

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

Estudo epidemiológico do consumo de café, sua contribuição na ingestão de polifenóis e seus potenciais efeitos em fatores de risco cardiovascular, considerando variações genéticas individuais

Andreia Alexandra Machado Miranda

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Profa. Assoc. Dirce Maria Lobo Marchioni

**São Paulo
2017**

Estudo epidemiológico do consumo de café, sua contribuição na ingestão de polifenóis e seus potenciais efeitos em fatores de risco cardiovascular, considerando variações genéticas individuais

Andreia Alexandra Machado Miranda

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Profa. Assoc. Dirce Maria Lobo Marchioni

**Versão Original
São Paulo
2017**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

AGRADECIMENTOS

Uma tese, não é um trabalho que se constrói de forma individual. Ao longo do seu desenvolvimento, várias foram as pessoas que contribuíram para que esta pudesse ser concluída!

É com grande estima, carinho e gratidão que aqui expresso o meu apreço por todos aqueles que de alguma forma, estiveram envolvidos nesta investigação, me acolheram de forma amistosa e tornaram os meus dias tão especiais...

À Profa. Dirce Marchioni, minha querida orientadora, que carinhosamente me acolheu, incentivou e direcionou à área da pesquisa. Agradeço pela confiança, todo o aprendizado e pelo apoio nestes quatro anos de convivência.

À Profa. Regina Fisberg, pela colaboração, valiosos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação acadêmica e por todos os momentos de bom humor e alegria.

Às professoras Alessandra Goulart, Cristiane Cominetti, Rosangela Pereira e Semiramis Domene, agradeço pela leitura, disponibilidade e importantes contribuições para o aprimoramento da tese.

À eterna amiga Rita Seara, que apesar da distância, é uma das amigas mais próximas, que sempre me apoiou e acreditou que conseguiria superar todos os obstáculos. Obrigada pela força, carinho e pelos muitos “cafázinhos” repletos de risadas.

À querida Diva Vieira, minha irmãzinha brasileira, pela amizade, infinitas conversas e ótima companhia. Obrigada pelas valiosas orientações e conselhos, por me ouvir quando preciava, pelas palavras de incentivo e por todo o cuidado.

À queridíssima Josiane Steluti, pela amizade, todo o apoio, preocupação, pelos momentos de descontração, pela sua preciosa ajuda e por compartilhar os seus conhecimentos, de forma tão generosa e carinhosa.

À querida Mariane Fontanelli, pela amizade, ternura, otimismo, constante disponibilidade, pelas longas conversas na “salinha” e pelos momentos de superação conjunta.

À querida Ana Pallottini, pela amizade, carinho, axé, boa disposição e pelas inúmeras risadas durante os longos cafés.

À querida Jaqueline Pereira, pelo carinho, agradável companhia e acima de tudo, pela amizade que construímos.

À querida Raíssa do Vale, pelo bom-humor infindável, pela tranquilidade, calma, otimismo e os bons momentos de descontração que passamos juntas.

À Adélia Pereira e à Ângela Martinez, amigas queridas e ótimas companhias. Obrigada pelos momentos de bom humor e diversão.

Ao querido Augusto Carioca, pela parceria, proveitosas discussões académicas e ânimo.

Ao querido Eduardo de Carli, pela sincera amizade, agradável colaboração, momentos de alegria e longas conversas.

Às amigas Roberta Santos, Bartira Gorgulho, Juliana Teixeira e ao caro Alexsandro Silva, pela acolhida no grupo de pesquisa, pelas parcerias e proveitosos períodos de discussão e pela agradável companhia nos congressos e viagens.

À querida Jéssica Levy, pela docura, por seu empenho e dedicação, que muito facilitou o meu trabalho de co-orientação.

À querida Cristiane Hermes, pela amizade, companhia, sabedoria e contribuições.

Às queridas Aline Veroneze, Luana Romão e Paula Santos, pelo seu espírito jovem, leve e por trazerem mais alegria para a “salinha”.

Aos alunos e ex-alunos do Grupo de Avaliação do Consumo Alimentar e do Grupo de Estudos Epidemiológicos e Inovação em Alimentação e Saúde, pelos ensinamentos, parceria e colaboração.

Aos funcionários da Pós-graduação da Nutrição em Saúde Pública, do Departamento de Nutrição, da Biblioteca e do Refeitório, por serem sempre tão solícitos, gentis e carinhosos.

Às minhas amigas portuguesinhas, Ana Isabel Silva, Ana Maria Araújo, Elisa Cruz, Elisabete Machado, Filomena Gomes, Gonçalina Góis, Lilia Ferreiro e Vânia Carvalho, pela longa amizade, incentivo, energias positivas e torcida do outro lado do Atlântico.

Aos queridos amigos da Igreja, pela companhia, ânimo e longas conversas nas tardes de domingo.

Às queridíssimas senhoras do voluntariado, D. Ana Maria Esteves, D. Denise, D. Edna Karkoska, D. Neusa Molliet, D. Oli Minutti, D. Sandra Pimho e ao amável Sr. Artur Grinkraut, por serem uma fonte de inspiração e generosidade, por todo o cuidado e amizade.

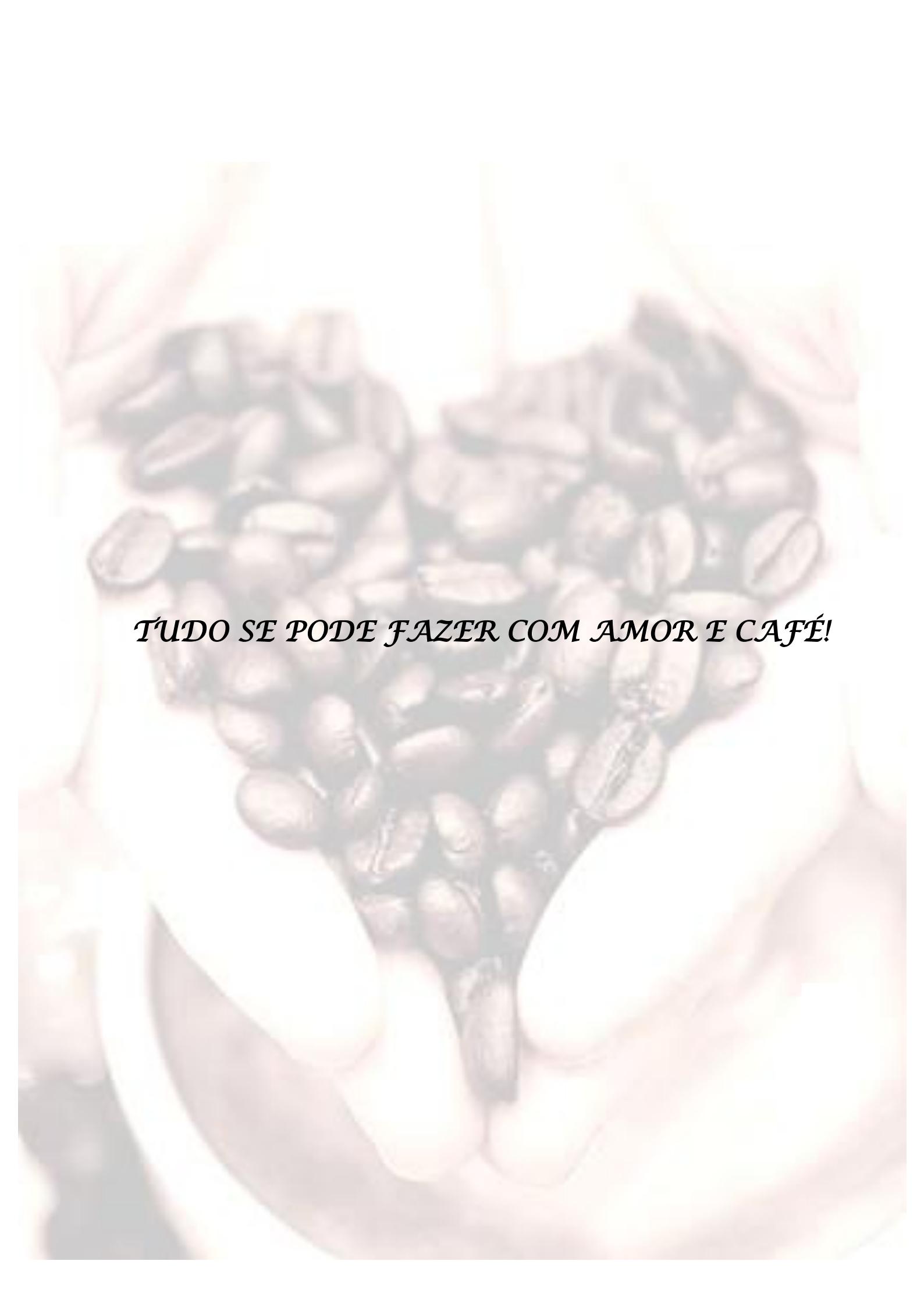
À D. Elisabeth Marcondes e ao Sr. Valdemar Pereira, meus pais brasileiros de coração, que me acolheram, orientaram e ajudaram desde o início da minha estadia em São Paulo. Obrigada pelo infinito carinho, preocupação, apoio, incentivo e por me fazerem sentir em casa.

Aos meus amados pais, Dagoberto Miranda e Irene Miranda, a quem sempre prestarei infinita gratidão, pelo seu amor incondicional, incomensurável apoio, otimismo diário e por não medirem esforços para a realização desta conquista.

Aos meus avózinhos Adriano Machado, António Miranda, Lucília Rosa, Maria Olimpia Sousa e tia Sãozinha Machado, por todo o amor, carinho, incentivo e orações.

Agradeço imensamente a Deus, pelas suas infinitas bênçãos ao longa desta jornada e por ter permitido que vivenciasse todos estes momentos especiais de crescimento e realização pessoal e profissional.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado (processo FAPESP nº 2014/04540-2), que muito contribuiu para a realização deste trabalho.



TUDO SE PODE FAZER COM AMOR E CAFÉ!

RESUMO

Miranda AAM. Estudo epidemiológico do consumo de café, sua contribuição na ingestão de polifenóis e seus potenciais efeitos em fatores de risco cardiovascular, considerando variações genéticas individuais [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2017.

Introdução: O café é uma das bebidas mais consumidas no Brasil e no mundo Ocidental, o que explica o grande interesse por parte dos pesquisadores. Dentre as diversas substâncias presentes na composição química do café, destacam-se os polifenóis. Alguns estudos têm verificado os efeitos fisiológicos destas substâncias bioativas na saúde humana, nomeadamente nas doenças cardiovasculares. Contudo, os resultados são ainda conflitantes e inconclusivos. **Objetivos:** Estimar a prevalência do consumo de café e sua contribuição na ingestão de polifenóis; investigar a associação do café com fatores de risco cardiovascular, e analisar a interação entre as variações genéticas e o consumo de café nos níveis de pressão arterial (PA), em amostra representativa de adultos e idosos residentes no município de São Paulo. **Métodos:** Utilizaram-se dados procedentes do estudo transversal de base populacional ISA-Capital 2008 e do banco de dados de polifenóis “Phenol-Explorer versão 3.5”. Para o presente estudo, foram incluídos indivíduos com 20 anos ou mais, de ambos os sexos, residentes na área urbana do município de São Paulo. O consumo alimentar foi avaliado por meio de dois recordatórios de 24 horas e o consumo de café foi categorizado em: <1 xícara/dia (equivalente a <50 mL), 1 a 3 xícaras/dia (50 a 150 mL) e ≥3 xícaras/dia (≥ 150 mL). Utilizou-se um questionário estruturado para obter informações socioeconômicas, demográficas e de estilo de vida. Aferiu-se a PA, realizaram-se medições antropométricas e coletaram-se amostras de sangue em jejum de 12 horas para as análises bioquímicas. Os analitos séricos avaliados foram: homocisteína, glicose em jejum, triacilgliceróis, colesterol total e frações plasmáticas (LDL-c e HDL-c). A genotipagem dos polimorfismos foi realizada utilizando a técnica PCR-alelo específico. Foram avaliados os polimorfismos envolvidos no metabolismo da cafeína, consumo de café e relacionados à PA. A partir de estudos de associação ampla do genoma (GWAS) previamente descritos na literatura, selecionaram-se os polimorfismos candidatos associados com a PA: *CYP1A1/CYP1A2* (rs2470893),

CYP1A1/CYP1A2 (rs2472297), *CPLX3/ULK3* (rs6495122), *MTHFR* (rs17367504). Posteriormente, foi calculado um escore genético de risco (do inglês, GRS) para a PA baseado nestes polimorfismos, o qual variou de zero a oito pontos, de acordo com o número de alelos de risco. As análises estatísticas foram efetuadas por modelos de regressão logística múltipla, no software STATA®, sendo considerado um nível de significância de 0,05.

Resultados: Verificou-se que o consumo médio de café nos residentes no Município de São Paulo foi de aproximadamente 140 mL/dia, e que esta bebida contribuiu com 70,5% da ingestão total de polifenóis. Após análises de regressão logística múltipla, encontrou-se uma associação inversa entre o consumo moderado de café e alguns dos fatores de risco cardiovascular (FRCV). Observou-se que, os indivíduos que consumiam diariamente de 1 a 3 xícaras de café, reduziram a chance de ter PA sistólica elevada ($OR= 0,45$; IC 95% = 0,26-0,78); PA diastólica elevada ($OR= 0,44$; IC 95% = 0,20-0,98) e concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína ($OR= 0,32$; IC 95% = 0,11-0,93), quando comparados aos indivíduos que tomavam menos de 1 xícara por dia. Além disso, constatou-se que o consumo de café pode interagir com a predisposição genética individual, influenciando a PA. Há medida que aumentou a pontuação no GRS, verificou-se uma maior chance dos indivíduos apresentarem níveis de PA elevada, principalmente naqueles com um alto consumo de café (superior a 3 xícaras por dia) ($OR= 5,09$; IC 95% = 1,32-19,7). **Conclusões:** Este estudo sugere que a prevalência do consumo de café por indivíduos adultos e idosos residentes em São Paulo é alta, o que contribui para a maior parte da ingestão de polifenóis da alimentação. Por ser uma bebida rica nestes compostos bioativos, o seu consumo moderado, parece exercer um efeito protetor em FRCV, nomeadamente na regulação da PA elevada e nas concentrações plasmáticas de homocisteína. Além disso, verifica-se uma interação entre o consumo de café e os polimorfismos genéticos nos níveis de PA, sublinhando a importância de reduzir o seu consumo para doses inferiores a 3 xícaras diárias, nos indivíduos geneticamente predispostos a este fator de risco cardiovascular.

Descritores: Consumo alimentar, Café, Polifenóis, Doenças cardiovasculares, Homocisteína, Pressão arterial, Lipídeos, Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Miranda AAM. Epidemiological study of coffee consumption, its contribution to the intake of polyphenols and their potential effects in cardiovascular risk factors, considering individual genetic variations [thesis]. São Paulo: School of Public Health, USP; 2017.

Introduction: Coffee is one of the most consumed non-alcoholic beverages in Brazil and the Western world, which explains the great interest of the researchers. Among the various substances present in the coffee composition, polyphenols are noteworthy. Some studies have verified the physiological effects of these bioactive substances on human health, especially in cardiovascular diseases. However, the results are still conflicting and inconclusive.

Objectives: To estimate the prevalence of coffee consumption and its contribution in the intake of polyphenols, to investigate the association of coffee consumption with cardiovascular risk factors, and to analyze the interaction between genetic polymorphisms and coffee in blood pressure (BP), in a representative sample of adult and older adults of the city of São Paulo. **Methods:** Data come from the cross-sectional population-based study “ISA-Capital 2008” and the polyphenol database “Phenol-Explorer version 3.5”. For the present study, we included adults and older adults, of both sexes, living in the urban area of the São Paulo city. Dietary intake was estimated by two 24-hour dietary recalls and coffee consumption was categorized into <1 (<50 mL), 1–3 (50–150 mL), and ≥3 cups/day (≥150 mL). Socioeconomic, demographic and lifestyle data were obtained through a structured questionnaire. Blood samples were collected after a 12-hour fasting for biochemical analysis and blood pressure (BP), weight, height were measured. The analytes analysed were plasma homocysteine, triglycerides, total cholesterol, and plasma fractions (HDL-c and LDL-c). Genotyping was performed using the PCR-allele-specific technique. Genetic polymorphisms involved in caffeine metabolism, coffee consumption and BP-related were identified. The following polymorphisms associated with BP [CYP1A1/CYP1A2 (rs2470893), CYP1A1/CYP1A2 (rs2472297), CPLX3/ULK3 (rs6495122), MTHFR (rs17367504)], were selected and obtained from the genome wide association studies (GWAS). Subsequently, a genetic risk score (GRS) for BP was calculated based on these polymorphisms, which ranged from zero to eight points, according to the number of risk alleles. All analyses were

performed with Stata® and a p-value < 0.05 was considered statistically significant. **Results:** The coffee consumption mean in the residents of São Paulo city was approximately 140 mL/day, and this beverage contributed with 70.5% of the total polyphenol intake. After multiple logistic regression analysis, an inverse association between moderate coffee consumption and some of the cardiovascular risk factors (CVRF) was observed. The individuals who drank 1–3 cups of coffee/day reduced the odds of elevated systolic blood pressure (SBP) (OR= 0.45; 95% CI= 0.26, 0.78), elevated diastolic blood pressure (DBP) (OR= 0.44; 95% CI= 0.20, 0.98), and hyperhomocysteinemia (OR= 0.32; 95% CI= 0.11, 0.93), when compared to subjects who consumed less than 1 cup/day. Furthermore, coffee consumption may interact with individual genetic predisposition, influencing BP. Individuals with a higher genetic risk score (GRS) appear to have high BP levels (OR= 5.09; 95% CI= 1.32-19.7), related to higher coffee consumption (greater than 3 cups/day). **Conclusions:** This study suggests that the prevalence of coffee consumption by adult and older adults living in São Paulo is high, which contributes to the majority of the polyphenol intake from the diet. The moderate consumption of this beverage seems to exert a protective effect on CVRF, principally in the regulation of high BP and hyperhomocysteinemia. In addition, there is an interaction between the consumption of this beverage and the GRS for high BP, highlighting the importance of reduce coffee consumption to doses below 3 cups/day, in individuals genetically predisposed to this CV risk factor.

Keywords: Food consumption, Coffee, Polyphenols, Cardiovascular diseases, Homocysteine, Blood pressure, Lipids, Genetic polymorphism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 CONSUMO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ	19
1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES E DOS FATORES DE RISCO RELACIONADOS	21
1.3 POLIFENÓIS.....	29
1.3.1 Polifenóis presentes no café.....	38
1.4 EFEITO DO CAFÉ NOS FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR	39
1.5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DA CAFEÍNA, CONSUMO DE CAFÉ E NIVEIS DE PRESSÃO ARTERIAL	52
1.6 ESCORE GENÉTICO DE RISCO PARA A PRESSÃO ARTERIAL E INTERAÇÃO COM O CONSUMO DE CAFÉ	58
2 JUSTIFICATIVA.....	59
3 OBJETIVOS	60
3.1 OBJETIVO GERAL	60
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
4 METODOLOGIA	62
4.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	62
4.2 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DE ESTUDO	62
4.3 AMOSTRAGEM	63
4.4 TAMANHO DA AMOSTRA	64
4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS	65
4.5.1 Dados socioeconômicos, de estilo de vida e saúde.....	66
4.5.2 Dados de consumo alimentar.....	67
4.5.3 Avaliação antropométrica.....	69
4.5.4 Aferição da pressão arterial.....	70
4.5.5 Dados bioquímicos e avaliação do perfil lipídico.....	70
4.5.6 Extração do DNA e genotipagem.....	72
4.5.6.1 Seleção dos SNP e construção do Escore Genético de Risco (GRS)	77
4.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	78
4.7 BANCO DE DADOS "PHENOL-EXPLORER"	80
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	87
4.9 ASPECTOS ÉTICOS.....	89

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.1	PRIMEIRO MANUSCRITO	90
5.2	SEGUNDO MANUSCRITO ..	116
5.3	TERCEIRO MANUSCRITO ..	140
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	167
7	REFERÊNCIAS	169
8	ANEXOS	191

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Subdivisão de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal.	29
Figura 2. Estrutura química dos polifenóis.	30
Figura 3. Propriedades biológicas dos polifenóis e principais mecanismos na redução do risco de DCV.	34
Figura 4. Fluxograma da amostra elegível para os três manuscritos apresentados na tese. ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.	65
Quadro 1. Características dos polimorfismos presentes nas enzimas que atuam no metabolismo da cafeína, consumo de café e nos níveis de pressão arterial. ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.	74
Quadro 2. Variáveis de estudo segundo o manuscrito. ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.	78
Quadro 3. Classificação dos alimentos para o estudo ISA-Capital 2008, segundo a base de dados <i>Phenol-Explorer</i> . São Paulo. Brasil.	85
Quadro 4. Classificação dos polifenóis presentes nos alimentos, segundo a base de dados <i>Phenol-Explorer</i> . ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.	86

Manuscrito 1

Table 1. General characteristics of the studied population (ISA-Capital 08), Sao Paulo, Brazil.	111
Table 2. Total polyphenol intake according to socio-demographic and lifestyle characteristics of the studied population (ISA-Capital 08). Sao Paulo, Brazil.	112
Table 3. Total, classes and subclasses of polyphenol intake, according to food group sources and main food contributors, Sao Paulo, Brazil.	113
Table 4. Main food contributors for adults and elderly adults, according to total and classes of polyphenol intake, Sao Paulo, Brazil.	114
Table 5. Polyphenol intake from coffee by individuals in Sao Paulo, Brazil.	115

Manuscrito 2

Table 1. General characteristics of the Health Survey of São Paulo (ISA-Capital) population according to category of coffee consumption. São Paulo, Brazil, 2008/09.	136
Table 2. Association between cardiovascular risk factors and categories of coffee consumption in Health Survey of São Paulo (ISA-Capital) population. São Paulo, Brazil, 2008/09.	138
Table 3. Association between cardiovascular risk factors and categories of coffee polyphenol intake in Health Survey of São Paulo (ISA-Capital) population. São Paulo, Brazil, 2008/09.	139

Manuscrito 3

Table 1. Panel of genetic variants, minor allele frequency and Hardy-Weinberg equilibrium of the eleven polymorphisms involved in coffee consumption and caffeine metabolism. ISA-Capital 2008. Sao Paulo, Brazil.	162
Table 2. Genotype frequencies of the SNPs and general characteristics of the study population according to genotypes (N=533). ISA-Capital 2008. Sao Paulo, Brazil.	163
Table 3. Crude and adjusted odds ratios (95% CI) for blood pressure (BP) across genetic risk score (GRS). ISA-Capital 2008. Sao Paulo, Brazil.	164
Table 4. Genetic risk score (GRS)-coffee consumption interaction and associations between the GRS and high blood pressure (BP) stratified by categories of coffee consumption. ISA-Capital 2008. Sao Paulo, Brazil.	165
Supplementary Figure 1. Plot of pairwise linkage disequilibrium for polymorphisms in the CYP1A1/CYP1A2 and CPLX3/ULK3 regions (15q24) genotyped in the ISA-Capital study population.	166

LISTA DE ABREVIATURAS

μL , Microlitros

$\mu\text{mol/L}$, Micromole por Litro

Ácido 5-metil THF, Ácido 5-metil tetra-hidrofolico

ABIC, Associação Brasileira da Indústria de Café

ADORA2A, Receptor de Adenosina A_{2A}

AHR, Receptor de Aril Hidrocarbonetos

CAGE, *Cutdown, Annoyed by criticism, Guilty e Eye-opener*

CEPT, *Cholesterol Ester Transfer Protein*

CT, Colesterol Total

CYP1A1, Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptideo 1

CYP1A2, Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptideo 2

CPLX3, Complexina 3

DALYS, Anos de vida ajustados por incapacidade

DCV, Doenças Cardiovasculares

DM, Diabetes *Mellitus*

DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2

DNA, Ácido desoxirribonucleico

ERO, Espécies Reativas de Oxigênio

FAO, *Food and Agriculture Organization*

FR, Fator de Retenção

FRCV, Fatores de Risco Cardiovascular

GBD, *Global Burden of Disease*

GJ, Glicemia de Jejum

GLP-1, *Glucagon-like peptide*

GRS, *Genetic Risk Score*

GWAS, *Genome Wide Association Studies*

HDL-c, *High density lipoprotein cholesterol*

HAS, Hipertensão Arterial Sistêmica

IMC, Índice de Massa Corporal

IPAQ, *International Physical Activity Questionnaire*

ISA-CAPITAL 2008, Inquérito de Saúde de São Paulo 2008

Kg, Quilogramas

L, Litros

LDL-c, *Low Density Lipoprotein Cholesterol*

mg, Miligramas

mL, Mililitros

mmHg, Milímetro de Mercúrio

MSM, *Multiple Source Method*

MTHFR, Metileno-Tetrahidrofolato Redutase

NDSR, *Nutrition Data System for Research*

OMS, Organização Mundial da Saúde

ON, Óxido Nítrico

OR, *Odds Ratio*

PA, Pressão Arterial

PAD, Pressão Arterial Diastólica

PAS, Pressão Arterial Sistólica

PLTP, *Phospholipid Transfer Protein*

QM, Quilomícrons

R24h, Recordatório Alimentar de 24 horas

RPM, Rotações por Minuto

SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*

SREBP, *Sterol Regulatory Element Binding Protein*

TG, Triacilgliceróis

ULK3, Proteína serina-treonina quinase

VLDL, *Very low density lipoprotein*

YF, Fator de Rendimento

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho utilizou dados oriundos do estudo ISA-Capital 2008, Inquérito de Saúde realizado no município de São Paulo, e foi orientado pela Professora Associada Dirce Maria Lobo Marchioni. A tese está estruturada em formato de artigos científicos, conforme as diretrizes aprovadas na 9^a. Sessão da Comissão da Pós-graduação da Faculdade de Saúde Pública em 05 de junho de 2008 e segue as normas estabelecidas pela Guia de Apresentação de Teses desta Instituição (CUENCA et al., 2008). Inclui as seguintes seções: (1) *Introdução*, que aborda o referencial teórico que norteia as hipóteses do presente trabalho; (2) *Justificativa*, que discorre sobre a relevância do trabalho e as possíveis contribuições para o conhecimento científico; (3) *Objetivos*, no qual são expostos os propósitos do estudo; (4) *Metodologia*, que contempla os procedimentos, técnicas e instrumentos utilizados na coleta, bem como o processamento e análise dos dados; (5) *Resultados e Discussão*, que incluem os manuscritos elaborados; (6) *Considerações finais*, que apresenta a síntese dos principais resultados do estudo; (7) *Referências bibliográficas*; (8) *Anexos*.

O primeiro manuscrito intitulado “*Dietary intake and food contributors of polyphenols in adults and elderly adults of São Paulo: a population-based study*” foi publicado no periódico *Bristish Journal of Nutrition*. O Segundo manuscrito intitulado “*Association between Coffee Consumption and Its Polyphenols with Cardiovascular Risk Factors: A Population-Based Study*” foi publicado na revista *Nutrients*. Já o terceiro manuscrito intitulado “*Coffee consumption and Genetic Risk Score in Blood Pressure: gene-diet interaction analysis in a population-based study*” será submetido ao periódico *European Journal of Nutrition* após a avaliação da banca examinadora.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSUMO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ

O café é uma das bebidas mais antigas, populares e apreciadas em todo o mundo. Teve a sua origem descrita na Etiópia e por volta do ano 800, espalhou-se pelo norte da África e chegou ao mundo árabe, em meados do século XV. No ano de 1727, chegou ao norte do Brasil, em Belém (PENAFORT, 2008). Atualmente, os principais produtores e exportadores mundiais de café são países da América Central e América do Sul (Brasil, Colômbia, Costa Rica, México), África (Etiópia) e Ásia (Indonésia). A Finlândia é o maior país consumidor de café, seguido pelo Brasil, Estados Unidos, Alemanha e Japão (ICO, 2015/2016).

Segundo o relatório dos Indicadores do Consumo de Café no Brasil, divulgado pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) em 2015, o consumo anual *per capita* nacional foi de 4,9 kg de café torrado e moído, o que equivale a 81 L para cada brasileiro por ano (ABIC, 2015). Além disso, o padrão básico do consumo alimentar em todo o País, proveniente dos dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares em 2008-2009, refere o café como o segundo alimento mais consumido, com uma prevalência de ingestão de 79% na população adulta (SOUZA et al., 2013).

Desta forma, dado o seu elevado consumo global que, de acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2015), atingiu cerca de nove milhões de toneladas por ano no mundo em 2015, bem como a sua importância econômica, a identificação de substâncias presentes no café e os potenciais efeitos fisiológicos e fisiopatológicos dos seus constituintes

suscitaram, desde cedo, o interesse da comunidade científica (MOREIRA et al., 2000; MONTEIRO e TRUGO, 2005; GARABONE e ROSA, 2007; ALVES et al., 2009).

Estima-se que o grão de café torrado possua mais de 2.000 compostos químicos, alguns com atividades biológicas conhecidas e potencialmente adversas ou benéficas para a saúde humana (ALVES et al., 2009). Deste modo, os efeitos do consumo de café dependem da qualidade e quantidade dos compostos químicos ingeridos. Encontram-se presentes uma grande variedade de micronutrientes: minerais, como o potássio, fósforo, magnésio, entre outros de menor expressão; vitamina E e niacina; aminoácidos, como glutamina, asparagina, valina, leucina e prolina; lipídeos como triacilgliceróis (TG) e ácidos graxos livres; açúcares como sucralose, glicose, frutose, arabinose, galactose, maltose e polissacarídeos.

Além dos nutrientes, o grão de café possui também compostos bioativos, sendo os mais estudados: a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), os diterpenos (cafestrol e *kahweol*) e os ácidos fenólicos, nomeadamente os ácidos hidroxicinâmicos, dos quais fazem parte o ácido cafeíco e os ácidos clorogênicos (cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos, feruloilquínicos e p-cumaroilquínicos) (MANACH et al., 2004; MONTEIRO e TRUGO, 2005; SALVA e LIMA, 2007; ABRAHÃO et al., 2008; ALVES et al., 2009; CANO-MARQUINA et al., 2013; MARCUCCI et al., 2013).

No entanto, a composição química da bebida é bastante variável e largamente dependente das espécies de café utilizadas, sendo as mais comuns a *Coffea arabica* (cerca de 60% da produção mundial) e a *Coffea canephora var. robusta* (atualmente mais de 25%) (ICO, 2017). Estas duas espécies diferem entre si pelas suas características organolépticas, físicas e químicas. De acordo com descrições feitas por ROSSETTI (2007) o café arábica origina sabor suave, levemente ácido e aromático, sendo por isso mais valorizado comercialmente. O café robusta resiste mais facilmente ao ataque de pragas durante o seu cultivo e é especialmente utilizado para aumentar o corpo e a espuma de algumas bebidas,

assim como para a produção de café solúvel. Por apresentar um sabor mais adstringente e amargo, não origina um café com a mesma qualidade do arábica (HALAL, 2008). Quimicamente, esta espécie contém menor teor de açúcares, mais sólidos solúveis e um teor de cafeína superior ao arábica (2,2% a 2,5% *versus* 1,1% a 1,3%) (HALAL, 2008).

Além da influência da espécie de café, o tipo de processamento a que os grãos verdes são sujeitos (via seca, úmida, mista ou descafeinização), o grau de torra (clara, média ou escura), de moagem (fina, média ou grossa), assim como o método de preparação da bebida (filtrado, fervido, expresso, solúvel, entre outros) e o respectivo volume, irão igualmente contribuir para a variação da composição química da bebida final (CARVALHO e CHALFOUN, 1985; SALVA e LIMA, 2007; ALVES et al., 2009).

Neste contexto, a magnitude dos efeitos individuais dos constituintes do café nas doenças crônicas, principalmente nas doenças cardiovasculares (DCV), continua por esclarecer, assim como, o potencial impacto do café na saúde humana, tendo em conta esta bebida como um todo e a sua composição química complexa (SILVA et al., 2007; BUTT e SULTAN, 2011; CORNELIS et al., 2012; CANO-MARQUINA et al., 2013; O'KEEFE et al., 2013).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES E DOS FATORES DE RISCO RELACIONADOS

Atualmente, as DCV são consideradas as principais responsáveis pela alta taxa de morbidade e mortalidade de doenças crônicas não transmissíveis em todo o mundo (GBD, 2015) e, na maioria dos países atingem grandes contingentes populacionais, além de

representarem elevados custos sociais e econômicos (RIBEIRO et al., 2012; MOZAFFARIAN et al., 2016).

Prevê-se que, até 2020, as DCV deverão aumentar os anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYS) em 150 milhões de pacientes, levando a uma expressiva queda da produtividade global (VILAHUR et al., 2014).

Segundo o relatório anual do *Global Burden of Disease* do ano de 2015 (GBD, 2015), as DCV constituíram a primeira causa de morte em todo o mundo, sendo responsáveis por 31% de todas as mortes em nível global, correspondendo a 17,9 milhões de óbitos por ano. Outro dado alarmante é o fato de que mais de 75% das mortes por DCV ocorrem em países de baixa e média renda. Acredita-se que mudanças no estilo de vida, associadas ao crescimento econômico e urbanização, reduções na morbimortalidade por doenças transmissíveis e na mortalidade perinatal, acompanhadas de aumento na prevalência de doenças crônicas, estão relacionadas à carga global das DCV, refletindo o período de transição epidemiológica que atravessam estes países (WHO, 2005).

No Brasil, tais doenças representam uma ameaça ao desenvolvimento social e econômico, sobretudo devido à grande proporção de óbitos que ocorrem prematuramente, além da elevada morbilidade que acarretam, sendo frequentemente responsáveis pela invalidez parcial ou total do indivíduo, com graves repercussões para a pessoa acometida, sua família e sociedade (MOURA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2017). Dados do Ministério da Saúde, evidenciam que as DCV continuam a ser a principal causa de morte na população brasileira, sendo que do total de óbitos registrados, 384.615 óbitos foram decorrentes de DCV, o que corresponde a 31% do total e 42% das mortes por DCNT, em 2012 (MS, 2012). Para além disso, o custo das internações por DCV é considerado o maior dentre as causas de internações hospitalares no Brasil (DUNCAN et al., 2012). O envelhecimento populacional, proveniente do aumento da expectativa de vida do brasileiro (IBGE, 2016) tende a aumentar a

incidência de DCV e, consequentemente, os gastos dispendidos em medicamentos, custos da previdência social e custos em serviços de saúde (SIQUEIRA et al., 2017). Estes fatos reforçam a importância desta patologia e alertam para a adoção de medidas preventivas efetivas. Desta forma, a consequente redução na morbidade e mortalidade relacionadas às DCV, deve ser um dos principais objetivos das políticas de saúde pública no Brasil e no mundo (GBD, 2015).

Neste sentido, torna-se necessário investigar os fatores de risco envolvidos na etiologia e progressão da DCV, pois a sua identificação e controle têm importância crucial na predição do desenvolvimento e na prevenção das manifestações clínicas destas patologias, impactando na redução da morbimortalidade por DCV. Os fatores de risco cardiovascular (FRCV) são caracterizados pela sua prevalência cada vez mais precoce na população (MAY et al., 2012; PÉREZ et al., 2014), mas também, por serem passíveis de controle por meio de modificações no estilo de vida (por exemplo, dieta, tabagismo, atividade física e consumo de álcool) (RIBEIRO et al., 2012).

Dados dos estudos *Prospective Cardiovascular Munster Study* (ASSMANN, 1988), *Multiple Risk Factor Intervention Trial* (STAMLER e NEATON, 2008) e *The Framingham Heart Study* (D'AGOSTINO et al., 2008), demonstraram o papel das dislipidemias, hipertensão arterial sistêmica (HAS), fumo, idade e diabetes *mellitus* (DM), como fatores de risco independentes para a aterosclerose e, consequente, a doença cardíaca. Além destes, existe a influência de outros potenciais fatores de risco, tais como, as concentrações aumentadas de fibrinogênio plasmático, de homocisteína e de fatores inflamatórios, como por exemplo, a proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-as ou PCR-us) (AKHABUE et al., 2014).

Do ponto de vista etiológico, a HAS, representa um dos mais importantes FRCV, pois além da sua direta associação com a morbidade e a mortalidade cardiovascular e renal, é uma

doença de alta prevalência mundial e apresenta baixas taxas de controle (MOZAFFARIAN et al., 2015; ROCHA e MARTINS, 2017).

A HAS, caracteriza-se por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, isto é, por valores de pressão arterial sistólica (PAS) iguais ou superiores a 140 mmHg, de pressão arterial diastólica (PAD) iguais ou superiores a 90 mmHg e/ou uso de medicação anti-hipertensiva (CHOBANIAN et al., 2003). A HAS afeta cerca de um terço dos adultos em todo o mundo, diminuindo a expectativa de vida e representa sete porcento da carga de doença - conforme medido em DALYS (WHO, 2014). Estima-se que, no Brasil, a HAS atinja 32,5% da população adulta, o que corresponde a cerca de 36 milhões de brasileiros e acomete mais de 60% dos idosos (SBC, 2016). É estimado que a PA elevada cause 9,4 milhões de mortes em todo o mundo a cada ano (WHO, 2014). Sabe-se que, para cada aumento de 20 mmHg na PAS ou 10 mmHg na PAD, há uma duplicação da mortalidade por doença cardíaca isquêmica e acidente vascular cerebral (CHOBANIAN et al., 2003).

Outro fator de risco cardiovascular bastante discutido na literatura são as dislipidemias (MILLER, 2009; NELSON, 2013; MOZAFFARIAN et al., 2015; HENDRANI et al., 2016; SBC, 2017), ou seja, alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico que ocasionem repercussão nos níveis séricos das lipoproteínas, incluindo elevadas concentrações de quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e/ou lipoproteínas de baixa densidade (LDL), assim como baixas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (NELSON, 2013; SBC, 2017).

Estas alterações lipídicas, representam um dos mais importantes fatores para o desenvolvimento e a progressão da doença aterosclerótica que constitui uma das principais causas de DCV (MILLER, 2009; HARIKUMAR et al., 2013; NELSON, 2013; SHATTAT, 2014; HENDRANI et al., 2016). O colesterol total (CT) deposita-se na parede arterial, constituindo um componente das placas de ateroma quando se encontra numa concentração

aumentada no plasma. O colesterol é produzido no fígado e transportado no sangue por moléculas compostas de proteínas e gordura, as lipoproteínas.

A fração de colesterol LDL (LDL-c), compõe aproximadamente 70% do CT sérico e é reconhecida como a principal lipoproteína aterogênica (TSOMPANIDI et al., 2010), contribuindo significativamente para a formação da placa de ateroma (NELSON, 2013; SHATTAT, 2014; SBC, 2017). A formação da placa aterosclerótica inicia-se por agressão ao endotélio vascular, mediada por diversos fatores que incluem, entre outros, a elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL-c, VLDL e remanescentes de QM). O endotélio disfuncional apresenta maior permeabilidade às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a infiltração e acumulação destas no espaço subendotelial. Esta fase de infiltração lipídica é seguida por modificações oxidativas de LDL-c, ou seja, as partículas de LDL-c sofrem oxidação, levando novamente a disfunção endotelial; esse endotélio apresenta menor reatividade vascular (NELSON, 2013; SHATTAT, 2014; SBC, 2017). Desta forma, o risco de atherosclerose aumenta, significativa e progressivamente, em indivíduos com concentrações de CT e LDL-c acima dos níveis de normalidade, bem como, com o aumento das concentrações de TG e a diminuição da fração de colesterol HDL (HDL-c) (SBC, 2017).

Um estudo observacional conduzido em nove capitais brasileiras, envolvendo 8.045 indivíduos com idade mediana de 35 (DP=10) anos, mostrou que 38% dos homens e 42% das mulheres possuíam concentrações plasmáticas de CT superior a 200 mg/dL, que é o valor de referência preconizado para os adultos maiores de 20 anos (SBC, 2007).

A glicemia de jejum (GJ) alterada também é considerada como um fator de risco de acometimentos cardiovasculares, pois a sua elevação plasmática acima dos valores de referência (≥ 100 mg/dL) (SBD, 2015/16), indica um potencial risco para o diabetes *mellitus* (POIAN, 2005) e uma consequente quebra da homeostase metabólica com aumentos

significativos dos valores basais de CT e TG (CRUZ FILHO et al., 2002; GENUTH et al., 2003; SCHAAN et al., 2004).

Entre os mecanismos fisiopatológicos pelos quais a hiperglicemia resulta numa aceleração da aterotrombogênese, estão a glicação de lipoproteínas, prolongando a meia-vida da LDL, facilitando a sua oxidação e aumentando o seu poder de agressão ao endotélio, além da formação de outros produtos finais de glicação, que promovem a disfunção endotelial generalizada (LAAKSO, 1999).

A elevada prevalência do diabetes *mellitus* ao nível mundial constitui um importante problema de saúde pública. Estima-se que sejam atualmente 387 milhões de diabéticos no mundo. A Pesquisa Nacional de Saúde – PNS (IBGE, 2013) estimou que, no Brasil, 6,2% da população com 18 anos ou mais de idade auto-referiram diagnóstico médico de DM, sendo de 7,0% nas mulheres e de 5,4% nos homens. Em relação à idade, as taxas variaram de 0,6% para a faixa etária de 18 a 29 anos a 19,9% para a de 65 a 74 anos (IBGE, 2013). O crescimento e envelhecimento populacional, a urbanização, a progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como, a maior sobrevida de pacientes com a patologia, são características que contribuem para o aumento de novos casos de DM (SBD, 2015/16).

Um dos mais recentes fatores de risco para as DCV é a elevação das concentrações plasmáticas de homocisteína (EL-KHAIRY et al., 1999; DE BREE et al., 2001; SPLAVER et al., 2004; RANHEIM et al., 2005; PINTO et al., 2009; CANO-MARQUINA et al., 2013), um aminoácido sulfurado, não essencial e não formador de proteínas. A homocisteína é formada a partir da desmetilação da metionina, através de uma reação enzimática que requer o folato, a cobalamina (vitamina B12), entre outros compostos. Uma vez formada, possui três importantes destinos metabólicos: ser remetilada a metionina, formar cisteína por meio da via de transulfuração ou ser liberada para o meio extracelular, de acordo com a sua formação intracelular e metabolismo (MEDINA et al., 2001).

Um ensaio clínico randomizado, sugeriu que uma elevação de 10% nas concentrações de homocisteína plasmática, refletiria num risco aumentado de 10 a 15% para a ocorrência das DCV (URGERT et al., 2000), e alguns estudos epidemiológicos constataram que mais de 40% dos pacientes com doença primária da artéria coronária, cerebrovascular ou vascular periférica apresentaram hiper-homocisteinemia (NAIR et al., 2000; NEVES et al., 2004; PINTO et al., 2009).

Denomina-se hiper-homocisteinemia, quando as concentrações plasmáticas de homocisteína são iguais ou superiores a 12 µmol/L para os indivíduos adultos e a 16 µmol/L para os idosos (REFSUM et al., 2004), sendo que, pode ser considerada moderada (de 16 a 30 µmol/L), intermediária (31 a 100 µmol/L), ou grave (superior a 100 µmol/L) (GRAVINA-TADDEI et al., 2005).

Os determinantes da hiper-homocisteinemia, são multifatoriais e envolvem ambos os componentes: adquiridos e genéticos. Causas adquiridas incluem a deficiência das vitaminas participantes do ciclo metil, isto é, folato, vitaminas B12 e B6 (piridoxina), fatores fisiológicos (idade, sexo), de estilo de vida (tabagismo, uso excessivo de café, uso de álcool, sedentarismo), a ação de alguns fármacos [óxido nítrico (ON), isoniazida, teofilina, carbamazepina, metotrexate, niacina, colestiramina], algumas doenças (insuficiência renal crônica, psoríase) (GRAVINA-TADDEI et al., 2005) e os fatores genéticos [variações genéticas dos genes das enzimas metilenotetrahidrofolatoredutase (MTHFR) e cistationina-β-sintase (CBS)], os quais se encontram associados à deficiência na quantidade ou diminuição da atividade das enzimas deste metabolismo (GRAVINA-TADDEI et al., 2005; YANG et al., 2008; LOPES et al., 2010).

No entanto, os mecanismos de ação pelos quais a hiper-homocisteinemia atua como fator de risco para as doenças cerebrovasculares, cardíacas e vasculares (BYDLOWSKI et al., 1998) ainda não estão totalmente esclarecidos. Porém, várias pesquisas apontam para

importantes fatores nesse processo como, lesão e disfunção endotelial, seguida da ativação plaquetária, proliferação de células lisas vasculares, distúrbios da coagulação e formação de ateromas na parede dos vasos sanguíneos (GRAVINA-TADDEI et al., 2005; D'ANGELO, 1997).

É importante destacar que os fatores de risco cardiovasculares, são frequentes na população geral e apresentam-se muitas vezes simultaneamente no mesmo indivíduo, o que pode pressupor a maximização do risco e potencial aceleração do processo de DCV (ROCHA e MARTINS, 2017). A predisposição genética e os fatores ambientais, tais como: o tabagismo, o sedentarismo, o consumo de bebida alcoólica, a dieta rica em energia, gorduras saturadas, sal e pobre em vegetais e frutas, podem também contribuir para a simultaneidade destes fatores de risco (WHO, 2009). Contudo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2009), estima que 75% das mortes por DCV podem ser reduzidas com mudanças no estilo de vida da população que interferem nos fatores de risco modificáveis, sendo este o grande desafio das diversas diretrizes existentes em prevenção cardiovascular.

Neste seguimento, nas últimas décadas, novas linhas de investigação têm dado especial importância aos compostos químicos bioativos presentes nos alimentos de origem vegetal, sugerindo potenciais efeitos benéficos e protetores na saúde cardiovascular dos consumidores (SCALBERT, JOHNSON e SALTMARSH, 2005; FALLER e FIALHO, 2009; HABAUZIT et al., 2012; TRESSERRA-RIMBAU et al., 2014a; TRESSERRA-RIMBAU, 2014b; GUO et al., 2016).

1.3 POLIFENÓIS: CLASSES, PRINCIPAIS FONTES ALIMENTARES E AÇÃO NA REDUÇÃO DO RISCO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Os compostos bioativos de alimentos, também denominados de fitoquímicos, apresentam algumas características em comum: pertencem maioritariamente a alimentos do reino vegetal, são substâncias orgânicas, geralmente de baixo peso molecular e não são sintetizados pelo organismo humano (BASTOS et al., 2009; FALLER e FIALHO, 2009; OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

Estes compostos existem em grande número e variam extensamente na estrutura química e nas funções biológicas, podendo ser subdivididos em distintos grupos, conforme evidencia o diagrama da Figura 1.

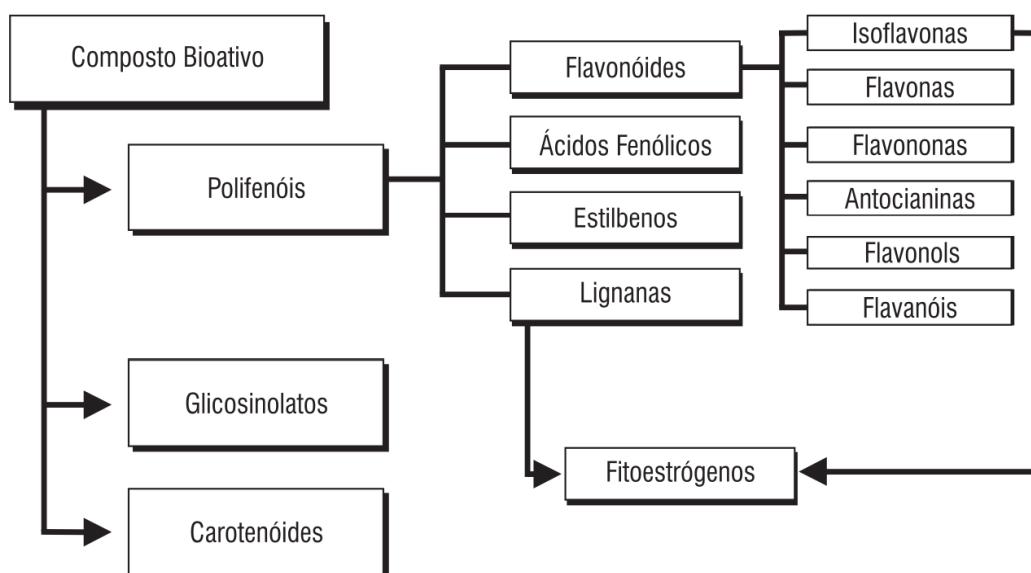


Figura 1. Subdivisão de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal.
Adaptado de CARRATÙ e SANZINI, 2005.

Os polifenóis ou compostos fenólicos constituem uma classe ampla e complexa dos compostos bioativos (BRAVO, 1998; FALLER e FIALHO, 2009), sendo onipresentes em alimentos de origem vegetal, como hortaliças (legumes e verduras), frutas, cereais e leguminosas, bem como em bebidas - chás, café, cacau, vinho, cerveja, suco de frutas e de soja (MANACH et al., 2004; SCALBERT, JOHNSON e SALTMARSH, 2005).

Em relação à sua estrutura química, os polifenóis caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula (SOARES, 2002). De acordo com o número de anéis fenólicos (aromáticos) e na maneira pela qual estes anéis se ligam uns aos outros, eles são classificados em quatro famílias: flavonóides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (MANACH et al., 2004; FALLER e FIALHO, 2009), conforme demonstra a Figura 2.

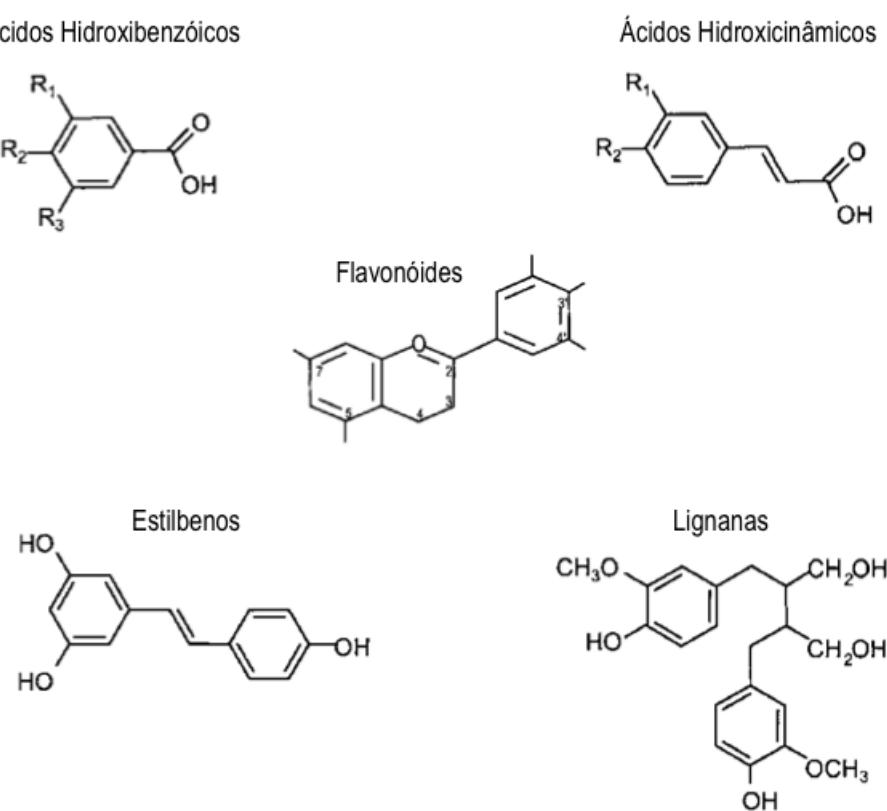


Figura 2. Estrutura química dos polifenóis. Extraído de MANACH et al., 2004.

Os flavonóides, por sua vez, constituem a maior e mais abundante classe de polifenóis, com mais de 5.000 compostos descritos (FALLER e FIALHO, 2009). Eles partilham uma estrutura comum que consiste em dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado e de acordo com a função do tipo de heterociclo podem ser divididos em seis subclasses: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis (catequinas e proantocianidinas) (MANACH et al., 2004). Por sua vez, os ácidos fenólicos incluem os compostos que possuem apenas um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxílicos. Duas subclasses principais de ácidos fenólicos podem ser distinguidas: os derivados do ácido benzóico e os derivados de ácido cinâmico. Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns que os ácidos hidroxibenzóicos e consistem principalmente dos seguintes ácidos: cafeico (3,4-di-hidroxicinamico), *p*-cumárico (4-hidróxi), ferúlico (3-metoxi, 4-hidróxi) e sinápico (3,5-dimetóxi, 4-hidróxi) (MANACH et al., 2004). A esterificação do ácido quínico e a combinação com um dos seguintes ácidos *trans*-cinâmicos (ácido cafeíco, ferúlico, sinápico ou *p*-cumárico) forma os ácidos clorogênicos (CGA), os quais são encontrados em diversos tipos de fruta e em elevadas concentrações no café (OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

A presença dos polifenóis em alimentos de origem vegetal é largamente influenciada por fatores genéticos das plantas e condições ambientais. Outros fatores como, germinação, nível de maturidade, variedade, processamento e armazenamento, também influenciam a concentração de polifenóis em plantas (HERRMANN, 1988; MANACH et al., 2004).

Os métodos de preparação culinária e de cocção, bem como, o processamento industrial de alimentos como descascar frutas, debulhar leguminosas e peneirar os cereais, podem alterar o teor de polifenóis resultando na perda de alguns compostos nestes alimentos (MANACH et al., 2004). Especificamente em relação à presença de polifenóis na bebida café, de acordo com MENEZES (1994), na torração, estes são gradualmente decompostos

resultando na formação de voláteis do aroma, materiais poliméricos (melanoidinas) e liberação de dióxido de carbono (CO_2). O ácido clorogénico é hidrolisado a ácidos caféico e quíntico cujos sabores, são mais amargos e adstringentes do que dos outros ácidos, pois o grupo cíclico é um fenol. Um grande número de polifenóis tem sido identificado no café torrado e alguns deles são originados dos ácidos clorogénicos. Segundo ABRAHÃO et al. (2010) o café torrado possui menores valores de polifenóis totais e maiores teores de ácido 5-cafeoilquínico comparados ao café verde analisado. Já os teores de ácido 5-cafeoilquínico e cafeína são semelhantes para os dois tipos de bebida estudados (extratos dos cafés verdes *versus* torrados).

Relativamente à ingestão dietética dos polifenóis, poucas informações se encontram disponíveis sobre as quantidades consumidas diariamente no mundo (MANACH et al., 2004). Contudo, pesquisadores sugerem que a ingestão mínima total em um dia seja cerca de 1g (SCALBERT et al., 2005; SILBERBERG et al. 2006). A média estimada da ingestão total de polifenóis reportada por PÉREZ-JIMÉNEZ et al. (2011) na população francesa foi de 1.193 mg/dia, a estimada na população polonesa foi de 1.757 mg/dia (GROSSO et al., 2014), na finlandesa de 863 mg/dia (OVASKAINEN et al., 2008) e na espanhola de 820 mg/dia (TRESSERRA-RIMBAU et al., 2013). Estas diferenças mencionadas entre os países, podem ser explicadas pelas preferências alimentares individuais e pelos diferentes padrões alimentares entre as populações, que muitas vezes são ditadas pela cultura, e que refletem nas diferentes quantidades de polifenóis ingeridas (MIRANDA et al., 2016).

Nos últimos anos, as dietas ricas em alimentos de origem vegetal, têm recebido atenção da comunidade científica pelos numerosos efeitos biológicos dos polifenóis e sua contribuição na redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, nomeadamente, as DCV, alguns tipos de câncer, doenças neurodegenerativas, DM e osteoporose (SCALBERT et al., 2005; SCALBERT et al., 2005; PANDEY e RIZVI, 2009; TRESSERRA-RIMBAU et al.,

2014a; TRESSERRA-RIMBAU, 2014b; WANG et al., 2015; GUO et al., 2016).

Neste sentido, diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação inversa entre o consumo de alimentos ou bebidas ricos em polifenóis, como frutas, legumes e verduras, cacau contido no chocolate, vinho, especialmente vinho tinto, suco natural, chá, café, etc., e a incidência de DCV, bem como o risco de mortalidade por todas as causas, especificamente por DCV (MIYAGI et al., 1997; NAKACHI et al., 2000; REIN et al., 2000; HU e WILLETT, 2002; ARTS e HOLLMAN, 2005; CURIN e ANDRIANTSITOHAINA 2005; DAUCHET et al., 2005; VITA, 2005; MINK et al. 2007; DAUCHET et al., 2009; HOLLMAN et al. 2010; DING et al., 2014; TRESSERRA-RIMBAU, 2014a; TRESSERRA-RIMBAU, 2014b).

A maioria dos estudos clínicos conduzidos em humanos utilizaram dados da ingestão de alimentos ricos em polifenóis e apenas alguns deles usaram compostos isolados (HABAUZIT e MORAND, 2012). Uma grande dificuldade com esta abordagem é a extrema complexidade em quantificar o teor em polifenóis dos alimentos e bebidas. Além de existirem várias centenas de compostos fenólicos de plantas, incluindo não-flavonóides (por exemplo, ácidos fenólicos, estilbenos) e flavonóides (flavanóis, flavonóis e antocianinas) (STOCLET et al., 2004), a natureza exata da atividade dos polifenóis permanece em grande parte desconhecida. Alguns polifenóis são altamente biodisponíveis, enquanto outros são dificilmente absorvidos através da barreira intestinal, altamente metabolizados ou rapidamente excretados, o que explica a falta de efeito biológico (MANACH et al., 2005).

Desta forma, a evidência atual sugere que a proteção contra as DCV associada a dietas ricas em polifenóis, resulta do somatório de uma variedade de propriedades químicas e efeitos biológicos produzidos por diferentes mecanismos e, em alguns casos, por diferentes compostos (STOCLET et al., 2004). O esquema com os efeitos biológicos dos polifenóis e os mecanismos propostos para a redução do risco de DCV, encontra-se descrito na Figura 3.

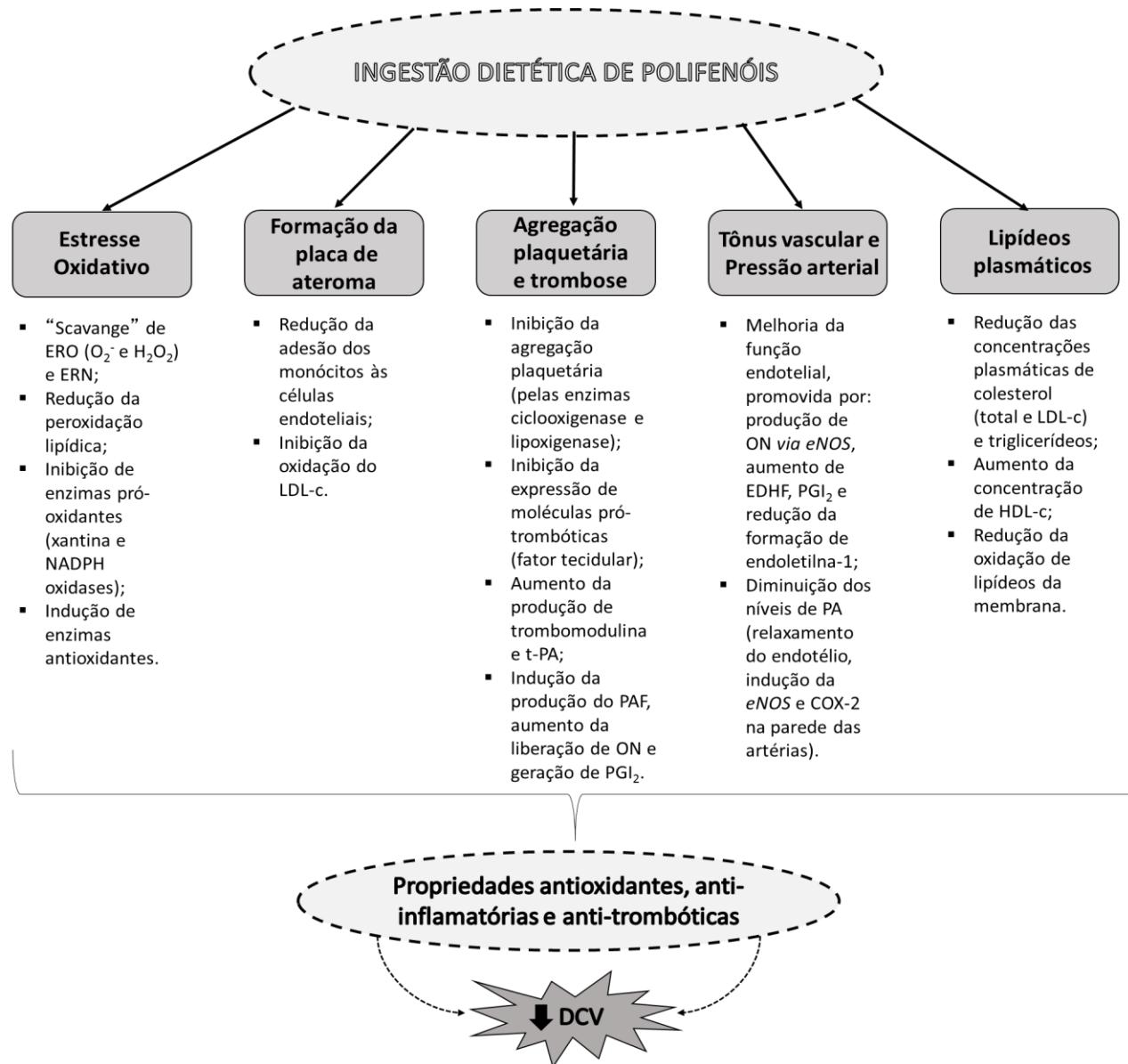


Figura 3. Propriedades biológicas dos polifenóis e principais mecanismos na redução do risco de DCV. Baseado em: CURIN e ANDRIANTSITOHAINA, 2005; MANACH et al., 2005; HABAUZIT e MORAND, 2012. Abreviaturas: ERO, Espécies Reativas de Oxigênio; t-PA, Ativador do plasminogênio tecidual; PAF, Fator de Ativação Plaquetária; PGI_2 , Prostaciclina; ON, Óxido Nítrico; EDHF, Fator Hiperpolarizante Dependente do Endotélio; *eNOS*, Enzima óxido nítrico sintase; COX-2, Ciclooxygenase-2; LDL-c, lipoproteínas de baixa densidade.

Entre os numerosos mecanismos plausíveis pelos quais os polifenóis podem conferir proteção cardiovascular, a melhoria da função endotelial e a inibição da angiogênese, da migração e da proliferação celular nos vasos sanguíneos tem sido o foco de diversos estudos recentes (STOCLET et al., 2004; CURIN e ANDRIANTSITOHAINA 2005; VITA, 2005; ANDRIANTSITOHAINA et al., 2012; HABAUZIT e MORAND, 2012; MEDINA-REMÓN et al., 2013). Uma hipótese defendida é que as propriedades antioxidantes dos polifenóis podem proteger os vasos sanguíneos contra as consequências deletérias do estresse oxidativo associadas a muitos dos fatores de risco cardiovasculares (STOCLET et al., 2004). Ressalta-se que, os polifenóis têm a capacidade de reduzir o estresse oxidativo vascular, não apenas através das suas propriedades diretas de eliminação do ânion superóxido (O_2^-) e da interação com outras espécies reativas de oxigênio (ERO), como os radicais hidroxilos (OH) e radicais peróxido, mas também, através dos efeitos indutores das enzimas endógenas antioxidantes e dos efeitos inibidores das oxidases xantina e NADPH, sendo estas as duas maiores enzimas geradoras de ERO (MEDINA-REMÓN et al., 2013).

Diversas investigações, referem que outra propriedade dos polifenóis é o seu efeito benéfico na alteração das concentrações dos lipídios plasmáticos e a sua capacidade de reduzir a oxidação lipídica, *in vivo*, *in vitro* e em humanos (CURIN e ANDRIANTSITOHAINA, 2005; MANACH et al., 2005; HABAUZIT e MORAND, 2012). A ingestão de polifenóis resultou numa diminuição das concentrações plasmáticas de CT, LDL-c, apolipoproteína B ou lipoproteína (a), ou num aumento da concentração de HDL-c e apolipoproteína A-I. Tal melhoria nos parâmetros lipídicos foi observada após a ingestão de polifenóis a partir do chá, azeite virgem, cacau, soja, ou frutos vermelhos, tanto em indivíduos normo quanto hipercolesterolêmicos (MANACH et al., 2005; RUEL et al., 2006; ERLUND et al., 2008). Além destas alterações lipídicas, foi demonstrada, *in vitro* e em seres humanos, a redução da suscetibilidade à oxidação do LDL-c pela administração e ingestão de

polifenóis em especial os ácidos fenólicos, tais como, o ácido cafeico (NARDINI et al., 1995; CARTRON et al., 2001; NATELLA et al., 2007; CANO-MARQUINA et al., 2013). Os ácidos fenólicos, são absorvidos na corrente sanguínea e incorporados nas partículas de LDL-c após a ingestão de café (NATELLA et al., 2007), sugerindo um papel benéfico como antioxidantes dietéticos, no aumento da proteção contra a oxidação do LDL-c (NARDINI et al., 1995).

O ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) é o mais comum dos ácidos clorogénicos e também apresenta elevado poder antioxidant (SALVA e LIMA, 2007; SILVA et al., 2007; GUESSOUS et al., 2014; OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

Além dos seus efeitos antioxidantes, que podem diminuir a circulação de LDL-c e a oxidação dos lipídios da membrana, evidências crescentes sugerem que os polifenóis podem melhorar a função endotelial, aumentando a produção de fatores vasodilatadores [óxido nítrico (ON), fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF) e prostaciclina] e inibindo a síntese da endotelina-1 em células endoteliais, um peptídeo que promove constrição dos vasos sanguíneos e aumenta a pressão arterial (PA). Do mesmo modo, têm a capacidade de inibir a expressão de dois principais fatores pró-angiogênicos: o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e metaloproteinase-2 de matriz (MMP-2), em células musculares lisas (STOCLET et al., 2004; CURIN e ANDRIANTSITOHAINA 2005; ANDRIANTSITOHAINA et al., 2012). Neste seguimento, evidências sugerem que o consumo de alimentos ricos em flavonóides podem levar à redução dos níveis de PAS e de PAD e proporcionar proteção contra as DCV (MOLINE et al., 2000; GALLEANO et al., 2010; MEDINA-REMÓN et al., 2013), não apenas em pacientes hipertensos (GRASSI et al. 2005b, 2008), mas também em indivíduos saudáveis (GRASSI et al., 2005a). Constatou-se que os efeitos benéficos dos polifenóis na diminuição e controlo da PA elevada podem resultar da influência complexa no balanço do ON no sistema cardiovascular (CURIN e

ANDRIANTSITOHAINA 2005). Este efeito hemodinâmico associou-se a uma melhoria no relaxamento dependente do endotélio e uma indução da expressão gênica (pela sintase do ON e COX-2) dentro da parede arterial, que juntos mantêm inalterada a contratilidade (DIEBOLT et al., 2001). Assim sendo, a melhoria da função endotelial e a inibição da angiogênese podem contribuir para as propriedades anti-aterogênicas dos polifenóis, previnindo o desenvolvimento de aterosclerose (STOCLET et al., 2004).

Desta forma, os efeitos benéficos dos polifenóis dietéticos no risco vascular, ou seja, na diminuição dos eventos vasculares obstrutivos isquêmicos, podem ser atribuídos à sua capacidade de retardar a progressão das lesões ateroscleróticas nas placas avançadas que são propensas a ruptura. Por outro lado, também podem estar relacionados com a prevenção da trombose, resultante da inibição da ativação plaquetária (WOLLNY et al., 1999; WANG et al., 2002), ou pela diminuição da expressão de moléculas pró-trombóticas e pro-ateroscleróticas, tais como, o fator tecidual (PENDURTHI et al., 1999). SOOBRATTEE et al., demonstraram que os ácidos hidroxicinâmicos impedem a formação de trombos ou o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, através dos mecanismos de proteção endotelial.

Em suma, as evidências recentes sugerem que estes efeitos biológicos evidenciados, são desencadeados pela ingestão de dietas ricas em polifenóis ou pela administração aguda ou crônica destes compostos isolados com estruturas específicas, e contribuem para um entendimento na proteção contra o desenvolvimento e a progressão das DCV, *in vitro*, *in vivo* em animais e em seres humanos (STOCLET et al., 2004).

1.3.1 POLIFENOIS PRESENTES NO CAFÉ

Os polifenóis mais comuns presentes no café são os ácidos fenólicos, especificamente os ácidos hidroxicinâmicos, os quais têm como exemplo desta subclasse de compostos, o ácido cafeico, um tipo de ácido *trans*-cinâmico e o seu derivado ácido clorogênico (CANO-MARQUINA et al., 2013; OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

Na forma de bebida, a quantidade média de ácidos clorogênicos no café varia, dependendo do estudo, de 70 a 350 mg por copo de 200 mL (MANACH et al., 2004; HIGDON e FREI, 2006; OLIVEIRA e BASTOS, 2011), de 200 a 550 mg por copo de 200 mL (RICHELLE et al., 2001; NATELLA et al., 2007) e a concentração de 396 mg em copo de 180 mL (BONITA et al., 2007). Apesar desta diversidade de informação na literatura, decorrente do tipo de grão, do tipo de preparo, da técnica de análise e da solubilidade destes compostos em água quente durante a extração industrial, o teor de ácidos clorogênicos nesta bebida é apreciável, na proporção de 7 a 10 %, tornando o café uma das principais fontes alimentares destes polifenóis (SALVA e LIMA, 2007; SILVA et al., 2007).

Segundo TRESSERRA-RIMBAU et al. (2012) e GROSSO et al. (2014), o café foi o item alimentar individual que mais contribuiu para a ingestão de ácidos fenólicos, fornecendo 55% e 66% destes compostos na população espanhola e polonesa, respectivamente; sendo também considerado o maior contribuinte da ingestão total de polifenóis, isto é, a principal fonte de polifenóis da dieta (com 18% e 40%, respectivamente). Do total de ácidos fenólicos, 75% corresponderam aos ácidos hidroxicinâmicos. No estudo de TRESSERRA-RIMBAU et al. (2012), os ácidos hidroxicinâmicos foram a subclasse de polifenóis que apresentaram teores de ingestão mais elevados, representando 33% do total de polifenóis da dieta da população espanhola, tendo sido fornecidos principalmente pelo café.

De acordo com o estudo epidemiológico de PÉREZ-JIMÉNEZ et al. (2011), realizado em 4.942 indivíduos que participaram da coorte *SUPplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants* (SU.VI.MAX), o grupo das bebidas não alcoólicas e das frutas foram considerados as principais fontes de polifenóis da dieta, com as respectivas contribuições de 658 e 206 mg/dia. No primeiro grupo, os principais contribuintes alimentares identificados foram o café (79%) e o chá (17%). Os consumidores de café, que correspondem a 92% da população total do estudo, apresentaram ingestão média de polifenóis totais significativamente maior do que os não consumidores (1.224 mg/dia versus 807 mg/dia), tendo o café contribuído com 44% desse consumo.

1.4 EFEITO DO CAFÉ NOS FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR

A influência do consumo habitual do café nas DCV, vem sendo objeto de muitos estudos, cujos resultados apresentados em revisões sistemáticas e meta-análises, são ainda inconsistentes e controversos (HIGDON e FREI, 2006; BONITA et al., 2007; SOFI et al., 2007; WU et al., 2009; LIMA et al., 2010; BUTT e SULTAN, 2011; BOHN et al., 2012; DI CASTELNUOVO et al., 2012; CANO-MARQUINA et al., 2013). Alguns estudos epidemiológicos sugerem uma associação inversa entre o consumo de café e o risco de DCV (LOPEZ-GARCIA et al., 2009; DING et al., 2014; DING et al., 2015), enquanto outros não evidenciam associação estatisticamente significativa (LOPEZ-GRACIA et al., 2006; SOFI et al., 2007; WU et al., 2009; FLOEGEL et al., 2012), ou ainda demonstram uma associação positiva (HAPPONEN et al., 2004; LIU et al., 2013; GRIONI et al., 2015). Embora em estudos observacionais recentes, o consumo habitual de quantidades moderadas de café possa

estar associado com um benefício em relação ao risco de incidência e mortalidade por DCV, os resultados de ensaios clínicos randomizados sobre os efeitos benéficos do café são menos evidentes (BUTT e SULTAN, 2011). Desta forma, os achados controversos apresentados na literatura podem dever-se aos diferentes tipos de estudos, os quais adotaram diferentes metodologias e foram realizados em populações distintas. Além disso, podem estar relacionados com as diferentes formas de preparo do café e com a sua quantidade ingerida diariamente.

A bebida café, além de ser a principal fonte de cafeína, é uma mistura complexa de diversos compostos - em particular polifenóis, magnésio, potássio, fibras e diterpenos - que podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais para o sistema cardiovascular (DI CASTELNUOVO et al., 2012; GODOS et al., 2014), particularmente na PA, concentrações plasmáticas de colesterol total, homocisteína, e incidência de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (CANO-MARQUINA et al., 2013; O'KEEFE et al., 2013; DING et al., 2014).

Inicialmente, o foco dos primeiros estudos publicados sobre este assunto teve unicamente como base a cafeína e os seus efeitos fisiológicos potencialmente deletérios no risco cardiovascular.

Reconhece-se que a cafeína, considerada um estimulante do sistema nervoso central e uma substância psicoativa, promove a liberação de neurotransmissores que atuam no SNC, tais como: dopamina, norepinefrina, serotonina, acetilcolina, ácido γ -aminobutírico e glutamato. Também exerce efeitos biológicos através do antagonismo dos receptores de adenosina A₁ e A₂, localizados no cérebro e vasos sanguíneos, diminuindo o tônus adenosinérgico endógeno e bloqueando a ação deste neuromodulador, causando efeitos neuroexcitatórios e vasoconstritores (FREDHOLM et al., 1999; HUANG et al., 2005). Consequentemente, há um aumento da atividade cerebral, liberando epinefrina na corrente sanguínea, que estimula o Sistema Nervoso provocando a elevação da frequência cardíaca,

um aumento da resistência vascular sistêmica e um aumento agudo da PA (NOORDZIJ et al., 2005; NEHLIG et al., 2010; KOPPELSTAETTER et al., 2010; MESAS et al., 2011). Além disso, a cafeína tem sido positivamente associada com a concentração e peroxidação de lipídeos plasmáticos (MOUTAERY et al., 2003; DU et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006) e a resistência à insulina (KEIJZERS et al., 2002; WHITEHEAD e WHITE, 2013). Desta forma, a cafeína parece exercer efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular, sendo frequentemente considerada a potencial mediadora do efeito no café no aumento do risco de DCV (CORNELIS et al., 2007; ALVES et al., 2009; GUESSOUS et al., 2014).

No entanto, existem outros compostos químicos no café, que têm vindo a despertar interesse na comunidade científica, nomeadamente o cafestol e o *kahweol*. Ambos são compostos diterpénicos, encontrados no café torrado e moído, nas formas livre e esterificada com ácidos graxos. Estas substâncias têm demonstrado efeitos no metabolismo lipídico, isto é, uma atividade potencialmente hiperlipemiante (THELLE et al., 1983; URGERT e KATAN, 1997; JEE et al., 2001; HAMMAR et al., 2003; SOFI et al., 2007; CAI et al., 2012).

Em relação aos polifenóis presentes no café, especialmente os ácidos hidroxicinâmicos, os mesmos têm vindo a evidenciar um efeito benéfico e um papel protetor no sistema cardiovascular (HIGDON e FREI, 2006; WATANABE et al., 2006; NATELLA et al., 2007; ALVES et al., 2009; FUENTES e PALOMO, 2014; GUO et al., 2016). Esta proteção foi demonstrada *in vivo* e pode ser explicada por vários mecanismos, incluindo as suas propriedades anti-inflamatórias (KEMPF et al., 2010), a forte capacidade antioxidante (NATELLA et al., 2002), bem como, as propriedades antitrombóticas (FUENTES e PALOMO, 2014).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos biológicos que certos componentes do café podem ter sobre o desenvolvimento de DCV. Neste contexto, serão abordados os efeitos da ingestão de café sobre os principais fatores de risco cardiovasculares,

particularmente, a PA elevada, as dislipidemias, a hiper-homocisteinemia e a hiperglicemia (HIGDON e FREI, 2006; GAMA et al., 2010; CANO-MARQUINA et al., 2013; O'KEEFE et al., 2013).

Diversos estudos experimentais e epidemiológicos (randomizados, meta-análises e estudos de coorte) que procuraram verificar a associação entre o consumo de café e os níveis de PA sistêmica, constataram uma associação positiva (JEE et al., 1999; NURMINEN et al., 1999; HARTLEY et al., 2000; KLAG et al., 2002; JAMES, 2004; NOORDZIJ et al., 2005), inversa (SMITS et al., 1985; STENSVOLD et al., 1989; SALVAGGIO et al., 1990; ZHANG et al., 2011) ou nenhuma associação (LANCASTER et al., 1994; WINKELMAYER et al., 2005; MESAS et al., 2011; STEFFEN et al., 2012). Estes resultados conflitantes podem ser explicados por diversos viéses, tais como: o tabagismo, o consumo de álcool, o status da HAS, a predisposição genética, a tolerância à cafeína, a frequência de ingestão da bebida, a forma de obtenção do dado de ingestão quantitativa de café, os métodos de preparo e os tipos de café (LIMA et al., 2010).

Deve ressaltar-se que, o potencial do café para aumentar a PA é largamente atribuído ao seu teor de cafeína, pelos efeitos agudos pressóricos desta substância (CORNELIS et al., 2007). A explicação para tal efeito está relacionada com a sua ação antagonista face aos receptores de adenosina, resultando em vasoconstrição e elevação da resistência vascular sistêmica, manifestando-se o seu efeito vasopressor (ECHEVERRI et al., 2010).

Uma revisão sistemática, evidenciou que a administração de cafeína em quantidades médias de 200 a 250 mg (equivalente a 2 a 3 xícaras de café por dia), provocou uma elevação aguda da PA em indivíduos normotensos, na ordem dos 3 a 14 mmHg na PAS e dos 4 a 13 mmHg na PAD, podendo este efeito subsistir durante várias horas (NURMINEN et al., 1999). Verificou-se, ainda, uma sensibilidade aumentada à cafeína em indivíduos hipertensos (NURMINEN et al., 1999; HARTLEY et al., 2000).

Mediante estas constatações, revisões sistemáticas e meta-análises relataram que a elevação aguda da PA foi significativa somente para a ingestão de cafeína, mas não para o consumo de café, não existindo uma clara relação causal entre o consumo da bebida e a influência na pressão sanguínea (NOORDZIJ et al., 2005; MESAS et al., 2011). É de considerar, neste caso, a presença de outros compostos químicos no café com ação contrária ao efeito constritor da cafeína, os quais podem potencialmente atenuar e contrabalançar os efeitos pressóricos como, por exemplo, os polifenóis (ácidos fenólicos) (NOORDZIJ et al., 2005; GODOS et al., 2014). Os efeitos benéficos desses compostos bioativos no sistema cardiovascular podem ajudar a explicar a falta de associação entre o consumo habitual de café e o aumento do risco de PA ou de DCV, em grandes estudos de coorte (MESAS et al., 2011).

O alto teor de polifenóis no café, em especial do grupo de ácidos hidroxicinâmicos, exibe uma forte atividade antioxidante e protege contra a aterotrombose ou o desenvolvimento da lesão aterosclerótica através da proteção endotelial [atenua o estresse oxidativo, melhora a biodisponibilidade de ON e diminui a E-selectina, a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e a expressão de proteína de adesão celular vascular (VCAM-1), entre outros] (FUENTES e PALOMO, 2014; RANHEIM et al., 2005). Neste contexto, as investigações na última década têm demonstrado que a ingestão e administração de ácido clorogénico, *in vivo* e *in vitro*, pode ter um efeito significativo na redução da PA (SUZUKI et al., 2006; MUBARAK et al., 2012; ZHAO et al., 2012). Este efeito hipotensivo pode envolver vasodilatação mediada pelo ON, melhoria da função endotelial e atenuação da hipertrofia vascular. Desta forma, a ingestão dietética de ácidos clorogênicos pode ser promissora para fornecer uma abordagem não farmacológica para a prevenção e tratamento da PA elevada (ZHAO et al., 2012).

Relativamente ao metabolismo lipídico, inúmeros estudos têm vindo a associar o consumo de café com as alterações nas concentrações séricas de colesterol total e suas

frações, importantes fatores de risco de DCV (THELLE et al., 1983; ARO et al., 1987; PIETINEN et al., 1988; RANHEIM e HALVORSEN, 2005; O'KEEFE et al., 2013; CANO-MARQUINA et al., 2013; CAI et al., 2012; REBELLO et al., 2013). Na literatura, encontram-se descritas duas razões distintas que promovem estas alterações nos lipídeos circulantes: a composição da fração lipídica do café por dois compostos químicos diterpénicos, o cafestol e o *kahweol*, com atividade hipercolesterolêmica (THELLE et al., 1983; URGERT e KATAN, 1997; JEE et al., 2001; HAMMAR et al., 2003; SOFI et al., 2007; CAI et al., 2012) e os componentes antioxidantes presentes no café, os quais podem reduzir a oxidação lipídica (NARDINI et al., 1995; CARTRON et al., 2001; NATELLA et al., 2002; YUKAWA et al., 2004; NATELLA et al., 2007; CANO-MARQUINA et al., 2013; FUENTES e PALOMO, 2014).

Primeiramente, é de salientar que, o teor de diterpenos da bebida e, consequentemente o seu efeito hipercolesterolêmico varia consoante o método de preparação (URGERT et al., 1995; DEFAZIO et al., 2007). Comparativamente ao café filtrado (no filtro de papel ou no coador) e ao solúvel, os cafés não filtrados e/ou fervidos, do tipo expresso, escandinavo, turco e *French press*, contêm maiores concentrações destas substâncias, devido à alta temperatura empregada durante o preparo e ao prolongado tempo de contato entre o pó de café e a água quente (URGERT et al., 1995; URGERT e KATAN, 1997; HIGDON e FREI, 2006). As concentrações de diterpenos variam de 6 a 12 mg/xícara no café não filtrado e/ou fervido, enquanto que, para o café solúvel e o filtrado, os teores de cafestol e o *kahweol* são menores, na ordem dos 0,2 a 0,6 mg/xícara (HIGDON e FREI, 2006). Este fato pode explicar-se pelo contato por um período mais curto com a água quente e pela retenção das gotículas de gordura no pó e no papel de filtro (URGERT e KATAN, 1997; JEE et al., 2001; HIGDON e FREI, 2006; SPEER e KOLLING-SPEER, 2006; O'KEEFE et al., 2013).

Ressalta-se que, na cultura brasileira, o café preparado no coador de pano é ainda um

método muito utilizado, estando mais presente nas cidades do Centro-Oeste, do Norte e Nordeste (PENAFORT, 2008; ABIC, 2014). Contudo, é difícil avaliar o impacto de tal procedimento nas substâncias lipídicas desta bebida, pois são escassas as publicações nacionais explorando esse tipo de preparo e as conclusões relativas aos efeitos do uso do coador de pano no preparo do café permanecem controversas. Segundo CAVALCANTE et al. (2000), o coador de pano não tinha a mesma capacidade de reter os diterpenos, como o filtro de papel, provavelmente devido às diferenças de porosidade entre os materiais do filtro. No entanto, COSTA (2004) não encontrou nenhuma modificação do perfil lipídico ou alterações nas concentrações das enzimas hepáticas com o uso do filtro de papel ou do coador de pano.

Em relação à utilização de um tipo de cafeteira com filtro metálico para preparação do café percolado ou “mocha”, URGERT e KATAN (1996) evidenciaram que apesar de tratar-se de um café não filtrado, esta bebida é pobre em cafestol e *kahweol* e os seus efeitos sobre os lipídeos sanguíneos são mínimos.

Assim, por forma a comprovar o impacto de ditintos métodos de preparação do café nas concentrações de lipídeos séricos, foram realizadas duas meta-análises de ensaios clínicos controlados randomizados, as quais concluíram que o consumo de café fervido ou não filtrado foi responsável por um aumento (dose-dependente) das concentrações séricas de CT (JEE e APPEL, 2001; CAI et al., 2012), enquanto que, de acordo com alguns estudos observacionais prospectivos, o consumo de café filtrado teve pouca ou nenhuma associação com a concentração sérica de colesterol (BØNAA et al., 1988; PIETINEN et al., 1988; BAK et al., 1989; JEE et al., 2001; RANHEIM e HALVORSEN, 2005; LOPEZ-GARCIA et al., 2006; REBELLO et al., 2013).

A possibilidade de elevação das frações LDL-c e VLDL mediante a ingestão de cafestol e *kahweol* tem sido discutida em diversos estudos publicados, principalmente a partir da década de 1990 (ZOCK et al., 1990; GROSS et al., 1997; BROWN et al., 1997; DE ROOS et

al., 1999; JEE e APPEL, 2001; CAI et al., 2012). Ressalta-se que, o aumento sérico do CT causado pela ingestão destes compostos se deveu essencialmente a um aumento de LDL-c (JEE e APPEL, 2001; CAI et al., 2012). Em menor extensão, observou-se também um aumento das VLDL e uma ligeira diminuição das concentrações de HDL-c (URGERT et al., 1997), o que representa importante fator de risco para o desenvolvimento de DCV (VILLALPANDO et al., 2010; OKAMURA, 2010).

O cafestol é considerado responsável por mais de 80% do efeito sobre os lipídeos séricos (URGERT et al., 1997; UITERWAAL et al., 2007), contudo, o mecanismo para a ação hiperlipemianta destes diterpenos ainda não está totalmente esclarecido. Uma possível explicação é que o consumo de cafestol e *kahweol* provoca um aumento da atividade da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CEPT) e da proteína de transferência de fosfolipídios (PLTP) em humanos, podendo esta ação resultar em mudança na composição das lipoproteínas, principalmente o enriquecimento de LDL-c e VLDL com ésteres de colesterol, contribuindo para o aumento destas duas lipoproteínas e diminuição do HDL-c circulantes (DE ROOS et al., 1999; DE ROOS et al., 2000; HIGDON e FREI, 2006). Outro mecanismo proposto, pode ser explicado por um efeito primário do cafestol sobre a proteína de ligação ao elemento de resposta a esteróides (SREBP) (BROWN et al., 1997; DE ROOS et al., 1999). O cafestol atua inibindo a via da SREBP, que é fator de transcrição ligado a membranas, importante reguladora da biossíntese de colesterol em humanos. A diminuição da atividade da SREBP pode, assim, resultar em diminuição da síntese do colesterol e do catabolismo de VLDL e em supressão da atividade dos receptores de LDL-c (receptores B/E), aumentando o LDL-c e VLDL séricos.

No entanto, alguns trabalhos têm sugerido que o consumo de café do tipo filtrado e instantâneo pode estar relacionado com a elevação da concentração de CT e de LDL-c (FRIED et al. 1992; MIYAKE et al., 1999; CHRISTENSEN, 2001). Tais efeitos podem ser

atribuídos à existência de substâncias ainda não identificadas presentes nestes tipos de café, à falta de controle para alguma variável de confundimento ainda não evidenciada, ou às características diferentes em relação aos estilos de vida e hábitos alimentares dos grupos avaliados.

Por outro lado, tem sido discutido se os antioxidantes presentes no café podem proteger o LDL-c da oxidação. Os resultados das investigações têm sido promissores, uma vez que, diversos autores (NARDINI et al., 1995; CARTRON et al., 2001, NATELLA et al., 2002; YUKAWA et al., 2004; SOOBRATTEE et al., 2005; NATELLA et al., 2007; CANO-MARQUINA et al., 2013; FUENTES e PALOMO, 2014) demonstraram que os ácidos fenólicos, especialmente os ácidos hidroxicinâmicos, são absorvidos na corrente sanguínea e incorporados nas partículas de LDL-c após o consumo de café, reduzindo a suscetibilidade à oxidação do LDL-c *in vitro* e *in vivo* em humanos, o que sugere o seu papel como antioxidante dietético.

Em relação à hiper-homocisteinemia, há determinantes dietéticos que podem influenciar as suas concentrações plasmáticas. Além da ingestão de folato, o consumo de café tem demonstrado efeito sobre as concentrações totais de homocisteína (DE BREE et al., 2001; DE BREE et al., 2002).

Diversos ensaios clínicos controlados (GRUBBEN et al., 2000; URGERT et al., 2000; HUSEMOEN et al., 2004; STRANDHAGEN et al., 2004) mostraram uma correlação direta entre as concentrações de homocisteína total no plasma e o consumo de café (efeito dose-dependente). GRUBBEN et al. (2000), mencionaram em seu estudo que indivíduos com consumo de café não filtrado, igual ou superior a 1 litro, apresentaram um aumento de 10% na concentração de homocisteína. Embora os autores não tenham sido capazes de concluir se esta associação se relacionou com o método de preparação, demonstrou-se que o café não filtrado foi mais propenso a aumentar a homocisteína total do que o café filtrado.

No entanto, não ficou evidente se a fração lipídica sérica, ou seja, os diterpenos presentes na bebida, foram os únicos responsáveis pelo aumento da concentração de homocisteína. Por isso, os pesquisadores especularam se a cafeína pode ter sido parcialmente responsável pelo efeito no aumento das concentrações plasmáticas de homocisteína. Um dos possíveis mecanismos propostos para explicar os aumentos de homocisteína provocados pela cafeína, seria a sua atuação como antagonista de vitamina B6, comprometendo a via de transulfuração no metabolismo do folato, originando uma diminuição da concentração sanguínea de vitamina B6, cujo déficit resulta em maior produção de homocisteína plasmática (GRUBBEN et al., 2000; VERHOEF et al., 2002).

Neste seguimento, JACQUES et al. (2001) mostraram forte associação positiva entre a ingestão diária de cafeína (superior a 89 mg/dia) e a homocisteinemia; e VERHOEF et al. (2002) verificaram que o consumo de cafeína pura (cápsulas) aumentou as concentrações plasmáticas de homocisteína em indivíduos saudáveis, mas apenas em 25 a 50% dos efeitos apresentados pelo consumo de café. Tais achados sugerem que outras substâncias presentes no café, poderiam adicionalmente ser responsáveis pelo aumento das concentrações plasmáticas de homocisteína. Este efeito do café na elevação da homocisteína plasmática em humanos, foi relacionado aos ácidos fenólicos, nomeadamente o ácido clorogênico (OLTHOF et al. 2001; VERHOEF et al., 2002; HODGSON et al., 2003). Os autores sugeriram que durante as reações de *O*-metilação, a transferência do grupo metílico da S-adenosilmetionina (SAM), proveniente do metabolismo da homocisteína, aos ácidos clorogénicos seria o provável mecanismo responsável pelo aumento da homocisteína plasmática.

Por outro lado, ESPOSITO et al. (2003) demonstrou que um consumo diário de cinco xícaras de café, em indivíduos saudáveis, não aumentou significativamente a concentração de homocisteína plasmática, e um estudo de base populacional realizado em adultos e idosos Asiáticos, mostrou que o consumo habitual desta bebida não foi associado à elevação da

homocisteína plasmática, após ajuste para a concentração plasmática de folato (SAW et al., 2001). Corroborando com estes resultados, MURSU et al. (2005) observaram que o consumo de café filtrado não teve efeitos detetáveis, a curto ou longo prazo, na concentração plasmática de homocisteína, em homens saudáveis e não fumantes. Mais recentemente, de acordo com CORRÊA et al. (2013), não foram observadas alterações para a homocisteína total plasmática na população brasileira, após o consumo diário de três a quatro xícaras de café. Uma possível hipótese proposta por MOON et al. (2009) e ZHAO et al. (2012) para o potencial efeito benéfico do café na homocisteína, está relacionada com a presença do ácido cafeico. Segundo os autores, este composto fenólico, inibe a hiper-homocisteinemia provocando o rolamento e adesão de leucócitos, diminuindo a produção de espécies de oxigênio reativo e a ativação da ciclooxygenase-2 (COX-2) em células endoteliais. Além disso, o ácido cafeico parece reduzir a expressão de moléculas de adesão como a E-selectina e ICAM-1 no endotélio, e a integrina CD11b/CD18 (Mac-1) em leucócitos, decorrentes da hiper-homocisteinemia.

Tendo em conta as inconsistências encontradas entre os estudos epidemiológicos acima mencionados, os mecanismos biológicos envolvidos no efeito do consumo de café nas concentrações de homocisteína plasmática necessitam de mais investigação. O fato desta bebida possuir variadas substâncias biologicamente ativas, torna difícil identificar um composto presente no café que explicaria tais efeitos na homocisteinemia. Outro fator importante é que, além das quantidades diárias ingeridas, aspectos ligados às suas formas de preparo sejam considerados.

Relativamente a outro importante fator de risco cardiovascular, diversos estudos epidemiológicos têm sido realizados em todo o mundo com o intuito de verificar a associação entre o consumo de café e o risco de desenvolver DM2 (YAMAJI et al., 2004; VAN DAM e HU, 2005; PEREIRA et al., 2006; PANAGIOTAKOS et al., 2007; PIMENTEL et al., 2009;

MULEY et al., 2012; SANTOS e LIMA, 2016). A maioria das investigações e revisões sistemáticas recentes, indicam que o consumo habitual de café (com ou sem cafeína) a longo prazo, parece proteger contra a ocorrência de DM2 sendo que a dose apontada para este efeito corresponde a pelo menos três a quatro xícaras de café por dia (PANAGIOTAKOS et al., 2007; PIMENTEL et al., 2009; MULEY et al., 2012; SANTOS e LIMA, 2016).

Verifica-se, igualmente, a manutenção do caráter de proteção do consumo de café no desenvolvimento de DM2 em diferentes populações, como as populações da Suécia (AGARDH et al., 2004), Grécia (PANAGIOTAKOS et al., 2007), Holanda (VAN DAM e FESKENS, 2002), Dinamarca (FAERCH et al., 2005) e América do Norte (SORIGUER et al., 2004; PEREIRA et al., 2006).

VAN DAM (2006) acredita que este efeito protetor do café na diminuição do risco de ocorrência de DM2 não se deve à cafeína. O fato do consumo de café descafeinado estar igualmente associado a um menor risco de desenvolver DM2 (SALAZAR-MARTINEZ et al., 2004; GREENBERG et al., 2005; BATTRAM et al., 2006) e, simultaneamente, a menores concentrações do peptídeo C em jejum (indicando uma melhoria da sensibilidade à insulina) (WU e WILLETT, 2005) sugere que outros constituintes do café, em alternativa à cafeína, deverão ser responsáveis por esses efeitos benéficos no metabolismo da glicose (GREENBERG et al., 2005; VAN DAM, 2006).

De fato, em estudos realizados *in vivo*, o consumo de ácidos clorogénicos e produtos da sua degradação durante a torra, provocou uma diminuição da concentração de glicose e um aumento da sensibilidade à insulina (ANDRADE-CETTO et al., 2001; SHEARER et al., 2003; RODRIGUEZ DE SOTILLO et al., 2006).

Diversos mecanismos de ação dos ácidos clorogénicos têm sido estudados, em animais e *in vitro*, com o objetivo de clarificar os seus efeitos benéficos no metabolismo da glicose, entre os quais: redução da absorção de glicose ao nível intestinal; retardo ou inibição da ação

da α -glicosidase (MATSUI et al., 2001); aumento subsequente na secreção dos hormônios de peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e de peptídeo insulinotrópico glicose-dependente (GIP), ambos com capacidade de diminuir as concentrações de glicose (MCCARTY, 2005; JOHNSTON et al., 2003; MEIER et al., 2001); redução da liberação da glicose hepática (por redução da hidrólise ou inibição da glicose-6-fosfatase), o que acarreta uma menor concentração de glicose plasmática (ARION et al., 1997; BIDEL et al., 2008); efeito antioxidante (CLIFFORD, 1999), uma vez que o estresse oxidativo desempenha um papel no desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 (CERIELLO e MOTZ, 2004); e inibição da formação de compostos N-nitrosos no trato gastrointestinal (CLIFFORD, 1999), que seriam tóxicos para as células beta do pâncreas (VAN DAM e FESKENS, 2002).

Entretanto, REUNANEN et al., (2003), verificaram que o consumo de café não conferiu efeito protetor no desenvolvimento da DM2 na população finlandesa. Pesquisadores acreditam que estes achados contrastantes podem ser explicados devido ao tipo de café consumido na Finlândia ter concentração diferente dos compostos benéficos, pelo fato dos participantes terem alterado a quantidade de café no meio do estudo, assim como o tipo de preparação consumida e terem sido incluídos participantes com enfermidades como doenças auto-imunes que podem participar do desencadeamento da DM2 em adultos (VAN DAM et al., 2003).

Permanece, assim, a dificuldade em estabelecer uma associação mais conclusiva entre o consumo de café e os fatores de risco cardiovascular em função destes efeitos contraditórios, que podem explicar-se pelo fato do café possuir substâncias variadas, muitas das quais consideradas biologicamente ativas, mas também pelo estilo de vida dos indivíduos (consumo de álcool e/ou tabaco), pelas diferentes formas de preparo da bebida, da quantidade consumida diariamente e da predisposição genética individual (HIGDON e FREI, 2006; ALVES et al., 2009).

De acordo com CORNELIS (2014), as constatações entre o consumo habitual de café e o risco de HAS e outros desfechos cardiovasculares, devem ser analisadas à luz dos resultados das interações gene e café.

Até recentemente, a maioria dos estudos que relacionava consumo de café e doenças coronarianas, incluia a história familiar como uma medida de susceptibilidade hereditária. Grande parte da predisposição hereditária para DC, no entanto, é pensada para ser relacionada com variantes genéticas comuns que não originam a doença na maioria dos carreadores, mas podem afetar o risco após a exposição aos fatores dietéticos ou de estilo de vida específicos (CORNELIS et al., 2007).

1.5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DA CAFEÍNA, CONSUMO DE CAFÉ E NOS NIVEIS DE PRESSÃO ARTERIAL

Alguns estudos sugerem diferenças interindividuais na concentração plasmática da cafeína, após administração da mesma dose, ou seja, na sensibilidade para o efeito do café (CORNELIS et al., 2006; HAPPONEN et al., 2006; CORNELIS et al., 2007). Estas diferenças dependem de quatro fatores: polimorfismos genéticos, indução e inibição metabólica da atividade do citocromo P450, características individuais, como, sexo e peso e existência de hepatopatia (TAVARES e SAKATA, 2012). Assim, o impacto do consumo de café irá variar de pessoa para pessoa com base no perfil de risco de cada um.

Dentre estas diferenças, os polimorfismos são variações na sequência do DNA em um determinado *locus* cromossômico, nas quais o alelo menos comum ocorre com uma frequência de pelo menos 1% na população (BURTON et al., 2005). O tipo mais simples e

mais comum de polimorfismo, conhecido como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), resulta na substituição de uma base nitrogenada por outra [adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G)], o que pode alterar a quantidade do transcrito final ou modificar a tradução de proteínas, resultando em proteínas e/ou enzimas com maior ou menor atividade, aumentando ou diminuindo a resposta metabólica, e consequentemente associando ao risco de doenças. Estima-se que o genoma humano contém cerca de 84,7 milhões de SNPs (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2015), e varie segundo as populações (CORELLA E ORDOVAS, 2005; SIMOPOULOS, 2010). Este é um ponto importante principalmente em países como o Brasil, que é heterogêneo, com descendentes de índios, africanos e europeus, tornando o seu genoma também miscigenado (SUAREZ-KURTZ, 2009).

Neste contexto, destaca-se a presença dos polimorfismos, sobretudo dos genes das enzimas que codificam isoformas do citocromo P450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*), do receptor de aril hidrocarbonetos (*AHR*), receptor de adenosina A_{2A} (*ADORA2A*), complexina 3/ proteína serina-treonina quinase (*CPLX3/ULK3*) e da enzima metileno-tetrahidrofolato redutase (*MTHFR*); que estão associados com a alteração da atividade das enzimas do metabolismo da cafeína, com os efeitos metabólicos no consumo de café, e o risco aumentado da ocorrência de agravos cardiovasculares, particularmente da PA (CORNELIS et al., 2007; LEVY et al., 2009; NEWTON-CHEH et al., 2009; CORNELIS et al., 2011; AMIN et al., 2012; JOSSE et al., 2012; CORNELIS et al., 2014).

Nos últimos anos, os estudos de associação ampla do genoma (do inglês, GWAS) provaram ser uma abordagem eficaz para associar os polimorfismos com o consumo de café, a ingestão de cafeína (CORNELIS et al., 2011; SULEM et al., 2011; AMIN et al., 2012; CORNELIS et al., 2014) e identificar novas variantes de risco genético, associando estes marcadores genéticos a fatores de risco para o desenvolvimento da DCV, incluindo a PA elevada e o diagnóstico de HAS (ADEYEMO et al., 2009; LEVY et al., 2009; NEWTON-

CHEH et al., 2009; ORG et al., 2009; EHRET et al., 2011; LIU et al., 2011; AMIN et al., 2012).

Desta forma, os estudos de GWAS facultam informações preliminares sobre a associação entre genes e fenótipos, sem que o pesquisador precise se valer de conhecimentos prévios sobre a fisiopatologia da doença para gerar genes candidatos a serem testados (BAUDHUIN, 2009). As abordagens mais comuns para estudos de associação concentram-se na análise de SNPs e os seus genes vizinhos e apenas os de maior evidência de associação são relatados.

Estudos de GWAS em populações de ascendência européia identificaram variantes no gene *AHR* e em genes que codificam isoformas do citocromo P450 (*CYP1A1/CYP1A2*) associados ao consumo de café e ao metabolismo da cafeína (CORNELIS et al., 2011; AMIN et al., 2012; JOSSE et al., 2012; CORNELIS et al., 2015).

Sabe-se que as enzimas do citocromo P450 têm um papel fundamental no metabolismo da cafeína (AMIN et al., 2012). A maior parte da cafeína (95%) é metabolizada por desmetilação no fígado, principalmente pela família 1, subfamília A, polipeptídeo 2 da isoenzima do citocromo P450 (*CYP1A2*), transformando-a em paraxantina (85%), teobromina (10%) e teofilina (5%) (FABER et al., 2005; JOSSE et al., 2012). Uma substituição do nucleotídeo citosina por adenina no *intron* 1, do gene *CYP1A2* diminui a indutibilidade da atividade da enzima, resultando num comprometimento do metabolismo da cafeína (SACHSE et al., 1999). Assim, os indivíduos classificados como metabolizadores “rápidos” da cafeína são carreadores do alelo *1A no gene *CYP1A2*, enquanto que, os metabolizadores “lentos” da cafeína carreiam o alelo variante *1F. A variação genética neste alelo, modifica o metabolismo da cafeína e faz com que os metabolizadores “lentos” apresentem maior risco de infarto do miocárdio (CORNELIS et al., 2006) e também de HAS (PALATINI et al., 2009).

O gene *AHR* regula a expressão da atividade das enzimas CYP1A1 e CYP1A2 que atuam na metabolização da cafeína (CORNELIS et al., 2011; SULEM et al., 2011; JOSSE et al., 2012). Este gene, codifica o receptor de aril hidrocarbonetos, o qual desempenha um importante papel no metabolismo dos xenobióticos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; e induz a transcrição dos genes de ambas as enzimas do citocromo P450 pela ligação a uma região promotora entre eles (SULEM et al., 2011; JOSSE et al., 2012). Assim, é possível que variações na expressão do gene *AHR*, estejam associadas com um aumento da atividade das enzimas CYP1A1 e CYP1A2, resultando consequentemente em um aumento no metabolismo da cafeína e um maior consumo de café (CORNELIS et al., 2011; SULEM et al., 2011; JOSSE et al., 2012).

Por sua vez, os polimorfismos no gene que codificam o receptor A_{2A} da adenosina (*ADORA2A*) têm sido relacionados com uma diminuição na ingestão habitual de cafeína (CORNELIS et al., 2007) devido aos seus efeitos fisiológicos adversos, tais como, o aumento dos níveis auto-relatados de ansiedade (ALSENE et al., 2003; CHILDS et al., 2008; ROGERS et al., 2010) e a alteração da qualidade do sono (RETEY et al., 2007), induzidos pela administração aguda de cafeína. Os autores RENDA et al. (2012), também encontraram uma associação entre a variante alélica TT do gene *ADORA2A* e um aumento agudo da PAS, após a ingestão de cafeína.

Devido à sua condição multifatorial, a PA é influenciada por fatores ambientais e genéticos, tendo sido estabelecida há muito tempo uma predisposição hereditária, sugerindo uma contribuição significativa de fatores genéticos para este fenótipo complexo (ZHAO et al., 2013). Ao longo da última década, vários marcadores genéticos foram associados à PA elevada ou à HAS através de genes candidatos e estudos de GWAS (LEVY et al., 2009; NEWTON-CHEH et al., 2009; LIU et al., 2011; AMIN et al., 2012).

Recentemente, duas importantes meta-análises de GWAS, contendo dados de indivíduos com descendência européia (LEVY et al., 2009; NEWTON-CHEH et al., 2009), a primeira do *CHARGE Consortium* (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) (N= 29,136) (LEVY et al., 2009) e a outra do Consórcio *Global BPgen* (Global Blood Pressure Genetics) (N= 34,433) (NEWTON-CHEH et al., 2009), identificaram variantes genéticas em 13 loci fortemente associadas com a PAS e a PAD (em regiões próximas ou nos genes *MTHFR*, *CYP17A1*, *PLCD3*, *FGF5*, *c10orf107*, *SH2B3*, *CYP1A2*, *ZNF652*, *ATP2B1*, *PLEKHA7*, *ATP2B1*, *CACNB2*, *CSK/ULK3*, *SH2B3*, *TBX3/TBX5*, *ULK4*). Ademais, o *International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies* (2011), realizado em 200.000 indivíduos também de descendência européia, identificou 16 novos loci para a PAS e PAD: seis desses loci contêm genes anteriormente conhecidos ou suspeitos de regular a PA (*GUCY1A3-GUCY1B3*; *NPR3-C5orf23*; *ADM*; *FURIN-FES*; *GOSR2*; *GNAS-EDN3*); os outros dez facultaram novas pistas para a fisiopatologia da PA (EHRET et al., 2011). Uma outra meta-análise realizada a partir de oito estudos de coorte, com dez GWAS, verificou que uma variação genética situada entre os genes *CPLX3* e *ULK3*, se encontrava associada a um aumento da PA sanguínea (AMIN et al., 2012).

Desta forma, constata-se que os estudos de GWAS têm suscitado interesse e grande relevância na pesquisa da genômica da HAS, destacando novas vias do metabolismo que influenciam a PA, elucidando os mecanismos genéticos subjacentes à regulação da PA (ZHAO et al., 2013). No entanto, as funções biológicas destas variantes genéticas em relação à PA e os mecanismos pelos quais as mesmas contribuem para afetar o aumento dos seus níveis, permanecem ainda pouco explicados e compreendidos, necessitando de serem melhor investigados (LEVY et al., 2009; LIU et al., 2011).

Os polimorfismos no gene *CPLX3/ULK3*, estão associados à expressão alterada da proteína serina-treonina quinase no fígado; no entanto, pouco se conhece sobre este gene e como a variação do mesmo pode afetar a PA (LEVY et al., 2009; TAKEUCHI et al., 2011).

Outra variante genética identificada pertence ao gene da enzima *MTHFR*. Tem sido descrito que os genótipos variantes podem reduzir a atividade desta enzima envolvida no metabolismo do folato e da homocisteina, diminuindo as concentrações da forma circulante de folato (5-metil THF) e resultando, subsequentemente, em hiper-homocisteinemia (BRUSTOLIN et al., 2010). Concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína foram associadas a DCV, particularmente, a HAS e hipertensão na gravidez, pois podem induzir a constrição arteriolar, a disfunção renal pelo aumento da reabsorção de sódio e também aumentar a rigidez arterial e o estresse oxidativo. Assim, uma meta-análise recente, forneceu evidências de que o polimorfismo *MTHFR* C677T está associado a HAS e hipertensão na gravidez, especialmente entre os asiáticos e os caucasianos (YANG et al., 2014). O estudo de LI et al. (2017), demonstrou que a variação genética *MTHFR* A1298C, provocou um aumento conjunto de hiper-homocisteinemia e de pressão arterial diastólica.

Outros polimorfismos estão relacionados aos genes *CYP1A1* e *CYP1A2*. O polimorfismo *CYP1A1* T3801C, relacionado com uma maior indutibilidade e um aumento da atividade catalítica da enzima *CYP1A1*, tem sido associado com alterações na PA (GAMBIER et al., 2006). Além disso, as variantes polimórficas do gene *CYP1A2* podem influenciar a PA, através do efeito da cafeína na modificação da via de reabsorção tubular renal de sódio (GUESSOUS et al., 2012). Os polimorfismos neste gene são conhecidos por mediar a associação entre o consumo de café e a HAS (PALATINI et al., 2009) ou o infarto do miocárdio (CORNELIS et al., 2006). Assim, o genótipo *CYP1A2* pode ter uma influência importante sobre a PA considerando a ingestão de café (PALATINI et al., 2009).

1.6 ESCORE GENÉTICO DE RISCO PARA A PRESSÃO ARTERIAL E INTERAÇÃO COM O CONSUMO DE CAFÉ

A partir dos estudos de GWAS publicados na literatura, são selecionados os polimorfismos elegíveis a marcadores genéticos de diversas doenças crônicas, os quais serão posteriormente utilizados na construção do escore genético de risco (do inglês, GRS) (HAVULINNA et al., 2013; HUNG et al., 2015; LIM et al., 2015; WANG et al., 2017).

O GRS permite fazer uma avaliação composta por dados genéticos em doenças complexas. Esta ferramenta permite combinar o risco relacionado à saúde modelada pela informação genética em um único número, o que facilita uma medida mais direta a ser utilizada para predição de risco (SMITH et al., 2015). No geral, o uso de GRS tem sido aplicado para melhorar a avaliação de risco com base em modelos de predição já estabelecidos.

SETTEN et al. (2013) publicaram um estudo de GWAS da calcificação arterial coronariana no risco de doença arterial coronariana e infarto do miocárdio e derivaram um escore genético de risco (GRS), construído a partir de 24 SNPs envolvidos na calcificação coronariana. Anteriormente, tinha sido realizado um outro GRS baseado em 29 variantes genéticas independentes, o qual foi significativamente associado com HAS, espessura da parede ventricular esquerda, acidente vascular cerebral e doença arterial coronariana (EHRET et al., 2011).

É sabido que existe uma variabilidade considerável nas respostas cardiovasculares ao consumo de café. Em parte, essa variabilidade é devido à tolerância à cafeína e ao efeito de compostos benéficos na PA, como os ácidos fenólicos, mas há evidências de que a mesma se encontra igualmente relacionada com a predisposição genética individual (YANG et al.,

2010). Desta forma, as associações heterogêneas e inconsistentes verificadas entre o consumo habitual de café e o risco de DCV, de HAS e o efeito a longo prazo na elevação da PA, podem ser atribuídas, pelo menos em parte, aos efeitos da predisposição genética, como observado em estudos que mostram as interações entre o café e os polimorfismos em diferentes desfechos de saúde (CORNELIS et al., 2006; DIK et al., 2014; WANG et al., 2017). Os fatores genéticos podem ser especialmente valiosos, pois permitem estudar os potenciais efeitos do consumo de café na saúde humana, através de interações entre gene e dieta (CORNELIS et al., 2015). Além disso, dados emergentes da literatura sugerem que estas interações sinérgicas da predisposição genética com os fatores dietéticos, como o consumo de café, podem desempenhar um papel importante na modificação dos níveis de PA e na compreensão da patogênese da HAS (KUNES e ZICHA, 2009).

Portanto, observa-se uma importante relação entre a presença de polimorfismos genéticos, o consumo de café e a resposta metabólica relacionada à PA. No entanto, a determinação de um mecanismo biológico preciso exigirá mais estudos, pois até ao momento os mecanismos envolvidos na interação entre o consumo de café e a predisposição genética para a elevação da PA, ainda não são claros e completamente compreendidos.

2 JUSTIFICATIVA

As inúmeras investigações epidemiológicas, metabólicas e químicas, realizadas até o momento em relação aos efeitos do consumo habitual de café na saúde do consumidor, particularmente sobre a ação protetora ou de risco nas DCV, não apresentam consenso na literatura científica e os resultados são contraditórios e inconclusivos. Os diferentes componentes biologicamente ativos presentes no café, aliados a uma enorme variabilidade

interindividual e a preferência por diferentes tipos de bebidas de café, com variações desde as espécies, graus de torra, de moagem e métodos de preparação da mesma, dificultam frequentemente a comparação entre os vários estudos.

Pelo fato do café ser um produto de fácil aquisição, grande aceitação popular e uma bebida muito consumida no Brasil, obter novas evidências científicas representativas da população brasileira e acrescentar dados relevantes acerca dos seus possíveis efeitos benéficos sobre os FRCV, gera potencial para uma contribuição positiva tanto do ponto de vista clínico (indivíduo), quanto das recomendações na saúde pública.

Desta forma, elaborou-se este trabalho científico que buscou confirmar algumas das associações verificadas e outras novas emergentes, em relação ao potencial efeito do café na saúde cardiovascular. Com este estudo, espera-se avançar no conhecimento entre o consumo de café, a contribuição na ingestão de polifenóis e os efeitos desta bebida em FRCV, tendo em conta as variações genéticas individuais na população brasileira, e contribuir com o entendimento da etiologia desta associação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o consumo de café, estimar a sua contribuição para a ingestão de polifenóis e investigar a relação com fatores de risco cardiovascular, considerando fatores sócio-demográficos, de estilo de vida, bioquímicos e polimorfismos genéticos selecionados,

em amostra representativa de adultos e idosos residentes no município de São Paulo, participantes do Inquérito de Saúde de São Paulo (ISA-Capital 2008).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar o consumo médio *per capita* de café e constatar a sua contribuição para a ingestão de polifenóis, em amostra representativa de adultos e idosos do município de São Paulo (Manuscrito 1);
- Avaliar o efeito do consumo de café e seus polifenóis nos fatores de risco cardiovascular, particularmente na pressão arterial, nas concentrações plasmáticas de homocisteína e de lipídeos, em amostra representativa de indivíduos adultos e idosos do município de São Paulo (Manuscrito 2);
- Construir um escore genético de risco (do inglês, GRS) para a pressão arterial, e investigar a interação entre os polimorfismos genéticos que compõem o GRS e o consumo de café nos níveis de pressão arterial, em amostra representativa de residentes do município de São Paulo (Manuscrito 3).

4 METODOLOGIA

4.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A presente tese utilizou os dados procedentes do estudo transversal de base populacional “Inquérito de Saúde do Município de São Paulo” – ISA-Capital 2008. O ISA-Capital vem sendo realizado com a periodicidade de cinco anos desde 2003 e foi financiado pela Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com o intuito de monitorar as condições de saúde, acesso a serviços e avaliar o impacto de políticas públicas na população residente no município de São Paulo.

Adicionalmente, para avaliação da quantidade de polifenóis nos alimentos, utilizaram-se, também, os dados provenientes do banco de dados de polifenóis “Phenol-Explorer” versão 3.5.

4.2 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal de base populacional, conduzido de 2008 a 2009, com amostra probabilística de adultos e idosos, de ambos os sexos, residentes em domicílios particulares da área urbana do município de São Paulo.

4.3 AMOSTRAGEM DO PROJETO ISA-CAPITAL 2008

O plano de amostragem foi desenvolvido com o objetivo de otimizar a logística de campo, e manter a representatividade da população do município de São Paulo. As informações dos inquéritos de saúde dos anos anteriores foram utilizadas como referência para estimar perdas e recusas. Maiores detalhes sobre o processo de amostragem podem ser encontrados em ALVES e ESCUDER (2009).

A amostra do estudo ISA-Capital 2008 foi obtida mediante amostragem probabilística complexa, por conglomerados em dois estágios: setor censitário e domicílio. No primeiro estágio, realizou-se sorteio aleatório simples de 70 setores censitários (unidades primárias de amostragem) dentre os 267 setores de área urbana do município de São Paulo que constavam no cadastro da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) 2005.

A partir dos objetivos do projeto, foram fixados oito domínios de estudo formados pelos grupos de idade e sexo: menores de um ano, de 1 a 11 anos de idade, mulheres de 12 a 19; 20 a 59 e 60 anos ou mais, e homens, nas mesmas faixas etárias. Planejou-se a realização de pelo menos 300 entrevistas em cada subgrupo populacional de interesse. Esse tamanho permitiria estimar proporções ($P=0,50$) com erros de amostragem de 7 pontos percentuais ($d=0,07$) ao nível de confiança de 95% e com efeitos do delineamento de 1,5.

O tamanho da amostra estipulado foi de 4.024, prevendo-se uma taxa de não-resposta de 20% e encontro de 5% dos domicílios fechados. Devido a perdas por recusa, falecimento e mudanças de endereço, a amostra final totalizou 3.271 indivíduos (580 crianças, 605 adolescentes, 1.162 adultos e 924 idosos), dos quais 1.662 (559 adolescentes, 586 adultos e 517 idosos) tiveram coletadas as informações dietéticas.

Durante a segunda fase do projeto, 750 indivíduos (158 adolescentes, 302 adultos e 290 idosos) tiveram a segunda medida dietética coletada e foram aferidas as medidas antropométricas, de PA e realizada a coleta de sangue venoso. A perda amostral ocorreu pela dificuldade de encontrar as pessoas no domicílio, agendar nova visita para coleta de sangue, além de perdas por recusas ou mudança de endereço/telefone. No entanto, esta ocorreu de forma aleatória em todos os estratos considerados para a amostragem, sem a ocorrência de viés por perdas diferenciais.

Das amostras de sangue total coletadas, foi extraído e quantificado o DNA e realizou-se a genotipagem dos polimorfismos nos 592 indivíduos adultos e idosos.

4.4 TAMANHO DA AMOSTRA

A amostra do presente estudo difere de acordo com os objetivos propostos em cada manuscrito. Assim, o fluxograma com a amostra elegível para cada um dos manuscritos da tese, está apresentado na Figura 4. De ressaltar que, foram avaliados apenas os domínios de adultos e idosos, de ambos os sexos.

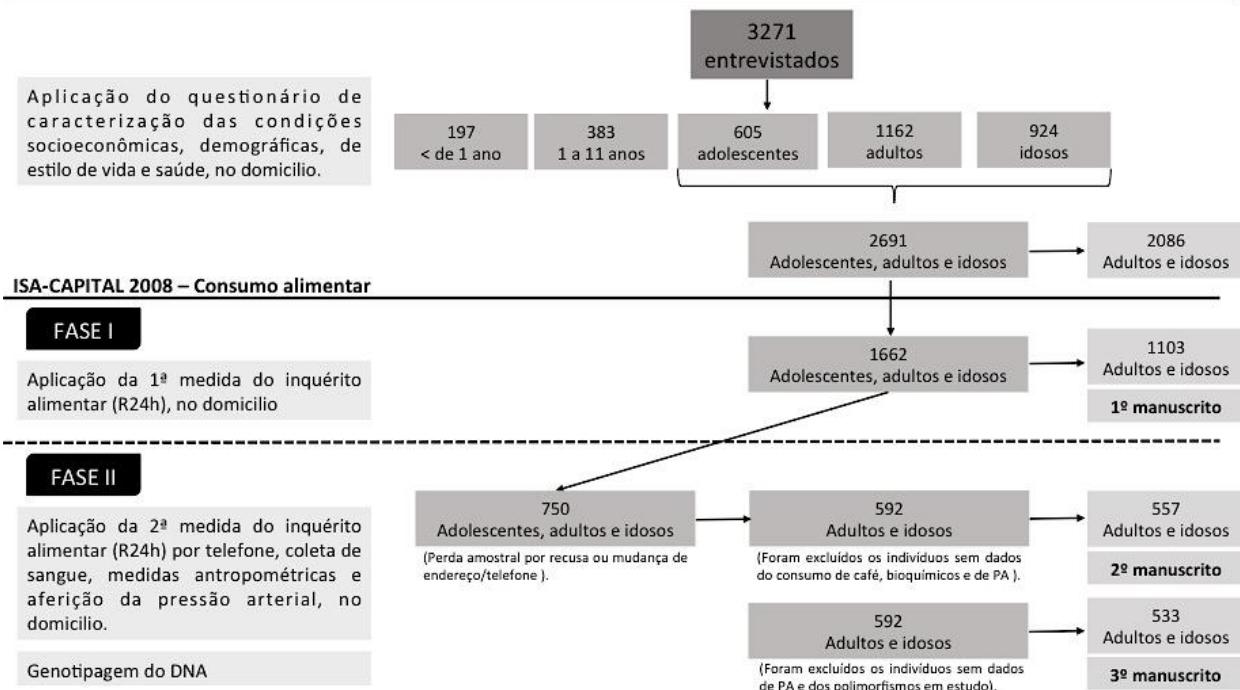
ISA-CAPITAL 2008 – Questionário estruturado

Figura 4. Fluxograma da amostra elegível para os três manuscritos apresentados na tese.
ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.

4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS

O ISA-Capital 2008 ocorreu em duas fases. A primeira fase, que teve início em setembro de 2008, consistiu da primeira visita domiciliar, na qual foi aplicado um questionário estruturado realizado por entrevistadores previamente treinados. Foram coletadas informações referentes ao estado socioeconômico, de estilo de vida (atividade física, tabagismo e etilismo), morbidade referida, histórico familiar de morbidade, uso de medicamentos e suplementos, dentre outras. Concomitantemente, ocorreu a avaliação do consumo alimentar, pelo R24h. No entanto, a aplicação do R24h foi realizada em uma sub-

amostra. Na segunda fase, realizou-se uma nova visita domiciliar, na qual foi medida a antropometria (peso e estatura), aferida a PA e coletado material biológico (amostra de sangue venoso). Nesta mesma fase, realizou-se o segundo R24h por telefone.

4.5.1 Dados socioeconômicos, de estilo de vida e saúde

As informações de sexo, idade, raça auto-declarada, renda familiar *per capita*, nível de escolaridade, consumo de bebida alcoólica, prática de atividade física, hábito de fumar e uso de medicamentos, foram obtidas por meio da aplicação de questionário estruturado durante a primeira visita domiciliar.

A prática de atividade física foi mensurada por meio da versão em português do IPAQ (*International Physical Activity Questionnaire*), versão longa, validado no Brasil (MATSUDO et al., 2001; CRAIG et al., 2003), no qual o entrevistado é questionado sobre a duração, frequência e intensidade da atividade física nos diferentes domínios: ocupacional, lazer, doméstico e transporte. Utilizou-se o domínio do lazer para classificar os indivíduos em insuficientemente ativos (prática de atividade vigorosa inferior a 3 dias por semana e menos de vinte minutos por sessão ou atividade moderada inferior a 5 dias por semana e menos de trinta minutos por sessão) e suficientemente ativos (prática de atividade vigorosa superior ou igual a 3 dias por semana e vinte minutos ou mais por sessão ou atividade moderada superior ou igual a 5 dias por semana e trinta minutos ou mais por sessão).

Os dados de tabagismo foram coletados a partir de questões sobre fumo atual ou pregresso, número de cigarros fumados por dia, tempo de exposição à fumaça do cigarro e, os participantes foram classificados em não fumantes, ex-fumante e fumantes. Em relação ao

consumo de álcool, este foi investigado por questionário específico para a avaliação de dependência alcoólica, denominado CAGE, acrônimo referente às suas quatro perguntas - *Cutdown, Annoyed by criticism, Guilty e Eye-opener* (EWING, 1984), validado no Brasil. A informação obtida a partir das questões sobre preferência do consumo de bebida alcoólica e frequência de consumo, classificou os indivíduos em não consumidores e consumidores de álcool.

4.5.2 Dados de consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado por meio da aplicação de dois R24h, o primeiro domiciliar e o segundo telefônico, utilizando a metodologia do *Multiple Pass Method* (GUENTHER et al., 1995) no primeiro R24h e do *Automated Multiple Pass Method* (BLANTON et al., 2006) no segundo R24h, no qual o entrevistado é conduzido por meio de cinco passos (listagem rápida; revisão preliminar; nomeação das refeições, detalhamento do consumo e revisão final) em um processo padronizado, que visa manter o indivíduo interessado e engajado na entrevista, ajudando-o a recordar todos os itens consumidos.

Anteriormente à digitação dos dados de consumo alimentar foi realizada a revisão de todos os R24h, com o objetivo de identificar falhas no preenchimento e na quantificação dos alimentos referidos pelo indivíduo. Em seguida, as falhas encontradas relacionadas à descrição do alimento, preparação, porcionamento e quantificação de cada item do R24h foram corrigidas para garantir a acurácia dos dados e viabilizar a análise de uma dieta mais próxima do real.

A padronização e a quantificação dos alimentos e preparações foram realizadas segundo as recomendações de FISBERG E VILLAR (2002) e PINHEIRO et al. (2008), que permitiram a conversão das medidas caseiras em unidades de peso (gramas) ou volume (mililitros). Essas informações de consumo alimentar, geradas a partir dos R24h, foram convertidas em valores de nutrientes e energia utilizando o software *Nutrition Data System for Research* (NDSR, versão 2014, Universidade de Minnesota, Minneapolis). Como o software utiliza como base de dados a tabela norte-americana desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (RAPER et al., 2004) foi elaborada uma lista com a tradução de mais de 700 itens alimentares (alimentos, bebidas, preparações culinárias) consumidos pelos indivíduos avaliados no estudo ISA-Capital 2008. Além disso, foi confrontado o valor de energia e macronutrientes dos alimentos a partir do NDSR com o de tabelas nacionais (TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas e TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo), para verificar a adequação dos valores nutricionais dos alimentos presentes no software. Os alimentos que obtiveram percentuais de concordância entre 80% e 120% dos valores de energia e macronutrientes foram incluídos na lista (FISBERG et al., 2012).

Após a tabulação dos dados, foi realizada a análise de consistência na tentativa de identificar possíveis erros durante a digitação dos dados.

4.5.3 Avaliação antropométrica

Foram aferidas medidas antropométricas relativas ao peso e estatura, adotando-se os procedimentos descritos pela OMS (WHO, 1995) e pelo Guia para realização do exame de antropometria do Laboratório de Avaliação Nutricional de Populações (LANPOP, 2006). Todas as medidas foram realizadas no domicílio, por um técnico de enfermagem, previamente treinado.

Para aferição do peso corporal, em quilogramas, foi utilizada uma balança eletrônica calibrada, do tipo plataforma, com capacidade máxima para 150 quilogramas e precisão de 100 gramas, a qual foi apoiada em superfície plana, firme, lisa e afastada da parede (Tanita®, modelo HD-313, Brisbane, Austrália). Os indivíduos foram pesados com roupas leves e descalços, posicionados em postura ereta, com os pés inteiramente colocados na plataforma, de forma paralela, com os braços ao longo do corpo e olhar no horizonte.

Para a medição da estatura, foi utilizado um estadiômetro portátil, fixado em parede lisa e sem rodapé, com escala de 0 a 220 centímetros e precisão de 0,1 centímetros (Seca®, modelo 208, Hamburg, Alemanha). O indivíduo foi posicionado em postura ereta, segundo o plano de Frankfurt de modo a encostar calcanhares, panturrilhas, nádegas, ombros e a parte posterior da cabeça na superfície vertical do estadiômetro.

O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela divisão da massa de um indivíduo adulto, em quilogramas, pelo quadrado da altura, medida em metros, por meio da equação de Quetelet [IMC = peso (kg)/estatura (m)²].

4.5.4 Aferição da Pressão Arterial

A PA foi aferida por meio de aparelho automático calibrado (Omron®, modelo HEM-712C, Health Care, Inc, EUA) durante a segunda visita domiciliar, pelo mesmo técnico de enfermagem responsável pelas medições antropométricas e pela coleta de sangue. Esta avaliação foi validada de acordo com os protocolos da *Association for Advancement of Medical Instrumentation e Hypertension Society* (GRAVES, 2005) e seguiu as orientações propostas pelas V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC, 2007). Após cinco minutos de repouso do indivíduo na posição sentada, com o braço apoiado em superfície firme, o manguito era adequado à circunferência braquial e insuflado. Primeiramente era realizada aferição no braço direito e, após intervalo de um minuto, no braço esquerdo. Eram realizadas novamente outras duas medidas no braço que tivesse apresentado maior PA, com mesmo intervalo de um minuto entre as aferições. Os valores finais de pressão sistólica e diastólica (em mmHg) foram considerados a partir da média aritmética das duas últimas medidas (FISBERG et al., 2012).

4.5.5 Dados bioquímicos e avaliação do perfil lipídico

As amostras sanguíneas foram coletadas no domicílio, por técnico de enfermagem treinado, por meio de punção venosa cubital. Os indivíduos foram orientados a permanecerem 12 horas em jejum, não alterarem a sua alimentação habitual nos dias anteriores a coleta, evitarem realizar atividade física intensa e não ingerirem bebida alcoólica 72 horas antes da

coleta. Essas orientações foram dadas, por telefone, ao indivíduo ou familiar, dias antes da visita domiciliar.

Foram coletados, aproximadamente, 20 mililitros (mL) de material sanguíneo em tubos secos e com EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético). Os tubos foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo reciclável e transportados ao Laboratório Nutrição Humana da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, onde as amostras foram imediatamente processadas. Após a retirada das alíquotas de plasma de interesse, o material restante no tubo foi armazenado em refrigeração para o processo de extração do ácido desoxirribonucleico (DNA). Todas as alíquotas foram armazenadas em freezer -80 °C para posterior dosagem e as demais enviadas a laboratório externo credenciado para as determinações bioquímicas.

No presente estudo, as variáveis bioquímicas analisadas foram: GJ plasmática, CT e frações (LDL-c e HDL-c), TG plasmáticos e homocisteína plasmática.

A GJ plasmática foi determinada por método enzimático colorimétrico com a glicose oxidase (Glucose Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) utilizando sistema automatizado (LabMax 240, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

As concentrações plasmáticas de CT, das frações LDL-c e HDL-c e de TG foram mensuradas por meio do método enzimático colorimétrico (Roche® Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

As análises da concentração plasmática de homocisteína foram realizadas utilizando o ARCHITECT homocisteína kit reagente (Abbott Diagnostics Division, Abbott Park, Lake Forest, IL, EUA), pelo método de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência.

Todos os testes realizados aderiram aos procedimentos de controle de qualidade, tal como recomendado pelo manual técnico do fabricante.

4.5.6 Extração do DNA e Genotipagem

A extração do DNA seguiu o protocolo do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da USP, sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Gilka Jorge Figaro Gattás. Os procedimentos realizados seguiram o protocolo do laboratório, que utiliza como metodologia padronizada a extração de DNA por sal (MILLER et al., 1988). Posteriormente, a quantificação do DNA foi realizada com o auxílio do espetofotômetro - Nanodrop ®.

A partir de 5 mL de sangue total coletados em tubo com EDTA foi feita a lise de hemárias com tampão, seguida da homogeneização por inversão e refrigeração dos tubos em geladeira por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos. Depois disso, eles foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C; desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se tampão de lise e homogeneizaram-se os mesmos. Foi repetido este processo novamente e os tubos congelados. Em seguida, foi realizada a lise de leucócitos com solução de lise a 10% e proteinase K. Colocaram-se os tubos em banho maria a 60°C por uma hora, para se obter uma solução viscosa clara, indicativa da completa digestão com proteinase. Seguidamente, os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e centrifugados a 3000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos a 18°C. O sobrenadante contendo o DNA desproteinizado, foi transferido para um tubo limpo e foram adicionados dois volumes de etanol absoluto gelado, invertendo o tubo até ocorrer a precipitação do DNA. O DNA precipitado foi transferido para um microtubo que continha 1000 µL de etanol a 70% e centrifugado a 6000 rpm por 5 minutos a 4°C. Desprezou-se o etanol e procedeu-se à mesma lavagem por mais duas vezes. Finalmente, o tubo foi deixado em um lugar limpo e fresco, para secar. Foram adicionados

100 µL de TE (tampão tris-HC1 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0) para cada um mL de sangue e o material foi congelado.

Todas as etapas do ensaio de genotipagem dos polimorfismos foram realizadas pela empresa *Helixxa Importação, Exportação e Serviços Genômicos Ltda* (Campinas, SP), utilizando o sistema *Taqman Open Array* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), o qual se baseia na técnica cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, de acordo com a metodologia descrita por MYAKISHEV et al. (2001).

A partir da revisão bibliográfica dos estudos de GWAS, de meta-análises e de estudos prospectivos e longitudinais, foram selecionados para serem analisados os polimorfismos de enzimas envolvidas no metabolismo da cafeína, no consumo de café e nos níveis de PA, conforme descrito no Quadro 1. São eles: *CYP1A1/CYP1A2* rs2470893; *CYP1A1/CYP1A2* rs2472297; *CYP1A2* rs762551; *AHR* rs4410790, rs6968865; *ADORA2A* rs5751876, rs2298383, rs3761422; *CPLX3/ULK3* rs6495122 e *MTHFR* rs17367504, rs1801133.

Quadro 1. Características dos polimorfismos presentes nas enzimas que atuam no metabolismo da cafeína, consumo de café e nos níveis de pressão arterial. ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.

Gene	Polimorfismo	Troca do nucleotídeo	Região cromossômica	Localização	Efeito e Associação	População em estudo	Referências
<i>CYP1A1/ CYP1A2</i>	rs2470893	C→T	15q24	Upstream da região promotora	Os carreadores do alelo T, apresentaram uma maior ingestão habitual de cafeína e consumo de café e um aumento dos níveis de PA (PAS e PAD).	Descendentes europeus (caucasianos)	Cornelis et al., 2011; Amin et al., 2012
	rs2472297	C→T	15q24	Intergênica	Os carreadores do alelo T, apresentaram uma maior ingestão de cafeína e consumo de café e uma redução dos níveis de PAD.	Descendentes europeus, afro-americanos e indivíduos hispano-americanos	Sulem et al., 2011; ICBP-GWAS, 2011; Josse et al., 2012; Cornelis et al., 2015
<i>CYP1A2</i>	rs762551 (alelo *1A)	A→C	15q24	Intron	Nos indivíduos carreadores do alelo *1A, classificados como "rápidos" metabolizadores da cafeína, não se observou associação entre o consumo de café e o risco de infarto do miocárdio. Além disso, os indivíduos não fumantes, apresentaram menor chance de hipertensão arterial e PA elevada.	Hispano-americanos e europeus adultos	Cornelis et al., 2006; Guessous et al., 2012
					Nos portadores do alelo *1A, verificou-se uma associação inversa entre o consumo de café e o risco de hipertensão, isto é, um menor risco de hipertensão para aqueles que beberam ≥ 4 xícaras de café/dia.	Adultos jovens caucasianos	Palatini et al., 2009
	rs762551 (alelo *1F)	A→C	15q24	Intron	Os indivíduos metabolizadores "lentos" da cafeína, carreadores do alelo *1F, que tiveram um alto consumo de café (≥ 4 xícaras/dia) apresentaram um maior risco de infarto do miocárdio.	Hispano-americanos	Cornelis et al., 2006
					Os portadores do alelo *1F, que consumiram mais de 1 xícara de café/dia, tiveram um aumento do risco de hipertensão.	Adultos jovens caucasianos	Palatini et al., 2009

AHR	rs4410790	T→C	7p21	Intron	Os indivíduos carreadores do alelo C, apresentaram uma maior ingestão habitual de cafeína (> 400 mg/dia).	Descendentes europeus e hispano-americanos	Cornelis et al., 2011; Josse et al., 2012
	rs6968865	A→T	7p21	Intron	Os indivíduos carreadores do alelo T, apresentaram uma maior ingestão habitual de cafeína (> 400 mg/dia) e maior consumo de café.	Europeus e hispano-americanos	Sulem et al., 2011; Josse et al., 2012
ADORA2A	rs5751876	C→T	22q11	Intron	Aumento da ansiedade auto-relatada induzida pela cafeína após uma ingestão moderada de 150 mg, nos indivíduos portadores do genótipo T/T.	Jovens adultos americanos	Alsene et al., 2003; Childs et al., 2008
					Nos carreadores do genótipo T/T, verificou-se uma redução na ingestão habitual de cafeína.	Hispano-americanos	Cornelis et al., 2007
					Efeito ansiogénico da cafeína, entre os não consumidores habituais. Indivíduos carreadores do alelo T tornaram-se mais suscetíveis à ansiedade induzida pela cafeína, após ingestão de 150 mg.	Europeus	Rogers et al., 2010
	rs5751876	T→C	22q11	Intron	Redução da qualidade do sono e aumento da ansiedade, após a ingestão de cafeína. Indivíduos com o genótipo C/C mostraram-se mais sensíveis à cafeína e suscetíveis a distúrbios do sono (insônia).	Jovens adultos europeus e americanos	Retey et al., 2007; Childs et al., 2008
	rs2298383	C→T	22q11	Intron	Os indivíduos portadores do alelo variante, relataram uma ansiedade significativamente maior do que os portadores do alelo ancestral, após a ingestão de 150 mg de cafeína.	Jovens adultos americanos	Childs et al., 2008
	rs3761422	C→T	22q11	Intron	Os portadores do genótipo T/T, tiveram um aumento da ansiedade em resposta à ingestão de 100 mg de cafeína.	Europeus	Rogers et al., 2010
CPLX3/ ULK3	rs6495122	A→C	15q24	Intergênica	Os carreadores do alelo C, tiveram um menor consumo de café.	Descendentes europeus	Amin et al., 2012; Cornelis et al., 2011
					Os carreadores do alelo A, apresentaram um aumento nos níveis de PAD.	Descendentes europeus	Levy et al., 2009

MTHFR	rs17367504	A→G	1p36	Intron	Os carreadores do alelo G, tiveram uma diminuição dos níveis da PAS, PAD e menor risco de hipertensão.	Descendentes europeus	Newton et al., 2009; ICBP-GWAS, 2011
					Os carreadores do alelo A, apresentaram maior risco de hipertensão e aumento dos níveis da PAS e PAD.	Asiáticos	Liu et al., 2010; Takeuchi et al., 2010
	rs1801133	C→T	1p36	<i>Missense</i>	Os indivíduos que carreavam o alelo variante T, apresentaram um maior risco de HAS e hipertensão na gravidez.	Asiáticos e caucasianos	Niu et al., 2012; Yang et al., 2014

Legenda: ADORA2A, receptor de adenosina A2A; AHR, receptor de aril hidrocarbonetos; CPLX3, complexina 3; CYP1A1, citocromo P450 1A1; CYP1A2, citocromo P450 1A2; MTHFR, metileno-tetrahidrofolato redutase; ULK3, proteína serina-treonina quinase.

Fonte: <https://www.ensembl.org/> e <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

4.5.6.1 Seleção dos polimorfismos candidatos e construção do Escore Genético de Risco (GRS) para a pressão arterial

De entre os polimorfismos analisados e descritos anteriormente (Quadro 1), foram selecionados para a construção do GRS quatro polimorfismos elegíveis a marcadores da PA [*CYP1A1/ CYP1A2* (rs2470893, rs2472297); *CPLX3/ULK3* (rs6495122); *MTHFR* (rs17367504)], a partir dos estudos de GWAS, previamente descritos na literatura (LEVY et al., 2009; NEWTON-CHEH et al., 2009; EHRET et al., 2011; AMIN et al., 2012).

Cada SNP candidato foi codificado como 0 (zero), 1 (um) ou 2 (dois) de acordo com o número de alelos variantes associados com a PA. Assim, se o indivíduo fosse homozigótico dominante obtinha a pontuação zero, se fosse heterozigótico (um alelo variante) obtinha a pontuação um e caso fosse homozigótico recessivo (dois alelos variantes) adquiria pontuação dois. De ressaltar que, para os polimorfismos selecionados rs2472297, rs6495122 e rs17367504, teve que realizar-se a recodificação do alelo de risco relacionado com o aumento da PA, uma vez que, a literatura prévia de GWAS mostrou uma associação inversa entre a presença do alelo variante e a pressão arterial elevada.

Posteriormente, o GRS “não ponderado” foi determinado por uma simples soma do número de alelos de risco dos quatro SNPs selecionados. Nesta abordagem, nenhuma ponderação de efeito foi utilizada, e cada alelo do SNP contou igualmente na pontuação (HUNG et al., 2015; LIM et al., 2015). O GRS variou de 0 a 8, e cada ponto do escore correspondeu a cada um dos alelos de risco, sendo que, há medida que vai aumentando a pontuação no escore, ocorre uma maior predisposição genética para a PA elevada.

4.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis estudadas em cada manuscrito que compõe a presente tese, encontram-se descritas em seguida, no quadro 2.

Quadro 2. Variáveis de estudo segundo o manuscrito (1º manuscrito). ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.

	Variável	Descrição
1º Manuscrito	Sexo	masculino, feminino
	Faixa etária	20 a 59 anos (adultos), 60 anos ou mais (idosos)
	Raça auto-declarada	branca, não branca
	Grau de escolaridade do chefe de família	anos de escolaridade completos
	Renda familiar <i>per capita</i>	salário mínimo em dólares [<1 salário mínimo (<135 dólares, o equivalente a 450 reais); ≥ 1 salário mínimo (≥ 135 dólares)]
	Tabagismo	nunca, ex-fumante, fumante
	Atividade física no lazer	insuficientemente ativo, suficientemente ativo
	Índice de Massa Corporal	normoponderal ($<25 \text{ kg/m}^2$), excesso de peso/obesidade ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$)
	Consumo de álcool (segundo o CAGE)	não, sim
	Ingestão de polifenóis	miligramas/dia

Quadro 2. Variáveis de estudo segundo o manuscrito (2º manuscrito). ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.

Variável	Descrição
2º Manuscrito	Sexo
	masculino, feminino
	Idade
	20 anos ou mais
	Raça auto-declarada
	branca, preta, outras (mulato, asiático e indígena)
	Renda familiar <i>per capita</i>
	salário mínimo em dólares [<1 salário mínimo (<135 dólares, o equivalente a 450 reais); ≥ 1 salário mínimo (≥ 135 dólares)]
	Tabagismo
	nunca e ex-fumante, fumante
	Atividade física no lazer
	insuficientemente ativo, suficientemente ativo
	Índice de massa corporal
	kg/m ²
	Consumo de álcool
	g/dia
	Consumo de café
	<1 xícara/dia (<50 mL), 1-3 xícaras/dia (50-150 mL) e ≥ 3 xícaras/dia (≥ 150 mL)
	Ingestão de polifenóis do café
	<101 mg/dia, 101–337 mg/dia e ≥ 337 mg/dia
	Ingestão de cafeína
	mg/dia
	Ingestão de sódio
	mg/dia
	Açúcares de adição
	g/dia
	Energia total
	kcal/dia
	Gordura saturada
	g/dia
	Gordura monoinsaturada
	g/dia
	Gordura polinsaturada
	g/dia
	Vitamina B6 plasmática
	nmol/L
	Vitamina B12 plasmática
	pmol/L
	Folato sérico
	nmol/L
	Pressão arterial sistólica
	normal (pressão arterial sistólica < 140 mmHg), elevada (pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg)
	Pressão arterial diastólica
	normal (pressão arterial diastólica < 90 mmHg), elevada (pressão diastólica ≥ 90 mmHg)
	Glicemia de jejum
	normal (< 100 mg/dL), elevada (≥ 100 mg/dL)
	Concentração de colesterol total
	normal (< 200 mg/dL), elevada (≥ 200 mg/dL)
	Concentração de LDL-c
	normal (< 100 mg/dL), elevada (≥ 100 mg/dL)
	Concentração de HDL-c
	normal (HDL-c ≥ 40 mg/dL para homens e HDL-c ≥ 50 mg/dL para mulheres), elevada (HDL-c < 40 mg/dL para homens e HDL-c < 50 mg/dL para mulheres)
	Concentração de triacilgliceróis
	normal (< 150 mg/dL), elevada (≥ 150 mg/dL)
	Concentração plasmática de homocisteína
	normal (≤ 12 µmol/L para adultos; ≤ 16 µmol/L para idosos), elevada (> 12 µmol/L para adultos; > 16 µmol/L para idosos)
	Medicação
	uso de antihipertensivos, hipolipemiantes e hipoglicemiantes

Quadro 2. Variáveis de estudo segundo o manuscrito (3º manuscrito). ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.

3º Manuscrito	Variável	Descrição
	Sexo	masculino, feminino
	Idade	20 anos ou mais
	Raça auto-declarada	branca, preta, outras (mulato, asiático e indígena)
	Tabagismo	nunca, ex-fumante, fumante
	Atividade física no lazer	insuficientemente ativo, suficientemente ativo
	Índice de Massa Corporal	kg/m ²
	Consumo de álcool (segundo o CAGE)	não, sim
	Consumo de café	<1 xícara/dia (<50 mL), 1-3 xícaras/dia (50-150 mL) e ≥3 xícaras/dia (≥150 mL)
	Ingestão de cafeína	mg/dia
	Ingestão de sódio	mg/dia
	Energia total	kcal/dia
	Pressão arterial	normal (pressão arterial sistólica <140 mmHg e pressão arterial diastólica <90 mmHg), elevada (pressão arterial sistólica ≥140 mmHg e pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg)
	Pressão arterial sistólica	normal (pressão arterial sistólica < 140 mmHg), elevada (pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg)
	Pressão arterial diastólica	normal (pressão arterial diastólica < 90 mmHg), elevada (pressão diastólica ≥ 90 mmHg)
	Medicação	uso de antihipertensivos
	Escore Genético de risco	Soma do número de alelos de risco dos SNPs [<i>CYP1A1/CYP1A2</i> (rs2470893, rs2472297); <i>CPLX3/ULK3</i> (rs6495122); <i>MTHFR</i> (rs17367504)], com variação de zero a oito pontos.

4.7 BANCO DE DADOS “PHENOL-EXPLORER VERSÃO 3.5”

Para estimar a ingestão diária de polifenóis na população de residentes do município de São Paulo, utilizaram-se os dados procedentes do banco de dados de polifenóis “Phenol-

Explorer versão 3.5”, disponível *online*, no seguinte endereço eletrônico: <http://www.phenol-explorer.eu/>.

A base *Phenol-Explorer*, foi lançada em 2009 e é o único banco de dados disponível gratuitamente na *web* sobre a concentração ou teor de polifenóis em alimentos. Ela contém mais de 37.000 pontos de dados originais coletados de 638 artigos científicos publicados.

A versão 3.5 utilizada, apresentou as concentrações médias de 502 polifenóis existentes em 452 alimentos, os quais, se encontravam agrupados em 9 grupos e 76 subgrupos. Possuía, ainda, informações sobre os efeitos do processamento de alimentos no teor de polifenóis. Os dados de 155 alimentos, abrangendo 161 polifenóis e 35 tipos de processamento, foram coletados de 129 publicações revisadas por pares (NEVEU et al., 2010; ROTHWELL et al., 2013).

O efeito do processamento e cocção dos alimentos no teor de polifenóis foi expresso sob a forma de coeficiente ou fator de retenção (FR), isto é, a proporção de um determinado polifenol retido após o processamento, ajustado para a mudança no teor de água. O FR é calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{FR} = \frac{\text{concentração do polifenol no alimento após processamento}}{\text{concentração do polifenol no alimento crú}} \times \text{fator rendimento (YF)}$$

sendo que,

$$\text{YF} = \frac{\text{peso do alimento após o processamento}}{\text{peso do alimento antes do processamento}}$$

O fator de rendimento (*yield factor* ou YF), também denominado como fator de cocção ou índice de conversão, leva em consideração as alterações no peso do alimento em função do processamento e principalmente teor de água. Em muitos casos, o calor do processamento faz com que ocorra perda de água, apesar de alguns alimentos, como o arroz, absorverem água

quando preparados. Desta forma, um YF de 0,95, significa que o alimento perdeu 5% do seu peso durante o processamento.

O FR é aplicado ao valor do teor de cada polifenol no alimento crú, para explicar a perda ou ganho do composto durante o processamento do alimento. Assim, um FR de 0,4, significa que 40% do polifenol foi mantido durante o processamento (ROTHWELL et al., 2013; ROTHWELL et al., 2015).

De acordo com ROTHWELL et al. (2013; 2015) os dados referentes ao FR e ao FY foram coletados de tabelas dos fatores de retenção de nutrientes, disponível em <http://www.langual.org> e de alimentos, tais como a *European Information Resource* (EUROFIR), bem como através do *National Nutrient Database for Standard Reference* do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), disponível no endereço eletrônico <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.

A quantificação do teor de polifenóis foi determinada por cinco tipos de métodos analíticos previamente definidos: cromatografia (flavonóides, ácidos fenólicos e estilbenos), cromatografia com hidrólise (lignanas e ácidos fenólicos em determinados alimentos), método colorimétrico Folin-Ciocalteau com leitura em espectrofotômetro (polifenóis totais), espectrofotometria por método diferencial de pH (antocianinas) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase normal (proantocianidinas) (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2010).

Deve referir-se, ainda, que os valores da concentração de polifenóis exibidos na base de dados, são expressos em unidades padrão (mg/100 g de peso fresco e mg/100 mL), após a conversão das unidades originais (parte por milhão, peso molecular, mg/kg, entre outras) encontradas nas publicações (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2010).

4.7.1 Correspondência dos itens alimentares entre os inquéritos dietéticos e o banco de dados

Phenol-Explorer

Constatou-se que todos os alimentos de origem animal, tais como: carnes, embutidos, peixes e frutos do mar, leite e derivados, queijos, ovos, manteiga e margarina, bem como, o açúcar, molhos e sucos industrializados que não possuíam ou continham apenas traços de polifenóis, não constavam do banco de dados *Phenol-Explorer*.

Por outro lado, alguns itens regionais consumidos no Brasil que poderiam conter polifenóis, também não tinham o seu teor quantificado na base de dados *Phenol-Explorer*, como por exemplo, farinha de mandioca, tapioca, batata doce, coco e leite de coco, mel, alguns cereais matinais, certos óleos, tais como, o óleo de canola e semente de algodão. Portanto, esses itens alimentares não foram considerados no presente estudo. Contudo, de referir que, apesar da base de dados não ter informações disponíveis sobre esses alimentos, verificou-se que o seu consumo no R24h era baixo ou inexistente e, portanto, o viés dos dados é improvável. Além disso, embora o Brasil ofereça uma grande variedade de alimentos regionais, São Paulo é uma cidade cosmopolita e menos tradicional sendo menos propensa a consumir esses alimentos regionais.

Desta forma, no projeto ISA-Capital 2008, a correspondência entre os itens alimentares presentes no R24h e no banco de dados *Phenol-Explorer* foi avaliada de acordo com os seguintes passos:

- 1) Utilizou-se o banco de ingredientes, pois este banco permite que as receitas sejam separadas de acordo com os seus componentes (ingredientes);
- 2) O teor médio de polifenóis de cada item alimentar foi extraído do banco disponível online *Phenol-Explorer 3.5*, sendo construída uma base de dados no Microsoft Excel®;

- 3) Foram excluídos do banco anterior, todos os polifenóis individuais que, após o somatório, não apresentaram nenhum teor (igual a zero mg), bem como os que apresentaram apenas traços (inferior a um mg);
- 4) A perda ou ganho de peso durante a preparação das receitas, bem como, o efeito do processamento e cocção dos alimentos altera a concentração de polifenóis, portanto, os valores dos teores de polifenóis foram corrigidos usando os fatores de retenção (FR), conforme descrito anteriormente no tópico 4.7;
- 5) O código correspondente a cada alimento no R24h (variável *food_id*), foi atribuído ao mesmo alimento no banco de polifenóis, permitindo o cruzamento e comparação dos dados. Desta forma, os alimentos consumidos que não tinham quantificado o seu teor de polifenóis, foram excluídos;
- 6) Em seguida, os alimentos foram agrupados conforme o teor de polifenóis, considerando os hábitos alimentares da população brasileira, o valor nutricional dos alimentos e informações da literatura. Foram realizados agrupamentos, a partir de classificações mais específicas, até se obter um número de 10 classes de alimentos, 21 grupos e 32 subgrupos, conforme descrito no quadro 3. Dos 502 polifenóis analisados, um total de 317 presentes nestes alimentos foram distribuídos em 8 classes e 20 subclasses, descritas no quadro 4, de modo a facilitar a interpretação dos resultados;
- 7) Posteriormente, combinaram-se os dois bancos de dados (pela mesma variável de identificação de cada alimento: *food_id*) no software STATA®, para se proceder às análises estatísticas e explorar os resultados.

Quadro 3. Classificação dos alimentos para o estudo ISA-Capital 2008, segundo a base de dados Phenol-Explorer. São Paulo. Brasil.

Classes dos alimentos	Grupos	Subgrupos	Nº de itens
Bebidas alcoólicas	Bebidas alcoólicas	Cerveja; vinhos; outras bebidas alcoólicas	14
Bebidas não alcoólicas	Bebidas não alcoólicas	Infusões de ervas; chá; café e achocolatado	11
Frutas, sucos de fruta e produtos de fruta	Frutas frescas	Frutas cítricas; tropicais; vermelhas; <i>pomes</i> ; <i>drupes</i> ; outras frutas e frutas secas	42
	Sucos naturais	Sucos cítricos; tropicais; de frutas vermelhas; de outras frutas	9
	Geleias e compotas	(sem subgrupo)	2
Legumes e Verduras	Legumes	De raiz; frutos; cabaças; outros legumes; família da cebola	35
	Verduras	Hortaliças e folhosos	23
Cereais, Grãos e Tubérculos	Cereais	Aveia e farelos; farinhas; cereais matinais; milho e farinha de milho (sem subgrupo)	19
	Arroz	(sem subgrupo)	5
	Macarrão	(sem subgrupo)	0
	Pães	(sem subgrupo)	25
	Raízes e Tubérculos	(sem subgrupo)	5
	Leguminosas	(sem subgrupo)	3
	Soja e produtos de soja	(sem subgrupo)	13
Feijões	Feijões	(sem subgrupo)	3
Sementes	Oleaginosas	(sem subgrupo)	23
Condimentos e Temperos	Eervas	(sem subgrupo)	12
	Especiarias	(sem subgrupo)	12
	Temperos	(sem subgrupo)	5
Cacau e chocolate	Cacau e chocolate	(sem subgrupo)	6
Óleos	Óleos	Oliva; de cereais; soja e outros	13

Quadro 4. Classificação dos polifenóis presentes nos alimentos, segundo a base de dados Phenol-Explorer. ISA-Capital 2008. São Paulo. Brasil.

Classes dos polifenóis	Subclasses dos polifenóis	Nº de Compostos
Flavonóides	Flavanóis; Flavanonas; Flavonas; Flavonóis; Isoflavonóides; Antocianinas; Chalconas; Di-hidrocalconas; Di-hidroflavonóis	164
Ácidos Fenólicos	Ácido hidroxibenzóico; Ácido hidroxicinâmico; Ácido hidroxifenilacético; Ácido hidroxifenilpropanóico	78
Estilbenos	(sem subclasse)	8
Lignanas	(sem subclasse)	15
Tirosóis	(sem subclasse)	12
Alquilfenóis	(sem subclasse)	10
Alquilmetoxifenóis	(sem subclasse)	6
Outros polifenóis	Furanocumarinas; Hidroxibenzaldeídos; Hidroxibenzocetonas; Hidroxicinamaldeídos; Hidroxicumarinas; naptoquinonas; outros	24

4.7.2 Estimativa da ingestão de polifenóis no estudo ISA-Capital 2008

A ingestão de polifenóis (por indivíduo/dia) foi calculada combinando os dados de consumo alimentar (R24h) com os do teor de polifenóis em alimentos do banco *Phenol-Explorer*.

Assim, a ingestão individual de polifenóis a partir de cada alimento foi calculada através da multiplicação do teor médio de cada polifenol pelo consumo diário de cada alimento (mg/dia). A ingestão total de polifenóis foi calculada como a soma de todos os polifenóis individuais, a partir de todas as fontes de alimentos relatadas nos recordatórios alimentares.

4.7.3 Determinação dos principais contribuintes alimentares de polifenóis

A razão da ingestão diária de polifenóis individuais ou totais provenientes de um grupo alimentar ou um alimento específico pela ingestão total de polifenóis de todos os alimentos, foi utilizada para calcular a contribuição de cada alimento ou grupo alimentar na ingestão diária total de polifenóis, expressa em porcentagem.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o *software STATA®* (versão 13.0, StataCorp LLC, College Station, TX, USA). Em todas as análises, foi considerado um nível de significância estatístico de 0,05.

A ingestão habitual dos nutrientes, dos polifenóis e o consumo de café, foi estimada por técnicas de modelagem estatística incorporadas na plataforma online *Multiple Source Method (MSM)* (DIfE, 2012). Este método permite estimar a ingestão habitual proveniente de dois

R24h, removendo a variabilidade intrapessoal em três passos. O primeiro passo estima a probabilidade de ingestão do nutriente para cada indivíduo. No segundo, a quantidade habitual da ingestão do nutriente nos dias de consumo é estimada e, no último passo, os números resultantes do passo um e dois são multiplicados para estimar a ingestão diária habitual individual (HARTTIG et al., 2011).

Inicialmente, nas análises estatísticas, foi verificada a aderência à normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados referentes às características socioeconômicas, demográficas, bioquímicas, antropométricas e de estilo de vida da amostra foram descritos por medidas de tendência central e de dispersão (médias, desvio-padrão ou medianas e intervalo inter-quartil) para as variáveis contínuas e por proporções e frequências para as variáveis categóricas. As características gerais da população de estudo foram apresentadas em tabela descritiva. Outros testes estatísticos (Mann-Whitey, Kruskal-Wallis, teste chi-quadrado de Pearson e teste de tendência) foram realizados, considerando o tipo de distribuição das variáveis.

No *manuscrito 1*, foram determinadas as ingestões médias (mg/dia por pessoa) de todos os polifenóis individuais e das suas classes (ácidos fenólicos, flavonóides, alquilfenóis, alquilmetoxifenóis, estilbenos, tirosóis, lignanas e outros grupos de polifenóis) e os principais alimentos contribuintes (% de contribuição das classes e subclasses dos polifenóis).

Posteriormente, utilizaram-se modelos de regressão logística múltipla para verificar a associação entre o consumo de café e seus polifenóis com alguns dos fatores de risco de DCV, particularmente a PA elevada, hiperglicemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiper-homocisteinemia plasmática (*manuscrito 2*); bem como a relação entre o escore genético de risco e a PA elevada (*manuscrito 3*). Neste último manuscrito, foi igualmente testada a interação entre o escore genético de risco e o consumo de café, por meio da adição de um termo multiplicativo destas variáveis nos modelos de regressão logística. Refere-se,

ainda, que os modelos múltiplos foram ajustados por variáveis de confusão descritas em estudos prévios e baseadas em considerações teóricas, segundo a literatura. Para avaliar a qualidade de ajuste dos modelos de regressão logística múltiplos foi aplicado o teste de validação de Hosmer-Lemeshow, selecionando-se aqueles mais parcimoniosos.

A descrição detalhada das análises estatísticas realizadas, encontra-se descrita apropriadamente na seção métodos de cada manuscrito elaborado na tese.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – número CAAE 33819114.2.0000.5421. Ademais, o estudo principal “Inquérito de Saúde de base populacional do Município de São Paulo” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde, parecer nº 027/08 – CEP/SMS e atendeu às exigências da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos. Cabe reiterar que o estudo garantiu a confidencialidade dos dados, sendo voluntária a participação dos indivíduos, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRIMEIRO MANUSCRITO

Dietary intake and food contributors of polyphenols in adults and elderly adults of São Paulo: a population-based study.

*Artigo publicado no periódico British Journal of Nutrition
(ANEXO 1)*

Andreia Machado Miranda¹

Josiane Steluti¹

Regina Mara Fisberg¹

Dirce Maria Marchioni¹

¹ Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo.

Avenida Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César, CEP 01246-904, São Paulo, SP – Brazil.

ABSTRACT

A comprehensive estimation of polyphenol intake is needed to gain a better understanding of the association between polyphenol-rich food intake and the potential effects of this intake on chronic diseases. The aim of this study was to estimate the intake of polyphenols and the major dietary contributors in the population of São Paulo. Data came from the Health Survey-São Paulo (ISA-Capital 2008) and were reported for 1,103 adults and elderly adults. Food intake was estimated by one 24-hour dietary recall (24HR). Polyphenol intake was calculated by matching food consumption data from the 24HR with the polyphenol content in foods listed in the Phenol-Explorer database. The mean total intake of polyphenols was 377.5 (SE=15.3) mg/day. The main polyphenol classes were phenolic acids [284.8 (SE=15.9) mg/day] and flavonoids [54.6 (SE=3.5) mg/day]. Intakes were higher in the elderly adults than in other adults ($p<0.001$) and higher in individuals with lower educational level ($p=0.01$) and current smokers ($p=0.02$). The main dietary contributors for total polyphenols were coffee (70.5%), citrus fruit (4.6%), and tropical fruit (3.4%). Coffee was the major source of polyphenols, providing 266.2 (SE=16.5) mg/day, and contributed 92.3% of the phenolic acids and 93.1% of the alkylmethoxyphenols. These findings will be useful for assessing the potential role on health of polyphenols and specific polyphenol-rich foods, such as coffee, and enable a comparison with people from other countries.

INTRODUCTION

A high consumption of polyphenols, which are bioactive compounds, has been suggested in several clinical trials and cohort studies to have beneficial effects on human health and provide protection against several chronic diseases, such as cardiovascular diseases, cancers, type II diabetes, neurodegenerative diseases, and osteoporosis^(1,2,3,4,5).

Polyphenols constitute a very heterogeneous and widespread group of compounds, with more than 500 different molecules⁽⁶⁾ found in various amounts in fruits and beverages, such as fruit juice, wine, coffee, tea, cocoa and beer and, to a lesser extent, in vegetables, dry legumes and cereals^(7,8). Dietary polyphenols belong to four main classes - flavonoids, phenolic acids, stilbenes, and lignans - which are largely present in a glycosidic form (glycosides of flavonoids, lignans, and stilbenes) or as esters (phenolic acids esterified to polyols such as quinic acid)⁽⁹⁾.

Flavonoids can be divided into six subclasses as a function of the type of heterocyclic ring involved: flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanins, and flavanols (catechins and proanthocyanidins). Two classes of phenolic acids can be distinguished: derivatives of benzoic acid and derivatives of cinnamic acid⁽⁷⁾.

Dietary polyphenols may differ substantially in bioavailability and biological properties, and these aspects should be considered when studying the health effects of these compounds^(7,10). For this reason, it is important to determine the intake of individual polyphenols.

The Phenol-Explorer database (www.phenol-explorer.eu) is the most complete database currently available and freely accessible on the web; this database contains food composition data for 502 polyphenols (flavonoids, phenolic acids, lignans, stilbenes, and other minor polyphenols) in 452 foods⁽⁸⁾.

The purpose of the current study was to estimate the quantitative intake of polyphenols and the major dietary contributors in the general population of São Paulo, using individual food recall and the recently developed database Phenol-Explorer.

EXPERIMENTAL METHODS

Study population and data collection

Data were retrieved from the ‘Health Survey-São Paulo (ISA-Capital 2008)’. The ISA-Capital 2008 is a cross-sectional study designed to assess the health and nutritional status of noninstitutionalized civilian residents in São Paulo City in south-eastern Brazil. This survey was a representative, complex, multistage probability-based study and included participants aged less than 1 year old and over. The survey was conducted in 2008 and combined interviews that collected information on health; food intake; socio-demographics; lifestyle factors (e.g., smoking, physical activity, alcohol drinking, use of medicines); and physical examinations that included blood draw, anthropometric measurements and blood pressure measurements⁽¹¹⁾.

A two-stage cluster sampling was used: census tracts and household. In the first stage, the census tracts were drawn using a probability of the number of households. In the second stage, the households were drawn using an inverse probability of the number of households. The drawing was systematic, and eight study domains were defined: less than 1 year old (both sexes); 1 to 11 years old (both sexes), and three more age groups for each sex, females and males aged 12 to 19 years old (adolescents), 20 to 59 years old (adults) and 60 years old or over (elderly adults). A minimum sample size of 300 in each of the eight domains was estimated to be needed based on a prevalence of 0.5 with a standard error of 0.07 at a 5% significance level and a design effect of 1.5. A total of 3,271 individuals participated in the

survey. Of these, 2,691 individuals, aged 12 years old or over, were selected to answer questions about diet, life conditions and socio-demographic information. Among those individuals, 2,086 subjects were adults and elderly adults. For the present study, only adults and elderly adults ($n=1,103$) who had also completed one 24-h dietary recall (24HR) were included.

Although the proportion of individuals who completed the study was similar by census tract and socio-demographic characteristics compared to the original sample, sampling weights were recalculated for each individual with consideration of the sample design, non-response, and post-stratification adjustment for sex and age group, in order to equalize the socio-demographic features of the sample.

The Ethics Committee of the School of Public Health of the University of São Paulo approved the project (CAAE no. 33819114.2.0000.5421). An informed consent form was obtained from all participants.

Assessment of dietary intake

In the study ‘Health Survey-São Paulo (ISA-Capital 2008)’, dietary intake was measured by two multiple-pass 24HR and Food Frequency Questionnaire (FFQ). The first 24HR was administered in the household by trained interviewers, and the second 24HR was administered by phone. These recalls were representative of all weekdays, weekends and seasons⁽¹²⁾ and were made in the households using the Multiple Pass Method⁽¹³⁾. This method is structured in five steps: 1) the quick list, in which participants list all of the foods and beverages consumed uninterruptedly; 2) the forgotten list, for which participants are asked about commonly forgotten foods consumed, such as candies, coffees and sodas; 3) the time and location of the food and beverage intake; 4) the detailing cycle, which corresponds to the description of the way of preparation and amounts consumed; and 5) the final review,

which verifies whether a certain food consumed during the day was not previously recorded (13,14).

The household measures reported in the 24HR were converted into grams and millilitres according to standard Brazilian references, which measured many foods using a precision balance (15,16). Recipes were broken down into ingredients to estimate the amount of all ingredients in each mixed dish.

Data from the 24HR were entered into the Nutrition Data System for Research – NDSR (version 5.0, 2007, Nutrition Coordinating Center at the University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) and were converted into energy and nutrients (17).

For the present study, the dietary intake was estimated from the first 24HR considering which the methodology is often used for analyses of food contributors (18). However, we provided as Supplementary material comparing the intake of a single 24HR and two 24HR with a statistical adjustment of the usual intake distribution using a statistical modeling technique Multiple Source Method (MSM). Even using this technique to remove the within-variance, the mean intake did not change, reinforcing our decision that one 24HR is adequate to estimate usual mean and dietary contributors of polyphenol intake.

Correspondence between food items in the dietary recall and those in the Phenol-Explorer database

Data on the polyphenol content in foods were obtained from the Phenol-Explorer database (www.phenol-explorer.eu). The Phenol-Explorer database contains data on the content of 502 polyphenols in 452 foods (6,8). The Phenol-Explorer has recently been enhanced with data on the effects of food processing on the polyphenol contents of foods. Food processing often causes losses in polyphenol content, usually brought about by oxidation, enzymatic action, removal of skin or seeds, and leaching into oil or water, which is

then discarded⁽¹⁹⁾.

For accurate measurements of the polyphenol intake in this study, an additional coefficient, or retention factor, has been applied to the content value of each polyphenol in raw foods to account for processing. A retention factor is the proportion of a particular polyphenol retained after processing, adjusted for the change in water content⁽²⁰⁾.

All animal foods that contain no or only traces of plant polyphenols were excluded. Certain food items that may contain polyphenols were present in the dietary recall but not in the Phenol-Explorer database. These food items included some spirits such as tequila, cassava flour, tapioca, sweet potato, coconut and coconut milk, honey, some breakfast cereals, and certain minor oils, such as canola oil and cottonseed oil. So, these foods were excluded from the database.

For mixed dishes made of polyphenol-containing ingredients and for recipes, polyphenol contents were calculated on the basis of contents of the ingredient or food component and their polyphenol composition.

The correspondence between the food items in the 24HR and the Phenol-Explorer database was assessed according to the following five steps:

1) recipes were separated according to their ingredients; 2) the polyphenol content of each food item was searched in the Phenol-Explorer database as described by Perez-Jimenez et al., 2011; 3) all foods with no or only traces of polyphenols were excluded; 4) weight loss or gain during cooking was corrected using yield and retention factors; and 5) foods were classified according to the polyphenol content, considering the eating habits of this population, the nutritional value of food and literature information. Then, the foods were clustered until attaining 10 classes of food, 21 groups and 32 subgroups. In the present study, of the 502 phenolic compounds analysed, a total of 317 polyphenols present in these foods were divided into 8 classes and 20 subclasses from the 280 food items described in the dietary recalls.

Estimation of polyphenol intake and dietary contributors of polyphenols

In the Phenol-Explorer database, the data used to calculate the polyphenol intake correspond to the high-performance liquid chromatography (HPLC) for all phenolic compounds. In the case of lignans and of phenolic acids in certain foods (cereals, olives and beans), data corresponding to the HPLC after hydrolysis were also collected because these treatments are needed to release phenolic compounds that otherwise could not be analysed (9,10).

The polyphenol intake was calculated by matching food intake data from the 24HR and the recently developed Phenol-Explorer database on polyphenol content in foods. The individual polyphenol intake from each food was calculated by multiplying the content of each polyphenol by the daily consumption of each food. The total polyphenol intake was calculated as the sum of all individual polyphenol intake from all food sources reported by the 24-hour dietary recall.

For dietary contributors of polyphenols, a ratio of the daily total or the individual polyphenols provided by the specific food or food group over the total intake of polyphenols from all foods was used to calculate the contribution of each food or food group to the daily total intake of polyphenols.

STATISTICAL ANALYSES

Data regarding socio-demographics and lifestyle characteristics were collected. The educational level was categorized as low (elementary school), medium (middle and high school), and high (university). The monthly household *per capita* income was categorized in two categories: less than \$ 135 dollars (450 reais, the equivalent of minimum wage in local money) and more than \$ 135 dollars. The BMI was calculated and classified as normal weight

($<25 \text{ kg/m}^2$) and overweight ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$) according to World Health Organization (WHO)⁽²¹⁾. The physical activity level was categorized as daily low active and active, according to the international physical activity questionnaire (IPAQ), validated in Brazil^(22,23). The smoking status was categorized as non-smoker, former smoker and current smoker. Finally, the alcohol consumption was categorized as non-drinker and alcohol drinker.

Data are presented as the means and standard error (SE), medians and interquartile range (IQR) for continuous variables, and frequencies and percentages for categorical variables. The mean and median intakes of total polyphenols were determined for the total study population as well as according to different sociodemographic and lifestyle characteristics, such as sex, age class, race, educational level, family income, body mass index (BMI), physical activity groups, smoking status and alcohol consumption.

The polyphenol intake distribution was analysed by the Kolmogorov-Smirnov test and did not follow a normal distribution. Thus, we also reported median values to compare differences in intakes between groups by using the Mann-Whitney U-test and the Kruskal-Wallis test, as appropriate. Mean intakes (mg/day per person) of all individual polyphenols, polyphenol groups (phenolic acids, flavonoids, alkylphenols, alkylmethoxyphenols, stilbenes, tyrosols, lignans and other polyphenol groups) and major food contributors (% contribution to polyphenol class) were determined.

All analyses were conducted using the appropriate sample weights to account for the complex survey design. For all analyses, the STATA® statistical software package version 12 was used and a $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Total polyphenol intake

A total of 1,103 individuals were available for the final analyses. The sample was comprised of 46% men and 54% women, mostly white (59%) and with a medium educational level (69%). Participants were divided into two groups, based on their age, that is, adults and elderly adults, and the frequencies and percentages of general characteristics of the studied population are shown in Table 1.

The mean and median polyphenol intake for the whole population was 377.5 and 300.3 mg polyphenols/day, respectively (Table 2). The total polyphenol intake is presented according to socio-demographic and lifestyle characteristics in Table 2. Intakes were higher in elderly adults than in other adults ($p<0.001$), 414.9 (SE=12.7) mg/day and 370.2 (SE=18.3) mg/day, respectively; therefore, we decided to stratify the results according to age: adults and elderly adults. Adults with a lower education level (elementary school) showed a significantly higher total polyphenol intake ($p=0.01$) than subjects with medium (middle and high school) and higher (university) education levels [453.3 (SE=0.0) compared with 374.7 (SE=17.7) and 331.6 (SE=39.1) mg/day]. Differences were also observed in the elderly adults ($p=0.03$), but in this group, individuals with a higher education level had the highest intake of polyphenols. Furthermore, higher intakes were detected among current smokers than in former smokers and non-smokers. However, significant differences existed only in adults ($p=0.02$). Higher mean polyphenol intakes were also found among men, who were white, in the higher physical activity groups and of normal weight, but no significant influence on polyphenol intake was observed in either age group.

Intake of polyphenols and main food contributors

Among the 348 food items considered in the 24-h dietary recall, 280 contained polyphenols according to the Phenol-Explorer database. In all, 317 polyphenols from 8 polyphenol classes and 20 polyphenol subclasses were described in these foods. The intake of the total, the different classes and the subclasses of polyphenols according to the different food groups and main food contributors are shown in Table 3. The mean total intake of polyphenols was 377.5 (SE=15.3) mg/day. The main polyphenol classes were phenolic acids (284.8 (SE=15.9) mg/day, 75.5% of total intake of polyphenols) and flavonoids (54.6 (SE=3.5) mg/day, 14.5% of total intake of polyphenols), whereas other polyphenols, such as, alkylphenols, alkylmethoxyphenols, stilbenes, tyrosols, and lignans accounted for lower proportions (each one <1%). The mean daily intakes of hydroxycinnamic acids (281.2 mg/d) in the phenolic acid group and flavanones (16.1 mg/d) in the flavonoid group were higher compared with other groups. Flavonols (14.6 mg/d) were the third most consumed polyphenol subgroup. The remaining polyphenols were grouped into a wide class of ‘other polyphenols’, including furanocoumarins, hydroxybenzaldehydes, hydroxybenzoketones hydroxycinnamaldehydes, hydroxycoumarins, naphthoquinones, among others, representing 0.5% of the total polyphenol intake.

The main food contributors to the intake of the total and each polyphenol class or subclass are also shown in Table 3. The main dietary sources for the total polyphenols were coffee (70.5%) and fruits, especially citrus fruits (4.6%) and tropical fruits (3.4%), whereas vegetables accounted for a lower percentage of the total amount of polyphenols in the diet (1.3%). In the citrus fruit group, the main contributor is tangerine with 49.3%, and in tropical fruits, papaya is the largest contributor (59.9%). Coffee was the primary food item contributing to phenolic acid intake (92.3%), mainly hydroxycinnamic acids (93.5%). Beer was the main source of hydroxybenzoic acids, with a contribution of 51.0%. Major

contributors of intakes of flavonoids were citrus fruits, mainly oranges (17.0%), and beans (14.3%). In addition, important contributors to the intake of flavanones were fruits (especially oranges and orange juice). Flavonols were found in onions and beans, and flavanols, in beans and apples. Tyrosols were derived from fruit vegetables (tomato and olives) and olive oil, lignans were derived from vegetable oil and seeds, alkylphenols were provided in bread and refined wheat flour, stilbenes, in wine and berries (mostly grapes), and alkylmethoxyphenols and other polyphenols came mostly from coffee and beer. Flour products, especially refined wheat flour, were the major sources for flavones; berries (mostly grapes), for anthocyanins; and soy milk for isoflavones.

Table 4 shows a stratification by age of the percentage contribution by the polyphenol class. Differences between adults and the elderly adults were observed regarding the same food items and their amounts. The largest differences were verified in the following classes of flavonoids and tyrosols. With regard to the total polyphenol intake, the food items were the same, but the elderly adults consumed a larger amount of fruits.

Polyphenols from coffee: the main dietary contributor

The specific contribution of coffee to the total polyphenol intake in this population was estimated. Coffee provided 266.2 (SE=16.5) mg/day of polyphenols, which represented approximately 70.5% of the total intake, being the first polyphenol contributor in the diet of this population. Table 5 shows the contribution of coffee to the intake of different classes and subclasses of polyphenols, which was more than 92.0% of phenolic acids, especially hydroxycinnamic acids (93.5%), such as 5-caffeoylquinic acid, alkylmethoxyphenols (93.1%) and other polyphenols (68.1%). This table also presents individual polyphenols ingested only from coffee according to the class (e.g., 4,5-dicaffeoylquinic acid, guaiacol, cathecol, and phenol). This does not mean that these polyphenols are found only in coffee, but rather that

other sources are scarcely or not consumed by the adults and elderly adults of São Paulo.

DISCUSSION

This study describes the estimation of dietary polyphenol intake in São Paulo, and it shows that coffee is the main dietary contributor of polyphenol intake.

Due to the large heterogeneity of food composition data^(5,9,24,25,26,27), comparisons of polyphenol intake between populations are difficult. Thus, the use of the same food composition database or of harmonized food-composition data is highly desirable to facilitate a comparison of polyphenol intake data in different studies⁽⁹⁾. All food-composition data used in the current work were available on the Phenol-Explorer website (www.phenol-explorer.eu).

Most of the studies found in the literature search employed similar methodology for polyphenols assessment^(9,10,28), so their data allow comparisons with the current study. The estimated mean of the total intake of polyphenols in the present study was 377.5 (SE=15.3) mg/day, which was lower than the 1193.0 (SD=510.0) mg/day found by Pérez-Jimenez et al. in the SU.VI.MAX cohort⁽⁹⁾, as well as the numbers of other studies reported with regard to the Polish 1757.0 (SD=696.0)⁽²⁸⁾, Finnish 863.0 (SD=415.0)⁽²⁷⁾, and Spanish 820.0 (SD=323.0) populations⁽¹⁰⁾; however, this is only a comparison among different countries, with different dietary patterns, which reflect the different amounts consumed. If we consider the total polyphenol intake to be approximately 1 g *per* day throughout the world, as reported by Scalbert and Williamson (2000)⁽²⁹⁾, our study suggests a daily polyphenol intake almost three times lower than the estimated.

Differences were also observed in phenolic acids and flavonoid intake in comparison with the aforementioned studies. The flavonoid intake of 54.6 (SE=3.5) mg/day was much

lower than what was reported for the United States (189.7 mg/day)⁽²⁶⁾, slightly lower than the estimated daily mean of flavonoid intake in the Brazilian population, which ranged from 60.0 to 106.0 mg/day⁽³⁰⁾, but higher than that reported in Japan 16.7 (SD=9.2) mg/day⁽³¹⁾, in Netherlands (23 mg/day)⁽³²⁾, and in Finland (0.4 mg/day, ranging from 0-41.4 mg/day)⁽³³⁾; although in these last two studies only the intake of subclasses of flavonoid (i.e. flavonols and flavones) was estimated. Higher differences were also seen regarding the intake of phenolic acids [284.8 (SE=15.9) mg/day] compared with those reported for French, Finnish and Polish populations^(9,27,28), but these contents were similar to that observed in the Spanish cohort⁽¹⁰⁾.

The above-mentioned large differences can be explained by the individual food preferences and various dietary habits among the different populations, which are often dictated by culture; thus, they affect the intake of subgroups and amount of polyphenols. Furthermore, retention factors were not examined in one study⁽²⁷⁾, which may overestimate the mean content of polyphenols because many processes such as storing, cooking, and peeling can cause variable losses in the concentrations of polyphenols.

Hydroxycinnamic acids were the most abundant phenolic acid consumed in all cohorts and in the present study. Flavanones were the first abundant flavonoid consumed by these subjects and by the Spanish population⁽¹⁰⁾, whereas isoflavones were less consumed due to the low consumption of their main dietary sources. Stilbenes had the lowest consumption, accounting for approximately 0.1 mg/day per person because of their low contents in foods.

Previous studies among the French, Finnish and Polish populations^(9,27,28) reported that polyphenol intake was influenced by sex, with men having a higher absolute intakes of total polyphenols, suggesting that polyphenol intake in men is influenced by the quantity of food. In this study, a slightly higher intake of polyphenols in men was reported, but no significant influence on polyphenol intakes was observed. Significant differences in polyphenol intake were due to age, education level and smoking (higher intakes in elderly participants, in

participants with a low education level and current smokers).

In an epidemiological study conducted in Brazil, Jaime and Figueiredo (2009) ⁽³⁴⁾ observed a positive association between age and the consumption of fruits and vegetables: elderly adults were the biggest consumers of fruits and vegetables according to WHO recommendations, which explained a higher intake of polyphenols among elderly participants. It was also observed that elderly subjects with a university educational level showed a significantly higher total polyphenol intake than subjects with low (elementary school) and medium (middle and high school) levels. It may be speculated that a higher education might mediate healthier lifestyles and eating behaviours, such as the consumption of fruits and vegetables, which are rich in polyphenols. However, the results regarding adults were the opposite when compared to those shown for the aforementioned elderly adults. This can be explained because adults with a lower educational level (primary school) consume larger amounts of coffee, which is a great source of polyphenols, than subjects with a higher educational level.

Similarly, smoking was associated with a higher intake of polyphenols in adults. This may be explained because smokers were more likely to drink coffee, which was the major contributor to polyphenol intake.

In this study, the main food contributors to polyphenol intake were mostly represented by coffee, which accounted for 70.5% of the total polyphenol intake, followed by fruits (citrus and tropical) and potatoes, which accounted for 4.6%, 3.4%, and 2.2%, respectively, of the total polyphenol intake. On the other hand, vegetables accounted for a lower percentage of the total amount of polyphenols in the diet of the citizens of São Paulo (1.3%). The aforementioned cohorts ^(9,10,28) reported a higher contribution of polyphenol intake from coffee (18.0 to 44.0%) but also from vegetables (more than 12.0%), and a significantly higher intake from alcoholic beverages, due to a higher consumption of red wine, which was not

observed in the present study. A possible explanation for these differences is that the daily intake of fruits and vegetables is below the levels recommended by the Food and Agriculture Organization (FAO) of 400 g⁽³⁵⁾ for more than 90% of the Brazilian population⁽³⁶⁾. According to Faller e Fialho (2009)⁽³⁷⁾, the intake of fruit and vegetables was only 66.8 g per day, well below the recommendation. In accordance with Jaime and Monteiro (2003)⁽³⁸⁾, fewer than half (41.0%) of the adult individuals in Brazil consume vegetables daily, whereas fewer than a third (30.0%) report a daily consumption of fruits. Even fewer Brazilians (only one in eight) meet the recommendation of consuming five or more servings a day of these foods.

Likewise, the wine consumption in Brazil is very low (1.9 l/person/year)⁽³⁹⁾, whereas beer is the most consumed alcoholic beverage in this country, with an average consumption of 62.0 l/person/year in 2012⁽⁴⁰⁾. For this reason, in the group of alcoholic beverages, beer was the major drink contributing to the total of polyphenol intake (63.1%) and wine contributes only with 36.5%, which reinforces the previous hypothesis.

Another remarkable difference between the polyphenol intake in European countries and the population of São Paulo was the relevant contribution of tropical fruits to the amount of polyphenols, especially papaya, guava and banana. Furthermore, beans contributed to approximately 7.8 mg/day of flavonoids per person (14.3%), and they were the main food item contributing to flavanols intake. Consequently, the low intake of polyphenols of these compounds in the PREDIMED cohort⁽¹⁰⁾ and SU.VI.MAX⁽⁹⁾ could reflect a low consumption of beans. In the present study, beer was the main dietary source of hydroxybenzoic acids (1.7 mg/day, corresponding to 51.0%), whereas in other cohort studies, this item is not mentioned. In those studies, the main food sources of hydroxybenzoic acids were tea, red wine and olives^(9,10).

As we have mentioned above, these differences in polyphenol intake may depend on country-specific food preferences and, consequently, on preferences for main dietary contributors, specifically the coffee contribution. Coffee is one of the most polyphenol-rich beverages consumed worldwide, containing 214.0 mg of total polyphenols per 100 ml⁽⁴¹⁾; therefore, the health implications of these polyphenols are of high interest. In this study, coffee was the main food source of hydroxycinnamic acids (262.9 (SE=16.3) mg/day), thus enhancing the total phenolic acid intake (284.8 (SE=15.9) mg/day), which was consistent with the other studies^(9,10,28). Moreover, eighty percent of adults and elderly adults were coffee drinkers, and the mean intake was 168 ml/day (equivalent 1.5 cups per day). This result was very similar to that found by Sousa et al.⁽⁴²⁾ in the Brazilian population. In the Polish population, 83.0% were consumers of coffee, with a mean intake of 237.0 ml/day⁽²⁸⁾, and in French adults, 92.0% of the total population were coffee drinkers⁽⁹⁾. Mediterranean populations have a relatively low consumption of coffee (equivalent to 100 ml/day), perhaps due to the mean age of 67 years of their participants⁽¹⁰⁾. The main characteristic of the São Paulo population was the high consumption of coffee and the presence of polyphenols provided by coffee. It provided 266.2 mg of polyphenols daily, constituting 70.5% of the total intake.

The results of this study should be interpreted based on the same limitations. First, although the Phenol-Explorer is the most complete database currently available, information about some regional foods consumed in Brazil is still scarce because they have not been characterized or only poorly characterized (e.g., cassava flour, tapioca, sweet potato, and coconut or coconut milk). However, despite the database not having information about these foods, their consumption was low or non-existent, so biasing of the data is unlikely. Besides, even though Brazil provides a wide variety of regional foods, São Paulo is a cosmopolitan and less traditional city, and less prone to consume these regional foods.

Furthermore, for some major polyphenol dietary contributors, composition data are still scarce. This was particularly evident for coffee for which only two types of coffee (decaffeinated or caffeinated, both filter) have been used to calculate intakes of phenolic acids, and these calculations did not take into account the different brewing recipes, for example, boiling, steeping, filtration or pressure.

A further point to note is that in our study and in the French cohort, the tool used was the 24HR, but in other studies, food frequency questionnaires were used. Although, on average, these recalls were collected across all weekdays, weekends and seasons, the 24HR method, like other methods used to assess dietary intake (e.g. FFQs and records), has been shown to be prone to systematic and random measurement error. However, if the interest is in estimating the mean intake, recall data for one day will be adequate because with random error, the mean is unbiased.

An essential step toward understanding the potential protective effects of polyphenols against chronic disease risk is to estimate the consumption of polyphenols with a food frequency questionnaire (FFQ) or other instruments, such as the 24-hour recall, in order to identify the compounds most likely to provide the greatest protective effects^(7,10,26). Even now, however, despite the reported importance of the health effects of polyphenols, a limited number of studies on the estimation of polyphenol intake have been documented around the world, and very few comprehensive assessments of polyphenol intake in different populations have been performed.

In conclusion, the present study gives a comprehensive description of the total polyphenol intake and main food contributors of the dietary polyphenols in adults and the elderly adults of São Paulo. To our knowledge, this research provides the first estimation of the dietary polyphenol intake regarding this population. The application of this methodology will facilitate the investigation of polyphenol intake and its relation with the incidence of

cardiovascular diseases in the epidemiological observational studies such as the ISA-Capital study and will also be useful for future dietary recommendations for individuals and population groups. In addition, the detailed data obtained on the dietary polyphenol intake will be useful to assess the potential role on health of specific foods with high polyphenol content, such as coffee. Further research would clarify whether the high consumption of coffee and, consequently, the increased intake of polyphenols in the population of São Paulo, could be translated to improve health or provide protection against cardiovascular diseases.

REFERENCES

1. Arts ICW & Hollman PCH (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **81**, S317-S325.
2. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* **81**, S215-S217.
3. Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T *et al.* (2012) Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr* **108**, 1532-1549.
4. Pandey KB & Rizvi SI (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**, 270-278.
5. Wedick NM, Pan A, Cassidy A *et al.* (2012) Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr* **95**, 925-933.
6. Neveu V, Pérez-Jiménez J, Vos F *et al.* Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*. Published online: 8 January 2010. doi:10.1093/database/bap024.
7. Manach C, Scalbert A, Morand C *et al.* (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727-747.
8. Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F *et al.* (2010) Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database. *J. Agric. Food Chem* **58**, 4959-4969.
9. Pérez-Jiménez J, Fezeu L, Touvier M *et al.* (2011) Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr* **93**, 1220-1228.
10. Tresserra-Rimbau A, Medina-Remón A, Pérez-Jiménez J *et al.* (2013) Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* **23**, 53-59.
11. Verly-Jr E, Steluti J, Fisberg RM *et al* (2014) A quantile regression approach can reveal the effect of fruit and vegetable consumption on plasma homocysteine levels. *PLoS One* **9**, e111619.
12. Thompson FE & Byers T (1994) Dietary assessment resource manual. *J Nutr* **124**, S2245-S2317.

- 13.Dwyer J, Picciano MF, Raiten DJ (2003) Future directions for the integrated CSFII-NHANES: What we eat in America-NHANES. *J Nutr* **133**, S576-S581.
- 14.Raper N, Perloff B, Ingwersen L *et al.* (2004) An overview of USDA's dietary intake data system. *J Food Compos Analysis* **17**, 545-555.
- 15.Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH *et al.* (2000) *Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras*. São Paulo: Ed. Atheneu.
- 16.Fisberg RM & Villar BS (2002) *Manual de receitas e Medidas caseiras para Cálculo de Inquéritos Alimentares: manual elaborado para auxiliar o processamento de inquéritos alimentares*. São Paulo: Signus.
- 17.NDSR (2005) Nutrition Data System for Research. Version 2005. Minneapolis: University of Minnesota.
- 18.Subar AF, Krebs-Smith S, Cook A, Kahle LL (1998) Dietary Sources of Nutrients Among US Children, 1989–1991. *Pediatrics* **102**, 913-923.
- 19.Rothwell JA, Medina-Remón A, Pérez-Jiménez J *et al.* (2015) Effects of food processing on polyphenol contents: A systematic analysis using Phenol-Explorer data. *Mol Nutr Food Res* **59**, 160-170.
- 20.Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V *et al.* Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*. Published online: October 2013. doi:10.1093/database/bat070.
- 21.World Health Organization (2000) *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation*. Geneva: World Health Organization. WHO Obesity Technical Report Series **284**, 256.
- 22.Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M *et al.* (2003) International physical activity questionnaire: 12- country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* **35**, 1381-1395.
- 23.Matsudo S, Araujo T, Matsudo V *et al.* (2001) Questionário internacional de atividade física-IPAQ: estudo de validade e reproduzibilidade no brasil. *Revista brasileira de atividade física e saúde* **6**, 5-18.
- 24.Arranz S, Silvan JM, Saura-Calixto F (2010) Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet. *Mol Nutr Food Res* **54**, 1646-1658.
- 25.Saura-Calixto F, Serrano J, Goni I (2007) Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem* **101**, 492-501.
- 26.Chun OK, Chung SJ, Song WO (2007) Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* **137**, 1244-1252.
- 27.Ovaskainen ML, Torronen R, Koponen JM *et al.* (2008) Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr* **138**, 562-566.
- 28.Grosso G, Stepaniak U, Topor-Madry R *et al.* (2014) Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition* **30**, 1398-1403.
- 29.Scalbert A & Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **130**, Suppl. 8, S2073-S2085.
- 30.Arabbi P, Genovese M, Lajolo F (2004) Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. *J Agric Chem* **52**, 1124-1131.
- 31.Arai Y, Watanabe S, Kimura M *et al.* (2000) Dietary intakes of flavonols, flavones and

- isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* **130**, 2243-2250.
- 32.Hertog MG, Hollman PC, Katan MB *et al.* (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* **20**, 21-29.
- 33.Knek P, Jarvinen R, Reunanen A *et al.* (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* **312**, 478-481.
- 34.Jaime PC, Figueiredo IC, Moura EC *et al.* (2009) Fatores associados ao consumo de frutas e hortaliças no Brasil, 2006. *Rev Saúde Pública* **43**, Suppl 2, S57-S64.
- 35.World Health Organization (2003) *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation*. Geneva: World Health Organization.
- 36.IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011) *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE.
- 37.Faller ALK & Fialho E (2009) Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Rev Saúde Pública* **43**, 211-218.
- 38.Jaime PC & Monteiro CA (2005) Fruit and vegetable intake by Brazilian adults, 2003. *Cad Saude Publica* **21**, 19-24.
- 39.Freitas CA, Oliveira GN, Campregher G *et al.* (2011) Orlando Economic incentives for vertical product differentiation in the Brazilian wine sector. *Economia Global e Gestão* **16**, 91-107.
- 40.Barth-Haas group (2012).
http://www.barthhaasgroup.com/images/pdfs/report2013/Barth_Beilage _2013.pdf (accessed April 2015).
- 41.Phenol-Explorer: Database on Polyphenol Content in Foods. <http://phenol-explorer.eu/> (accessed January 2015).
- 42.Sousa AG & da Costa TH (2015) Usual coffee intake in Brazil: results from the National Dietary Survey 2008-9. *Br J Nutr* **113**, 1615-1620.

TABLES**Table 1** – General characteristics of the studied population (ISA-Capital 08). São Paulo, Brazil.

Characteristics	Age Group				Total population	
	Adults (20-59 years)		Elderly adults (≥ 60 years)		N	%
	n	%	n	%		
Sex						
Male	252	47.0	193	40.5	425	46.0
Female	354	53.0	324	59.5	678	54.0
Race						
White	323	57.0	348	68.2	671	58.8
Others	263	43.0	169	31.8	432	41.2
Educational level						
Low	49	06.5	189	33.9	238	11.0
Medium	431	71.1	299	57.7	730	68.9
High	106	22.4	29	08.4	135	20.1
Household per capita income						
< 1 MW	254	39.6	243	44.7	497	40.5
≥ 1 MW	332	60.4	274	55.3	606	59.5
BMI (Kg/m²)*						
Normal weight	322	54.8	207	39.9	529	52.4
Overweight	264	45.2	310	60.1	574	47.6
Physical activity						
Low active	224	37.3	316	59.4	540	40.9
Active	360	62.7	201	40.6	561	59.1
Smoking status						
Never	338	59.4	297	56.6	635	58.9
Former smoker	94	15.5	166	33.2	260	18.4
Current smoker	154	25.1	54	10.2	208	22.7
Alcohol drinking						
No	430	72.0	417	79.3	847	73.2
Yes	156	28.0	100	20.7	256	26.8

MW, minimum wage.

The sample weight was considered for statistical analysis.

* Weight and height related

Table 2 – Total polyphenol intake according to socio-demographic and lifestyle characteristics of studied population (ISA-Capital 08). Sao Paulo, Brazil.

Characteristics	Polyphenol intake (mg/day)											
	Adults (20-59 years)				Elderly adults (≥ 60 years)				Total population			
	Mean	SE	Median	IQR	Mean	SE	Median	IQR	Mean	SE	Median	IQR
Total population	370.2	18.2	292.2	136.8-473.8	414.9	12.7	348.6	215.0- 544.1	377.5	15.3	300.3	154.1-486.9
Gender												
Male	384.5	26.5	297.2	125.0-481.0	437.5	25.4	367.4	220.9-544.1	392.1	23.9	306.0	134.0-491.7
Female	357.4	20.6	287.2	161.3-453.7	399.6	16.2	345.3	214.5- 545.2	365.0	16.7	297.1	167.9-481.8
<i>p-value *</i>	0.85			0.21					0.77			
Race												
White	378.5	23.0	294.8	148.3-491.7	421.3	15.5	360.1	219.5-559.6	386.6	18.8	299.0	163.8- 506.7
Others	359.1	20.6	286.7	129.7- 466.1	401.2	26.7	322.6	207.9-501.4	364.4	20.8	300.3	141.4-466.1
<i>p-value</i>	0.66			0.16					0.38			
Educational level												
Low	453.3	0.0	306.0	161.6-638.6	397.4	23.8	319.4	214.5-520.9	425.3	28.7	313.5	184.0-583.7
Medium	374.6	17.7	305.2	151.8-486.0	415.2	19.3	352.1	207.0-529.7	380.2	15.6	311.2	169.4-498.8
High	331.6	39.1	261.8	111.0-381.9	483.1	0.0	441.4	322.6-598.9	341.9	36.9	271.1	118.6-403.9
<i>p-value</i>	0.01			0.03					<0.01			
Household per capita income												
< 1 MW	407.0	35.7	304.2	136.8-518.3	411.2	20.2	349.3	229.0-520.9	407.8	29.9	321.7	154.1-518.3
≥ 1 MW	345.9	22.3	283.2	138.7-463.1	417.9	16.8	347.2	206.0-565.5	356.8	19.7	288.2	157.5-479.2
<i>p-value</i>	0.30			0.85					0.26			
BMI (Kg/m²)*												
Normal weight	385.4	31.9	294.8	151.8-483.4	437.2	22.2	352.1	228.4-538.9	391.8	28.6	298.6	158.6-496.4
Overweight	351.7	19.6	286.7	129.7-446.6	400.1	18.7	346.7	207.9- 544.1	361.6	16.9	300.9	144.1-481.0
<i>p-value</i>	0.58			0.37					0.67			
Physical activity												
Low active	341.0	27.4	265.3	122.2-463.1	401.8	16.1	347.2	226.9-511.7	355.4	20.9	283.1	148.3-484.6
Active	387.3	23.4	306.2	161.3-477.4	434.1	24.8	348.6	193.3-587.7	392.5	21.3	311.8	163.3-491.7
<i>p-value</i>	0.13			0.62					0.28			
Smoking status												
Never	349.2	19.8	271.9	120.4-453.0	402.1	14.8	338.0	214.5-532.9	357.5	16.8	283.1	127.0-466.1
Former smoker	367.3	30.6	321.7	191.3-498.8	414.3	27.0	356.2	214.5-523.6	381.1	23.3	324.4	194.3-500.6
Current smoker	421.5	34.5	327.0	184.0-535.6	488.5	52.5	385.5	248.4-589.0	426.4	32.4	327.0	185.8-538.4
<i>p-value</i>	0.02			0.37					0.02			
Alcohol drinking												
No	357.4	21.1	285.8	128.4- 465.2	421.4	14.4	353.4	221.3- 557.3	368.7	17.1	302.3	152.1- 486.0
Yes	403.1	36.6	297.1	167.9- 503.9	390.1	35.5	311.8	185.3- 456.4	401.4	33.5	297.1	168.5- 503.9
<i>p-value</i>	0.24			0.07					0.49			

BMI, body mass index; SE, Standard Error; IQR, Interquartile Range.

* Comparisons across categories were performed by using Mann-Whitney test or Kruskall-Wallis test.

Table 3 – Total, classes and subclasses of polyphenol intake, according to food group sources and main food contributors. São Paulo, Brazil.

Polyphenol class and subclass	Food group (mg/day per person) Mean (SE)										Main food contributors (% contribution to polyphenol class)
	Alcoholic beverages	Nonalcoholic beverages	Fruits and natural juices	Vegetables	Cereals and tubers	Beans	Seeds and nuts	Seasonings	Cocoa and chocolate	Oils	
Phenolic acids	2.8 (0.4)	263.0 (16.3)	3.2 (0.4)	4.7 (0.4)	9.6 (1.0)	<0.1	0.4 (0.2)	<0.1	<0.1	0.5 (<0.1)	284.8 (15.9)
<i>Hydroxycinnamic acids</i>	0.8 (0.1)	262.9 (16.3)	2.8 (0.3)	3.9 (0.3)	9.5 (1.0)	<0.1	0.3 (0.2)	<0.1	0.132 (<0.1)	0.5 (<0.1)	281.2 (15.9)
<i>Hydroxybenzoic acids</i>	1.8 (0.3)	0.1 (<0.1)	0.4 (<0.1)	0.7 (0.2)	0.1 (<0.1)	<0.1	<0.1	<0.1	---	<0.1	3.4 (0.4)
Flavonoids	2.3 (0.6)	1.1 (0.5)	27.3 (2.6)	10.3 (0.9)	2.4 (0.2)	7.8 (0.4)	1.3 (0.5)	<0.1	1.7 (0.4)	<0.1	54.6 (3.5)
Flavanones	<0.1	---	15.9 (1.9)	<0.1	---	---	<0.1	---	---	---	16.1 (1.9)
Flavonols	0.2 (<0.1)	<0.1	1.0 (0.1)	9.4 (0.9)	---	3.7 (0.2)	<0.1	<0.1	<0.1	---	14.6 (0.9)
Flavanols	1.5 (0.3)	1.0 (0.4)	3.4 (0.4)	---	<0.1	3.6 (0.2)	<0.1	<0.1	1.6 (0.4)	---	11.4 (0.8)
Anthocyanins	0.4 (0.1)	---	5.3 (1.0)	0.6 (0.0)	---	0.4 (0.1)	---	---	---	---	6.8 (1.1)
Flavones	<0.1	---	1.0 (0.1)	0.1 (<0.1)	2.3 (0.2)	<0.1	---	<0.1	---	<0.1	3.6 (0.3)
Isoflavonoids	<0.1	---	---	---	---	0.1 (<0.1)	1.3 (0.5)	<0.1	---	---	1.5 (0.5)
Tirosols	0.3 (<0.1)	---	---	1.7 (0.3)	---	---	---	<0.1	---	0.9 (0.1)	3.1 (0.4)
Lignans	---	---	<0.1	<0.1	<0.1	---	0.5 (0.3)	---	---	1.6 (0.5)	2.3 (0.7)
Alkylmethoxyphenols	0.1 (<0.1)	1.9 (0.1)	---	---	---	---	<0.1	---	<0.1	<0.1	2.1 (0.1)
Others	0.1 (<0.1)	1.3 (<0.1)	0.4 (<0.1)	<0.1	---	---	---	<0.1	<0.1	<0.1	1.9 (0.1)
Alkylphenols	<0.1	---	---	---	0.9 (0.1)	---	---	---	---	---	1.0 (0.2)
Stilbenes	<0.1	---	<0.1	---	---	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Total polyphenols	5.9 (1.0)	267.5 (16.5)	55.9 (4.4)	19.2 (1.5)	13.3 (1.2)	7.9 (0.5)	2.4 (0.7)	0.4 (<0.1)	1.9 (0.5)	3.1 (0.6)	377.5 (15.3)

SE, Standard Error.

---: omitted values

Table 4 – Main food contributors for adults and elderly adults, according to total and classes of polyphenol intake. São Paulo, Brazil.

Polyphenol class	Main food contributors (%)	
	<i>Adults (20-59 years)</i>	<i>Elderly adults (≥ 60 years)</i>
Phenolic acids	Coffee (92.1) Potatoes (3.1) Beer (1.0)	Coffee (93.3) Potatoes (2.6) Apples (1.1)
Flavonoids	Citrus juices (15.7) Beans (15.4) Onion (15.0)	Citrus fruits (30.3) Beans (11.9) Berries (11.3)
Stilbenes	Wine (80.0) Berries (18.8) Cocoa and chocolate (0.7)	Wine (82.0) Berries (17.1) Beans (0.5)
Lignans	Cereal oils (78.6) Nuts (18.4) Olive oil (1.9)	Nuts (72.6) Cereal oils (23.8) Olive oil (2.5)
Tirosols	Fruit vegetables (58.3) Olive oil (27.7) Beer (10.5)	Olive oil (56.8) Fruit vegetables (31.7) Wine (6.2)
Alkylphenols	Bread (60.7) Flours (33.1) Breakfast cereals (5.6)	Bread (86.8) Flours (11.2) Breakfast cereals (1.9)
Alkylmethoxyphenols	Coffee (92.0) Beer (7.9) Cereal oils (0.1)	Coffee (98.7) Cereal oils (1.2) Beer (0.03)
Others	Coffee (73.4) Citrus juices (25.4) Beer (0.4)	Coffee (80.4) Citrus juices (14.9) Herbs (1.4)
Total polyphenols	Coffee (70.8) Citrus fruits (3.7) Tropical fruits (3.0)	Coffee (68.9) Citrus fruits (9.0) Tropical fruits (5.6)

Table 5 – Polyphenol intake from coffee by individuals in São Paulo, Brazil.

Individual and class of polyphenols ingested from coffee	Total intake from (mg/day)				Intake derived from coffee
	Coffee		Full diet		
	Mean	SE	Mean	SE	%
Phenolic acids					
<i>Hydroxycinnamic acids</i>	262.9	16.3	284.8	15.9	92.3
<i>5-Caffeoylquinic acid</i>	262.9	16.3	281.2	15.9	93.5
<i>4-Caffeoylquinic acid</i>	86.8	5.4	98.7	5.2	87.9
<i>3-Caffeoylquinic acid</i>	73.9	4.6	74.2	4.6	99.5
<i>5-Feruloylquinic acid</i>	64.2	3.9	64.6	3.8	99.4
<i>4-Feruloylquinic acid</i>	14.5	0.9	14.5	0.9	99.8
<i>3,4-Dicaffeoylquinic acid</i>	10.6	0.7	10.6	0.6	99.9
<i>4,5-Dicaffeoylquinic acid</i>	3.3	0.2	3.4	0.2	96.4
<i>Caffeic acid</i>	2.5	0.1	2.5	0.1	100.0
<i><0.1</i>	<0.1	<0.1	0.5	<0.1	7.5
Alkylmethoxyphenols	1.9	0.1	2.1	0.1	93.1
<i>4-Ethylguaiacol</i>	0.8	<0.1	0.8	<0.1	100.0
<i>4-Vinylguaiacol</i>	0.6	<0.1	0.7	<0.1	79.9
<i>Guaiacol</i>	0.2	<0.1	0.2	<0.1	100.0
<i>4-Ethylcatechol</i>	0.2	<0.1	0.2	<0.1	100.0
<i>3-Methylcatechol</i>	0.1	<0.1	0.1	<0.1	100.0
Others	1.3	0.1	1.9	0.1	68.1
<i>Pyrogallol</i>	0.7	<0.1	0.7	<0.1	99.3
<i>Catechol</i>	0.5	<0.1	0.5	<0.1	99.8
<i>Phenol</i>	0.1	<0.1	0.1	<0.1	100.0
Total polyphenols	266.2	16.5	377.5	15.3	70.5

SE, Standard Error.

5.2 SEGUNDO MANUSCRITO

Association between Coffee Consumption and Its Polyphenols with Cardiovascular Risk Factors: A Population-Based Study.

Artigo publicado na revista Nutrients
(ANEXO 2)

Andreia Machado Miranda¹

Josiane Steluti¹

Regina Mara Fisberg¹

Dirce Maria Marchioni¹

¹ Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo. Avenida Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César, CEP 01246-904, São Paulo, SP – Brazil.

ABSTRACT

Epidemiological studies have examined the effect of coffee intake on cardiovascular disease, but the benefits and risks for the cardiovascular system remain controversial. Our objective was to evaluate the association between coffee consumption and its polyphenols on cardiovascular risk factors. Data came from the “Health Survey of São Paulo (ISA-Capital)” among 557 individuals, in São Paulo, Brazil. Diet was assessed by two 24-h dietary recalls. Coffee consumption was categorized into <1, 1–3, and ≥3 cups/day. Polyphenol intake was calculated by matching food consumption data with the Phenol-Explorer database. Multiple logistic regression models were used to assess the associations between cardiovascular risk factors [blood pressure, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides, fasting glucose, and homocysteine] and usual coffee intake. The odds were lower among individuals who drank 1–3 cups of coffee/day to elevated systolic blood pressure (SBP) (Odds Ratio (OR) = 0.45; 95% Confidence Interval (95% CI): 0.26, 0.78), elevated diastolic blood pressure (DBP) (OR = 0.44; 95% CI: 0.20, 0.98), and hyperhomocysteinemia (OR = 0.32; 95% CI: 0.11, 0.93). Furthermore, significant inverse associations were also observed between moderate intake of coffee polyphenols and elevated SBP (OR = 0.46; 95% CI: 0.24, 0.87), elevated DBP (OR = 0.51; 95% CI: 0.26, 0.98), and hyperhomocysteinemia (OR = 0.29; 95% CI: 0.11, 0.78). In conclusion, coffee intake of 1–3 cups/day and its polyphenols were associated with lower odds of elevated SBP, DBP, and hyperhomocysteinemia. Thus, the moderate consumption of coffee, a polyphenol-rich beverage, could exert a protective effect against some cardiovascular risk factors.

Keywords: coffee consumption; coffee polyphenol intake; cardiovascular risk factors; representative sample.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases (CVD) are considered to be the leading global cause of death, accounting for 17.3 million deaths per year, which is predicted to rise to more than 23.6 million by 2030 [1]. The main causes of CVD involve non-modifiable risk factors, in addition to the metabolic risk factors, that are targeted together with the behavioral risk factors, such as unhealthy diets (rich in salt, saturated fat, and calories) [2]. However, there are still food items whose role is controversial, such as coffee.

Coffee has been considered an important dietary factor, because it is one of the most popular and widely consumed nonalcoholic beverages in the world. Finland is the largest coffee consumer market, followed by Brazil. In Brazil, the average coffee consumption is 5.9 kg per capita [3], with an estimated prevalence of intake of 79%, i.e., the second-most consumed food in the country [4].

Coffee beverage, a mixture of several pharmacologically-bioactive compounds, including caffeine, phenolic acids, and the diterpene alcohols, cafestol and kahweol, can also have long term effects on risk factors for CVD, such as blood pressure, plasma concentrations of cholesterol and homocysteine, and the incidence of type 2 diabetes mellitus [5–7].

Caffeine, a central nervous system stimulant and psychoactive substance, has been positively associated with blood pressure [8,9], systemic vascular resistance and unfavorable effects on endothelial function [9], serum lipids concentration [10], and insulin resistance [11]. Other prospective studies, however, have generally not supported adverse risk effects on CVD associated with coffee consumption [12–14]. The major beneficial properties of coffee seem to depend on its content of phenolic acids, which demonstrates protective roles in the cardiovascular system [15]. This cardiovascular protection has been demonstrated *in vivo*, and can be explained by various mechanisms, including their anti-inflammatory properties

[16], the strong antioxidant capacity [17] related to nitric oxide (NO) bioavailability, as well as low-density lipoprotein (LDL) oxidation, and antithrombotic properties through endothelial protection [18].

Contrary to earlier studies focused on caffeine, existing evidence is suggesting that coffee may exert a beneficial effect toward cardiovascular-related outcomes, together with all-cause and cancer mortality [19]. However, the public debate about reducing or increasing the risk of CVD by drinking coffee is still relevant due to the previous contrasting findings on cardiovascular effects. Additionally, its effects on CVD might have considerable public health and clinical implications [12].

Therefore, the current study aimed to assess the association between usual coffee consumption and coffee polyphenol intake on cardiovascular risk factors, e.g., systolic and diastolic blood pressure, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglyceride, fasting plasma glucose, and homocysteine, in a representative sample of individuals aged 20 years or older in São Paulo City.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Data were retrieved from the “Health Survey of São Paulo (ISA-Capital)”, a cross-sectional population-based study designed to assess the health and nutritional status of non-institutionalized individuals residing in São Paulo City in Southeastern Brazil, between 2008 and 2009.

A complex probabilistic sampling, by conglomerates, based on census tracts and households that had already been drawn in the National Household Sample Survey 2005

(PNAD 2005) was used. The drawing was systematic, and eight study domains were defined: less than one year old; one to 11 years old, and three more age groups by sex: 12 to 19 years (adolescents), 20 to 59 years (adults), and 60 years or over (older adults). A minimum sample size of 300 in each of the six domains was estimated to be needed based on a prevalence of 0.5 with a standard error of 0.07 at a 5% significance level and a design effect of 1.5.

A total of 2691 individuals, aged 12 years or over, were selected to answer questions about diet, life conditions, and sociodemographic information. Thereby, only 1662 individuals of the initial sample agreed to participate. Of those, 750 subjects provided a blood sample for biochemical analysis, completed two 24-h dietary recalls (24 HR), anthropometric data, as well as arterial blood pressure measurements. For the present study, only adults and older adults were included, totaling a final sample of 557 individuals.

The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee at the School of Public Health, University of São Paulo (Approval Number: 003.0.162.000-08). A written informed consent form was obtained from all participants.

Dietary Assessment

The dietary intake was measured by two 24 HR. The first 24 HR was administered at households by trained interviewers using the multiple pass method [20]; the second 24 HR was performed by telephone using the automated multiple pass method [21]. The multiple pass method, automated or not, is structured in five steps: (1) a quick list, where participants list all of the foods and beverages consumed uninterruptedly; (2) a forgotten list, where participants are asked about commonly consumed forgotten foods, such as candies, coffees, and sodas; (3) time and location of food and beverage intake; (4) detailing cycle, that is, a description of the way of preparation and amounts consumed; and (5) a final review, which verifies whether a certain food consumed during the day was not previously recorded. The

sampling days covered all the days of the week and seasons. Dietary data were entered into the Nutrition Data System for Research software (version 2007, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA), which is mainly based on data from the food composition table published by the United States Department for Agriculture (USDA).

The multiple source method (MSM), a statistical modeling technique, was used to estimate the usual dietary intake of polyphenols and nutrients and to remove within-person variation. In the first step, the probability of eating the food on a random day for each individual was estimated by a logistic regression model. Secondly, the usual amount of food or nutrient intake is estimated by a linear regression model. Finally, the resulting numbers from step one and two are multiplied by each other to estimate the usual daily intake for each individual [22].

Assessment of Coffee Consumption

In the 24 HR, the participants reported if they consumed coffee on the day before the interview and, thereafter, a question about the method of coffee preparation (filtered, instant, espresso, or other), and whether additional items were typically added to the coffee (none, milk, sugar, artificial sweetener, etc.) were probed. Daily coffee intake (in mL) was categorized, according to the standard cup size used in the study (50 mL), into three categories: <1 cup/day, 1–3 cups/day, and ≥3 cups/day. The category of <1 cup/day of coffee was used as the reference group.

Estimation of Polyphenol Intake from Coffee

Data on the polyphenol content in foods were obtained from the Phenol-Explorer database (www.phenol-explorer.eu) [23] that presents data on the content of 502 polyphenols in 452 foods [24].

The polyphenol intake was calculated by matching usual food intake data from the 24HR with the polyphenol content in foods from the Phenol-Explorer database. The individual polyphenol intake from each food was calculated by multiplying the content of each polyphenol by the daily consumption of each food, including coffee. The total polyphenol intake was the sum of all individual polyphenol intakes from all food sources reported in the 24 HR. Other details on the estimation of polyphenol intakes are available elsewhere in previous publications [25].

For the present study, the classes of polyphenols ingested from coffee included the phenolic acids, especially hydroxycinnamic acids (4-caffeoylequinic acid, 5-caffeoylequinic acid, 3-caffeoylequinic acid, 5-feruloylquinic acid, caffeic acid), alkylmethoxyphenols (4-ethylguaiacol, 4-vinylguaiacol), and others (catechol, pyrogallol, phenol). The coffee polyphenols were categorized into three categories: <101 mg/day (corresponding to <1 cup coffee/day), 101–337 mg/day (corresponding to 1–3 cups/day), and ≥337 mg/day (corresponding to ≥3 cups/day).

Demographic and Lifestyle Characteristics

Sociodemographic and lifestyle characteristics included age, sex, household per capita income, smoking status, alcohol drinking, and the use of medicines.

The physical activity included energy expenditure in leisure time by reporting type and duration of activity according to the predetermined questionnaire items of the long version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) [26], validated in Brazil. The physical activity level was categorized as daily low, moderate and high. In the current study, physical activity was grouped in two categories: low and moderate/high. More details for levels of physical activity proposed by IPAQ are available online (<http://www.ipaq.ki.se>) [27].

The smoking status was categorized as nonsmoker and current smoker or former smoker.

Anthropometric Measurements

Anthropometric measurements were obtained in participant homes by a trained nursing assistant following the procedures recommended by the WHO [28]. Body weight (kg) was measured using a calibrated digital scale (Tanita®, model HD-313, Tanita Corporation of America, Inc., Illinois, USA). Height (cm) was measured with a portable wall-mounted stadiometer (Seca®, model 208, Seca Brazil, São Paulo, Brazil). Body mass index (BMI) was calculated by dividing weight (kilograms) by the square of the height (meters).

Outcome Measurements

Blood Pressure

During the home visit, BP was measured using an automatic blood pressure monitor (Omron HEM-712C, Omron Health Care, Inc., USA) handled by a nursing technician, according to the recommendations of the V Brazilian Guidelines on Hypertension [29]. Participants were considered to have high BP if they had systolic (SBP) and/or diastolic (DBP) higher or equal to 140 mmHg and 90 mmHg, respectively, according to the national and international recommendations [29,30].

Blood Samples

The blood samples were collected by venipuncture after 12-h of overnight fasting by a nursing assistant, using a standardized protocol.

Serum total cholesterol (TC) and fractions, LDL-c and HDL-c, as well as triglyceride (TG), were determined by enzymatic-colorimetric method (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). We considered the cut-off point value for elevated TC level ≥ 200 mg/dL, for elevated LDL-c > 100 mg/dL, reduced HDL-c < 40 mg/dL in males or < 50 mg/dL in females, and elevated TG ≥ 150 mg/dL [31].

Fasting plasma glucose (FPG) was measured by enzymatic-colorimetric glucose oxidase procedure using the kit gluco-quant Glucose/HK (GLU Roche/Hitachi 1,447,513; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The cut-off value for elevated fasting glucose level was ≥ 100 mg/dL [31].

The immunoassay method of chemiluminescence microparticles using the ARCHITECT Homocysteine Reagent Kit (Abbott Diagnostics Division, Abbott Park, Illinois, USA) was used to analyze the plasma concentrations of homocysteine. We selected the value of plasma homocysteine > 16 $\mu\text{mol/L}$ for older adults and a value > 12 $\mu\text{mol/L}$ for adults, as cut-off point for categorization in hyperhomocysteinemia [32].

Statistical Analysis

The characteristics of the study participants were described by coffee consumption categories, and presented as medians and interquartile range (IQR) for continuous variables, and frequencies and percentages for categorical variables. The variables were examined for normality (Kolmogorov-Smirnov test). Differences between coffee consumption categories were tested by Kruskall-Wallis test for continuous variables, and by the Chi-square test for categorical variables.

The associations between the independent variables (categories of usual coffee consumption and coffee polyphenol intake) and the following dependent variables (i.e., SBP,

DBP, FPG, serum TC, LDL-c, HDL-c, TG, and homocysteine) were tested by multiple logistic regression analysis. Two models were fitted for each independent variable. The first model was the crude model (unadjusted). The second model (adjusted), corresponding to models 1, 2, 3, and 4, was adjusted for classic potential confounders (i.e., age, sex, race, BMI, smoking status, alcohol consumption, physical activity level, household per capita income, intake of caffeine, added sugars, total energy intake, and saturated fat), and additionally adjusted for particular variables hypothesized to be associated with each cardiovascular risk factor, according to the literature. Thus, model 1 corresponded to both SBP and DBP was additionally adjusted for sodium intake, and antihypertensive drugs; model 2 corresponded to fasting plasma glucose was additionally adjusted for hypoglycemic drugs; model 3 corresponded to TC, LDL-c, HDL-c, and TG was additionally adjusted for monounsaturated fat, polyunsaturated fat, and hypolipidemic medicines; and lastly model 4 corresponded to homocysteine was additionally adjusted for folate, B6, and B12 vitamins.

All analyses were conducted using the appropriate sample weights to account for the complex survey design. For all analyses, Stata® statistical software package version 12 (StataCorp LLC, Texas, USA) was used and a *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The final study population had a mean age of 45.1 years, mostly women (54.2%), self-declared white (61.1%), non-smokers (58.4%), insufficiently active (77.7%), and non-obese (74.5%).

The mean of coffee consumption for the whole population was 143.4 mL/day. A minority of participants consumed espresso coffee (*n*=7), and there were no decaffeinated

coffee consumers in the current study population. Furthermore, the median total intake of polyphenols was 363.9 mg/day. Coffee provided 247.0 mg/day of polyphenols, which represented approximately 68% of the total intake. The sociodemographic, biochemical, and dietary characteristics of the studied population according to coffee consumption categories are shown in Table 1. Coffee drinking was higher in older adults than in adults, and among current smokers than in non-smokers. Differences were also observed between the usual coffee consumption and polyphenols intake from coffee, and caffeine intake. A further significant difference by coffee consumption was found with prevalence of DBP.

The associations between coffee consumption categories and cardiovascular risk factors are presented in Table 2. The adjusted models demonstrated lower odds for SBP, DBP, and homocysteine in individuals that were consuming 1–3 cups of coffee per day, than in individuals who drank less than 1 cup of coffee per day to elevated SBP (Odds Ratio (OR) 0.45, 95% Confidence Interval (95% CI): 0.26, 0.78); elevated DBP (OR 0.44, 95% CI: 0.20, 0.98), and hyperhomocysteinemia (OR 0.32, 95% CI: 0.11, 0.93). For those subjects with higher consumption (≥ 3 cups/day), the association was not significant for any cardiovascular risk factors.

Table 3 shows the association between the same cardiovascular risk factors and categories of coffee polyphenols in this population. After adjustment for potential confounding factors, OR showed that a moderate intake of coffee polyphenols (101 to 337 mg/day) was inversely associated with elevated SBP (OR 0.46, 95% CI: 0.24, 0.87), elevated DBP (OR 0.51, 95% CI: 0.26, 0.98), and hyperhomocysteinemia (OR 0.29, 95% CI: 0.11, 0.78).

DISCUSSION

The current study found that a moderate coffee consumption (1 to 3 cups per day), which corresponds to a coffee polyphenol intake of 101–337 mg/day, had a beneficial effect on cardiovascular risk factors, such as, elevated SBP, elevated DBP, and hyperhomocysteinemia.

Previous epidemiological studies on the benefits of coffee consumption on the cardiovascular system have provided inconsistent and conflicting results [33]. In this way, some studies suggested a positive association between coffee consumption and risk of CVD [34,35], whereas others reported no association [36,37], or even an inverse association [12–14]. Therefore, these controversial findings may be due to the different types of studies, with different designs performed in distinct populations. Additionally, inconsistent and conflicting results may be related to the various confounding dietary factors, different forms of brewing coffee and the daily amount consumed.

Numerous risk factors for CVD have been described in the literature, and elevated BP is a recognized and well-established risk factor for coronary heart disease and stroke. A large number of epidemiological studies on the effect of coffee or caffeine on BP has been published, but they have provided conflicting results, and the effect of chronic coffee consumption on BP is still unclear [9,38]. A meta-analysis of randomized controlled clinical trials has concluded that regular coffee consumption slightly increases systolic and diastolic BP [8]. Interestingly, Noordzij et al. [8] showed that the BP elevations were larger in the studies using caffeine than in the studies on coffee consumption. In agreement with these findings, another recent systematic review and meta-analysis reports that BP elevations appeared to be significant only for caffeine but not for coffee consumption [9]. The prevailing explanation for such effect is that caffeine antagonizes endogenous adenosine, resulting in

vasoconstriction and elevated total peripheral vascular resistance [39]. Moreover, although these results suggesting that caffeine acutely increasing BP, its effects may be somehow attenuated if ingested as coffee, so, it seems that other compounds in the coffee could potentially counterbalance the pressor effect of caffeine [8]. Coffee is a drink with a very complex chemical composition, rich in BP-lowering minerals (that is, potassium and magnesium) and antioxidant compounds (phenolic acids) that may outweigh the hypertensive effects of caffeine [40]. The beneficial effects of these other components in the cardiovascular system, may help explain the lack of association between long-term coffee consumption and increase BP or CVD risk in large cohort studies [9].

It was observed in our study that moderate coffee drinking was associated with lower odds of elevated SBP and DBP, especially due to the presence of polyphenols. The high content of phenolic compounds in coffee, especially due to the group of hydroxycinnamic acids (caffeic, chlorogenic, ferulic, and p-coumaric acids), exhibits a strong antioxidant activity, and protects against atherothrombosis or atherosclerotic lesion development through endothelial protection (attenuates oxidative stress, improved NO bioavailability, and decreased E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1) expression, among others) [18,41]. In this context, investigations during the last decade have implied that chlorogenic acid consumption can have a significant lowering effect on BP [42,43]. This hypotensive effect might involve nitric oxide (NO)-mediated vasodilation, and improvement of endothelial function. In this way, the dietary intake of chlorogenic acids may hold promise for providing a non-pharmacological approach for the prevention and treatment of high BP [42].

Increased concentrations of total plasma homocysteine have been associated with an increased risk of cardiovascular disease [6,41]. Therefore, modifiable factors can influence homocysteine levels. Besides folate intake i.e., the most important dietary determinant of

plasma total homocysteine concentration, coffee consumption has an effect on total homocysteine levels in the general population [44]. A positive association, in a dose-dependent manner between homocysteine concentrations and coffee consumption, was reported in a cross-sectional study [44] and has confirmed in randomized controlled trials [45,46]. Grubben et al. [45] have suggested that 10% higher concentration of homocysteine is associated with very high intake of unfiltered coffee (1 L/day), but it is not clear whether the serum lipid fraction, i.e., cholesterol-raising diterpenes present exclusively in unfiltered coffee, is the only factor responsible for the increase in homocysteine concentration. Although the authors were not able to conclude whether this association depends on the brewing method, it seems that unfiltered coffee is more likely to increase total homocysteine than filtered coffee. They speculated that the effect of coffee, mediated by caffeine, on increased plasma homocysteine concentrations could be due to a decrease in blood vitamin B6 concentration, a vitamin related to homocysteine metabolism, whose deficit results in higher production of homocysteine. Additionally, chlorogenic acid, a polyphenol that is present in coffee, may also be partly responsible for the increase of the homocysteine production through increased methylation reactions [47].

On the other hand, moderate coffee consumption among healthy subjects did not significantly increase the homocysteine concentration [48], and a population based-study described that coffee was no longer associated with plasma homocysteine after adjustment for plasma folate concentration [49]. In addition, Mursu et al. [50] found similar results and showed that the consumption of filtered coffee has neither short- nor long-term detectable effects on lipid peroxidation nor on plasma homocysteine concentrations in healthy non-smoking men. More recently, according to Corrêa et al. [51] in Brazilian population, no changes were observed for plasma total homocysteine, after the consumption of three or four cups of paper-filtered coffee per day. The inconsistencies between the above-mentioned

epidemiological studies suggest that not all types of coffee brew have the same effect on plasma homocysteine concentrations or that the effect is spurious.

In the current study, we reported that individuals who were consuming more than three cups of filtered coffee per day had lower odds (even not significant) for hyperhomocysteinemia, and moderate consumption of filtered coffee and the polyphenols intake from coffee were inversely associated with hyperhomocysteinemia. A possible hypothesis for this finding is that caffeic acid inhibited hyperhomocysteinemia, elicited leukocyte rolling and adhesion, decreased reactive oxygen species production and activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) in endothelial cells. Additionally, caffeic acid was seen to reduce the expression of adhesion molecules such as E-selectin and ICAM-1 on endothelium and integrin CD11b/CD18 (Mac-1 [macrophage-1 antigen]) on leukocytes caused by hyperhomocysteinemia [52,53]. However, the biological mechanisms involved on the effect of coffee consumption on homocysteine concentrations are still unclear and need further investigation. In addition, coffee consumption has also been associated with alterations in circulating lipids, particularly higher serum TC and LDL-c concentrations, in some observational studies, but not in all [5,6,41]. There are two distinct reasons for these findings. The reason in favor of coffee consumption is that the antioxidants included in coffee might reduce lipid oxidation. The topic has been insufficiently investigated, with two small studies reporting protective (unfiltered coffee for one week) and neutral (filtered coffee for three weeks) effects [6]. The unfavorable reason is that unfiltered coffee is rich in the cholesterol-raising oils (diterpenes, kahweol and cafestol), which contribute significantly to the increase in TC, LDL-c and TG [54]. In contrast to unfiltered coffee, consumption of filtered coffee had no substantial effects on blood lipids [41,55], because the brewing releases oil droplets containing diterpenes from ground coffee beans, and the oil is retained by a paper filter [6,41]. In the present study, we found no association between coffee consumption and serum

lipids (cholesterol profiles, and triglyceride levels), perhaps due to the fact that the traditional brewing method of coffee in Brazil is filtering. Thus, our study corroborated and supported this information.

To our knowledge, this is the first study in Brazil to investigate the association between usual coffee consumption and its polyphenols and the main cardiovascular risk factors, and the most important merit of our study is the emphasis of the role of moderate coffee consumption through its relation with BP and homocysteine in decreasing risk of CVD.

However, some limitations of this study should be considered when interpreting results. Firstly, our study is of a cross-sectional nature, which does not allow definitive establishment of causal inference. Furthermore, several confounders in multivariate models were controlled, but other unknown or unmeasured confounders (such as genetic information) may exist. This should be the focus of future studies. Further research, especially coming from randomized clinical trials, is warranted to confirm our findings and establish the biological basis of coffee's potential preventive effects on CVD.

CONCLUSIONS

Our study shows that moderate coffee consumption and its polyphenols were associated with lower odds of elevated SBP and DBP, and hyperhomocysteinemia in this population. Therefore, moderate coffee consumption, a polyphenol-rich beverage, could provide beneficial effects against clinical cardiovascular risk factors.

REFERENCES

1. Mozaffarian, D.; Benjamin, E.J.; Go, A.S.; Amett, D.K.; Blaha, M.J.; Cushman, M.; Dai, S.; De Simone, G.; Ferguson, T.B.; Ford, E.; et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* **2015**, *131*, e29–e322.

2. WHO. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*; WHO (World Health Organization): Geneva, Switzerland, 2011.
3. International Coffee Organization. Trade Statistics. Available online: http://www.ico.org/profiles_e.asp (accessed on 20 February 2017).
4. Souza, A.M.; Pereira, R.A.; Yokoo, E.M.; Levy, R.B.; Sichieri, R. Alimentos mais consumidos no Brasil: Inquérito Nacional de Alimentação 2008–2009 (Most consumed foods in Brazil: National Dietary Survey 2008–2009). *Rev. Saúde Pública* **2013**, *47*, 190S–199S.
5. O'Keefe, J.H.; Bhatti, S.K.; Patil, H.R.; DiNicolantonio, J.J.; Lucan, S.C.; Lavie, C.J. Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *62*, 1043–1051.
6. Cano-Marquina, A.; Tarín, J.J.; Cano, A. The impact of coffee on health. *Maturitas* **2013**, *75*, 7–21.
7. Ding, M.; Bhupathiraju, S.N.; Chen, M.; van Dam, R.M.; Hu, F.B. Caffeinated and Decaffeinated Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes: A systematic review and a dose-response meta-analysis. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 569–586.
8. Noordzij, M.; Uiterwaal, C.S.P.M.; Arends, L.R.; Kok, F.J.; Grobbee, D.E.; Geleijnse, J.M. Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Hypertens.* **2005**, *23*, 921–928.
9. Mesas, A.E.; Leon-Muñoz, L.M.; Rodriguez-Artalejo, F.; Lopez-Garcia, E. The effect of coffee on blood pressure and cardiovascular disease in hypertensive individuals: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *94*, 1113–1126.
10. Rodrigues, I.M.; Klein, L.C. Boiled or filtered coffee? Effects of coffee and caffeine on cholesterol, fibrinogen and C-reactive protein. *Toxicol. Rev.* **2006**, *25*, 55–69.
11. Whitehead, N.; White, H. Systematic review of randomized controlled trials of the effects of caffeine or caffeinated drinks on blood glucose concentrations and insulin sensitivity in people with diabetes mellitus. *J. Hum. Nutr. Diet* **2013**, *26*, 111–125.
12. Wu, J.N.; Ho, S.C.; Zhou, C.; Ling, W.H.; Chen, W.Q.; Wang, C.L.; Chen, Y.-M. Coffee consumption and risk of coronary heart diseases: A meta-analysis of 21 prospective cohort studies. *Int. J. Cardiol.* **2009**, *137*, 216–225.
13. Ding, M.; Satija, A.; Bhupathiraju, S.N.; Hu, Y.; Sun, Q.; Han, J.; Lopez-Garcia, E.; Willett, W.; van Dam, R.M.; Hu, F.B. Association of Coffee Consumption with Total and Cause-Specific Mortality in Three Large Prospective Cohorts. *Circulation* **2015**, *132*, 2305–2315.
14. Ding, M.; Bhupathiraju, S.N.; Satija, A.; van Dam, RM.; Hu, F.B. Long-term coffee consumption and risk of cardiovascular disease: A systematic review and a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation* **2014**, *129*, 643–659.
15. Guo, X.; Tresserra-Rimbau, A.; Estruch, R.; Martínez-González, M.; Medina-Remón, A.; Castañer, O.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Lamuela-Raventós, R.M. Effects of Polyphenol, Measured by a Biomarker of Total Polyphenols in Urine, on Cardiovascular Risk Factors After a Long-Term Follow-Up in the PREDIMED Study. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, doi:10.1155/2016/2572606.
16. Kempf, K.; Herder, C.; Erlund, I.; Kolb, H.; Martin, S.; Carstensen, M.; Koenig, W.; Sundvall, J.; Bidel, S.; Kuha, S.; et al. Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: A clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 950–957.
17. Natella, F.; Nardini, M.; Giannetti, I.; Dattilo, C.; Scaccini, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6211–6216.
18. Fuentes, E.; Palomo, I. Mechanisms of endothelial cell protection by hydroxycinnamic acids. *Vasc. Pharmacol.* **2014**, *63*, 155–161.

19. Grosso, G.; Micek, A.; Godos, J.; Sciacca, S.; Pajak, A.; Martínez-González, M.A.; Giovannucci, E.L.; Galvano, F. Coffee consumption and risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in smokers and non-smokers: A dose-response meta-analysis. *Eur. J. Epidemiol.* **2016**, *31*, 1191–1205.
20. Guenther, P.M.; DeMaio, T.J.; Ingwersen, L.A.; Berline, M. The multiple-pass approach for the 24 h recall in the Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII) 1994 ± 1996. In Proceedings of the International Conference on Dietary Assessment Methods, Boston, MA, USA, January 1995.
21. Blanton, C.A.; Moshfegh, A.J.; Baer, D.J.; Kretsch, M.J. The USDA Automated Multiple-Pass Method accurately estimates group total energy and nutrient intake. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2594–2599.
22. Harttig, U.; Haubrock, J.; Knueppel, S.; Boeing, H.; Consortium EFCOVAL. The MSM program: Web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2011**, *65*, S87–S91.
23. Scalbert, A; et al. Phenol-Explorer: Database on Polyphenol Content in Foods. Available online: <http://phenol-explorer.eu/> (accessed on 28 September 2015).
24. Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: An application of the Phenol-Explorer database. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4959–4969.
25. Miranda, A.M.; Steluti, J.; Fisberg, R.M.; Marchioni, D.M. Dietary intake and food contributors of polyphenols in adults and elderly adults of São Paulo: A population-based study. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115*, 1061–1070.
26. Craig, C.L.; Marshall, A.L.; Sjostrom, M.; Bauman, A.E.; Booth, M.L.; Ainsworth, B.E.; Pratt, M.; Ekelund, U.; Yngve, A.; Sallis, J.F.; et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2003**, *35*, 1381–1395.
27. The IPAQ group. International physical activity questionnaire. Available online: <http://www.ipaq.ki.se> (accessed on 12 October 2016).
28. WHO (World Health Organization). *Physical Status: The Use & Interpretation of Anthropometry*; WHO: Geneva, Switzerland, 1995.
29. Sociedade Brasileira de Cardiologia; Sociedade Brasileira de Hipertensão; Sociedade Brasileira de Nefrologia. V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. *Arq. Bras. Cardiol.* **2007**, *89*, e24–e79.
30. Chobanian, A.V.; Bakris, G.L.; Black, H.R.; Cushman, W.C.; Green, L.A.; Izzo, J.L., Jr. The Seventh Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA* **2003**, *289*, 2560–2571.
31. Expert Dyslipidemia Panel of the International Atherosclerosis Society. An International Atherosclerosis Society Position Paper: Global recommendations for the management of dyslipidemia-full report. *J. Clin. Lipidol.* **2014**, *8*, 29–60.
32. Refsum, H.; Smith, A.D.; Ueland, P.M.; Nexo, E.; Clarke, R.; McPartlin, J.; Johnston, C.; Engbaek, F.; Schneede, J.; McPartlin, C.; et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: An expert opinion. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 3–32.
33. Butt, M.S.; Sultan, M.T. Coffee and its consumption: Benefits and risks. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 363–373.
34. Liu, J.; Sui, X.; Lavie, C.J.; Hebert, J.R.; Earnest, C.P.; Zhang, J.; Blair, S.N. Association of coffee consumption with all-cause and cardiovascular disease mortality. *Mayo Clin. Proc.* **2013**, *88*, 1066–1074.
35. Grioni, S.; Agnoli, C.; Sieri, S.; Pala, V.; Ricceri, F.; Masala, G.; Saieva, C.; Panico, S.; Mattiello, A.; Chiodini, P.; et al. Espresso coffee consumption and risk of coronary heart disease in a large Italian Cohort. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126550.

36. Floegel, A.; Pischeda, T.; Bergmann, M.M.; Teucher, B.; Kaaks, R.; Boeing, H. Coffee consumption and risk of chronic disease in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Germany study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 901–908.
37. Lopez-Gracia, E.; Van Dam, R.M.; Willett, W.C.; Rimm, E.B.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Rexrode, K.M.; Hu, F.B. Coffee consumption and coronary heart disease in men and women. *Circulation* **2006**, *113*, 2045–2053.
38. Riksen, N.P.; Rongen, G.A.; Smits, P. Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: Implications for coronary heart disease. *Pharmacol. Ther.* **2009**, *121*, 185–191.
39. Echeverri, D.; Montes, F.R.; Cabrera, M.; Galán, A.; Prieto, A. Caffeine's vascular mechanisms of action. *Int. J. Vasc. Med.* **2010**, *2010*, 834060.
40. Godos, J.; Pluchinotta, F.R.; Marventano, S.; Buscemi, S.; Li Volti, G.; Galvano, F.; Grossi, G. Coffee components and cardiovascular risk: Beneficial and detrimental effects. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2014**, *21*, 1–12.
41. Ranheim, T.; Halvorsen, B. Coffee consumption and human health-beneficial or detrimental?—Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 274–284.
42. Zhao, Y.; Wang, J.; Ballevre, O.; Luo, H.; Zhang, W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertens. Res.* **2012**, *35*, 370–374.
43. Mubarak, A.; Bondonno, C.P.; Liu, A.H.; Considine, M.J.; Rich, L.; Mas, E.; Croft, K.D.; Hodgson, J.M. Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: A randomized trial. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9130–9136.
44. De Bree, A.; Verschuren, W.M.; Blom, H.J.; Kromhout, D. Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample. *Am. J. Epidemiol.* **2001**, *154*, 150–154.
45. Grubben, M.J.; Boers, G.H.; Blom, H.J.; Broekhuizen, R.; de Jong, R.; van Rijt, L.; de Ruijter, E.; Swinkels, D.W.; Nagengast, F.M.; Katan, M.B. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: A randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 480–484.
46. Urgert, R.A.; van Vliet, T.; Zock, P.L.; Katan, M.B. Heavy coffee consumption and plasma homocysteine: A randomized controlled trial in healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 1107–1110.
47. Olthof, M.R.; Hollman, P.C.; Zock, P.L.; Katan, M.B. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases total homocysteine concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 532–538.
48. Esposito, F.; Morisco, F.; Verde, V.; Ritieni, A.; Alezio, A.; Caporaso, N.; Fogliano, V. Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2003**, *17*, 595–601.
49. Saw, S.M.; Yuan, J.M.; Ong, C.N.; Arakawa, K.; Lee, H.P.; Coetzee, G.A.; Yu, M.C. Genetic, dietary and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 232–239.
50. Mursu, J.; Voutilainen, S.; Nurmi, T.; Alfthan, G.; Virtanen, J.K.; Rissanen, T.H.; Happonen, P.; Nygård, K.; Kaikkonen, J.; Salonen, R.; et al. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: A clinical trial. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 527–534.
51. Corrêa, T.A.; Rogero, M.M.; Mioto, B.M.; Tarasoutchi, D.; Tuda, V.L.; César, L.A.; Torres, E.A. Paper-filtered coffee increases cholesterol and inflammation biomarkers independent of roasting degree: A clinical trial. *Nutrition* **2013**, *29*, 977–981.

52. Zhao, H.P.; Feng, J.; Sun, K.; Liu, Y.Y.; Wei, X.H.; Fan, J.Y.; Huang, P.; Mao, X.-W.; Zhou, Z.; Wang, C.-S.; et al. Caffeic acid inhibits acute hyperhomocysteinemia-induced leukocyte rolling and adhesion in mouse cerebral venules. *Microcirculation* **2012**, *19*, 233–244.
53. Moon, M.K.; Lee, Y.J.; Kim, J.S.; Kang, D.G.; Lee, H.S. Effect of caffeic acid on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 1371–1377.
54. Cai, L.; Ma, D.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Wang, P. The effect of coffee consumption on serum lipids: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2012**, *66*, 872–877.
55. Rebello, S.A.; van Dam, R.M. Coffee consumption and cardiovascular health: Getting to the heart of the matter. *Curr. Cardiol. Rep.* **2013**, *15*, 403.

Table 1. General characteristics of the Health Survey of São Paulo (ISA-Capital) population according to category of coffee consumption. São Paulo, Brazil, 2008/09.

Characteristics	Coffee Consumption, cups per day				<i>p</i> -value ^a
	<1	1–3	≥3	Total	
No. of subjects	193	185	179	557	
Sociodemographic					
Age (years), median (IQR)	40 (29.0, 53.0)	44 (33.0, 57.0)	47 (36.0, 57.0)	61 (44.0, 70.5)	0.013 ¹
Sex, <i>n</i> (%)					
Male	64 (40.9)	71 (50.2)	71 (47.0)	206 (45.8)	0.360 ²
Female	129 (59.1)	114 (49.8)	108 (53.0)	351 (54.2)	
Race, <i>n</i> (%)					
White	120 (63.0)	109 (58.1)	117 (62.1)	346 (61.1)	0.918 ²
Black	14 (5.8)	18 (6.5)	9 (6.4)	41 (6.2)	
Others	59 (31.2)	58 (35.4)	53 (31.5)	170 (32.7)	
Household <i>per capita</i> income, <i>n</i> (%)					
<1 MW	80 (34.6)	83 (37.5)	68 (38.3)	231 (36.7)	0.851 ²
≥1 MW	113 (65.4)	102 (62.5)	111 (61.7)	326 (63.3)	
Physical activity level, <i>n</i> (%)					
Low	157 (74.1)	161 (80.5)	152 (79.2)	470 (77.7)	0.608 ²
Moderate/High	36 (25.9)	23 (19.5)	27 (20.8)	86 (22.3)	
Smoking status, <i>n</i> (%)					
Non-smoker	114 (65.6)	96 (56.1)	97 (52.1)	307 (58.4)	0.034 ²
Smoker	79 (34.4)	82 (43.9)	89 (47.9)	250 (41.6)	
Body Mass Index (kg/m ²), median (IQR)	25.2 (23.2, 29.1)	24.9 (22.7, 28.6)	26.7 (23.7, 30.8)	26.5 (23.6, 30.5)	0.307 ¹
Biochemical					
SBP (mm Hg), <i>n</i> (%)					
Normal	133 (80.1)	130 (87.2)	119 (77.3)	382 (81.5)	0.089 ²
Elevated	60 (19.9)	55 (12.8)	60 (22.7)	175 (18.5)	
DBP (mm Hg), <i>n</i> (%)					
Normal	163 (85.3)	168 (91.5)	144 (81.8)	465 (86.2)	0.045 ²
Elevated	30 (14.7)	27 (8.5)	35 (18.2)	92 (13.8)	
FPG (mg/dL), <i>n</i> (%)					
Normal	167 (90.9)	154 (86.0)	158 (92.5)	479 (89.8)	0.177 ²

Elevated	26 (9.1)	31 (14.0)	21 (7.4)	78 (10.2)	
TC (mg/dL), n (%)					
Normal	118 (69.0)	98 (58.7)	88 (54.0)	304 (61.1)	0.061 ²
Elevated	75 (31.0)	87 (41.3)	91 (46.0)	253 (38.9)	
LDL-c (mg/dL), n (%)					
Normal	63 (36.2)	46 (26.6)	31 (20.5)	140 (28.2)	0.098 ²
Elevated	130 (63.8)	139 (73.4)	148 (79.5)	417 (71.8)	
HDL-c (mg/dL), n (%)					
Normal	150 (68.7)	133 (61.1)	129 (61.2)	412 (64.0)	0.466 ²
Elevated	43 (31.3)	52 (38.9)	50 (38.8)	145 (36.0)	
TG (mg/dL), n (%)					
Normal	135 (74.2)	123 (69.5)	116 (66.8)	374 (70.4)	0.565 ²
Elevated	58 (25.8)	62 (30.5)	63 (33.2)	183 (29.6)	
Homocysteine (μmol/L)					
Normal	163 (88.0)	162 (93.4)	156 (89.9)	481 (90.3)	0.350 ²
Elevated	30 (12.0)	23 (6.6)	23 (10.1)	76 (9.7)	
Dietetic					
Coffee polyphenol intake (mg/day), median (IQR)	66.6 (0, 147.4)	261.6 (225.3, 297.3)	408.4 (351.8, 546.1)	247.0 (145.9, 346.7)	<0.001 ¹
Caffeine intake (mg/day), median (IQR)	44.7 (24.0, 67.1)	91.3 (80.2, 100.6)	147.3 (117.3, 173.3)	92.4 (60.8, 125.2)	<0.001 ¹
Alcohol intake (g/day), median (IQR)	0.1 (0.0, 1.2)	0.2 (0.0, 2.3)	0.3 (0.0, 3.2)	0.2 (0.0, 2.1)	0.412 ¹
Sodium intake (mg/day), median (IQR)	2986.1 (2526.5, 3848.9)	3260.0 (2563.4, 3895.6)	3015.9 (2567.4, 3677.5)	2863.4 (2342.0, 3472.7)	0.995 ¹
Total energy intake (kcal/day), median (IQR)	1679.4 (1354.4, 2013.8)	1712.8 (1382.3, 2152.6)	1671.1 (1361.8, 2010.2)	1543.9 (1243.8, 1887.9)	0.615 ¹

Abbreviations: DBP: Diastolic blood pressure; FPG: Fasting plasma glucose; HDL-c: High-density lipoprotein cholesterol; IQR: Interquartile Range; LDL-c: Low-density lipoprotein cholesterol; MW: Minimum Wage; SBP: Systolic blood pressure; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride.

Comparisons across categories were performed using the ¹ Kruskall-Wallis test; ²chi-squared. ^a p-value < 0.05 was considered statistically significant. The sample weight was considered for statistical analysis.

Table 2. Association between cardiovascular risk factors and categories of coffee consumption in Health Survey of São Paulo (ISA-Capital) population. São Paulo, Brazil, 2008/09.

Cardiovascular Risk Factors	Coffee Consumption, cups per day		
	<1	1–3	≥3
Elevated SBP (≥ 140 mm Hg)			
OR crude (unadjusted)	1.00	0.58 (0.33, 1.05)	1.17 (0.63, 2.21)
OR adjusted ¹	1.00	0.45 (0.26, 0.78)	0.81 (0.41, 1.61)
Elevated DBP (≥ 90 mm Hg)			
OR crude (unadjusted)	1.00	0.54 (0.24, 1.22)	1.30 (0.66, 2.54)
OR adjusted ¹	1.00	0.44 (0.20, 0.98)	0.89 (0.45, 1.75)
Increased FPG (≥ 100 mg/dL)			
OR crude (unadjusted)	1.00	1.64 (0.82, 3.24)	0.81 (0.34, 1.92)
OR adjusted ²	1.00	1.39 (0.60, 3.23)	0.72 (0.22, 2.26)
Increased TC (≥ 200 mg/dL)			
OR crude (unadjusted)	1.00	1.57 (0.86, 2.85)	1.89 (1.22, 2.93)
OR adjusted ³	1.00	1.46 (0.76, 2.80)	1.45 (0.94, 2.22)
Increased LDL-c (>100 mg/dL)			
OR crude (unadjusted)	1.00	1.56 (0.76, 3.20)	2.20 (1.12, 4.32)
OR adjusted ³	1.00	1.46 (0.68, 3.12)	2.07 (0.92, 4.67)
Reduced HDL-c (<40 mg/dL men; <50 mg/dL women)			
OR crude (unadjusted)	1.00	1.40 (0.77, 2.54)	1.39 (0.75, 2.59)
OR adjusted ³		1.67 (0.87, 3.20)	1.77 (0.80, 3.94)
Increased TG (≥ 150 mg/dL)			
OR crude (unadjusted)	1.00	1.26 (0.59, 2.71)	1.43 (0.73, 2.80)
OR adjusted ³	1.00	1.26 (0.59, 2.63)	1.35 (0.61, 2.98)
Increased Homocysteine (>12 $\mu\text{mol/L}$ adults; >16 $\mu\text{mol/L}$ older adults)			
OR crude (unadjusted)	1.00	0.52 (0.16, 1.43)	0.82 (0.35, 1.94)
OR adjusted ⁴	1.00	0.32 (0.11, 0.93)	0.43 (0.19, 1.01)

Odds ratio (OR) and 95% Confidence Interval (95% CI) were calculated by using multivariate logistic regression. Models were adjusted for age, sex, race, body mass index, smoking, alcohol, physical activity, household per capita income, intake of caffeine, added sugars, total energy intake, and saturated fat: ¹ additionally adjusted for sodium intake, and antihypertensive drugs; ² additionally adjusted for hypoglycemic drugs; ³ additionally adjusted for monounsaturated fat, polyunsaturated fat, and hypolipidemic drugs; ⁴ additionally adjusted for vitamins folate, B6, and B12.

Abbreviations: DBP: Diastolic blood pressure; FPG: Fasting plasma glucose; HDL-c: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-c: Low-density lipoprotein cholesterol; SBP: Systolic blood pressure; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride

Table 3. Association between cardiovascular risk factors and categories of coffee polyphenol intake in Health Survey of São Paulo (ISA-Capital) population. São Paulo, Brazil, 2008/09.

Cardiovascular Risk Factors	Polyphenol Intake from Coffee, mg per day ^a		
	<101	101–337	≥337
Elevated SBP (≥140 mm Hg)			
OR crude (unadjusted)	1.00	0.55 (0.30, 1.02)	0.94 (0.52, 1.73)
OR adjusted ¹	1.00	0.46 (0.24, 0.87)	0.72 (0.35, 1.45)
Elevated DBP (≥90 mm Hg)			
OR crude (unadjusted)	1.00	0.52 (0.26, 1.06)	0.86 (0.45, 1.65)
OR adjusted ¹	1.00	0.51 (0.26, 0.98)	0.70 (0.39, 1.27)
Increased FPG (≥100 mg/dL)			
OR crude (unadjusted)	1.00	1.77 (0.97, 3.23)	0.66 (0.28, 1.58)
OR adjusted ²	1.00	1.98 (0.87, 4.54)	0.71 (0.23, 2.20)
Increased TC (≥200 mg/dL)			
OR crude (unadjusted)	1.00	0.96 (0.54, 1.72)	1.35 (0.92, 1.98)
OR adjusted ³	1.00	0.83 (0.44, 1.57)	1.07 (0.71, 1.59)
Increased LDL-c (>100 mg/dL)			
OR crude (unadjusted)	1.00	1.05 (0.49, 2.25)	1.80 (0.86, 3.75)
OR adjusted ³	1.00	0.99 (0.45, 2.17)	1.67 (0.70, 4.03)
Reduced HDL-c (<40 mg/dL men; <50 mg/dL women)			
OR crude (unadjusted)	1.00	1.31 (0.78, 2.18)	1.31 (0.74, 2.31)
OR adjusted ³	1.00	1.27 (0.70, 2.31)	1.51 (0.74, 3.07)
Increased TG (≥150 mg/dL)			
OR crude (unadjusted)	1.00	0.87 (0.45, 1.71)	1.00 (0.52, 1.92)
OR adjusted ³	1.00	0.72 (0.36, 1.45)	0.86 (0.41, 1.78)
Increased Homocysteine (>12 µmol/L adults; >16 µmol/L older adults)			
OR crude (unadjusted)	1.00	0.52 (0.18, 1.51)	0.84 (0.40, 1.81)
OR adjusted ⁴	1.00	0.29 (0.11, 0.78)	0.59 (0.31, 1.11)

Odds ratio (OR) and 95% CI were calculated by using multivariate logistic regression. Models were adjusted for age, sex, race, BMI, smoking, alcohol, physical activity, household per capita income, intake of caffeine, added sugars, total energy intake, saturated fat, and other polyphenol intake (except polyphenols from coffee). ¹ additionally adjusted for sodium intake, and antihypertensive drugs; ² additionally adjusted for hypoglycemic drugs; ³ additionally adjusted for monounsaturated fat, polyunsaturated fat, and hypolipidemic drugs; ⁴ additionally adjusted for vitamins folate, B6, and B12. ^a < 101 mg/day (corresponding to <1 cup coffee/day), 101–337 mg/day (corresponding to 1–3 cups/day), and ≥ 337 mg/day (corresponding to ≥3 cups/day). Abbreviations: DBP: Diastolic blood pressure; FPG: Fasting plasma glucose; HDL-c: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-c: Low-density lipoprotein cholesterol; SBP: Systolic blood pressure; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride.

5.3 TERCEIRO MANUSCRITO

Coffee consumption and Genetic Risk Score in Blood Pressure: gene-diet interaction analysis in a population-based study.

O presente artigo será submetido ao periódico European Journal of Nutrition

Andreia Machado Miranda¹

Josiane Steluti¹

Regina Mara Fisberg¹

Dirce Maria Marchioni¹

¹ Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo. Avenida Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César, CEP 01246-904, São Paulo, SP – Brazil.

ABSTRACT

Purpose: Recent genome-wide association studies (GWAS) have identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) that are associated with high blood pressure (BP). However, whether coffee consumption interacts with the genetic variants related to BP is yet unclear. Thus, this study aimed to examine the interaction between usual consumption of coffee and a genetic risk score (GRS) in relation to high BP. **Methods:** Data came from the ‘Health Survey of São Paulo’ among 533 participants. Coffee consumption was assessed by two 24-hour dietary recalls and categorized into <1, 1-3, and >3 cups/day. The GRS was calculated based on SNPs in previous GWAS [*CYP1A1/CYP1A2* (rs2470893, rs2472297); *CPLX3/ULK3* (rs6495122); *MTHFR* (rs17367504)]. The interactions between GRS and coffee consumption in relation to high BP were analyzed using multiple logistic regression models. **Results:** Higher GRS independently contributed to higher probability of elevated BP, systolic BP (SBP) and diastolic BP (DBP) in this population (OR=1.85, 95%CI=1.19-2.87; OR=2.30, 95%CI=1.32-4.01 and OR=1.66, 95%CI=1.10-2.51; respectively). Moreover, there was a significant interaction effect for coffee consumption and GRS on the high BP, and both SBP and DBP. Individuals with higher BP increasing alleles in the GRS had a significantly high BP (OR=5.09, 95%CI=1.32-19.7), and both elevated SBP and DBP (OR=2.14, 95%CI=1.12-4.11; OR=3.54, 95%CI=1.17-10.75), among those with high coffee consumption (>3 cups coffee/day). **Conclusions:** Consumption of coffee could interact with genetic predisposition in relation to BP. Thus, individuals with greater GRS appeared to have high BP associated with higher coffee consumption, highlighting the particular importance of reducing coffee intake in individuals genetically predisposed to this CVD risk factor.

INTRODUCTION

High blood pressure (BP) has long been recognized as an important risk factor for cardiovascular disease (CVD). Data from epidemiological studies have established that the increases in systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), even within the normal range (between 130–139/85–89 mmHg), have a continuous and graded impact on CVD risk [1,2]. In addition, elevated BP affects about one third of adults, decreases life expectancy, and accounts for 7% of disease burden - as measured in disability-adjusted life-years (DALYS). Raised BP is estimated to cause 9.4 million deaths worldwide every year [3]. For every 20 mmHg systolic or 10 mmHg diastolic increase in BP, there is a doubling of mortality from both ischemic heart disease and stroke [2].

As a multifactorial condition, BP is influenced by both environmental and genetic factors, as well as their interactions, and has long been established as an inheritable trait, suggesting a significant contribution of genetic factors to this complex phenotype [4]. The considerable heritability of BP (about 30-60 percent) has prompted extensive efforts to identify its genetic underpinnings but the vast majority of the genetic contribution to variation in BP, remains largely unknown or unexplained [4,5]. Therefore, the identification of susceptibility genes associated with inter-individual variation in BP in the general population could help elucidate the underlying molecular mechanisms of hypertension [5].

Over the last decade, various genetic loci or chromosomal regions were found to be associated with BP or hypertension through candidate gene and genome-wide linkage studies [6,7,8,9]. Large-scale genome-wide association studies (GWAS) have recently proven to be an effective approach to identify novel genetic risk variants for

many common diseases and traits, including continuous BP and dichotomous hypertension [10,11]. Subsequently, two large GWAS meta-analyses in European descendent, one by the CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium (N=29,136) [6] and the second by the Global BPgen (Global Blood Pressure Genetics) Consortium (N=34,433) [7] identified 17 variants in 13 loci robustly associated with both SBP and/or DBP [6,7]. More recently, the International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies [12] of SBP and DBP, in individuals of European descent, identified 16 novel loci: six of these loci contain genes previously known or suspected to regulate BP (*GUCY1A3-GUCY1B3; NPR3-C5orf23; ADM; FURIN-FES; GOSR2; GNAS-EDN3*); the other 10 provide new clues to BP physiology. A genetic risk score based on 29 independent genetic variants was significantly associated with hypertension, left ventricular wall thickness, stroke, and coronary artery disease [12].

Emerging data suggest that synergistic interactions of genetic predisposition with diet and lifestyle factors may play an important role in affecting BP and the pathogenesis of hypertension [13]. In this way, coffee is among the most widely consumed beverages in the world, having received considerable attention regarding health risks and benefits [14]. The majority of recent observational studies have associated regular coffee consumption with reduced risk of hypertension and related cardiovascular disease [15,16,17], but the effect of long-term coffee consumption on BP is not entirely consistent [18,19,20]. Although the acute effect of caffeine intake is to increase BP by blocking adenosine receptors in the vascular tissue, which leads to vasoconstriction in the general and micro circulation [19,21], coffee is a mixture of complex organic compounds (i.e., minerals, soluble fiber, and phenolic compounds) with strong anti-oxidant capacity [22], anti-inflammatory and antithrombotic properties

[23]. Furthermore, such heterogeneous associations might be attributed, at least partly, to the modification effects of divergent genetic predispositions, as observed in previous studies showing coffee-gene interactions on different health outcomes [24,25,26]. A meta-analysis of GWAS on coffee intake from 8 Caucasian cohorts showed significant association for two SNPs in the 15q24 region (*CYP1A1/CYP1A2* genes) with coffee-related phenotypes, such as SBP and DBP [9].

Genetic factors could be especially valuable as they offer ways to study the potential health effects of coffee via instrumental variables or gene-environment interactions [27]. Therefore, the purpose of the present study was to investigate the interaction between usual coffee consumption and a genetic risk score (GRS) related to high BP, in a representative sample of São Paulo population, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Study and sample population

Data was derived from the ‘Health Survey of São Paulo’ (ISA-Capital), a population-based and cross-sectional household health survey conducted in 2008-2009. The study population comprised residents of private households in the urban area of São Paulo. This complex probabilistic sample was obtained using conglomerates in two stages: census tracts and household sectors, using data from the ‘National Household Sample Survey’ (NHSS) conducted in 2005 [28]. Six sample domains were defined by age groups and sex: females and males aged 13 to 19 years old (adolescents), 20 to 59 years old (adults) and 60 years old or over (older adults). A sample size of 300 in each domain was estimated to be the minimum, based on a prevalence of 0.5 with a standard error of 0.07 at a 5% significance level and a design effect of 1.5.

A total of 2,691 individuals, aged 12 years old or over, were selected to answer questions about diet, life conditions (e.g. physical activity, and smoking) and socio-demographic information (e.g. age, sex, race, educational level, and family income). Among these participants, blood samples, blood pressure and anthropometric measurements were obtained from 750 individuals. Other details of the sampling have been previously published [29]. For the present study, we considered only participants aged 20 years old or older at the time of collection. A total of 533 individuals responded to a social-economic survey, completed two 24-hour dietary recalls (24HR), underwent anthropometric and blood pressure measurements and, subsequently, blood samples were collected for DNA extraction and genotyping.

The Ethical and Research Committee at the School of Public Health University of São Paulo (Protocol number 2001) reviewed and approved the study protocol. A written informed consent form was obtained from all participants

Data Collection and Processing

Household information was obtained from randomly selected residents using structured questionnaires applied by previously trained interviewers. Demographic, socio-economic and lifestyle characteristics, self-reported morbidity, family-history diseases, supplementation, medication, and diet information were collected. In a subsequent home visit, BP was measured, blood samples were collected, and anthropometric measurements were recorded.

Dietary assessment

The dietary intake was measured by two 24HR. The first was collected in the households and the second over the telephone. These 24HR were collected using the multiple-pass method and automated multiple-pass method [30], respectively, on non-

consecutive days, regardless of the day of the week and the season. The Multiple-Pass Method is structured in five steps: 1) a quick list, where participants list all the foods and beverages consumed uninterruptedly; 2) a forgotten list; participants are asked about commonly forgotten foods consumed, such as candies, coffees, and sodas; 3) time and location of food and beverage intake; 4) detailing cycle, that is, a description of the way of preparation and amounts consumed, and 5) final review, that verifies whether a certain food consumed during the day was not previously recorded. Food items reported in each 24HR were critically reviewed to identify any failures in reporting related to the descriptions of the food consumed or to food preparation techniques, including their apportionment and quantification. The dietetic data were entered in the Nutrition Data System for Research software, version 2007 (Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA), which is based on data from the food composition table published by the United States Department for Agriculture (USDA), to obtain the nutritional information (energy and nutrient values). The nutritional adequacy of the food consumption data was verified using a national food composition table - *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos* (available here: <http://www.intranet.fcf.usp.br/tabela/>).

Moreover, the Multiple Source Method (MSM) was used to estimate the usual dietary intake of coffee, alcohol and total energy, and to remove within-person variation. This method consists in a statistical modeling technique that uses two 24HR. First, the MSM calculates the dietary intake of individuals and then builds the population distribution based on individual data [31].

Coffee consumption

In the 24HR, the participants reported their dietary intake including if they consumed coffee on the day before the interview. Information about the method of

coffee preparation (filtered, instant, espresso, or other) was asked during the detailed cycle of the multiple-pass method, and whether additional items were typically added to the coffee (none, milk, sugar, artificial sweetener, etc.). Daily coffee intake (in mL) was categorized, according to the standard cup size of 50 mL, into three categories: <1 cup/day (<50 mL), 1–3 cups/day (50-150 mL), and >3 cups/day (>150 mL). The category of <1 cup/day of coffee was used as the reference group.

Blood pressure measurement

During the home visit, BP was measured according to the recommendations of the Fifth Brazilian Guidelines for Hypertension for adults [32], using a validated automatic oscillometer (Omron®, model HEM-712 C, Omron Health Care, Inc., Vernon Hills, IL, USA) handled by a nursing technician, who also collected data on medication use, including antihypertensive drugs. High systolic blood pressure (SBP) was defined as a SBP more than or equal to 140 mm Hg, and high diastolic blood pressure (DBP) was defined as DBP more than or equal to 90 mmHg. Therefore, participants were considered to have high BP if they had a SBP and/or a DBP higher or equal to 140 mmHg and 90 mmHg, respectively, according to the national and international recommendations [2,32].

Lifestyle and anthropometric measures

A structured questionnaire was used to obtain information on lifestyle characteristics (physical activity, smoking habits and alcohol consumption). The physical activity included energy expenditure in leisure time by reporting type and duration of activity according to the predetermined questionnaire items of the long version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), validated in Brazil [33]. In the current study, physical activity level was grouped in two categories: low

and moderate or high. The smoking status was ascertained from questions about current or past smoking, time from smoking cessation and the number of cigarettes smoked *per day*, and it was categorized as non-smoker, former smoker and current smoker. Alcohol consumption was assessed from information about amount, frequency and preferences, then it was categorized as non-drinker and alcohol drinker.

A trained nurse technician, using a standardized protocol, measured body weight and height at the participants' homes. Body weight (kg) was measured using a digital balance (Tanita®, model HD-313, Tanita Corporation of America, Inc., Arlington Heights, IL, USA). Height (cm) was measured with a fixed stadiometer, with head, shoulders, buttocks, and heels pressed back against the wall (Seca®, model 208, Seca Brazil, São Paulo, Brazil). Then, these two measures were used to calculate the body mass index (BMI, Kg/m²) dividing the weight (kilograms) by the square of the height (meters).

Blood collection

A trained nurse technician performed blood collection at home using disposable needles and syringes according to the standardized procedures. The blood samples were collected through venipuncture after 12-hour of overnight fasting. Approximately 20 ml of blood were collected, in tubes containing EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and plastic serum tubes which had spray-coated silica. The tubes were stored in Styrofoam packages with recyclable ice packs and were transported to the Laboratory of Human Nutrition at School of Public Health, followed by centrifugation and processing into aliquots of serum and plasma, and storage in a freezer at -80 °C until analysis.

DNA extraction and genotyping

The DNA was extracted using the salting out method [34]. Subsequently, the DNA integrity was observed using a 1% agarose gel whereas DNA concentration was quantified using a Nanodrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The genotyping of the SNPs was performed by the TaqMan Open Array (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), using the PCR-allele technique [35]. A fluorescence reader was used to capture the emitted fluorescence signal for clusterizing and identifying genotypes [35].

The following four polymorphisms in the genes involved in caffeine metabolism, coffee consumption and BP levels were analyzed: *CYP1A1/CYP1A2* (rs2470893), *CYP1A1/CYP1A2* (rs2472297), *CPLX3/ULK3* (rs6495122), *MTHFR* (rs17367504).

Single Nucleotide Polymorphism Selection and Construction of genetic risk score

The GRS was created using four single nucleotide polymorphisms that reached genome-wide significance level with BP in previous GWAS [*CYP1A1/ CYP1A2* (rs2470893, rs2472297); *CPLX3/ULK3* (rs6495122); *MTHFR* (rs17367504)] [6,7,9,12].

Each SNP was recoded as 0, 1 or 2 according to the number of risk alleles known to increase BP, i.e. BP increasing alleles. Thereafter, the unweighted GRS was determined by a simple summation of the number of risk alleles from the four SNPs. In our approach, no weighting of effects is used, and each SNP allele counts equally in the score. The GRS ranges from 0 to 8, and each point of the genetic risk score corresponded to each risk allele, with higher scores indicating a greater genetic predisposition to high BP.

Statistical analyses

For each polymorphism in this population, the minor allele frequency (MAF) was calculated, and the Chi-square test with continuity correction was used to determine whether genotype frequencies followed the Hardy-Weinberg equilibrium.

The frequencies of sex, age group, self-declared skin color, smoking status, leisure-time physical activity levels, coffee and alcohol consumption, medians and interquartile range (IQR) of BMI, and total energy intake were described according to genotypes for each gene. The Chi-square test and Kruskall-Wallis test were performed to verify differences between categorical variables and continuous variables, respectively.

Multiple logistic regression analyses were performed to estimate adjusted odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) for associations between high BP, and both, high SBP and DBP with the GRS, adjusting for potential confounders, described below. Thereafter, the effect of interaction between the GRS and coffee consumption on high BP, SBP and DBP was tested by including the respective multiplicative interaction term in the logistic regression models. Statistical adjustments for potential confounding factors were made for age (years), sex (male and female), self-declared skin color (White, Black and others: Mixed, Asian or Indigenous), smoking status (non-smoker, former and current smoker), leisure-time physical activity (low and moderate or high), body mass index (Kg/m^2), current use of alcoholic beverages (no and yes), total energy intake (kcal/day), sodium intake (mg/day), and use of antihypertensive drugs (no and yes). After statistically significant interaction was found, the multiple logistic models were used to assess the associations of the GRS with high BP, stratified by categories of coffee consumption (<1 cup/day, 1–3 cups/day, and >3 cups/day).

All statistical analyses were conducted using the appropriate sample weights to account for the complex survey design and were performed using the STATA® software package version 13 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA). A significance level of 5% was considered in all analyses.

RESULTS

The current study involved a total of 533 participants as a representative sample of the population of São Paulo, Brazil, of which 54.1% were women, averaging 44.9 years of age ($SD= 16.1$ years). Moreover, in terms of skin color, most of the participants were self-declared White (59.9%), followed by Mixed, Asians or Indigenous (33.7%), and Black (6.4%). The non-smokers totaled 76.6% of the population. In relation to the leisure-time physical activity, 77.1% had low level. The median of coffee consumption for the whole population was 138.0 mL/day (IQR= 87.6, 185.9), and 87.6% of the individuals consumed coffee.

The information relating to the polymorphisms studied in this population, such as gene location, change of DNA molecule bases, Hardy-Weinberg equilibrium, and MAF, is listed in **Table 1**. The chi-square test ($P>0.05$) revealed that genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium for all of the SNPs. A linkage disequilibrium (LD) map of the three SNPs in and around the *CYP1A1/CYP1A2* and *CPLX3/ULK3* regions (15q24) investigated in this study population is shown in Supplementary Material (Figure S1). The software Haploview was used to analyze and visualize patterns of LD and it was observed that SNPs (rs2470893, rs2472297 and rs6495122) were either weakly linked to each other or not linked at all, because all r^2 values were lower ($r^2<0.80$). Therefore, in the ISA-Capital study population, genotyped polymorphisms in the *CYP1A1/CYP1A2* and *CPLX3/ULK3* genes were not in LD.

The genotype frequencies of the SNPs, regarding the final population and the sociodemographic, lifestyle and dietary characteristics of the study population according to genotypes are summarized in **Table 2**. Individuals presenting genotypes AG and GG for the *MTHFR* polymorphism had higher caffeine intake than individuals with genotype AA. Participants with genotype TT for the *CYP1A1/CYP1A2* polymorphism (rs2470893) had higher BMI than individuals with genotype CC. Regarding race and age groups, statistical differences were observed in the genotypes of *CYP1A1/CYP1A2*, and *CPLX3/ULK3*. Moreover, with regard to smoking status, a statistical difference was depicted in the genotype of *CYP1A1/CYP1A2* (rs2472297) ($P=0.003$). In relation to sex, a significant difference was only observed for *CPLX3/ULK3* polymorphism ($P=0.031$). The major proportion of individuals with high BP had the allele CT for the *CYP1A1/CYP1A2* (rs2470893) and the allele AA for the *MTHFR* polymorphisms. For *CPLX3/ULK3* polymorphism the difference in BP was of borderline significance ($P=0.068$). The other variables did not differ between the genotypes.

Crude and adjusted odds ratios for high BP, SBP and DBP across genetic risk score are showed in **Table 3**. After adjustment for potential confounding factors, the findings suggested that higher GRS independently contributed to higher probability of elevated BP, SBP and DBP in this population (OR=1.85, 95%CI=1.19-2.87; OR=2.30, 95%CI=1.32-4.01 and OR=1.66, 95%CI=1.10-2.51; respectively).

Gene-coffee interaction and associations between high BP, SBP and DBP with genetic risk score stratified by coffee consumption categories are depicted in **Table 4**. There was a significant interaction effect for coffee consumption and GRS on the high BP ($P\text{-interaction}=0.026$), and both high SBP ($P\text{-interaction}=0.035$) and DBP ($P\text{-interaction}=0.026$). Moreover, the positive associations between GRS and high BP differ by coffee consumption groups. A single point rise in the GRS increases the

probability of high BP (OR= 5.09, 95% CI= 1.32-19.7) among participants with high coffee consumption (>3 cups coffee/day). In addition, higher BP increasing alleles in the GRS was also associated with high SBP (OR= 2.14, 95% CI= 1.12-4.11) and high DBP (OR=3.54, 95%CI=1.17-10.75), in individuals who drank more than 3 cups of coffee/day. For those individuals with low and moderate coffee consumption (<1 cups/day and 1-3 cups/day, respectively), the associations were not significant for high BP, SBP or DBP.

DISCUSSION

The present study showed an association between GRS, derived from four SNPs related to BP identified in a previous large GWAS, and high BP in a population-based study of individuals in São Paulo City, Brazil. Furthermore, it also found a significant interaction between usual coffee consumption and genetic predisposition in relation to BP among this population.

Multiple epidemiological studies on the effect of coffee or caffeine on increase BP have been published, but they have provided inconsistent and conflicting results [18,19,20]. Some studies suggested a positive association between coffee consumption and increase BP [21,36], whereas others reported an inverse association [16,17]. The acute effects of caffeine intake are well-known [19,21], but the effect of chronic coffee consumption on BP is still unclear [18,19,20]. This finding suggests that despite the fact than an acute ingestion of caffeine increases BP, when ingested through coffee, the hypertensive effect of caffeine may be somehow attenuated, so it seems that other compounds of coffee could potentially counteract the negative effect of caffeine. Coffee is a complex ‘blend’ of a vast number of different bioactive chemicals, it is rich in BP-lowering minerals (i.e., potassium and magnesium), soluble fiber, and phenolic

compounds (polyphenols) that may outweigh the pressor effects of caffeine [18]. Among these, polyphenols, particularly hydroxycinnamic acids, seem to play a protective role in the cardiovascular system due to their extensive antioxidant activity, anti-inflammatory properties, improvement in endothelial function, inhibition of platelet aggregation, and antithrombotic properties [22,23]. In recent years, epidemiological investigations have suggested that dietary consumption of chlorogenic acid (CGA) can have a significant lowering effect on BP in humans [37,38]. In 28 mild hypertensive individuals who were randomized in a double-blind placebo-controlled study, the chlorogenic acid regimen caused a significant lowering of systolic and diastolic BP [37]. Mechanistically, the CGAs (in particular their metabolites caffeic acid and ferulic acid) attenuate oxidative stress (reactive oxygen species), which leads to the benefit of blood-pressure reduction through improved endothelial function and nitric oxide bioavailability in the arterial vasculature [23,38].

In this context, it is well known that considerable variability exists in the cardiovascular responses to coffee drinking. In part, such variability is due to tolerance to caffeine and effects of BP-lowering compounds, such as phenolic acids, but there is evidence that some may have a genetic predisposition [39].

The BP associated loci were recently identified by genome-wide association studies [6,7,9]. GWAS have elicited renewed optimism in hypertension genomics research, highlighting novel pathways influencing BP and elucidating genetic mechanisms underlying BP regulation [4]. The results of the present study showed a significant and positive association between the combination of all four genetic risk variants and high BP in a Brazilian population, which showed consistent direction as reported in the Global Blood Pressure Genetics (Global BPgen) and the CHARGE Consortium [6,7]. However, the biological functions of these genetic loci in relation to

high BP are poorly understood. The mechanisms by which these common variants contribute to affect and higher BP remain unexplained and need to be investigated [6,8]. The *CPLX3/ULK3* polymorphism is associated with altered expression of *ULK3* in liver; however, little is known about *ULK3* and how variation in these genes might affect BP [6]. Another genetic variant considered in GRS was *MTHFR* gene. It has been described that the variant genotypes can reduce enzyme activity, decrease folate levels, and subsequently result in hyperhomocysteinemia [40]. High levels of homocysteine have been linked to cardiovascular disease, namely, high BP, and hypertension in pregnancy (HIP) because they may induce arteriolar constriction, renal dysfunction, increased sodium reabsorption, as well as increase arterial stiffness and oxidative stress. Thus, a recent meta-analysis provides evidence that the *MTHFR* C677T polymorphism is associated with hypertension and HIP, especially among East Asians and Caucasians [41]. The study of Li *et al.* [42], demonstrated that the *MTHFR* A1298C mutation accompanied by hyperhomocysteinemia jointly elevated DBP.

Other polymorphisms are related to *CYP1A1* and *CYP1A2* genes. It is known that the cytochrome P450 enzymes in the liver have a key role in coffee metabolism [9]. *CYP1A2* is the main enzyme that metabolizes caffeine to the dimethylxanthine metabolites theobromine, paraxanthine, and theophylline [43]. Indeed, *CYP1A2* has been shown to account for more than 95% of hepatic caffeine clearance [44], whereas its coregulated homolog *CYP1A1*, also known as AHH (aryl hydrocarbon hydroxylase), metabolizes polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) such as benzo(a)pyrene, which is a constituent of coffee [45]. The *CYP1A1* T3801C polymorphism, associated with a higher *CYP1A1* inducibility and enhanced catalytic activity, has been linked to stroke, triple vessel disease and may, therefore, be associated with BP [46]. Additionally, *CYP1A2* variants, and thus *CYP1A2* activity, could influence BP via the effect of

caffeine on renal segmental tubular sodium handling [47]. Polymorphisms in the *CYP1A2* gene are known to moderate the association between coffee consumption and hypertension [48] or myocardial infarction [24]. Thus, *CYP1A2* genotype may have important influences on the pressor effect of coffee [48].

Different individuals have different risks, and coffee or caffeine consumption can modulate the risk of developing cardiovascular disease in individuals with genetic predisposition [39]. In the current study, we provided novel evidence from an aspect gene-diet interaction that usual coffee consumption and genetic predisposition may interact with each other and synergistically influence BP, that is, coffee consumption could modify the associations between genetic risk and high BP. It is difficult to understand whether coffee consumption per se or another correlated unhealthy lifestyle interacts with genetic predisposition to BP. The observed interaction between coffee consumption and the genetic risk score in relation to high BP, however, was independent of multiple sociodemographic, diet and lifestyle factors. We further adjusted for the potential confounding factors that had been previously described in literature and had shown a significant association with genetic predisposition to BP, and the results remained unchanged. The observed interaction on BP might reflect the cumulative effects of multiple genetic variants rather than any single variant.

Determination of the precise mechanism will require more studies, because until now the mechanisms involved in the interaction between coffee consumption and the genetic predisposition to BP are still unclear and incompletely understood. Thus, future functional experiments are needed to explore the pathways underlying such gene-diet interactions that lead to high BP.

Some points should be considered when interpreting the findings of the current study. Firstly, our data are related to the cross-sectional study design, which does not

allow definitive establishment of causal inference among coffee consumption, genetic variants, and high BP. Secondly, the unweighted GRS was considered because the relative effect size (β coefficient) to some SNPs was not available in the GWAS. Finally, the participants included in our study were adults and older adults of multiple ethnicities recruited in a Brazilian population, and it is unknown whether our findings could be generalized to other demographic or ethnic groups. On the other hand, considering the differences of genetic backgrounds between people of European descent and other ethnic populations, the contribution of these loci to BP in other ethnicities and the mechanisms by which they increase BP need to be investigated.

Notwithstanding these limitations, the major strength of the current study is that it offers consistent findings of the gene-diet interactions, i.e. data-linking coffee intake, genetic predisposition and change in BP in a representative sample of São Paulo population. Furthermore, the present analyses include the use of a genetic risk score combining genetic information of four variants associated with BP. The characterization of new GRS can serve as a basis for future approaches to early detection of high risk in individuals, and for the development of novel therapies for the prevention or treatment of hypertension.

CONCLUSIONS

In summary, the present data provide additional evidence that usual coffee consumption and genetic predisposition to BP may interact with each other and influence BP in a Brazilian population, and the association between genetic risk and high BP vary according to differences in coffee consumption. Thus, individuals with higher GRS are associated with high BP, SBP and DBP, particularly those who drank

more than 3 cups of coffee/day. Our findings further emphasize the importance of reducing consumption of coffee in the prevention of high BP, in individuals genetically predisposed to this cardiovascular disease risk factor.

REFERENCES

1. Karmali KN, Lloyd-Jones DM (2017) Global Risk Assessment to Guide Blood Pressure Management in Cardiovascular Disease Prevention. *Hypertension* 69.
2. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr (2003) The Seventh Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA* 289:2560-72.
3. World Health Organization (2014) Global status report on noncommunicable diseases 2014. WHO.
4. Zhao Q, Kelly TN, Li C, He J (2013) Progress and Future Aspects in Genetics of Human Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 15:676-86.
5. Garcia EA, Newhouse S, Caulfield MJ, Munroe PB (2003) Genes and hypertension. *Curr Pharm Des* 9:1679-89.
6. Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A et al (2009) Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nature Genet* 41:677-87.
7. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L et al (2009) Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nature Genet* 41:666–76.
8. Liu C, Li H, Qi Q, Lu L, Gan W, Loos RJ, Lin X (2011) Common variants in or near FGF5, CYP17A1 and MTHFR genes are associated with blood pressure and hypertension in Chinese Hans. *J Hypertens* 29:70-5. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833f60ab.
9. Amin N, Byrne E, Johnson J, Chenevix-Trench G, Walter S, Nolte IM et al (2012) Genome-wide association analysis of coffee drinking suggests association with CYP1A1/CYP1A2 and NRCAM. *Mol Psychiatry* 17: 1116-29.
10. Adeyemo A, Gerry N, Chen G, Herbert A, Doumatey A, Huang H et al (2009) A genome-wide association study of hypertension and blood pressure in African Americans. *PLoS Genet* 5:e1000564.
11. Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N et al (2009) Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet* 18:2288-96.
12. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, Smith AV, Tobin MD, Verwoert GC, Hwang SJ et al (2011) Genetic Variants in Novel Pathways Influence Blood Pressure and Cardiovascular Disease Risk. *Nature* 478:103-9.

13. Kunes J, Zicha J (2009) The Interaction of Genetic and Environmental Factors in the Etiology of Hypertension. *Physiol Res* 58:S33-41.
14. Butt MS, Sultan MT (2011) Coffee and its consumption: Benefits and risks. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr* 51:363–73.
15. Ding M, Bhupathiraju SN, Satija A, van Dam RM, Hu FB (2014) Long-term coffee consumption and risk of cardiovascular disease: A systematic review and a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation* 129:643–59.
16. Gross G, Stepaniak U, Polak M, Micek A, Topor-Madry R, Stefler D, Szafraniec K, Pajak A (2016) Coffee consumption and risk of hypertension in the Polish arm of the HAPIEE cohort study. *Eur J Clin Nutr* 70:109-15.
17. Miranda AM, Steluti J, Fisberg RM, Marchioni DM (2017) Association between Coffee Consumption and Its Polyphenols with Cardiovascular Risk Factors: A Population-Based Study. *Nutrients* 9:E276. doi: 10.3390/nu9030276.
18. Geleijnse JM (2008) Habitual coffee consumption and blood pressure: An epidemiological perspective. *Vasc Health Risk Manag* 4: 963-70.
19. Mesas AE, Leon-Muñoz LM, Rodriguez-Artalejo F, Lopez-Garcia E (2011) The effect of coffee on blood pressure and cardiovascular disease in hypertensive individuals: A systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 94:1113-26.
20. Steffen M, Kuhle C, Hensrud D, Erwin PJ, Murad MH (2012) The effect of coffee consumption on blood pressure and the development of hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* 30:2245–54.
21. Noordzij M, Uiterwaal CSPM, Arends LR, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM (2005) Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens* 23:921-8.
22. Natella F, Nardini M, Belelli F, Scaccini C (2007) Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 86:604e9.
23. Fuentes E, Palomo I (2014) Mechanisms of endothelial cell protection by hydroxycinnamic acids. *Vasc. Pharmacol* 63:155–61.
24. Cornelis MC, El-Sohemy A, Kabagambe EK, Campos H (2006) Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. *JAMA* 295:1135–41.
25. Dik VK, Bueno-de-Mesquita HB, Van Oijen MG, Siersema PD, Uiterwaal CS, Van Gils CH, Van Duijnhoven FJ, Cauchi S, Yengo L, Froguel P, Overvad K, Bech BH, Tjønneland A, Olsen A et al (2014) Coffee and tea consumption, genotype-based CYP1A2 and NAT2 activity and colorectal cancer risk-results from the EPIC cohort study. *Int J Cancer* 135:401-12. doi: 10.1002/ijc.28655.
26. Wang T, Huang T, Kang JH, Zheng Y, Jensen MK, Wiggs JL, Pasquale LR, Fuchs CS, Campos H, Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Qi L (2017) Habitual coffee consumption and genetic predisposition to obesity: gene-diet interaction analyses in three US prospective studies. *BMC Med* 15:97. doi: 10.1186/s12916-017-0862-0.
27. Coffee and Caffeine Genetics Consortium, Cornelis MC, Byrne EM, Esko T, Nalls MA, Ganna A, Paynter N, Monda KL, Amin N, Fischer K, Renstrom F, Ngwa JS, Huikari V, Cavadiño A et al (2015) Genome-wide meta-analysis identifies six novel

- loci associated with habitual coffee consumption. *Mol Psychiatry* 20:647-56. doi: 10.1038/mp.2014.107.
28. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (2005) [Government Reseach]. Available: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2005/>.
29. Miranda AM, Steluti J, Fisberg RM, Marchioni DM (2016) Association between Polyphenol Intake and Hypertension in Adults and Older Adults: A Population-Based Study in Brazil. *PLoS One* 11:e0165791. doi: 10.1371/journal.pone.0165791.
30. Blanton CA, Moshfegh AJ, Baer DJ, Kretsch MJ (2006) The USDA Automated Multiple-Pass Method accurately estimates group total energy and nutrient intake. *J Nutr* 136:2594-99.
31. Hartig U, Haubrock J, Knueppel S, Boeing H, Consortium EFCOVAL (2011) The MSM program: Web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. *Eur J Clin Nutr* 65:S87–S91.
32. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia (2007) V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. *Arq Bras Cardiol* 89:e24–e79.
33. Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF et al (2003) International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 35:1381–95.
34. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
35. Myakishev MV, Khrapin Y, Hu S, Hamer DH (2001) High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res* 11:163-9.
36. Jee SH, He J, Whelton PK, Suh I, Klag MJ (1999) The effect of chronic coffee drinking on blood pressure: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Hypertension* 33:647-52.
37. Watanabe T, Arai Y, Mitsui Y, Kusaura T, Okawa W, Kajihara Y et al (2006) The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 28:439–49.
38. Zhao Y, Wang J, Ballevre O, Luo H, Zhang W (2012) Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertens Res* 35:370–4.
39. Yang A, Palmer AA, de Wit H (2010) Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology (Berl)* 211:245–57.
40. Brustolin S, Giugliani R, Félix TM (2010) Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res* 43(1):1-7.
41. Yang B, Fan S, Zhi X, Li Y, Liu Y, Wang D, He M, Hou Y, Zheng Q, Sun G (2014) Associations of MTHFR Gene Polymorphisms with Hypertension and Hypertension in Pregnancy: A Meta-Analysis from 114 Studies with 15411 Cases and 21970 Controls. *PLoS One* 9:e87497. doi: 10.1371/journal.pone.0087497.
42. Li WX, Liao P, Hu CY, Cheng F, Zhang T, Sun YY, Tang L, Wang MM, Liu KS, Liu D, Liu F (2017) Interactions of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms, Folate, and Homocysteine on Blood Pressure in a Chinese

- Hypertensive Population. *Clin Lab* 63:817-825. doi: 10.7754/Clin.Lab.2016.160918.
43. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E (2010) Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci* 75:R77–87.
44. Faber MS, Jetter A, Fuhr U (2005) Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97:125–34.
45. Nehlig A, Debry G (1994) Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee: a review. *Mutat Res* 317:145–62.
46. Gambier N, Marteau JB, Batt AM, Marie B, Thompson A, Siest G, Foernzler D, Visvikis-Siest S (2006) Interaction between CYP1A1 T3801C and AHR G1661A polymorphisms according to smoking status on blood pressure in the Stanislas cohort. *J Hypertens* 24:2199–205.
47. Guessous I, Dobrinas M, Katalik Z, Pruijm M, Ehret G, Maillard M, Bergmann S, Beckmann JS, Cusi D, Rizzi F, Cappuccio F, Cornuz J, Paccaud F, Mooser V, Gaspoz JM, Waeber G, Burnier M, Vollenweider P, Eap CB, Bochud M (2012) Caffeine intake and CYP1A2 variants associated with high caffeine intake protect non-smokers from hypertension. *Hum Mol Genet* 21(14):3283-92. doi: 10.1093/hmg/dds137.
48. Palatini P, Ceolotto G, Ragazzo F, Dorigatti F, Saladini F, Papparella I et al (2009) CYP1A2 genotype modifies the association between coffee intake and the risk of hypertension. *J Hypertens* 27:1594–601.

TABLES

Table 1 - Panel of genetic variants, minor allele frequency and Hardy-Weinberg equilibrium of the polymorphisms used to calculate the genetic risk score for blood pressure. ISA-Capital 2008. Sao Paulo, Brazil.

Polymorphisms	Location	Gene	Changes in DNA	MAF	Position
rs2470893	15q24	<i>CYP1A1/CYP1A2</i>	C→T	0.22	Upstream variant
rs2472297	15q24	<i>CYP1A1/CYP1A2</i>	C→T	0.10	Intergenic variant
rs6495122	15q24	<i>CPLX3/ULK3</i>	A→C	0.07	Intergenic variant
rs17367504	1p36	<i>MTHFR</i>	A→G	0.12	Intron variant

All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium (*P*-value >0.05).

CPLX3, complexin 3; *CYP1A1*, cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; *CYP1A2*, cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2; *MAF*, minor allele frequency; *MTHFR*, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; *ULK3*, unc-51 like kinase 3.

Table 2 - Genotype frequencies of the SNPs and general characteristics of the study population according to genotypes (N=533). ISA-Capital 2008. São Paulo, Brazil.

Characteristics	CYP1A1/CYP1A2 C>T (rs2470893)			p-value ^c	CYP1A1/CYP1A2 C>T (rs2472297)			p-value ^c	CPLX3/ULK3 A>C (rs6495122)			p-value ^c	MTHFR A>G (rs17367504)			p-value ^c
	C:C	C:T	T:T		C:C	C:T	T:T		A:A	A:C	C:C		A:A	A:G	G:G	
Total, % Sex, % ^a	58.0	39.6	2.4		80.7	18.9	0.4		85.9	14.1	0.0		76.2	23.0	0.8	
Male	56.3	41.4	2.3	0.768	77.8	21.4	0.8	0.363	90.2	9.8	0.0	0.031	77.2	22.7	0.1	0.161
Female	59.5	38.0	2.5		83.3	16.7	0.0		82.4	17.6	0.0		75.3	23.3	1.4	
Age (years), median (IQR) ^b	36 (28-48)	57 (42-68)	53 (33-58)	<0.001	42 (31-56)	47 (34-57)	53 (53-53)	0.179	43 (31-56)	47 (32-64)	---	0.241	43 (32-57)	42 (30-53)	52 (32-58)	0.390
Self-declared skin colour, % ^a																
White	53.0	43.4	35.7	0.040	75.4	23.9	0.6	0.063	81.7	18.3	0.0	0.019	78.0	21.1	0.9	0.372
Black	58.4	40.8	0.8		82.3	17.7	0.0		95.7	4.3	0.0		61.3	38.7	0.0	
Others (Mixed, Asian/ Indigenous)	66.9	32.5	0.6		90.0	10.0	0.0		91.0	9.0	0.0		75.7	23.5	0.8	
Smoking status, % ^a																
Non-smoker	61.7	36.0	2.3	0.074	85.7	14.3	0.0		85.5	14.5	0.0		76.4	22.8	0.8	
Former smoker	46.6	48.0	5.4		84.0	14.0	2.0	0.003	80.3	19.7	0.0	0.161	76.2	22.0	1.8	0.779
Current Smoker	58.1	41.5	0.4		66.1	33.9	0.0		91.0	9.0	0.0		75.7	24.3	0.0	
Leisure-time physical activity levels, % ^a																
Low	56.6	40.8	2.6	0.159	79.5	20.1	0.4	0.328	86.3	13.7	0.0	0.576	77.2	21.9	0.8	0.214
Moderate or high	69.3	29.9	0.8		90.7	9.3	0.0		82.8	17.2	0.0		67.7	31.8	0.5	
Blood pressure (mm Hg), % ^a																
Normal	65.0	32.2	2.8	0.007	81.6	17.9	0.5	0.708	84.9	15.1	0.0	0.068	74.7	24.3	1.0	0.027
High	37.3	62.7	0.0		76.6	23.4	0.0		92.4	7.6	0.0		91.7	8.3	0.0	
Coffee consumption (cups per day), % ^a																
<1	64.8	33.1	2.1		84.0	14.9	1.1		83.9	16.1			78.6	21.3	0.1	
1-3	55.2	41.8	3.0	0.310	81.0	19.0	0.0	0.430	85.4	14.6	0.0	0.638	76.8	22.3	0.9	0.646
>3	53.0	44.8	2.2		76.7	23.3	0.0		88.7	11.3	0.0		72.7	25.9	1.4	
Alcohol consumption (g/day), % ^a																
No	60.6	38.0	1.4	0.573	87.8	12.2	0.0	0.077	87.1	12.9	0.0	0.621	72.3	26.9	0.8	0.436
Yes	56.6	40.4	3.0		76.9	22.5	0.6		85.2	17.8	0.0		78.2	20.9	0.8	
Body Mass Index (kg/m ²), median (IQR) ^b	24.8 (22.5, 28.4)	26.1 (22.9, 29.9)	27.2 (23.9, 31.0)	0.017	25.8 (23.1, 29.9)	25.0 (22.7, 29.5)	---	0.770	25.8 (23.3, 29.5)	25.1 (22.8, 29.1)	---	0.480	25.6 (23.3, 29.4)	25.7 (21.3, 30.6)	28.7 (22.8, 30.6)	0.971
Caffeine intake (mg/d), median (IQR) ^b	91.0 (54.4,123.7)	90.5 (63.0,130.2)	95.3 (69.2,114.1)	0.595	93.0 (58.8,123.6)	85.7 (55.1, 132.4)	69.2 (69.2, 69.2)	0.948	92.8 (59.4, 130.2)	80.8 (33.2, 116.7)	---	0.178	87.8 (55.1, 118.0)	100.5 (69.7, 155.9)	112.7 (103.2, 139.7)	0.008
Total energy intake (kcal/d), median (IQR) ^b	1741.3 (1415.5, 2013.7)	1638.3 (1306.6, 2054.5)	1850.3 (1279.2, 2168.7)	0.348	1683.2 (1359.6, 2004.8)	1808.4 (1391.6, 2310.8)	1534.0 (1534.0, 1534.0)	0.189	1697.0 (1354.0, 2018.4)	1698.1 (1391.7, 2081.8)	---	0.831	1683.3 (1337.7, 2060.7)	1752.3 (1461.8, 2017.4)	1217.0 (1217.0, 1808.4)	0.416

^ap-value for the Chi-Square test;^bp-value for the Kruskal-Wallis test;^cThe p-value <0.05 was considered statistically significant.

The effect allele (EA) for rs2470893 was T; the EA for rs2472297 was T; the EA for rs6495122 was A, and the EA for rs17367504 was G.

The sample weight was considered for statistical analysis.

Table 3 – Crude and adjusted odds ratios (95% CI) for blood pressure (BP) across genetic risk score (GRS). ISA-Capital 2008. Sao Paulo, Brazil.

GRS	High BP	P-value ^a	High Systolic BP	P-value ^a	High Diastolic BP	P-value ^a
Individuals, %	11.5		18.6		14.0	
OR (95% IC)						
Model 1 (crude)	2.52 (1.63, 3.90)	<0.001	1.31 (0.88, 1.96)	0.186	1.80 (1.26, 2.56)	0.001
Model 2 (adjusted)	1.85 (1.19, 2.87)	0.007	2.30 (1.32, 4.01)	0.004	1.66 (1.10, 2.51)	0.016

Odds ratio (OR) and 95% Confidence Interval (CI) were calculated by using multiple logistic regression.

Model 1 – Crude

Model 2 – Adjusted for age, sex, race/skin color, smoking status, leisure-time physical activity, body mass index, current use of alcoholic beverages, total energy intake, sodium intake, and antihypertensive drugs.

^a The P-value <0.05 was considered statistically significant.

The sample weight was considered for statistical analysis.

The reference category considered in logistic regression analysis was GRS equal to zero (GRS=0).

High BP (SBP≥140 mmHg and/or DBP≥90 mmHg); high SBP (≥ 140 mmHg); high DBP (≥ 90 mmHg).

Table 4 – Genetic risk score (GRS)-coffee consumption interaction and associations between the GRS with high blood pressure (BP), high systolic BP and high diastolic BP stratified by categories of coffee consumption. ISA-Capital 2008. São Paulo, Brazil.

GRS	Total population ^a	Coffee consumption, cups per day			<i>P</i> -value for interaction ^b
		<1	1-3	>3	
High BP					
High BP/ normal BP, n	70/344	24/117	20/120	26/107	---
BP (mmHg), median (IQR)	198 (181, 216)	198 (179, 217)	196 (176, 210)	200 (186, 220)	
OR (95% CI)					
Model 1 (crude)	1.82 (1.28, 2.60)	1.94 (1.01, 3.72)	2.20 (1.08, 4.52)	3.57 (1.71, 7.45)	0.001
Model 2 (adjusted)	1.55 (1.06, 2.28)	1.15 (0.46, 2.87)	1.36 (0.58, 3.20)	5.09 (1.32, 19.7)	0.026
High Systolic BP					
High BP/ normal BP, n	169/364	58/123	53/127	58/114	---
Systolic BP (mmHg), median (IQR)	121 (111, 134)	121 (108, 133)	120 (111, 130)	124 (113, 138)	
OR (95% CI)					
Model 1 (crude)	2.03 (1.42, 2.90)	1.26 (0.50, 3.20)	3.04 (1.49, 6.24)	3.86 (1.83, 8.17)	<0.001
Model 2 (adjusted)	1.38 (1.02, 1.87)	0.55 (0.27, 1.14)	2.01 (0.95, 4.24)	2.14 (1.12, 4.11)	0.035
High Diastolic BP					
High BP/ normal BP, n	90/443	30/151	27/153	33/139	---
Diastolic BP (mmHg), median (IQR)	76 (69, 84)	76 (69, 85)	76 (68, 82)	76 (70, 85)	
OR (95% CI)					
Model 1 (crude)	1.45 (1.15, 1.82)	1.44 (0.91, 2.30)	1.68 (0.73, 3.84)	2.33 (1.44, 3.75)	0.002
Model 2 (adjusted)	1.36 (1.04, 1.78)	1.18 (0.63, 2.23)	1.56 (0.88, 2.78)	3.54 (1.17, 10.75)	0.026

Odds ratio (OR) and 95% Confidence Interval (CI) were calculated by using multiple logistic regression.

^a Interaction between coffee consumption and genetic risk score

Model 1 – Crude

Model 2 – Adjusted for age, sex, race/skin color, smoking status, leisure-time physical activity, body mass index, current use of alcoholic beverages, total energy intake, sodium intake, and antihypertensive drugs.

^b The *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

The sample weight was considered for statistical analysis.

High BP (SBP≥140 mmHg and/or DBP≥90 mmHg); high SBP (≥ 140 mmHg); high DBP (≥ 90 mmHg).

The reference category considered in logistic regression analysis was GRS equal to zero (GRS=0).

The reported OR values are based on one-point increments in GRS.

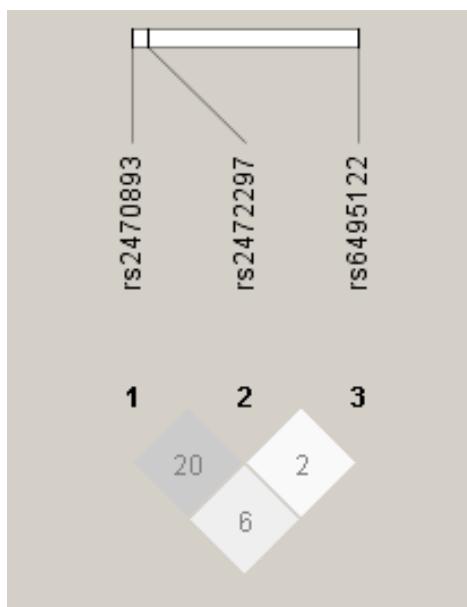
Supplementary Material

Figure S1 - Plot of pairwise linkage disequilibrium for polymorphisms in the *CYP1A1/CYP1A2* and *CPLX3/ULK3* regions (15q24) genotyped in the ISA-Capital study population. SNPs are listed from left to right at the top of the figure according to their position in the gene (5' to 3' with relative locations marked with a black line). Each square shows the pairwise comparison [r^2 value (*100)] between the 2 SNPs on either side of the square on the diagonal. The darker the square, the higher the r^2 value. Black, strong linkage disequilibrium; gray, uninformative; white, recombination.

SNP, single nucleotide polymorphism.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O café é uma das bebidas mais populares e amplamente consumidas no mundo. No Brasil, o consumo médio de café é de 4,9 kg per capita, com uma prevalência de ingestão de 79%, ou seja, o segundo alimento mais consumido no País. Após as análises dos dados oriundos do projeto ISA-Capital 2008, com uma amostra representativa de adultos e idosos residentes no Município de São Paulo, observou-se que o consumo médio de café foi de aproximadamente 140 mL/dia.

O café é uma mistura complexa de diversos compostos, incluindo a cafeína, os minerais, as fibras e outros componentes biologicamente ativos, como os diterpenos, cafestol e *kahweol*, e os polifenóis (principalmente, os ácidos fenólicos). No presente estudo, observa-se que essa bebida contribuiu com 70% da ingestão total de polifenóis, isto é, foi a principal fonte de polifenóis da dieta dos paulistanos.

Os polifenóis, por sua vez, influenciam a homeostase humana e o metabolismo e podem ter efeitos prejudiciais ou benéficos para o sistema cardiovascular. Neste contexto, alguns estudos epidemiológicos sugerem uma associação inversa entre o consumo de café e o risco de DCV, enquanto outros não evidenciam associação estatisticamente significativa, ou ainda relatam uma associação positiva. Assim, o debate público sobre a redução ou aumento do risco de DCV pelo consumo de café mantém-se relevante devido aos resultados controversos e inconsistentes sobre os efeitos cardiovasculares.

Os resultados do atual trabalho sugeriram que, os indivíduos que tomavam café de forma moderada (de uma a três xícaras por dia) apresentaram menores chances de PA elevada e concentrações plasmáticas aumentadas de homocisteína; e esse efeito protetor do consumo de café nestes fatores de risco provinha dos polifenóis.

No Brasil, não há evidências de outro trabalho que tenha avaliado o efeito do consumo de café e dos seus polifenóis em fatores de risco cardiovascular, nomeadamente, numa amostra de estudo de base populacional.

Além disso, constatou-se que o consumo de café pode interagir com a predisposição genética individual, influenciando a PA, isto é, a associação entre o escore genético de risco e a PA elevada varia de acordo com a quantidade de café consumido. Assim, indivíduos com maior pontuação no GRS parecem apresentar níveis de PA elevados, relacionados com um maior consumo de café (superior a três xícaras por dia).

Desta forma, ressalta-se que o mérito mais importante desta investigação é a ênfase atribuída ao consumo moderado de café, pelo seu efeito na regulação da PA e concentrações plasmáticas de homocisteína, sublinhando a importância de reduzir o seu consumo para doses diárias inferiores a três xícaras, particularmente em indivíduos geneticamente predispostos à PA elevada.

Nesta perspectiva, os presentes resultados promovem um avanço na pesquisa científica e adicionam evidências para um maior entendimento sobre o consumo de café e seu potencial efeito benéfico nas DCV, com implicações clínicas e de saúde pública.

No entanto, estas informações devem ser aprofundadas em estudos epidemiológicos de caráter longitudinal e novas linhas de investigação devem ser consideradas no que respeita à caracterização da composição química do café brasileiro.

7 REFERÊNCIAS

- ABIC - Associação Brasileira de Indústria de Café (online) [acesso em 28 de agosto de 2017]. Disponível em: <http://www.abic.com.br>.
- ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café. Estatísticas – Pesquisas. Tendências do Consumo de Café no Brasil em 2014 [Internet]. Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 2014 [acesso em 14 de novembro de 2017]. Disponível em: <http://abic.com.br/estatisticas/pesquisas/pesquisa-tendencias-de-consumo/>.
- Abrahão SA, Pereira RG, Lima AR, Ferreira EB, Malta MR. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. *Pesq agropec bras.* 2008;43(12):1799-804.
- Abrahão SA, Pereira RGF, Duarte SMS, Lima AR, Alvarenga DJ, Ferreira EB. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica L.*). *Ciênc agrotec.* 2010;34(2):414-20.
- Adeyemo A, Gerry N, Chen G, Herbert A, Doumatey A, Huang H, Zhou J, Lashley K, Chen Y, Christman M, Rotimi C. A genome-wide association study of hypertension and blood pressure in African Americans. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000564.
- Agardh EE, Carlsson S, Ahlbom A, Efendic S, Grill V, Hammar N, Hilding A, Stenson CGO. Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. *J Intern Med.* 2004;255:645-52.
- Akhabue E, Thiboutot J, Cheng JW, Vittorio TJ, Christodoulidis G, Grady KM, Lerakis S, Kosmas CE. New and emerging risk factors for coronary heart disease. *Am J Med Sci.* 2014;347(2):151-8.
- Alsene K, Deckert J, Sand P, de Wit H. Association between A2a receptor gene polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuro Psycho Pharmacology.* 2003;28(9):1694-702.
- Alves MCGP, Escuder MML. Plano de amostragem do ISA-Capital 2008 [acesso em 20 de fevereiro de 2014]. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/isa-sp/pdf/planoamostral2008.pdf>.
- Alves RC, Casal S, Oliveira B. Benefícios do café na saúde: Mito ou realidade? Quim Nova. 2009; 32(8):2169-80.
- Amin N, Byrne E, Johnson J, Chenevix-Trench G, Walter S, Nolte IM, kConFab Investigators, Vink JM, Rawal R, Mangino M, et al. Genome-wide association analysis of coffee drinking suggests association with CYP1A1/CYP1A2 and NRCAM. *Mol Psychiatry.* 2012;17:1116-29.
- Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2001;78(2-3):145-9.

- Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Étienne-Selloum N, Li H, Martínez MC, Schini-Kerth VB, Laher I. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr.* 2012;108(9):1532-49.
- Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Schindler PW, Burger HJ, Hemmerle H, Schubertb G, Belowb P, Herling AW. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6- phosphatase. *Arch Biochem Biophys.* 1997;339:315-22.
- Aro A, Tuomilehto J, Kostiainen E, Uusitalo U, Pietinen P. Boiled coffee increases serum low density lipoprotein concentration. *Metabolism.* 1987;36(11):1027-30.
- Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(Suppl):317S-5S.
- Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J.* 1988;116:1713-24.
- Bak AA, Grobbee DE. The effect on serum cholesterol levels of coffee brewed by filtering or boiling. *N Engl J Med.* 1989;321(21):1432-7.
- Bastos DHM, Rogero MM, Arêas JAG. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53:646.
- Battram DS1, Arthur R, Weekes A, Graham TE. The glucose intolerance induced by caffeinated coffee ingestion is less pronounced than that due to alkaloid caffeine in men. *J Nutr.* 2006;136(5):1276-80.
- Baudhuin L. Genetics of coronary artery disease: focus on genome-wide association studies. *Am J Transl Res.* 2009;1(3):221-34.
- Bidel S, Hu G, Tuomilehto J. Coffee consumption and Type 2 Diabetes – An Extensive Review. *CEJ Med.* 2008;3(1):9-19.
- Blanton CA, Moshfegh AJ, Baer DJ, Kretsch MJ. The USDA Automated Multiple-Pass Method accurately estimates group total energy and nutrient intake. *J Nutr.* 2006;136:2594-9.
- Bohn S, Ward N, Hodgson J, Croft K. Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. *Food Funct.* 2012;3:575-91.
- Bønaa K, Arnesen E, Thelle DS, Førde OH. Coffee and cholesterol: is it all in the brewing? The Tromsø Study. *BMJ.* 1988;297(6656):1103-4.
- Bonita JF, Mandarano M, Shuta D, Vinson J. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol Res.* 2007;55:187-98.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-33.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997;89:331-40.

- Brustolin S, Giugiani R, Félix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(1):1-7.
- Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *The Lancet.* 2005;366(9489):941-51.
- Butt MS, Sultan MT. Coffee and its consumption: Benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51:363-73.
- Bydlowski SP, Magnanelli AC, Chamone DAF. Hiperhomocisteína e doença vaso-oclusivas. *Arq Brás Cardiol São Paulo.* 1998;71(1):69-76.
- Cai L, Ma D, Zhang Y, Liu Z, Wang P. The effect of coffee consumption on serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr.* 2012;66:872-7.
- Cano-Marquina A, Tarín JJ, Cano A. The impact of coffee on health. *Maturitas.* 2013;75:7-21.
- Carratù B, Sanzini E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Ann 1st Super Sanitá.* 2005;41(1):7-16.
- Cartron E, Carbonneau MA, Fouret G, Descomps B, Leger CL. Specific Antioxidant Activity of Caffeoyl Derivatives and Other Natural Phenolic Compounds: LDL Protection against Oxidation and Decrease in the Proinflammatory Lysophosphatidylcholine Production. *J Nat Prod.* 2001;64:480-6.
- Carvalho VD, Chaufoun SM. Aspectos qualitativos do café. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte.* 1985;11(126):79-92.
- Ca valcante JWS, Santos PRM, Menezes MGF, Marques HO, Cavalcante LP, Pacheco WS. Influence of caffeine on blood pressure and platelet aggregation. *Arq Bras Cardiol.* 2000;75(2):102-105.
- Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(5):816-23.
- Childs E, Hohoff C, Deckert J, Xu K, Badner J, de Wit H. Association between ADORA2A and DRD2 polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuro Psycho Pharmacology.* 2008;33:2791-800.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr. The Seventh Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA.* 2003;289:2560-72.
- Christensen B, Mosdol A, Retterstol L, Landaas S, Thelle DS. Abstention from filtered coffee reduces the concentrations of plasma homocysteine and serum cholesterol--a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(3):302-7.
- Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agr.* 1999;79:362-72.
- Coffee and Caffeine Genetics Consortium, Cornelis MC, Byrne EM, Esko T, Nalls MA, Ganna A, Paynter N, Monda KL, Amin N, Fischer K, et al. Genome-wide meta-analysis

identifies six novel loci associated with habitual coffee consumption. *Mol Psychiatry*. 2015;20:647-56.

Corella D, Ordovas JM. Single nucleotide polymorphisms that influence lipid metabolism: interaction with dietary factors. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:341-90.

Cornelis MC, El-Sohemy A. Coffee, caffeine, and coronary heart disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10:745-51.

Cornelis MC, El-Sohemy A, Kabagambe EK, Campos H. Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2006;295(10):1135-41.

Cornelis MC, Monda KL, Yu K, Paynter N, Azzato EM, Bennett SN, Berndt SI, Boerwinkle E, Chanock S, Chatterjee N, et al. Genome-wide meta-analysis identifies regions on 7p21 (AHR) and 15q24 (CYP1A2) as determinants of habitual caffeine consumption. *PLoS Genet*. 2011;7:e1002033.

Cornelis MC. Coffee Intake. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2012;108:293-322.

Cornelis MC. Gene-Coffee Interactions and Health. *Curr Nutr Rep*. 2014;3:178-95.

Corrêa TA, Rogero MM, Mioto BM, Tarasoutchi D, Tuda VL, César LA, Torres EA. Paper-filtered coffee increases cholesterol and inflammation biomarkers independent of roasting degree: A clinical trial. *Nutrition*. 2013;29:977-81.

Costa RP. Efeitos do café filtrado e do café fervido sobre o perfil lipídico e a lipoperoxidação em pacientes hipercolesterolemicos. 2004. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo; 2004.

Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman AE, Booth LE, Ainsworth BE et al. International physical activity questionnaire: 12- country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(8):1381-95.

Cruz Filho RA, Corrêa LL, Ehrhardt AO, Cardoso GP, Barbosa GM. O papel da glicemia capilar de jejum no diagnóstico precoce do diabetes mellitus: correlação com fatores de risco cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(3):255-9.

Cuenca AMB, Andrade MTD, Noronha DP, Ferraz MLEF. Guia de apresentação de teses [guia na internet]. 2. ed. São Paulo: FSP/USP; 2008 [acesso em 01 de outubro 2017]. Disponível em: <http://www.biblioteca.fsp.usp.br/guia/>.

Curin Y, Andriantsitohaina R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep*. 2005;57(Suppl):97-107.

D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008; 117:743-753

D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood*. 1997;90(1):1-11.

Dauchet L, Amouyel P, Dallongeville J. Fruit and vegetable consumption and risk of stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Neurology*. 2005;65:1193-7.

- Dauchet L, Amouyel P, Dallongeville J. Fruits, vegetables and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6:599-608.
- De Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Epidemiol.* 2001;154:150-4.
- De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev.* 2002;54(4):599-618.
- De Roos B, Katan MB. Possible mechanisms underlying the cholesterol-raising effect of the coffee diterpene cafestol. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10:41-5.
- De Roos B, Van Tol A, Urgert R, Scheek LM, Van Gent T, Buyten- hek R, Princen HM, Katan MB. Consumption of French-press coffee raises cholestryl ester transfer protein activity levels before LDL cholesterol in normolipidaemic subjects. *J Int Med.* 2000;248(3):211-6.
- Defazio G, Martino D, Abbruzzese G, Girlanda P, Tinazzi M, Fabbrini G, Colosimo C, Aniello MS, Avanzino L, Buccafusca M, et al. Influence of coffee drinking and cigarette smoking on the risk of primary late onset blepharospasm: evidence from a multicentre case control study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007;78(8):877-9.
- Di Castelnuovo A, Giuseppe R, Iacoviello L, Gaetano G. Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease. *Eur J Intern Med.* 2012;23:15-25.
- Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R: Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension.* 2001;38:159-65.
- Dik VK, Bueno-de-Mesquita HB, Van Oijen MG, Siersema PD, Uiterwaal CS, Van Gils CH, Van Duijnhoven FJ, Cauchi S, Yengo L, Froguel P, et al. Coffee and tea consumption, genotype-based CYP1A2 and NAT2 activity and colorectal cancer risk-results from the EPIC cohort study. *Int J Cancer.* 2014;135:401-12.
- Ding M, Bhupathiraju SN, Satija A, van Dam RM, Hu FB. Long-term coffee consumption and risk of cardiovascular disease: a systematic review and a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation.* 2014;129(6):643-59.
- Ding M, Satija A, Bhupathiraju SN, Hu Y, Sun Q, Han J, Lopez-Garcia E, Willett W, van Dam RM, Hu FB. Association of Coffee Consumption with Total and Cause-Specific Mortality in Three Large Prospective Cohorts. *Circulation.* 2015;132:2305-15.
- Du Y, Melchert HU, Knopf H, Braemer-Hauth M, Gerding B, Pabel E. Association of serum caffeine concentrations with blood lipids in caffeine-drug users and nonusers – Results of German National Health Surveys from 1984 to 1999. *Eur J Epidemiol.* 2005;20(4):311-6.
- Duncan BB, Stevens A, Schmidt MI. Mortalidade por doenças crônicas no Brasil: situação em 2010. Em: Ministério da Saúde. *Saúde Brasil 2011: uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher.* Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde. 2012;93-104.

- Echeverri D, Montes FR, Cabrera M, Galán A, Prieto A. Caffeine's vascular mechanisms of action. *Int J Vasc Med.* 2010;2010:834060.
- Erlund I, Koli R, Alfthan G, Marniemi J, Puukka P, Mustonen P, Mattila P, Jula A. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:323-31.
- Esposito F, Morisco F, Verde V, Ritieni A, Alezio A, Caporaso N, Fogliano V. Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:595-601.
- Ewing, JA. Detecting alcoholism. The CAGE questionnaire. *JAMA.* 1984;252(14):1905-7.
- Faber MS, Jetter A, Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;97:125-34.
- Faerch K, Lau C, Tetens I, Pedersen OB, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Glümer C. A statistical approach based on substitution of macronutrients provides additional information to models analyzing single dietary factors in relation to type-2 diabetes in danish adults: The Inter99 Study. *J Nutr.* 2005;135:1177-82.
- Faller ALK, Fialho E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Rev Saúde Pública.* 2009;43(2):211-8.
- FAO - Food and Agriculture Organization. Coffee Pocketbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome; 2015.
- Fisberg R, Marchioni D, Previdelli AN, Martins AC, Mendes A, Timm AS, Gorgulho BM, Verly EJ, Steluti J, Brunacio KH, et al. Manual de Avaliação do Consumo Alimentar em estudos populacionais: a experiência do inquérito de saúde em São Paulo (ISA)/Universidade de São Paulo. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2012.
- Fisberg RM, Villar BS. Manual de receitas e Medidas caseiras para Cálculo de Inquéritos Alimentares: manual elaborado para auxiliar o processamento de inquéritos alimentares. São Paulo: Signus; 2002.
- Floegel A, Pischedla T, Bergmann MM, Teucher B, Kaaks R, Boeing H. Coffee consumption and risk of chronic disease in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Germany study. *Am J Clin Nutr.* 2012;95:901-8.
- Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999;51:83-133.
- Fried E, Levine DM, Kwiterovich PO, Diamond EL, Wilder NB, Moy TF, Pearson TA. The effect of filtered-coffee consumption on plasma lipid levels. *JAMA.* 1992;267(6):811-5.
- Fuentes E, Palomo I. Mechanisms of endothelial cell protection by hydroxycinnamic acids. *Vasc Pharmacol.* 2014;63:155-61.
- Galleano M, Pechanova O, Fraga CG. Hypertension, nitric oxide, oxidants, and dietary plant polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11(8):837-48.

- Gama GG, Mussi FC, Guimarães AC. Revisando os fatores de risco cardiovascular. *Rev enferm.* 2010;18(4):650-5.
- Gambier N, Marteau JB, Batt AM, Marie B, Thompson A, Siest G, Foernzler D, Visvikis-Siest S. Interaction between CYP1A1 T3801C and AHR G1661A polymorphisms according to smoking status on blood pressure in the Stanislas cohort. *J Hypertens.* 2006;24:2199-205.
- Garabone E, Rosa G. Possíveis benefícios do ácido clorogénico à saúde. *Alim Nutr.* 2007; 18(2):229-35.
- GBD 2015 - Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388:1459-544.
- Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003;26:3160-7.
- German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke (Dife). Department of Epidemiology. The Multiple Source Method (MSM). Version 1.0.1. 2012. Available from: <https://nugo.dife.de/msm>.
- Godos J, Pluchinotta FR, Marventano S, Buscemi S, Li Volti G, Galvano F, Grossi G. Coffee components and cardiovascular risk: beneficial and detrimental effects. *Int J Food Sci Nutr.* 2014;65(8):925-36.
- Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Blumberg JB, Ferri C. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose- intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J Nutr.* 2008;138:1671-6.
- Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr.* 2005a;81:611-4.
- Grassi D, Necozione S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg JB, Ferri C. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension.* 2005b;46:398-405.
- Graves JW. A survey of validated automated home blood pressure monitors available for the Internet shopper. *Blood Press Monit.* 2005;10:103-7.
- Gravina-Taddei CF, Michel Batlouni, Camila Sarteschi, Valéria T. Baltar, Nívea A. C. Salvarini, Marcelo C. Bertolami, José Eduardo M. R. Sousa. Hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. *Arq Bras Cardiol.* 2005;85(3):166-73.
- Greenberg JA, Axen KV, Schnoll R, Boozer CN. Coffee, tea and diabetes: the role of weight loss and caffeine. *Int J Obes (Lond).* 2005;29(9):1121-9.

- Grioni S, Agnoli C, Sieri S, Pala V, Ricceri F, Masala G, Saieva C, Panico S, Mattiello A, Chiodini P, et al. Espresso coffee consumption and risk of coronary heart disease in a large Italian Cohort. *PLoS One.* 2015;10:e0126550.
- Gross G, Jaccaud E, Huggett AC. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. *F Chem Toxic.* 1997;35:547-54.
- Grosso G, Stepaniak U, Topor-Madry R, Szafraniec K, Pajak A. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition.* 2014;30:1398-403.
- Grubben MJ, Boers GH, Blom HJ, Broekhuizen R, de Jong R, van Rijt L, de Ruijter E, Swinkels DW, Nagengast FM, Katan MB. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(2):480-4.
- Guenther PM, DeMaio TJ, Ingwersen LA, Berline M. The multiple-pass approach for the 24 h recall in the Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII) 1994±1996. In Proceedings of the International Conference on Dietary Assessment Methods, Boston, MA, USA; 1995.
- Guessous I, Dobrinas M, Katalik Z, Pruijm M, Ehret G, Maillard M, Bergmann S, Beckmann JS, Cusi D, Rizzi F, Cappuccio F, Cornuz J, Paccaud F, Mooser V, Gaspoz JM, Waeber G, Burnier M, Vollenweider P, Eap CB, Bochud M. Caffeine intake and CYP1A2 variants associated with high caffeine intake protect non-smokers from hypertension. *Hum Mol Genet.* 2012;21(14):3283-92.
- Guessous I, Eap C, Bochud M. Blood Pressure in Relation to Coffee and Caffeine Consumption. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16:468.
- Guo X, Tresserra-Rimbau A, Estruch R, Martínez-González M, Medina-Remón A, Castañer O, Corella D, Salas-Salvadó J, Lamuela-Raventós RM. Effects of Polyphenol, Measured by a Biomarker of Total Polyphenols in Urine, on Cardiovascular Risk Factors After a Long-Term Follow-Up in the PREDIMED Study. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2572606.
- Habauzit V, Morand C. Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis.* 2012;3(2):87-106.
- Halal SLM. Composição, Processamento e Qualidade do Café. Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas; 2008.
- Hammar N, Andersson T, Aldredsson L, Reuterwall C, Nilsson T, Hallqvist J, et al. SHEEP and the VHEEP study. Association of boiled filtered coffee with incidence of first nonfatal myocardial infarction: the SHEEP and the VHEEP study. *J Intern Med.* 2003;253:653-9.
- Haaponen P, Voutilainen S, Tuomainen TP, Salonen JT. Catecholo-methyltransferase gene polymorphism modifies the effect of coffee intake on incidence of acute coronary events. *PLoS ONE.* 2006;1:e117.
- Haaponen P, Voutilainen S, Salonen JT. Coffee drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. *J Nutr.* 2004;134(9):2381-6.

- Harikumar K, Althaf SA, Kumar BK, Ramunaik M, Suvarna CH. A Review on Hyperlipidemic. International Journal of Novel Trends In Pharmaceutical Sciences. 2013;3(4).
- Hartley TR, Sung BH, Pincomb GA. Hypertension risk status and effect of caffeine on blood pressure. *Hypertension*. 2000;36:137-41.
- Hartwig U, Haubrock J, Knueppel S, Boeing H, EFCOVAL Consortium. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65:S87-S91.
- Havulinna AS, Kettunen J, Ukkola O, Osmond C, Eriksson JG, Kesäniemi YA, Jula A, Peltonen L, Kontula K, Salomaa V, Newton-Cheh C. A blood pressure genetic risk score is a significant predictor of incident cardiovascular events in 32,669 individuals. *Hypertension*. 2013;61(5):987-94.
- Hendrani AD, Adesiyun T, Quispe R, Jones SR, Stone NJ, Blumenthal RS, Martin SS. Dyslipidemia management in primary prevention of cardiovascular disease: Current guidelines and strategies. *World J Cardiol*. 2016; 8(2):201-10.
- Herrmann H. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Lebensm Unters Forsch*. 1988;186:1-5.
- Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46:101-23.
- Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005;6(2):95-108.
- Hodgson JM, Burke V, Beilin LJ, Croft KD, Pudsey IB. Can black tea influence plasma total homocysteine concentrations? *Am J Clin Nutr*. 2003;77(4):907-11.
- Hollman PC, Geelen A, Kromhout D. Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *J Nutr*. 2010;140:600-4.
- Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA*. 2002;288:2569-78.
- Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O. Adenosine A_{2A}, but not A₁, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci*. 2005;8:858-9.
- Hung CF, Breen G, Czamara D, Corre T, Wolf C, Kloiber S, Bergmann S, Craddock N, Gill M, Holsboer F, et al. A genetic risk score combining 32 SNPs is associated with body mass index and improves obesity prediction in people with major depressive disorder. *BMC Med*. 2015;13:86.
- Husemoen LL, Thomsen TF, Fenger M, Jorgensen T. Effect of lifestyle factors on plasma total homocysteine concentrations in relation to MTHFR (C677T) genotype. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58:1142-50.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa da população. IBGE. [Online] Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro. 2014.

ICO - International Coffee Organization. Trade Statistics 2015/2016 (online) [acesso em 21 de setembro de 2017]. Disponível em: http://www.ico.org/profiles_e.asp.

ICO - International Coffee Organization. Aspectos botânicos [acesso em 11 de novembro de 2017]. Disponível online: http://www.ico.org/pt/botanical_p.asp.

International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, Smith AV, Tobin MD, Verwoert GC, Hwang SJ, CARDIoGRAM consortium; CKDGen Consortium; KidneyGen Consortium; EchoGen consortium; CHARGE-HF consortium, et al. Genetic Variants in Novel Pathways Influence Blood Pressure and Cardiovascular Disease Risk. *Nature*. 2011;478:103-9.

Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(3):613-21.

James JE. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. *Psychosom Med*. 2004; 66:63-71.

Jee SH, He J, Appel LJ, Whelton PK, Suh I, Klag MJ. Coffee consumption and serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Am J Epidemiol*. 2001;153(3):353-62.

Jee SH, He J, Whelton PK, Suh I, Klag MJ. The effect of chronic coffee drinking on blood pressure: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Hypertension*. 1999;33:647-52.

Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:728-33.

Josse AR, Da Costa LA, Campos H, El-Sohemy A. Associations between polymorphisms in the AHR and CYP1A1-CYP1A2 gene regions and habitual caffeine consumption. *Am J Clin Nutr*. 2012;96:665-71.

Keijzers GB, De Galan BE, Tack CJ, Smits P. Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care*. 2002;25(2):364-9.

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

Klag MJ, Wang NY, Meoni LA, Brancati FL, Cooper LA, Liang KY, et al. Coffee intake and risk of hypertension. *Arch Int Med*. 2002;162:657-62.

Koppelstaetter F, Poeppel TD, Siedentopf CM, Ischebeck A, Kolbitsch C, Mottaghay FM, Felber SR, Jaschke WR, Krause BJ. Caffeine and cognition in functional magnetic resonance imaging. *J Alzheimers Dis*. 2010;20 (Suppl 1):S71-84.

- Kunes J, Zicha J. The Interaction of Genetic and Environmental Factors in the Etiology of Hypertension. *Physiol Res.* 2009;58:S33-41.
- Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999;48:937-42.
- Lancaster T, Muir J, Silagy C. The effects of coffee on serum lipids and blood pressure in a UK population. *J Royal Soc Medicine.* 1994;87:506-7.
- LANPOP - Laboratório de Avaliação Nutricional de Populações. Guia para realização do exame de antropometria. São Paulo: Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.
- Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A, Glazer NL, Morrison AC, Johnson AD, Aspelund T, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nature Genet.* 2009;41:677-87.
- Li WX, Liao P, Hu CY, Cheng F, Zhang T, Sun YY, Tang L, Wang MM, Liu KS, Liu D, Liu F. Interactions of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms, Folate, and Homocysteine on Blood Pressure in a Chinese Hypertensive Population. *Clin Lab.* 2017;63:817-25.
- Lim NK, Lee JY, Lee JY, Park HY, Cho MC. The Role of Genetic Risk Score in Predicting the Risk of Hypertension in the Korean population: Korean Genome and Epidemiology Study. *PLoS One.* 2015;10(6):e0131603.
- Lima FA, Sant'ana AEG, Ataíde TR; Omena CMB; Menezes MES; Vasconcelos SML. Café e saúde humana: um enfoque nas substâncias presentes na bebida relacionadas às doenças cardiovasculares. *Rev Nutr Campinas.* 2010;23(6):1063-73.
- Liu C, Li H, Qi Q, Lu L, Gan W, Loos RJ, Lin X. Common variants in or near FGF5, CYP17A1 and MTHFR genes are associated with blood pressure and hypertension in Chinese Hans. *J Hypertens.* 2011;29:70-5.
- Liu J, Sui X, Lavie CJ, Hebert JR, Earnest CP, Zhang J, Blair SN. Association of coffee consumption with all-cause and cardiovascular disease mortality. *Mayo Clin Proc.* 2013;88:1066-74.
- Lopes SLB, Lopes HHMC, Vannucchi H. A hiperhomocisteinemia como fator de risco cardiovascular: perspectivas atuais. *Rev Med.* 2010;89(1):1-11.
- Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB, van Dam RM. Coffee consumption and risk of stroke in women. *Circulation.* 2009;119:1116-23.
- Lopez-Gracia E, Van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Manson JE, Stampfer MJ, Rexrode KM, Hu FB. Coffee consumption and coronary heart disease in men and women. *Circulation.* 2006;113:2045-53.
- Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(1):77-84.

- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:727-47.
- Marcucci CT, Benassi MT, Almeida MB, Nixdorf SL. Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros. *Quim Nova.* 2013; 36(4):544-8.
- Matsudo S, Araujo T, Matsudo V, Andrade D, Andrade E, Oliveira LC, et al. Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no brasil. *Revista brasileira de atividade física e saúde.* 2001;6(2):5-18.
- Matsui T, Ueda T, Oki T, Sugita K, Terahara N, Matsumoto K. Alpha- glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 2001;49:1952-6.
- May AL, Kuklina EV, Yoon PW. Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adolescents, 1999-2008. *Pediatrics.* 2012;129(6):1035-41.
- Medina MA, Urdiales JL, Amores-Sanches M. Roles of homocysteine in cell metabolism. *Eur J Biochem.* 2001;268(14):3871-82.
- Medina-Remón A, Estruch R, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventos RM. The effect of polyphenol consumption on blood pressure. *Mini Rev Med Chem.* 2013;13(8):1137-49.
- Meier JJ, Hucking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegel WH, Nauck MA. Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2001;50:2497-504.
- Menezes HC. Variação dos monoisômeros e diisômeros do ácido cafeoilquínico com maturação de café. Tese (Doutorado) em Tecnologia de Alimentos. Campinas: UNICAMP; 1994.
- Mesas AE, Leon-Muñoz LM, Rodriguez-Artalejo F, Lopez-Garcia E. The effect of coffee on blood pressure and cardiovascular disease in hypertensive individuals: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2011;94:1113-26.
- Miller M. Dyslipidemia and cardiovascular risk: the importance of early prevention. *Q J Med.* 2009;102:657-67.
- Miller S, Dykes D, Poleski H. A single salting out procedures for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids REs.* 1988;16(3):1215-16.
- Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA, Jacobs DR Jr. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:895-909.
- Miranda AM, Steluti J, Fisberg RM, Marchioni DM. Dietary intake and food contributors of polyphenols in adults and elderly adults of São Paulo: A population-based study. *Br J Nutr.* 2016;115:1061–70.
- Miyagi Y, Miwa K, Inoue H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol.* 1997;80:1627-31.

- Miyake Y, Kono S, Nishiwaki M, Hamada H, Nishikawa H, Koga H, Ogawa S. Relationship of coffee consumption with serum lipids and lipoproteins in Japanese men. *Ann Epidemiol.* 1999;9:121-6.
- Moline J, Bukharovich IF, Wolff MS, Phillips R. Dietary flavonoids and hypertension: is there a link? *Med Hypotheses.* 2000;55:306-9.
- Monteiro MC, Trugo LC. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim Nova.* 2005;28(4):637-41.
- Moon MK, Lee YJ, Kim JS, Kang DG, Lee HS. Effect of caffeic acid on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Biol Pharm Bull.* 2009;32:1371-7.
- Moreira RFA, Trugo LC, De Maria CAB. Componentes voláteis do café torrado. Parte II: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Quim Nova.* 2000;23(2):195-203.
- Moura AAG, Carvalho EF, Silva NJC. Repercussão das doenças crônicas não-transmissíveis na concessão de benefícios pela previdência social. *Ciênc saúde coletiva.* 2007;12(6):1661-72.
- Moutaery KA, Deed SA, Khan HA, Tariq M. Caffeine impairs short-term neurological outcome after concussive head injury in rats. *Neurosurgery.* 2003;53:704-12.
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2016;133:e38-360.
- MS - Ministério da Saúde. DATASUS. Indicadores e Dados Básicos Brasil; 2012 [acesso em 28 de agosto de 2017]. Disponível em: www.datasus.gov.br/ibd..
- Mubarak A, Bondonno CP, Liu AH, Considine MJ, Rich L, Mas E, Croft KD, Hodgson JM. Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: A randomized trial. *J Agric Food Chem.* 2012;60:9130-6.
- Muley A, Muley P, Shah M. Coffee to reduce risk of type 2 diabetes?: a systematic review. *Curr Diabetes Rev.* 2012;8(3):162-8.
- Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Alfthan G, Virtanen JK, Rissanen TH, Happonen P, Nyysönen K, Kaikkonen J, Salonen R, Salonen JT. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: A clinical trial. *Free Radic Biol Med.* 2005;38:527-34.
- Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, Hamer DH. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res.* 2001;11:163-9.
- Nair KG, Ashavaid TF, Nair SR, Eghlim FF. The genetic basis of hiperhomocysteinemia. *Indian Heart J.* 2000;52:S16-7.
- Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Saganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors.* 2000;13:49-54.

- Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic Biol Med.* 1995;19:541-52.
- Natella F, Nardini M, Belelli F, Scaccini C. Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:604-9.
- Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem.* 2002;50:6211-6.
- Nehlig A, Arnaud JP, Namer IJ. SPECT assessment of brain activation induced by caffeine: no effect on areas involved in dependence. *Dialogues Clin Neurosci.* 2010;12(2):255-63.
- Nehlig A, Debry G. Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee: a review. *Mutat Res.* 1994;317:145-62.
- Nelson RH. Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Prim Care.* 2013;40(1):195-211.
- Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J Bras Patol Med Lab.* 2004;40(5):311-20.
- Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database.* 2010.
- Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, Najjar SS, Zhao JH, Heath SC, Eyheramendy S, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nature Genet.* 2009;41:666-76.
- Niu WQ, You YG, Qi Y. Strong association of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism with hypertension and hypertension-in-pregnancy in Chinese: a meta-analysis. *J Hum Hypertens.* 2012;26(4):259-67.
- Noordzij M, Uiterwaal CSPM, Arends LR, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM. Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens.* 2005;23:921-8.
- Nurminen ML, Niittynen L, Korpela R, Vapaatalo H. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53:831-9.
- O'Keefe JH, Bhatti SK, Patil HR, Di Nicolantonio JJ, Lucan SC, Lavie CJ. Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:1043-51.
- Okamura T. Dyslipidemia and Cardiovascular Disease: A Series of Epidemiological Studies in Japanese Populations. Young Investigator Award Winner's Special Article. *J Epidemiol.* 2010;20(4):259-65.
- O'Keefe JH, Bhatti SK, Patil HR, DiNicolantonio JJ, Lucan SC, Lavie CJ. Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:1043-51.

- Oliveira DM, Bastos DH. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim Nova*. 2011;34(6):1051-6.
- Olthof MR, Hollman PC, Zock PL, Katan MB. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases total homocysteine concentrations in humans. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:532-8.
- Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, Veldre G, Döring A, Viigimaa M, Söber S, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet*. 2009;18:2288-96.
- Ovaskainen ML, Torronen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr*. 2008;138:562-6.
- Palatini P, Ceolotto G, Ragazzo F, Dorigatti F, Saladini F, Papparella I, Mos L, Zanata G, Santonastaso M. CYP1A2 genotype modifies the association between coffee intake and the risk of hypertension. *J Hypertens*. 2009;27:1594-601.
- Panagiotakos DB, Lionis C, Zeimbekis A, Makri K, Bountziouka V, Economou M, Micheli M, Tsakountakis N, Metallinos G, Polychronopoulos E. Long-term moderate coffee consumption is associated with lower prevalence of diabetes mellitus among elderly non-tea drinkers from the Mediterranean Islands (MEDIS Study). *Rev Diabetic Stud*. 2007;4(2):105-12.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2(5):270-8.
- Penafort AG. Padrão de consumo de café e de cafeína de um grupo populacional no nordeste brasileiro: risco a saúde ou não? Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza; 2008.
- Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: a possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:419-26.
- Pereira MA, Parker ED, Folsom AR. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: an 11-year prospective study of 28,812 postmenopausal women. *Arch Inter Med*. 2006;166:1311-16.
- Pérez CM, Ortiz AP, Fuentes-Mattei E, Velázquez-Torres G, Santiago D, Giovanetti K, Bernabe R, Lee MH, Yeung SC. High prevalence of cardiometabolic risk factors in hispanic adolescents: correlations with adipocytokines and markers of inflammation. *J Immigr Minot Health*. 2014;16(5):865-73.
- Pérez-Jiménez J, Fezeu L, Touvier M, Arnault N, Manach C, Hercberg S, Galan P, Scalbert A. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(6):1220-8.

- Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database. *J. Agric Food Chem.* 2010;58(8).
- Pietinen P, Geboers J, Kesteloot H. Coffee consumption and serum cholesterol: an epidemiological study in Belgium. *Int J Epidemiol.* 1988;17(1):98-104.
- Pimentel GD, Zemdegs JCS, Theodoro JA, Mota JF. Does long-term coffee intake reduce type 2 diabetes mellitus risk? *Diabetol Metab Syndr.* 2009;1(1):6.
- Pinheiro ABV, Lacerda EM de A, Benzecri EH, Gomes MC da S, Costa, VM da. Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras. 5 ed. São Paulo: Atheneu; 2008.
- Pinto WJ, Areas MA, Marialva JE, Cardoso SMG, Pinto EG. Homocisteína e risco cardiovascular. *Rev Ciênc Med Campinas.* 2009;18(5/6):259-68.
- Poian AT. Regulação e integração do metabolismo durante o jejum. Capítulo 8. In: Poian AT da Carvalho-Alves PC de. Hormônios e metabolismo. Integração e correlações clínicas. Ed. Atheneu. São Paulo. 2005.
- Ranheim T, Halvorsen B. Coffee consumption and human health-beneficial or detrimental?-Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49: 274-84.
- Raper N, Perloff B, Ingwersen L, Steinfeldt L, Anand J. An overview of USDA's Dietary Intake Data System. *J Food Compos Anal.* 2004;17:545-55.
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexo E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: An expert opinion. *Clin Chem.* 2004;50:3-32.
- Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr.* 2000;130:2120S-6S.
- Renda G, Zimarino M, Antonucci I, Tatasciore A, Ruggieri B, Bucciarelli T, Prontera T, Stuppia L, De Caterina R. Genetic determinants of blood pressure responses to caffeine drinking. *Am J Clin Nutr.* 2012;95:241-8.
- Retey JV, Adam M, Khatami R, Luhmann UF, Jung HH, Berger W, Landolt HP. A genetic variation in the adenosine A_{2A} receptor gene (ADORA2A) contributes to individual sensitivity to caffeine effects on sleep. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81:692-8.
- Reunanen A, Heliövaara M, Aho K. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet.* 2003;361(9358):702-3.
- Ribeiro AG, Cotta RMM, Ribeiro SMR. A promoção da saúde e a prevenção integrada dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2012;17(1):7-17.
- Richelle M, Tavazzi I, Offord E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *J Agric Food Chem.* 2001;49(7):3438-42.

- Rocha R, Martins W. Manual de prevenção cardiovascular. 1^a edição. Rio de Janeiro; 2017.
- Rodrigues IM, Klein LC. Boiled or filtered coffee? Effects of coffee and caffeine on cholesterol, fibrinogen and C-reactive protein. *Toxicol Rev.* 2006;25:55-69.
- Rodriguez de Sotillo DV, Hadley M, Sotillo JE. Insulin receptor exon 11+/- is expressed in Zucker (fa/fa) rats, and chlorogenic acid modifies their plasma insulin and liver protein and DNA. *J Nutr Biochem.* 2006;17(1):63-71.
- Rogers PJ, Hohoff C, Heatherley SV, Mullings EL, Maxfield PJ, Evershed RP, Deckert J, Nutt DJ. Association of the anxiogenic and alerting effects of caffeine with ADORA2A and ADORA1 polymorphisms and habitual level of caffeine consumption. *Neuro Psycho Pharmacology.* 2010;35:1973-83.
- Rossetti RP. Determinação de fenóis totais em frutos do café: Avaliações em diferentes fases de maturação. Dissertação (Mestrado em ciências) Universidade de São Paulo. São Carlos; 2007.
- Rothwell JA, Medina-Remón A, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Knaze V, Slimani N, Scalbert A. Effects of food processing on polyphenol contents: A systematic analysis using Phenol-Explorer data. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59:160-70.
- Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Medina-Ramon A, M'Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database.* 2013.
- Ruel G, Pomerleau S, Couture P, Lemieux S, Lamarche B, Couillard C. Favourable impact of low-calorie cranberry juice consumption on plasma HDL-cholesterol concentrations in men. *Br J Nutr.* 2006;96:357-64.
- Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C/A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;47:445-9.
- Salazar-Martinez E, Willett WC, Ascherio A, Manson JE, Leitzmann MF, Stampfer MJ, Hu FB. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Int Med.* 2004;140(1):1-8.
- Salva TJG, Lima VB. A composição química do café e as características da bebida e do grão. *O agrônomo.* 2007;59(1):57-9.
- Salvaggio A, Periti M, Miano L, Zambelli C. Association between habitual coffee consumption and blood pressure levels. *J Hypertens.* 1990;8:585-90.
- Santos RM, Lima DR. Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: a mini-review. *Eur J Nutr.* 2016;55(4):1345-58.
- Saw SM, Yuan JM, Ong CN, Arakawa K, Lee HP, Coetzee GA, Yu MC. Genetic, dietary and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:232-9.

- SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. 7^a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. 2016;107(Suppl. 3).
- SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. 2017;109(2):Supl.1.
- SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2007;88 (Suppl. 1):2-19.
- SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. Arq Bras Cardiol. 2007;89(3):e24-e79.
- SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016). Rio de Janeiro; 2016.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. Am J Clin Nutr. 2005;81(suppl):215S–7S.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr. 2005;45:287-306.
- Schaan BD, Harzheim E, Gus I. Perfil de risco cardíaco no diabetes mellitus e na glicemia de jejum alterada. Rev Saúde Pública. 2004;38:4
- Setten J Van, Isgum I, Smolonska J, Ripke S, Jong PA De, Oudkerk M, et al. Genome-wide association study of coronary and aortic calcification implicates risk loci for coronary artery disease and myocardial infarction. Atherosclerosis. 2013;228(2):400-5.
- Shattat GF. A Review Article on Hyperlipidemia: Types, Treatments and New Drug Targets. Biomed & Pharmacol J. 2014;7(2):399-409.
- Shearer J, Farah A, de Paulis T, Bracy DP, Pencek RR, Graham TE, Wasserman DH Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. J Nutr. 2003;133(11):3529-32.
- Silva DCF, Nascimento MA, Moreira AVB. A Verificação da presença de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes em amostras de café. Nutrire Rev Soc Bras Alim Nutr. 2007;32(1):41-58.
- Simopoulos AP. Nutrigenetics/nutrigenomics. Annual review of public health. 2010;31:53-68.
- Siqueira ASE, Siqueira-Filho AG, Land MGP. Análise do Impacto Econômico das Doenças Cardiovasculares nos Últimos Cinco Anos no Brasil. Arq Bras Cardiol. 2017;109(1):39-46.
- Smith JA, Ware EB, Middha P, Beacher L, Kardia SLR. Current Applications of Genetic Risk Scores to Cardiovascular Outcomes and Subclinical Phenotypes. Curr Epidemiol Rep. 2015;2:180-90.
- Smits P, Thien T, Laar A. Circulatory effects of coffee in relation to the pharmacokinetics of caffeine. American Journal of Cardiology. 1985;56:958-9.
- Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. Rev Nutr. 2002;15(1):71-81.

- Sofi F, Conti AA, Gori AM, Eliana Luisi ML, Casini A, Abbate M, Gensini GF. Coffee and consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(3):209-23.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat Res.* 2005;579:200-13.
- Soriguer F, Rojo-Martinez G, De Antonio IE. Coffee consumption and type 2 diabetes mellitus. *Ann Inter Med.* 2004;141:321-3.
- Souza AM, Pereira RA, Yokoo EM, Levy RB, Sichieri R. Alimentos mais consumidos no Brasil: Inquérito Nacional de Alimentação 2008–2009 (Most consumed foods in Brazil: National Dietary Survey 2008–2009). *Rev Saúde Publica.* 2013;47:90S-199S.
- Speer K, Kölling-Speer I. The lipid fraction of the coffee bean. *Braz J Plant Physiol.* 2006;18(1):201-216.
- Splaver A, Lamas GA, Hennekens CH. Homocysteine and cardiovascular disease: biological mechanisms, observational epidemiology, and the need for randomized trials. *Am Heart J.* 2004;148:34-40.
- Stamler J, Neaton JD. The Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) - Importance Then and Now. *JAMA.* 2008;300(11):1343-5.
- Steffen M, Kuhle C, Hensrud D, Erwin PJ, Murad MH. The effect of coffee consumption on blood pressure and the development of hyper-tension: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Hypertension.* 2012;30:2245-54.
- Stensvold I, Tverdal A, Foss OP. The effect of coffee on blood lipids and blood pressure. Results from a Norwegian cross-sectional study, men and women, 40–42 years. *J Clin Epidemiol.* 1989;42:877-84.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004;500(1-3):299-313.
- Strandhagen E, Zetterberg H, Aires N, Palmer M, Rymo L, Blennow K, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is a major determinant of coffee-induced increase of plasma homocysteine: a randomized placebo controlled study. *Int J Mol Med.* 2004;13(6):811-5.
- Suarez-Kurtz G. Farmacogenômica e a diversidade genética da população brasileira. *Cadernos de Saúde Pública.* 2009;25(8):1650-1.
- Sulem P, Gudbjartsson DF, Geller F, Prokopenko I, Feenstra B, Aben KK, Franke B, den Heijer M, Kovacs P, Stumvoll M, et al. Sequence variants at CYP1A1-CYP1A2 and AHR associate with coffee consumption. *Hum Mol Genet.* 2011;20:2071-7.
- Suzuki A, Yamamoto N, Jokura H, Yamamoto M, Fujii A, Tokimitsu I, Saito I. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2006;24:1065-73.

- Takeuchi D, Isono M, Katsuya T, Yamamoto K, Yokota M, Sugiyama T, Nabika T, Fujioka A, Ohnaka K, Asano H, et al. Blood pressure and hypertension are associated with 7 loci in the Japanese population. *Circulation*. 2010;121:2302-9.
- Tavares C, Sakata RK. Cafeína para o tratamento de dor. *Rev Bras Anestesiol*. 2012;62(3):387-401.
- Thelle DS, Arnesen E, Førde OH. The Tromsø heart study. Does coffee raise serum cholesterol? *N Engl J Med*. 1983;308(24):1454-7.
- Tresserra-Rimbau A, Medina-Remón A, Pérez-Jiménez J, Martínez-González MA, Covas MI, Corella D, Salas-Salvadó J, Gómez-Gracia E, Lapetra J, Arós F, et al. Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23:53-9.
- Tresserra-Rimbau A, Rimm EB, Medina-Remón A, Martínez-González MA, de la Torre R, Corella D, Salas-Salvadó J, Gómez-Gracia E, Lapetra J, Arós F, et al.; PREDIMED Study Investigators. Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014a;24(6):639-47.
- Tresserra-Rimbau A, Rimm EB, Medina-Remón A, Martínez-González MA, López-Sabater MC, Covas MI, Corella D, Salas-Salvadó J, Gómez-Gracia E, Lapetra J, et al. Polyphenol intake and mortality risk: a re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Med*. 2014b;12:77.
- Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kyriacos KE. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010;208:3-9.
- Uiterwaal CSPM, Verschuren WM, Bueno-de-Mesquita HB, Ocké M, Geleijnse JM, Boshuizen HC, et al. Coffee intake and incidence of hypertension. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:718-23.
- Urgert R, Katan MB. The cholesterol-raising factor from coffee beans. *J R Soc Med*. 1996;89(11):618-23.
- Urgert R, Katan MB. The cholesterol-raising factor from coffee beans. *Annu Rev Nutr*. 1997;17:305-24.
- Urgert R, Schulz AG, Katan MB. Effects of cafestol and kahweol from coffee grounds on serum lipids and serum liver enzymes in humans. *Am J Clin Nutr*. 1995;61(10):149-54.
- Urgert R, van der Weg G, Kosmeijer-Schuil TG, van de Bovenkamp P, Hovenier R, Katan MB. Levels of the Cholesterol-Elevating Diterpenes Cafestol and Kahweol in Various Coffee Brews. *J Agric Food Chem*. 1995;43(8):2167-72.
- Urgert R, van Vliet T, Zock PL, Katan MB. Heavy coffee consumption and plasma homocysteine: a randomised controlled trial in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(5):1107-10.
- Van Dam RM, Feskens EJ. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 2002;360(9344):1477-8.

- Van Dam RM, Feskens EJM, Kromhout D. Coffee consumption in relation to hyperinsulinemia and glucose intolerance in elderly men. *Ann Nutr Metab.* 2003;47:319-666.
- Van Dam RM, Hu FB. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes. A systematic review. *JAMA.* 2005;294(1):97-104
- Van Dam RM. Coffee consumption and the decreased risk of diabetes mellitus type 2. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2006;150(33):1821-5.
- Verhoef P, Pasman WJ, Van Vliet T, Urgert R, Katan MB. Contribution of caffeine to the homocysteine-raising effect of coffee: a randomized controlled trial in humans. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(6):1244-8.
- Vilahur G, Badimon JJ, Bugiardini R, Badimon L. Perspectives: The burden of cardiovascular risk factors and coronary heart disease in Europe and worldwide. *European Heart Journal Supplements.* 2014;16:A7–A11.
- Vita JA. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(Suppl):292S-7S.
- Wang J, Tang L, Wang JS. Biomarkers of Dietary Polyphenols in Cancer Studies: Current Evidence and Beyond. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:732302.
- Wang T, Huang T, Kang JH, Zheng Y, Jensen MK, Wiggs JL, Pasquale LR, Fuchs CS, Campos H, Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Qi L. Habitual coffee consumption and genetic predisposition to obesity: gene-diet interaction analyses in three US prospective studies. *BMC Med.* 2017;15:97.
- Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K, Xu Y, Wu JM. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med.* 2002;9:77-9.
- Watanabe T, Arai Y, Mitsui Y, Kusaura T, Okawa W, Kajihara Y, et al. The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2006;28:439-49.
- Whitehead N, White H. Systematic review of randomized controlled trials of the effects of caffeine or caffeinated drinks on blood glucose concentrations and insulin sensitivity in people with diabetes mellitus. *J Hum Nutr Diet.* 2013;26:111-25.
- WHO - World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: World Health Organization; 2009.
- WHO - World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014; 2014.
- WHO - World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva;1995.
- WHO - World Health Organization. Preventing chronic diseases: a vital investment: WHO global report; 2005.
- Winkelmayr WC, Stampfer MJ, Willett WC, Curhan GC. Habitual caffeine intake and risk of hypertension in women. *JAMA.* 2005;294(18):2330-35.

- Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *Br J Pharmacol.* 1999;127:747-55.
- Wu JN, Ho SC, Zhou C, Ling WH, Chen WQ, Wang CL, Chen YM. Coffee consumption and risk of coronary heart diseases: A meta-analysis of 21 prospective cohort studies. *Int J Cardiol.* 2009;137:216-25.
- Wu T, Willett WC, Hankinson SE, Giovannucci E. Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and caffeine in relation to plasma C-peptide levels, a marker of insulin secretion, in U.S. women. *Diabetes Care.* 2005;28(6):1390-6.
- Yamaji T, Mizoune T, Tabata S, Ogawa S, Yamaguchi K, et al. Coffee consumption and glucose tolerance status in middle-aged Japanese men. *Diabetologia.* 2004;47:2145-51.
- Yang A, Palmer AA, de Wit H. Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology (Berl).* 2010;211:245-57.
- Yang B, Fan S, Zhi X, Li Y, Liu Y, Wang D, He M, Hou Y, Zheng Q, Sun G. Associations of MTHFR Gene Polymorphisms with Hypertension and Hypertension in Pregnancy: A Meta-Analysis from 114 Studies with 15411 Cases and 21970 Controls. *PLoS One.* 2014;9:e87497.
- Yang Q-H, Botto LD, Gallagher M, Friedman J, Sanders CL, Koontz D, Nikolova S, Erickson JD, Steinberg K. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(1):232-46.
- Yukawa GS, Mune M, Otani H, et al. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry Biokhimiia.* 2004;69:70-4.
- Zhang Z, Hu G, Caballero B, Appel L, Chen L. Habitual coffee consumption and risk of hypertension: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:1212-9.
- Zhao Q, Kelly TN, Li C, He J. Progress and Future Aspects in Genetics of Human Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2013;15:676-86.
- Zhao Y, Wang J, Ballevre O, Luo H, Zhang W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertens Res.* 2012;35:370-4.
- Zock PL, Katan MB, Merkus MP, Dusseldorp MV, Harryan JL. Effect of a lipid-rich fraction from boiled coffee on serum cholesterol. *Lancet.* 1990;335:1235-37.
- 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.

ANEXOS

ANEXO 1 – PRIMEIRO MANUSCRITO PUBLICADO NO BJR



British Journal of Nutrition (2016), **115**, 1061–1070
 © The Authors 2016

doi:10.1017/S0007114515005061

Dietary intake and food contributors of polyphenols in adults and elderly adults of São Paulo: a population-based study

A. M. Miranda, J. Steluti, R. M. Fisberg and D. M. Marchioni*

Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, Cerqueira César 01246-000, São Paulo, SP, Brazil

(Submitted 10 June 2015 – Final revision received 13 November 2015 – Accepted 17 November 2015 – First published online 26 January 2016)

Abstract

A comprehensive estimation of polyphenol intake is needed to gain a better understanding of the association between polyphenol-rich food intake and the potential effects of this intake on chronic diseases. The aim of this study was to estimate the intake of polyphenols and the major dietary contributors in the population of São Paulo. Data were obtained from the Health Survey-São Paulo (ISA-Capital 2008) and were reported for 1103 adults and elderly adults. Food intake was estimated by one 24-h dietary recall (24HR). Polyphenol intake was calculated by matching food consumption data from the 24HR with the polyphenol content in foods listed in the Phenol-Explorer database. The mean total intake of polyphenols was 377.5 (\pm 15.3) mg/d. The main polyphenol classes were phenolic acids (284.8 (\pm 15.9) mg/d) and flavonoids (54.6 (\pm 3.5) mg/d). Intakes were higher in the elderly adults than in other adults ($P < 0.001$) and higher in individuals with lower educational level ($P = 0.01$) and current smokers ($P = 0.02$). The main dietary contributors for total polyphenols were coffee (70.5%), citrus fruits (4.6%) and tropical fruits (3.4%). Coffee was the major source of polyphenols, providing 266.2 (\pm 16.5) mg/d, and contributed 92.3% of the phenolic acids and 93.1% of the alkylmethoxyphenols. These findings will be useful for assessing the potential role on health of polyphenols and specific polyphenol-rich foods, such as coffee, and enable a comparison with people from other countries.

Key words: Polyphenol intakes; Food contributors; Coffee; Representative samples

A high consumption of polyphenols, which are bioactive compounds, has been suggested in several clinical trials and cohort studies to have beneficial effects on human health and to provide protection against several chronic diseases such as CVD, cancers, type II diabetes, neurodegenerative diseases and osteoporosis^(1–5).

Polyphenols constitute a very heterogeneous and widespread group of compounds, with more than 500 different molecules⁽⁶⁾ found in various amounts in fruits and beverages, such as fruit juice, wine, coffee, tea, cocoa and beer as well as, to a lesser extent, in vegetables, dry legumes and cereals^(7,8). Dietary polyphenols belong to four main classes – flavonoids, phenolic acids, stilbenes and lignans – which are largely present in a glycosidic form (glycosides of flavonoids, lignans and stilbenes) or as esters (phenolic acids esterified to polyols such as quinic acid)⁽⁹⁾.

Flavonoids can be divided into six subclasses based on the function of the type of heterocyclic ring involved: flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanins and flavanols (catechins and proanthocyanidins). In addition, two classes of phenolic acids can be distinguished: derivatives of benzoic acid and derivatives of cinnamic acid⁽⁷⁾.

Dietary polyphenols may differ substantially in bioavailability and biological properties, and these aspects should be considered when studying the health effects of these compounds^(7,10).

For this reason, it is important to determine the intake of individual polyphenols.

The Phenol-Explorer database (www.phenol-explorer.eu) is the most complete database currently available and freely accessible on the web; this database contains food composition data for 502 polyphenols (flavonoids, phenolic acids, lignans, stilbenes and other minor polyphenols) in 452 foods⁽⁸⁾.

The purpose of the present study was to estimate the quantitative intake of polyphenols and the major dietary contributors in the general population of São Paulo, using individual food recall and the recently developed database Phenol-Explorer.

Methods

Study population and data collection

Data were retrieved from the 'Health Survey-São Paulo (ISA-Capital 2008)'. The ISA-Capital 2008 is a cross-sectional study designed to assess the health and nutritional status of non-institutionalised civilian residents of São Paulo City in south-eastern Brazil. This survey was a representative, complex, multistage, probability-based study and included participants aged <1 year and over. The survey was conducted in 2008 and combined interviews that collected information on health;

Abbreviation: 24HR, 24-h dietary recall.

* **Corresponding author:** D. M. Marchioni, fax +55 11 3061 7804, email marchioni@usp.br

ANEXO 2 – SEGUNDO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA NUTRIENTS



nutrients



Article

Association between Coffee Consumption and Its Polyphenols with Cardiovascular Risk Factors: A Population-Based Study

Andreia Machado Miranda *, Josiane Steluti, Regina Mara Fisberg and Dirce Maria Marchioni

Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo 01246-904, Brazil; jsteluti@gmail.com (J.S.); rfisberg@usp.br (R.M.F.); marchioni@usp.br (D.M.M.)

* Correspondence: andreia.am.miranda@gmail.com; Tel.: +55-11-3061-7856

Received: 26 January 2017; Accepted: 10 March 2017; Published: 14 March 2017

Abstract: Epidemiological studies have examined the effect of coffee intake on cardiovascular disease, but the benefits and risks for the cardiovascular system remain controversial. Our objective was to evaluate the association between coffee consumption and its polyphenols on cardiovascular risk factors. Data came from the “Health Survey of São Paulo (ISA-Capital)” among 557 individuals, in São Paulo, Brazil. Diet was assessed by two 24-h dietary recalls. Coffee consumption was categorized into <1, 1–3, and ≥3 cups/day. Polyphenol intake was calculated by matching food consumption data with the Phenol-Explorer database. Multiple logistic regression models were used to assess the associations between cardiovascular risk factors (blood pressure, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides, fasting glucose, and homocysteine) and usual coffee intake. The odds were lower among individuals who drank 1–3 cups of coffee/day to elevated systolic blood pressure (SBP) (Odds Ratio (OR) = 0.45; 95% Confidence Interval (95% CI): 0.26, 0.78), elevated diastolic blood pressure (DBP) (OR = 0.44; 95% CI: 0.20, 0.98), and hyperhomocysteinemia (OR = 0.32; 95% CI: 0.11, 0.93). Furthermore, significant inverse associations were also observed between moderate intake of coffee polyphenols and elevated SBP (OR = 0.46; 95% CI: 0.24, 0.87), elevated DBP (OR = 0.51; 95% CI: 0.26, 0.98), and hyperhomocysteinemia (OR = 0.29; 95% CI: 0.11, 0.78). In conclusion, coffee intake of 1–3 cups/day and its polyphenols were associated with lower odds of elevated SBP, DBP, and hyperhomocysteinemia. Thus, the moderate consumption of coffee, a polyphenol-rich beverage, could exert a protective effect against some cardiovascular risk factors.

Keywords: coffee consumption; coffee polyphenol intake; cardiovascular risk factors; representative sample

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are considered to be the leading global cause of death, accounting for 17.3 million deaths per year, which is predicted to rise to more than 23.6 million by 2030 [1]. The main causes of CVD involve non-modifiable risk factors, in addition to the metabolic risk factors, that are targeted together with the behavioral risk factors, such as unhealthy diets (rich in salt, saturated fat, and calories) [2]. However, there are still food items whose role is controversial, such as coffee.

Coffee has been considered an important dietary factor, because it is one of the most popular and widely consumed nonalcoholic beverages in the world. Finland is the largest coffee consumer market, followed by Brazil. In Brazil, the average coffee consumption is 5.9 kg per capita [3], with an estimated prevalence of intake of 79%, i.e., the second-most consumed food in the country [4].

Coffee beverage, a mixture of several pharmacologically-bioactive compounds, including caffeine, phenolic acids, and the diterpene alcohols, cafestol and kahweol, can also have long term effects on

ANEXO 3 - CURRICULO LATTES DO DOUTORANDO



Andreia Alexandra Machado Miranda

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2607186132604888>

Última atualização do currículo em 21/07/2017

Graduada em Ciências da Nutrição, pela Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto (2008) e com diploma de graduação validado pela Universidade de São Paulo (2013). Mestre em Nutrição Clínica pela Universidade do Porto (2010). Atualmente, doutoranda na área de Nutrição em Saúde Pública na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (desde 2014). Tem experiência na área de Nutrição Clínica e tem vindo a desenvolver interesse pelas áreas de avaliação do consumo alimentar, epidemiologia, genômica e metabolômica nutricional. (**Texto informado pelo autor**)

Identificação

Nome

Andreia Alexandra Machado Miranda



Nome em citações bibliográficas

MIRANDA, A. A. M.;MIRANDA, ANDREIA ALEXANDRA MACHADO;Miranda, A.M.;MIRANDA, A. M.;MIRANDA, ANDREIA MACHADO;MIRANDA, ANDREIA

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2014

Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Estudo epidemiológico do consumo de café, sua contribuição na ingestão de polifenóis e seus potenciais efeitos nos fatores de risco cardiovascular, considerando variações genéticas individuais,

Orientador: Dirce Maria Lobo Marchioni.

2008 - 2010

Mestrado em Nutrição Clínica.

Universidade do Porto, U.PORTO, Portugal.

Título: Angulo de fase como indicador prognóstico em doentes críticos com sépsis, Ano de Obtenção: 2010.

Orientador: Professora Doutora Flora Correia.

2003 - 2008

Graduação em Ciências da Nutrição.

Universidade do Porto, U.PORTO, Portugal.

Título: Impacto da intervenção nutricional em doentes gastrectomizados.

Orientador: Drª Cristina Teixeira.

Formação Complementar

2014 - 2014

Treinamento EndNote Basic. (Carga horária: 4h).
Faculdade de Saúde Pública, FSP, Brasil.

2013 - 2013

Curso de Atualização em Nutrição em Diabetes. (Carga horária: 6h).
Escola de Enfermagem da USP, EEUSP, Brasil.

2013 - 2013

Introdução ao uso do software Stata. (Carga horária: 16h).
Faculdade de Saúde Pública da USP, FSP-USP, Brasil.

2012 - 2012

Nutrição em Diabetes. (Carga horária: 10h).
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina USP, HCFMUSP, Brasil.

2012 - 2012

Sistema de monitoramento da saúde: Nutrisim. (Carga horária: 5h).
Faculdade de Saúde Pública da USP, FSP, Brasil.

ANEXO 4 - CURRICULO LATTES DO ORIENTADOR



Dirce Maria Lobo Marchioni

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1D

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9059164202721558>

Última atualização do currículo em 29/09/2017

Possui graduação em Nutrição pela Universidade de São Paulo (1985), mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1999) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2003) e pós doutorado no Imperial College London. Atualmente é pesquisador e professor Associado da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Consumo Alimentar, atuando principalmente nos seguintes temas: consumo alimentar, dieta, recomendações dietéticas, consumo de alimentos e estudos epidemiológicos. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Dirce Maria Lobo Marchioni

Nome em citações bibliográficas

MARCHIONI, Dirce Maria Lobo;Marchioni, Dirce Maria Lobo;Marchioni, Dirce M.;Marchioni, Dirce M. L.;Marchioni, D. M. L.;Marchioni, D.;Marchioni, Dirce Maria;MARCHIONI, DIRCE M.L.;MARCHIONI, DIRCE M.L.;Dirce Maria Lobo Marchioni;MARCHIONI, D.M.;MARCHIONI DM;MARCHIONI, DIRCE ML;LOBO MARCHIONI, DIRCE MARIA;DIRCE MARIA LOBO MARCHIONI;MARCHIONI, DIRCE MARIA L.;MARCHIONI, DIRCE M.

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição.
Av Dr Arnaldo 715
01246-904 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30667771
Ramal: 257
URL da Homepage: <http://>

Formação acadêmica/titulação

1999 - 2003

Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
com período sanduíche em International Agency For Research On Cancer (Orientador: Paulo Boffetta).
Título: Fatores dietéticos e câncer oral: um estudo caso-controle no Município de São Paulo, Ano de obtenção: 2003.
Orientador: Regina Mara Fisberg.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: câncer oral; consumo de alimentos.
Grande área: Ciências da Saúde
Setores de atividade: Nutrição e Alimentação; Cuidado À Saúde das Populações Humanas.

1996 - 1999

Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Alimentação no primeiro ano de vida: prevalência de consumo de alimentos em dois Centros de Saúde no Município de São Paulo, Ano de Obtenção: 1999.
Orientador: Sonia Buongermino de Souza.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: alimentação do lactente; aleitamento materno; desmame; suplementação alimentar.