

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM AMOSTRAS DE CAFÉ, CHÁS VERDE E PRETO, ERVA-MATE E GUARANÁ E SUA RELAÇÃO COM A MODULAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES: EM BUSCA DA LONGEVIDADE

Audrei de Oliveira Alves (1); Grazielle Castagna Cezimbra Weis (2); Vanusa do Nascimento (3); Charles Elias Assmann (4); Ivana Beatrice Mânica da Cruz (5)

- (1) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. audrei.alves77@gmail.com
(2) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. grazielle.castagna@gmail.com
(3) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. vanusanascimento@gmail.com
(4) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. charles.ufsm@gmail.com
(5) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. ibmcruz@hotmail.com

Introdução

O café e os chás preto e verde estão entre as bebidas mais consumidas e mais antigas do mundo, sendo referidas na literatura como ótimas fontes de compostos bioativos. Entretanto, existem outras, como a erva-mate e o guaraná, os quais devido à regionalização não são tão exploradas, apresentando consumo mais restrito. Em comum, está o fato dessas bebidas apresentarem moléculas bioativas, como a cafeína, a teobromina e a catequina, responsáveis por seus efeitos benéficos a saúde da população^{1,2,3}.

Além dessas bebidas apresentarem em comum moléculas bioativas, diversos estudos produzidos a partir de modelos experimentais sugerem ocorrência de propriedades biológicas semelhantes entre extratos produzidos a partir desses alimentos ricos em cafeína e catequina. Essas propriedades incluem antioxidante, anti-inflamatória, antiobesogênica, antimutagênica, antitumoral, efeitos hipolipemiantes entre outros^{1,2,3,4,5,6}. Por este motivo, o consumo moderado destas bebidas pode ser indicado para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas podendo aumentar, potencialmente, a longevidade das populações.

Os mecanismos causais que tornam essas bebidas importantes para a prevenção de doenças incluem a capacidade destas moléculas bioativas em modular diferencialmente o gatilho da transcrição de genes envolvidos em várias vias bioquímicas e moleculares, incluindo genes relacionados com metabolismo oxidativo e inflamatório.

No entanto, a maioria das investigações realizadas sobre a ação genômica destes alimentos foi realizada isoladamente, sem comparar aos demais tipos de bebidas, e, usualmente, utilizando extratos obtidos a partir de diferentes solventes orgânicos, condição que não reflete o consumo pela população. Portanto, uma questão em aberto é saber se, de fato, a preparação habitual destas

bebidas ricas em compostos bioativos, que geralmente envolve um extrato de infusão quente aquoso, produz um número suficiente de moléculas bioativas para atuar na modulação destes genes.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi quantificar os compostos bioativos catequina, cafeína e teobromina em infusões aquosas de café (*Coffea arabica*), chás verde e preto (*Camellia sinensis*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e guaraná (*Paullinia cupana*). Além disso, almejou-se investigar a ação nutrigenômica destas cinco bebidas na modulação dos genes das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase 1 e 2 (SOD 1 e SOD 2), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX), utilizando células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) obtidas a partir de indivíduos saudáveis.

Materiais e métodos

O estudo *in vitro* foi realizado utilizando células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) obtidas de quatro voluntários saudáveis não fumantes (26 ± 6 anos), sendo este projeto aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria sob o número 0146.0.243.000-07. As células foram mantidas em condições ótimas de cultivo (37°C , 5% CO_2) até o momento do experimento, onde foram expostas por 24 horas aos extratos.

Os extratos foram preparados a partir de uma infusão aquosa, de 10g de amostra em 100mL de água quente ($90 \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 10 minutos, sendo filtrados e liofilizados posteriormente. A concentração utilizada de todos os extratos para testar nas células foi de 5 mg/mL.

A separação, identificação e quantificação dos compostos bioativos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Shimadzu®, Japão) equipada com detector de arranjo de fotodiodo (PDA), com sistema de bomba quaternário (LC-20AT) e utilizado coluna ODS-3 (5 μm , 150 mm \times 4.6 mm). A fase móvel foi constituída por um gradiente de 0,1% H_3PO_4 em água e 100% de acetonitrila, sendo o fluxo mantido constante (1 mL/min). As amostras foram filtradas em microfiltro 0,45 μm e após injetadas. Os padrões de cafeína, teobromina e catequina foram injetados em diferentes concentrações construindo uma curva de calibração.

A expressão dos genes relacionados ao metabolismo oxidativo e inflamatório (SOD 1, SOD 2, CAT e GPX) foi quantificada por qRT-PCR (reação da enzima Polimerase em tempo real) nas células expostas aos cinco diferentes extratos^{10,11}.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 5 e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para a comparação entre os tratamentos

utilizou-se ANOVA de duas vias seguidas por test *post hoc* de Tukey ou Dunnet, a um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Resultados e Discussão

Os resultados encontrados mostraram uma maior concentração de alcaloides no café, seguido pelo chá verde e erva-mate. Entre os alcaloides, o guaraná e o café apresentaram as maiores concentrações de cafeína, seguidos pelo chá verde e a erva-mate. Já para a teobromina, a erva-mate apresentou concentrações bastante significativas em relação às outras bebidas. Quanto ao café principalmente esta diferença chegou a níveis quase 30 vezes superiores. Quanto aos taninos, mais especificamente a catequina, o guaraná foi o extrato que apresentou maiores níveis (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação dos compostos bioativos nas amostras de café, chá preto, chá verde, erva mate e guaraná.

Compostos	Café	Chá verde	Chá preto	Erva mate	Guaraná
Cafeína (mg/100g)	1023.3 ± 10.1 ^a	166.9 ± 11.7 ^b	950.6 ± 7.2 ^c	533.1 ± 23.3 ^d	1308.7 ± 18.9 ^e
Teobromina (mg/100g)	3.9 ± 0.8 ^a	14.7 ± 1.8 ^b	15.7 ± 3.2 ^b	113.8 ± 14.0 ^d	21.5 ± 2.2 ^e
Catequina (mg/100g)	ND	6.5 ± 1.3 ^a	6.1 ± 0.9 ^a	ND	233.3 ± 12.7 ^b

ND = Não detectado; Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

O perfil cromatográfico dos chás, bem como do café, da erva mate e do guaraná revela a presença de importantes compostos bioativos nas preparações, realizadas com água quente, simulando a forma usual de preparo pela população. Essa constatação indica que assim como os extratos alcoólicos desses alimentos, suas formas aquosas, e especialmente a forma usual de consumo apresenta compostos bioativos de interesse para a saúde humana. Além disso, os resultados da expressão gênica mostraram que todos os extratos aumentaram a regulação dos genes das enzimas SOD1, CAT e GPX, mostrando que esses extratos, que correspondem a forma usual de consumo da população são capazes de aumentar a expressão dessas enzimas do sistema antioxidante endógeno, potencializando nossas defesas frente a agentes oxidativos e inflamatórios (Figura 1).

A intensidade da expressão gênica mostrou-se variável conforme o tipo de extrato devido às diferenças nas concentrações dos compostos bioativos testados. Dentre todos os extratos, o de erva-mate foi o único capaz de modular a expressão de todas as enzimas avaliadas, inclusive, a SOD2.

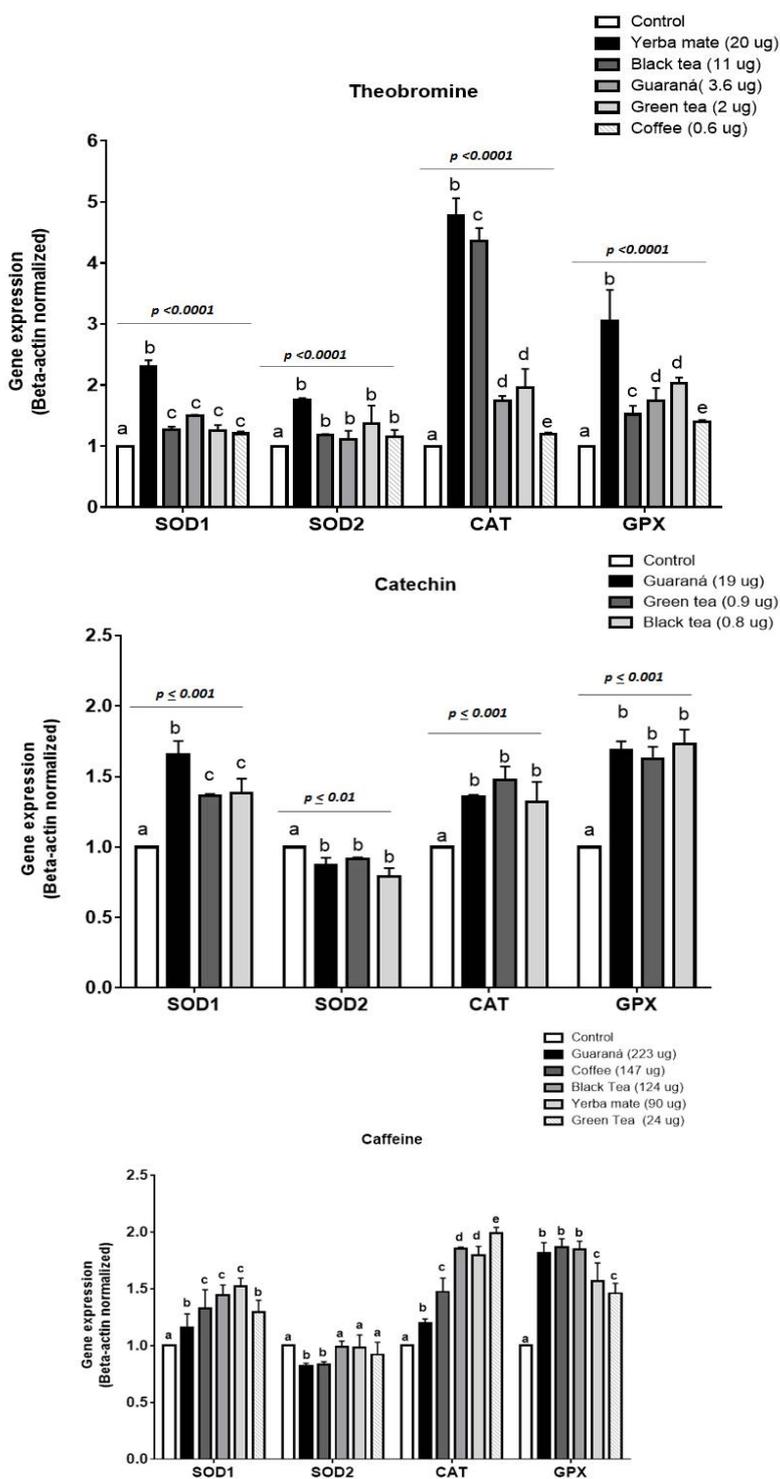


Figura 1. Modulação da expressão dos genes das enzimas antioxidantes (SOD 1 e 2, CAT, GPX) pelas cinco diferentes bebidas.

A partir destes resultados é possível sugerir que as bebidas testadas exercem importantes efeitos antioxidantes na modulação das enzimas testadas, possuindo efeito nutrigenômico e possivelmente, promovendo aumento da longevidade das populações que as consomem.

Conclusão

Esses resultados são relevantes do ponto de vista nutricional, uma vez que essas bebidas apresentam quantidades significativas dos compostos analisados, possibilitando assim, efeitos benéficos para a saúde. Mais estudos estão sendo conduzidos por nosso grupo, com o intuito de avaliar os efeitos destas infusões sobre a nutrigenética e nutrigenômica.

Referências bibliográficas

- 1 Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol.* 2011; 136(1): 378-384.
- 2 Schimpl FC, da Silva JF, Gonçalves JF, Mazzafera P. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *J Ethnopharmacol.* 2013; 150(1): 14-31.
- 3 Bhatti SK, O'Keefe JH, Lavie CJ. Coffee and tea: perks for health and longevity? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013; 16(1): 688-697.
- 4 Cano-Marquina A, Tarín JJ, Cano AT. The impact of coffee on health. *Maturitas.* 2013; 75(1): 7-21.
- 5 Bhardwaj P, Khanna D. Green tea catechins: defensive role in cardiovascular disorders. *Chin J Nat Med.* 2013; 11(1): 345-53.
- 6 Santesso N, Manheimer E. A summary of a cochrane review: green and black tea for the primary prevention of cardiovascular disease. *Glob Adv Health Med.* 2014; 3(1): 66-67.
- 7 Sreevidya N, Mehrotra S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC International.* 2003; 86(1): 1124-1127.
- 8 Ribeiro EE, Veras RP, Viegas K, Caldas CP, Maia-Ribeiro EA, Rocha MIUM, Cruz IBM. Projeto Idoso da Floresta: indicadores de saúde dos idosos inseridos na Estratégia de Saúde da Família (ESF-SUS) de Manaus-AM, *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.* 2008; 8(1): 307-326.
- 9 Price ML, Scoyoc SV, Butler L. A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain. *J. Agric. Food Chem.* 1978; 26(5): 1-10.
- 10 Barbisan F, Motta JR, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MMMF, Mostardeiro CP, Unfer TC, Shott KL, Cruz IBM. Methotrexate-Related Response on

Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. *Plos One*. 2014; 9(10): 1-10.

11. Machado AK, Cadoná FC, Azzolin VF, Dornelles EB, Barbisan F, Ribeiro EE, Manica-Cattani MF, Duarte MMF, Saldanha JRP. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Research International*. 2015; 67(1): 426-433.