P. et al. *Farmacologia*. 5^a edição Rio de Janeiro: Editora Elsevier, p.825-56. 2004.
- RETEY J. V., ADAM M., KHATAMI R., LUHMANN U. F., JUNG H. H., BERGER W., LANDOLT H. P. A genetic variation in the adenosine A2A receptor gene (ADORA2A) contributes to individual sensitivity to caffeine effects on sleep. *Clin Pharmacol Ther*, 81(5):692-98, 2007.
- RIBEIRO D. O., VALLE L. E., METZLER C. W., JACOBS B. L. Facilitation of masseter EMG and masseteric (jaw closure) reflex by serotonin in behaving cats. *Brain Res*, 7;550(2):197-204, 1991.
- RIBEIRO J. A., SEBASTIAO A. M., MENDONÇA A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol*, 68(6):377-92, 2003.
- RIEDEL W., HOGERVORST E., LEBOUX R., VERHEY F., VAN PRAAG H., JOLLES J. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. *Psychopharmacology*, 122(2):158-68, 1995.
- SCHOLEY A. B., KENNEDY D. O. Cognitive and physiological effects of an "energy drink": an evaluation of the whole drink and of glucose, caffeine and herbal flavouring fractions. *Psychopharmacology*, 176(3-4):320-30, 2004.
- SEBASTIÃO A. M., CUNHA R. A., MENDONÇA A., RIBEIRO J. A. Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *Br J Pharmacol*, 131(8):1629-34, 2000.

- SELIG D. K. e MALENKA R. C. Extracellular field potential recording in brain slices. *AxoBits*, 20:7-10, 1997.
- SESSLE B. J: Mastication, swallowing, and related activities. In Roth G.I., Calmes R., editors: *Oral Biology*, St Louis, Mosby, 1981.
- SHIMBO M., NAKAMURA K., JING SHI H., KIZUKI M., SEINO K., INOSE T., TAKANO T. Green tea consumption in everyday life and mental health. *Public Health Nutr*, 8(8);1300-6, 2005.
- SILVA J. S. Colheita, secagem e armazenamento do café. In: I ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, Viçosa, MG. Anais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; p.39-80, 1999.
- SINDICAFÉ, SINDICATO DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. *Café no Mundo*. 2005. Disponível no site <http://sindicafe-mg.com.br/plus/modulos/conteudo/?tac=cafe-no-mundo>. Acesso em 25/09/2011.
- SMITH A. W. Introduction. In: CLARKE R. J.; MACRAE R. (Ed.) *Coffee chemistry*, v1;1-41. London: Elsevier Applied Science, 1989.
- SMITH A. Effects of caffeine on human behavior. *Food Chemical Toxicology*, 40(9):1243-55, 2002.
- SMITH A., BRICE C., NASH J., RICH N., NUTT D. J. Caffeine and central noradrenaline: effects on mood, cognitive performance, eye movements and cardiovascular function. *J Psychopharmacol*, 17(3):283-92, 2003.
- SOKOLOFF A. J. Activity of tongue muscles during respiration: it takes a village? Review. *J Appl Physiol*, 96(2):438-9, 2004.
- TANAKA K., TOKUNAGA S., KONO S. Coffee consumption and decreased serumgamma-glutamyltransferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. *Int J Epidemiol*, 27:438-43, 1998.
- TAKEDA M., TANIMOTO T., OJIMA K., MATSUMOTO S. Suppressive effect of vagal afferents on the activity of the trigeminal spinal neurons related to the jaw-opening reflex in rats: involvement of the endogenous opioid system. *Brain Res Bull*, 47:49-56, 1998.

- TSAI C. M., CHIANG C. Y., YU X. M., SESSLE B. J. Involvement of trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) in craniofacial nociceptive reflex activity. *Pain*, 81:115-28, 1999.
- TURESKY R. J., RICHOSZ J., CONSTABLE, A., CURTIS, K. D., DINGLEY, K. H., TURTELTAUB, K. W. The effects of coffee on enzymes involved in metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine in rats. *Chem Biol Interact*, 145:251-26, 2003.
- ULUCAN C., SCHNELL C., MESSLINGER K., ELLRICH J. Effects of acetylsalicylic acid and morphine on neurons of the rostral ventromedial medulla in rat. *Neurosci Res*, 47:391-7, 2003.
- VITORINO M. D., FRANÇA A. S., OLIVEIRA L. S., BORGES M. L. A. Metodologia de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis. *Revista Brasileira de Armazenamento*, V. Especial café, nº.3, p.17-24, 2001.
- WALTON C., KALMAR J. M., CAFARELLI E. Effect of caffeine on self-sustained firing in human motor units. *Journal of Physiology*, Dec1:v.545;2:671-9, 2002.
- YAMATO T., YAMASAKI S., MISUMI Y., KINO M., OBATA T., AOMINE M. Modulation of the stress response by coffee: an in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. *Neurosc, Letters*, v.332:87-90, 2002.

R114e Rabelo, Márcio José Martins.
Efeito do café e da cafeína na modulação do reflexo mandibular de
abertura da boca em ratos anestesiados / Márcio José Martins Rabelo. –
2012.

75 f. : il.

Orientador: Dr. Tasso Moraes e Santos.
Co-orientador: Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos.

1. Café - Pesquisa - Teses. 2. Cafeína – Teses. 3. Reflexos –
Teses. 4. Neurônios motores - Teses. I. Moraes-Santos, Tasso. II.
Moraes, Márcio Flávio Dutra. III. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 663.93