

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO NUTRIGENÔMICO DE EXTRATOS
AQUOSOS ORIUNDOS DE ALIMENTOS
CAFEINADOS NA MODULAÇÃO *IN VITRO* DOS
GENES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Adriano Flesch Lenz

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**EFEITO NUTRIGENÔMICO DE EXTRATOS
AQUOSOS ORIUNDOS DE ALIMENTOS
CAFEINADOS NA MODULAÇÃO *IN VITRO* DOS
GENES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.**

por

Adriano Flesch Lenz

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Estresse Oxidativo associado a Patologias Humanas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Flesch Lenz, Adriano

EFEITO NUTRIGENÔMICO DE EXTRATOS AQUOSOS ORIUNDOS DE ALIMENTOS CAFEINADOS NA MODULAÇÃO IN VITRO DOS GENES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES. / Adriano Flesch Lenz.-2015.

70 p.; 30cm

Orientador: Ivana Beatrice Manica da Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2015

1. Bebidas cafeinadas 2. Antioxidantes 3. Expressão gênica I. Manica da Cruz, Ivana Beatrice II. Título.

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica

A Comissão Avaliadora, abaixo assinada, Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO NUTRIGENÔMICO DE EXTRATOS
AQUOSOS ORIUNDOS DE ALIMENTOS
CAFEINADOS NA MODULAÇÃO *IN VITRO* DOS
GENES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.**

elaborada por

Adriano Flesch Lenz

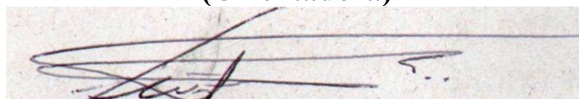
Como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA



Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a.(UFSM)
(Orientadora)



Luiz Fernando Freire Royes, Dr. (UFSM)



Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, 23 de julho de 2015.

DEDICATÓRIA

Para Eneida e Luiz Fernando, meus pais, por sempre estarem comigo, incentivando e auxiliando nos momentos de dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro e especialmente a minha orientadora, Ivana, por toda ajuda, compreensão e novas oportunidades. A qual em todos os momentos de dificuldades, quando não tive sucesso, me permitiu tentar novamente e amadurecer.

A todos os colegas do laboratório, obrigado pela amizade, por toda ajuda tanto física nos experimentos e estudos como emocional, nas palavras de carinho e conforto em frente às dificuldades.

Meus pais, por todo carinho, amor e compaixão sem os quais absolutamente nada teria sido possível.

Boditchita (compaixão)

“Tal como em uma noite escura com nuvens negras
Um relâmpago repentino esplandece e tudo é aclarado,
De igual modo, raramente, pelo por dos Budas,
Pensamentos virtuosos surgem neste mundo, breves e passageiros.”

Shatideva

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO NUTRIGENÔMICO DE EXTRATOS AQUOSOS ORIUNDOS DE ALIMENTOS CAFEINADOS NA MODULAÇÃO *IN VITRO* DOS GENES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

AUTOR: Adriano Flesch Lenz

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e Local da Apresentação: Santa Maria, 23 de julho de 2015.

Bebidas ricas em cafeína e outras biomoléculas, são produzidas a partir de diferentes plantas, originadas de distintas partes do planeta. Atualmente o café, chá verde, chá preto, erva-mate e guaraná, são as cinco bebidas cafeinadas mais utilizadas, pelas sociedades humanas. Estudos *in vitro* e *in vivo* vêm demonstrando que estas bebidas apresentam efeitos benéficos à saúde tais como: ação antioxidante, anti-inflamatória, antiobesogênica, antimutagênica e antitumoral, atuando inclusive na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis como as cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer. Entretanto, as propriedades destas bebidas sempre foram estudadas em trabalhos isolados, neste estudo buscamos investigar *in vitro* os efeitos dos extratos aquosos quentes de cinco bebidas cafeinadas (café, chá verde, chá preto, erva-mate e guaraná) sobre a modulação dos genes das principais enzimas antioxidantes. Os extratos aquosos foram preparados de maneira bastante similar àquela que os seres humanos consomem suas bebidas cotidianamente. Após, os compostos bioativos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência e a capacidade antioxidante foi mensurada via teste DPPH. Para análise de citotoxicidade dos compostos e da expressão dos genes, realizou-se coleta de sangue de indivíduos jovens saudáveis, as células mononucleares foram separadas por gradiente de Histopaque 1077, e cultivadas em condições controladas. As células foram expostas a concentração de 5mg/mL de cada extrato aquoso, e após 6 horas de tratamento, foi avaliada a expressão dos genes via qRT-PCR, e após, a análise da citotoxicidade via MTT. O efeito do isolado cafeína, teobromina e catequina em concentrações estimadas para cada extrato também foi também avaliado. Nossos resultados demonstram composição bastante similar de compostos bioativos nos extratos, quanto a capacidade antioxidante o café demonstrou resultados mais significativos, e nenhum dos extratos apresentou atividade citotóxica no teste do MTT. Em relação a expressão dos genes, todos os extratos foram capazes de elevar a expressão dos genes das enzimas Superóxido Dismutase 1, Catalase e Glutathione Peroxidase. Nossos resultados corroboram resultados descritos previamente na literatura sugerindo ação nutrigenômica das bebidas cafeinadas aqui testadas.

Palavras Chave: Café, chá, erva-mate, guaraná, antioxidantes.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Post-Graduate Program in Biological Sciences: Biochemical Toxicology
Federal University of Santa Maria

NUTRIGENÔMICO EXTRACTS AQUEOUS EFFECT ARISING OUT OF CAFFEINATED FOOD IN MODULATION IN VITRO OF GENES ENZYMES ANTIOXIDANTS

AUTHOR: Adriano Flesch Lenz

ADVISOR: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, July 23th, 2015

Beverages rich in caffeine and other biomolecules are produced from different plants, originated from different parts of the planet. Currently, coffee, green tea, black tea, yerba mate and guarana, are the five most caffeinated beverages used by human societies. *In vitro* and *in vivo* studies have been showing that these drinks have beneficial health effects such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-obesogenic, anti-mutagenic and antitumor, including acting in the prevention of chronic diseases such as cardiovascular, neurodegenerative and cancer. However, the properties of these drinks have always been studied in isolated works, this study aims to investigate the *in vitro* effects of the hot aqueous extracts of five caffeinated drinks (coffee, green tea, black tea, yerba mate and guarana) on the modulation of major antioxidant enzymes genes. The aqueous extracts were prepared in a very similar way to that humans consume their daily drinks. After the bioactive compounds were quantified by high-performance liquid chromatography and the antioxidant capacity was measured via DPPH test. To analyze the cytotoxicity of the compounds and the expression of genes was performed collecting blood from healthy young subjects, the mononuclear cells were separated by Histopaque 1077 gradient and grown under controlled conditions. Cells were exposed to concentrations of 5 mg / mL of each aqueous extract, and after 6 hours of treatment, the expression of the gene pathways qRT-PCR was assessed, after the analysis of cytotoxicity via MTT. The effect of isolated caffeine, theobromine and catechin at concentrations estimated for each extract was also evaluated. Our results show quite similar composition of bioactive compounds in the extracts, as the coffee antioxidant capacity demonstrated significant results, and none of the extract showed cytotoxic activity in the MTT test. For gene expression, all extracts were able to elevate the expression of genes of the enzymes superoxide dismutase 1, catalase and glutathione peroxidase. Our results confirm previously reported results in the literature suggesting nutrigenomics action of caffeinated beverages tested here.

Key-words: Coffee, Tea, Yerba-mate, guaraná, antioxidants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Estresse Oxidativo, doenças crônicas e bebidas cafeinadas.....	11
1.2 Cafeína e xantinas associadas: aspectos farmacológicos e toxicológicos.....	12
1.3 Catequinas.....	14
1.4 Bebidas Cafeinadas.....	16
1.4.1-Café.....	16
1.4.2 - Chá verde e preto.....	20
1.4.3 – Erva – mate.....	22
1.4.4- Guaraná.....	26
1.5 Nutrigenômica: Hipótese do Estudo.....	29
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3 RESULTADOS.....	31
Manuscrito.....	32
4 DISCUSSÃO.....	60
5 CONCLUSÃO.....	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse Oxidativo, doenças crônicas e bebidas cafeinadas

O estresse oxidativo está envolvido em várias doenças crônicas não transmissíveis, como por exemplo, arteriosclerose, hipertensão, doenças neurodegenerativas, câncer e diabetes *mellitus* tipo I. Nesta última o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) influenciam de forma prejudicial a captação da glicose pelos tecidos musculares e adiposo, além de diminuir a secreção de insulina (GREEN et al, 2004; BROWNLEE, 2001; MADDUX et al, 2001; RUDICH et al, 1998).

Com o aumento de gordura corporal há o desenvolvimento de um processo inflamatório determinando uma considerável elevação nas citocinas pró-inflamatórias circulantes e outras moléculas de caráter inflamatório, as adipocinas (WOZNIAK et al, 2009). Para compensar o estresse metabólico acarretado pela obesidade, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é ativado e conseqüentemente há a produção aumentada de glicocorticóides, os quais potencializam a diferenciação de pré-adipócitos a adipócitos (PURNELL et al, 2009).

Esta correlação entre a obesidade e resposta inflamatória tem sido descrita a partir do ano de 1950, todavia esta correlação ainda não é totalmente elucidada (HOTAMISLIGIL et al, 1993). Sabe-se também que a infiltração de macrófagos no tecido adiposo é bastante presente e este processo está extremamente relacionado com a adiposidade, já que indivíduos obesos possuem 60% do tecido adiposo constituído de macrófagos, de forma que adipócitos necrosados durante a obesidade avançada atraem tais células para fagocitose (WEISBERG et al, 2003).

Uma grande quantidade de alimentos possui moléculas bioativas que possuem atividade antioxidante agindo positivamente na fisiologia e saúde humana. Entre estes alimentos se destacam bebidas que são ricas em cafeína e outras moléculas como é o caso do café, chá (verde/preto), erva-mate e guaraná. Estas bebidas cafeinadas produzidas por plantas originadas de diferentes regiões do mundo são ampla e habitualmente consumidas no mundo todo. Além da ação antioxidante muitos estudos descreveram outras importantes propriedades presentes nestas bebidas como: efeito anti-inflamatório, antimutagênico, antitumoral, hipolipimiente e antiobesogênico (BRACESCO e al., 2011; SCHIMPL et al., 2013; BATHI et al., 2013; CANO-MARQUINA et al., 2013; BHARDWAJ E KHANNA, 2013; SANTESSO E MANHEIMER, 2014).

Por esta razão, o consumo moderado e habitual destes alimentos tem sido associado à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e do câncer. Estudos longitudinais também sugerem que o consumo destes alimentos podem potencialmente diminuir a mortalidade (BHATTI et al, 2013; JE E GIOVANNUCCI, 2014). Algumas bebidas cafeinadas, como o chá e o guaraná possuem outras moléculas antioxidantes importantes como catequinas. Estes polifenóis também têm efeito no peso corporal. Tanto a presença de cafeína e outras xantinas quanto de catequinas podem contribuir para as propriedades benéficas encontradas em bebidas cafeinadas (HURSEL et al., 2013).

1.2 Cafeína e xantinas associadas: aspectos farmacológicos e toxicológicos

Em termos químicos a cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$) é um alcaloide quimicamente conhecido como 1,3,7-trimethylxanthine, é uma molécula amplamente consumida por pessoas de todas as idades. Existe estimativa de que 90% dos adultos americanos consomem diariamente café ou outro produto rico em cafeína (LOVETT, 2005). Com base no conhecimento atual estima-se que o consumo diário de cafeína deva ser moderado (em torno de 400 mg/dia) e que, nesta concentração os efeitos adversos são praticamente inexistentes para a maioria das pessoas. Na Europa o consumo médio diário da cafeína é entre 280-490 mg (BOLLUMAR et al., 1997). Doses de cafeína acima de 100 g/dia são consideradas tóxicas, sendo que uma xícara de café contém de 80-175 mg de cafeína, deste modo seria necessário consumir de 50 a 100 xícaras em um dia para que ocorresse toxicidade. Além do consumo via ingestão de café a cafeína também é consumida diariamente sob a forma de chá, chocolates, refrigerantes à base de cafeína ou medicamentos. (ECHEVERRI et al., 2010).

A cafeína é um estimulante do sistema nervoso central, sendo considerada a substância psicoativa mais consumida do mundo. Por ser lipossolúvel e hidrossolúvel a cafeína atravessa rapidamente as membranas celulares, assim como a barreira hematoencefálica e placentária, atingindo grandes concentrações em todo o organismo, inclusive no encéfalo (TAVARES et al., 2012)

Após administração por via oral, a concentração plasmática máxima ocorre de 30 minutos a 2 horas, podendo ser prolongado com a ingestão de alimentos. A cafeína é absorvida pelo trato intestinal de forma rápida e completa, apresentando biodisponibilidade de 100%.

As grandes diferenças observadas na concentração plasmática da cafeína em cada indivíduo, após administração da mesma dose, estão relacionadas principalmente às variações do metabolismo, como: polimorfismos genéticos, indução e inibição metabólica do citocromo P450, alterações individuais (sexo e peso), e a existência de hepatopatia. A subfamília CYP1A2 da isoenzima citocromo P450, metaboliza por desmetilação a maior parte da cafeína (95%), transformando-a em paraxantina (85%), teobromina (10%) e teofilina (5%) (TAVARES et al., 2012).

A paraxantina apresenta capacidade de aumentar a lipólise, já teobromina tem ação vasodilatadora e diurética, e por fim a teofilina tem ação no relaxamento dos músculos brônquicos e por este motivo tem sido usada como fármaco no tratamento da asma. Entretanto, a dose terapêutica da teofilina é muito mais alta do que as concentrações desta molécula produzidas a partir do metabolismo da cafeína (ECHEVERRI et al., 2010).

Quanto da eliminação somente 1% a 2% da dose ingerida de cafeína é excretada sem alteração na urina, em adultos, a meia-vida de eliminação da cafeína é de 3 a 5 horas. Nos recém-nascidos, tanto o metabolismo quanto a taxa de depuração da cafeína estão diminuídos e a meia-vida pode ser de até 100 horas. Em indivíduos que não consomem café regularmente, a meia-vida da cafeína é duas vezes maior, o que explica a maior incidência de intoxicação nesses pacientes. A cafeína é secretada no leite materno, saliva, bile e sêmen (TAVARES et al., 2012).

Assim como outras xantinas, a cafeína possui efeitos inotrópicos, taquicardizantes, broncodilatadores e estimulantes da secreção gástrica. Em doses maiores, produz excitação, ansiedade e insônia e em consumidores habituais se desenvolve tolerância com necessidade de aumentar o consumo para obter os efeitos iniciais. A interrupção do uso produz uma síndrome de abstinência com cefaléia, irritabilidade e letargia (GUERRA et al., 2000).

A nível celular a cafeína apresenta ação sobre os receptores de adenosina, fosfodiesterases, canais de cálcio, receptores GABA, destes o principal mecanismo de ação é a inibição dos receptores de adenosina, pelo fato de a cafeína ser sua antagonista.

A adenosina é um ribonucleosídeo constituído por uma base púrica (adenina) ligada a uma pentose (D-ribose) que está envolvida em funções importantes em nível de sistema nervoso central (SNC) como neuromodulação da transmissão sináptica e neuroproteção, atuando como um mensageiro intercelular. Os receptores purinérgicos de adenosina A1 e A2 são amplamente distribuídos no SNC (ECHEVERRI et al., 2010).

Devido a sua ação sobre os receptores A1 e A2 da adenosina, a cafeína leva a uma maior liberação de dopamina, noradrenalina, ácido gama amino butírico e glutamato em

várias regiões do cérebro, ocasionando um efeito neuroestimulador potenciando o estado de alerta e atenção, assim como retardando o aparecimento da fadiga (ECHEVERRI et al., 2010).

A cafeína apresenta ação na redução do cálcio citoplasmático nas células musculares lisas através da adenosina monofosfato cíclica (cAMP) estimulando o aumento dos níveis de óxido nítrico pelas células endoteliais. A cafeína também é capaz de mobilizar ácidos graxos do tecido adiposo ou dos triglicerídeos intramusculares, o que aumenta a oxidação das gorduras (DALY, 2007; POHANKA, 2014).

O consumo elevado tem impacto negativo na saúde tendo como consequência direta agitação psicomotora, insônia, dor de cabeça e distúrbios gastrointestinais. Um dos grandes problemas atuais relacionados a cafeína é o seu consumo excessivo via bebidas energéticas. Um número crescente de estudos sugere a ocorrência de importantes efeitos adversos principalmente em indivíduos jovens que mesclam estas bebidas energética com bebidas alcóolicas (BREDA et al., 2014).

1.3 Catequinas

Polifenóis são moléculas que apresentam uma ampla variedade de compostos, que segundo suas propriedades químico estruturais estão categorizados como: ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinamicos, antocianinas, protoantocianinas, flavonoides, flavonas, isoflavonas, estiblenos e lignanos. (SILVA et al., 2010).

A catequina ($C_{15}H_{14}O_6$) é um flavonoide, sintetizado como metabólito secundário por diversas plantas. Em termos químicos a catequina possui dois anéis de benzeno (A e B) e um dihidropirano heterocíclico (anel C) que possui um grupo hidroxila no carbono 3. Esta molécula possui dois isômeros que tem configuração trans, e são denominados “catequinas” e dois isômeros que possuem configuração cis que são denominados “epicatequinas”. Como existem estas quatro isoformas, estas moléculas são conhecidas pelo nome genérico de “catequinas” (SILVA et al., 2010).

O consumo diário de catequinas pelo ser humano é estimado ser de 18-50 mg, sendo a maior fonte destas moléculas o chá (verde e preto), chocolate, maçãs, peras, uvas e vinho tinto (MANACH et al., 2005).

As catequinas possuem uma poderosa atividade antioxidante principalmente pela sua propriedade de catalisar oxigênios singlet, uma EROs extremamente lesiva, contra a qual o

organismo não apresenta defesa endógena. Esta capacidade de neutralizar oxigênios singlet está associada a presença do grupo hidroxila no anel B da molécula. (PORTO, 2014).

A biodisponibilidade das catequinas difere conforme a sua estrutura química. A absorção das catequinas e sua biodisponibilidade oral foram determinadas a partir de estudo com camundongos da raça *Spragye Dawley*. Estes animais receberam doses intravenosas ou orais (5000 mg/kg) dos isômeros de catequina. A concentração destas moléculas no plasma, fezes e urina foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os resultados indicaram concentrações plasmáticas máximas de catequina de 15-112 mg/mL duas horas após a administração oral, e a meia vida foi de 7-8 horas (PORTO, 2014).

Em seres humanos, a farmacocinética das catequinas foi estudada a partir da ingestão de chá verde. As concentrações máximas no plasma variaram entre 77,9 a 223 ng/mL, com pico entre 1,3 a 1,6 horas após a ingestão do chá, as catequinas são metabolizadas no fígado via enzimas do Citocromo P450, e a excreção ocorre via renal (LEE et al., 2002).

Um estudo conduzido por Wang et al (2009) com 12 indivíduos saudáveis descreveu que após dez dias de tratamento com uma bebida rica em catequina concomitante a dieta rica em gorduras ocorreu o aumento da oxidação dos ácidos graxos, e a diminuição da absorção gastrointestinal da gordura presente na dieta. Além disto, a ingestão de catequinas aumenta a secreção pelo tecido adiposo da adiponectina um hormônio, que modula vários processos metabólicos tais como: o aumento da captação de glicose, a oxidação de ácidos graxos pelo músculo, e a redução da gliconeogênese hepática. Baixas concentrações sanguíneas desse hormônio tem sido associadas com obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 em humanos e em animais. (NAGAO et al., 2009).

Uma vez que a cafeína e a catequina possuem propriedades químicas com efeitos fisiológicos sistêmicos, muitos estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que o consumo habitual de alimentos ricos nestes compostos, como é o caso do café, chá verde/preto, erva-mate e guaraná, pode ter um papel importante no metabolismo, prevenindo a evolução de doenças crônicas como as cardiovasculares, neurodegenerativas e o câncer.

1.4 Bebidas Cafeinadas

1.4.1 Café

O café (*Coffea arabica*) preparado a partir das sementes torradas é cultivado em mais de 70 países distribuídos em todas as regiões do planeta. Com certeza, o café é a bebida mais popular do mundo (figura 1), sendo preparado nas mais diversas formas.

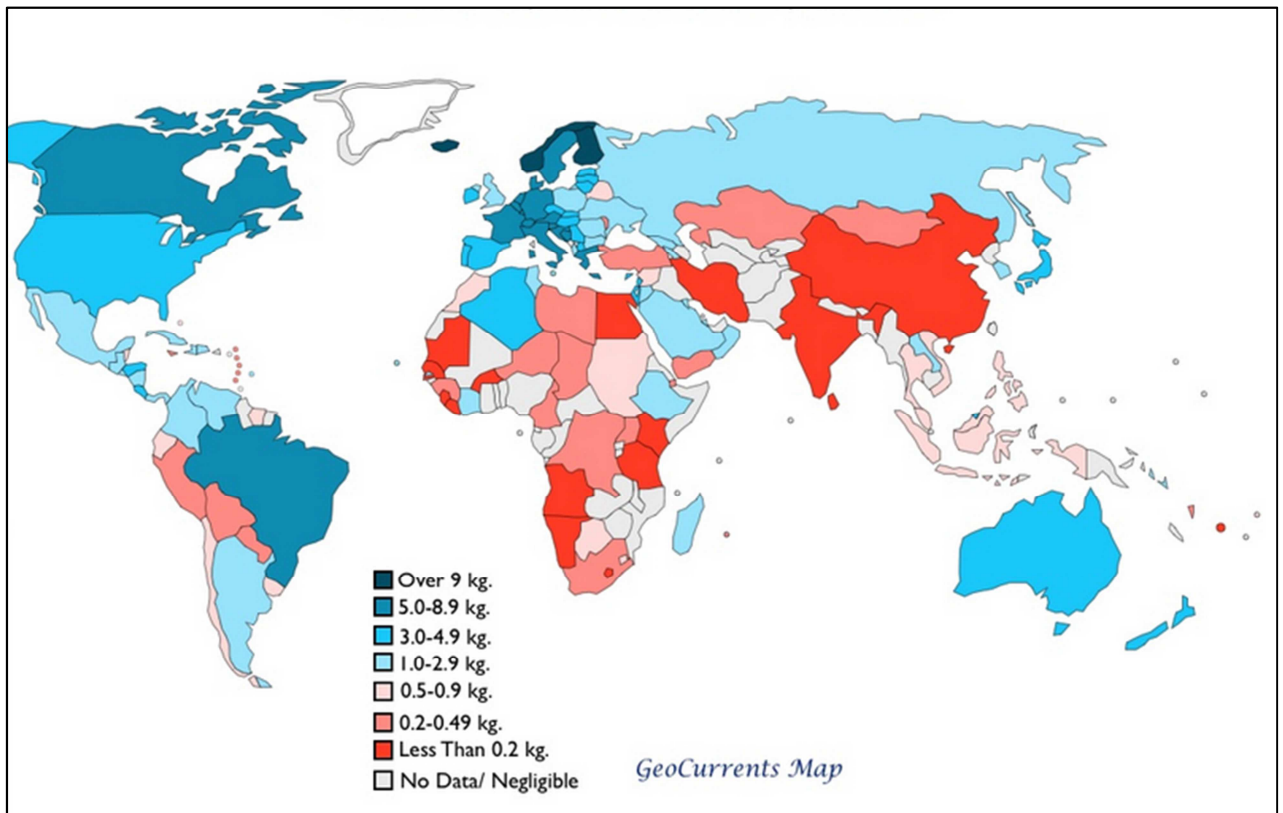


Figura 1: Consumo anual de café per capita no mundo no ano de 2008

Fonte: Geocurrents

O cultivo do café foi iniciado no século XV na região de Mocha, Yemen. Entretanto, foi na Arábia que o café foi tostado e começou a ser preparado de um jeito similar do qual até os dias de hoje é consumido. No ano de 1474 na cidade de Constantinopla foi aberta a primeira loja de café no mundo, que primeiro se expandiu no mundo islâmico e depois para outras regiões. O café foi introduzido na Europa a partir de Veneza e foi aceito, em 1600 pelo Papa Clemente VIII como uma bebida que poderia ser consumida pelos cristãos apesar de muitas pessoas quererem banir o café por considera-lo uma “bebida muçulmana”. Assim, a primeira cafeteria europeia abriu suas portas em Roma no ano de 1645 (CROZIER et al.,

2014). Muitos países produzem café, mas o Brasil permanece com o seu principal produtor, seguido pelo Vietnã e Indonésia.

O nome genérico *Coffea* cobre aproximadamente setenta espécies, sendo duas espécies de maior importância econômica a *Coffea arábica* que corresponde a cerca de 60% do café produzido no mundo, e *Coffea canéfora* responde pelos 40% da produção restante. O *Coffea arábica* é apreciado pela sua qualidade superior, aroma, e maior quantidade de antioxidantes e cafeína. (CROZIER et al., 2014).

O café é uma mistura química complexa composta por mais de mil substâncias químicas, incluindo carboidratos, lipídios, compostos nitrogenados compostos, vitaminas, minerais, alcalóides e compostos fenólicos, entretanto, a composição química de uma infusão de café depende além da variedade, de fatores como o clima de cultivo, o processamento, condições de torrefação e moagem (CROZIER et al., 2014).

Dentre os principais compostos do café estão:

-Cafeína (1,3,7-trimetilxantina), um alcaloide de purina, age inibindo competitivamente os receptores de adenosina A1 e A2a, estimulando assim a atividade neural, e a vasoconstrição. Com o aumento da atividade neural ocorre maior liberação de adrenalina pela glândula supra-renal, culminando com o aumento da pressão arterial, maior capacidade respiratória e aumento do metabolismo energético. A cafeína também aumenta os níveis de dopamina, atribuindo-se a este fato o prazer de tomar café.

-Ácido Clorogênico- De acordo com a sistematização de Clifford (1979), os ácidos clorogênicos (CGA) são descritos como sendo um conjunto de 5 grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros, formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos: o ácido caféico (CA), o ferúlico (FA), ou o *p*-cumárico (*p*-CoA). O ácido clorogênico é reconhecido por diversos estudos como potente antioxidante (CROZIER, 2014). A torra do café causa progressiva destruição e transformação do ácido clorogênico com cerca de 8 a 10% de perda comparada a 1% de perda no extrato seco. A infusão doméstica e a fabricação do café instantâneo extraem muito deste ácido. Uma xícara de 200 mL de café pode conter de 20 a 675 mg de ácido clorogênico dependendo da espécie e condições de processamento (CROZIER, 2014).

-Cafestol e *kahweol*- Diterpenos que correspondem a cerca de 0,6% da composição do café e desempenham papel importante na qualidade da bebida e aroma. Ao cafestol e Kahweol é atribuída a propriedade anti-inflamatória do café (Bertholet 1987, 1988). O cafestol é associado a elevação das frações LDL (Lipoproteína de baixa densidade) e VLDL

(Lipoproteína de muito baixa densidade) do colesterol, por inibir a SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein), que é um fator de transcrição ligado a membranas, reguladora da biossíntese do colesterol por controlar a transcrição dos genes da Hidroximetilglutaril-Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), Lipase Lipoproteica (LPL) e dos receptores de LDL (receptores B/E). 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 do receptor B/E, aumentando LDL e VLDL séricas (HIGDON E FREI, 2007).

Embora o café seja consumido no mundo inteiro, pelo seu aroma, sabor agradável e propriedades estimulantes, estudos vêm demonstrando potenciais efeitos benéficos à saúde associados com o café.

Ascherio e Chen (2003), realizaram estudo com 8 mil homens japoneses e americanos, acompanhados durante 30 anos e descobriram que aqueles que não bebiam café eram de 3 a 5 vezes mais propensos a desenvolverem Doença de Parkinson no período de 30 anos. Os homens que consumiram pelos menos uma xícara de café regularmente apresentaram 50% a menos de chances de desenvolverem Parkinson em 10 anos.

O consumo de café também parece estar associado ao menor risco de suicídio. Lucas et al (2013), realizaram um estudo no qual analisaram o banco de dados de 43.599 homens registrados no *Health Professionals* (1988-2008) e de 73.820 mulheres participantes do estudo *Nurses' Health Study* (NHS, 1992 – 2008) buscando uma relação entre o consumo diário de café e o suicídio. Os resultados demonstraram a diminuição nos índices de suicídio nos consumidores de café.

Numerosos estudos epidemiológicos buscaram a associação entre o consumo de café e o risco de desenvolvimento de câncer, entretanto não há conclusões definitivas entre o consumo da bebida e o desenvolvimento da doença. Ao contrário, Giovanucci (1997) realizou uma meta-análise de artigos publicados, concluindo que o consumo de café pode estar relacionado a menor risco de desenvolvimento de câncer colorretal. Já em estudos realizados por Gallus et al.,(2002), Inoue et al. (2005), e Schimazu et al, (2005) demonstraram que o consumo de café diminui as chances de desenvolvimento de Carcinoma Hepatocelular.

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de café está relacionado com a perda de peso por aumento termogênese, tendo sido verificado aumento de gasto energético após a ingestão do café. Este efeito é creditado a cafeína que parece ser o composto químico responsável pelo efeito termogênico, uma vez que este não foi verificado após a ingestão de café descafeinado (ALVES et al, 2009).

Quanto ao metabolismo antioxidante, Hori et al (2014), analisaram os níveis de 8-deoxiguanosina um marcador de dano ao DNA e perceberam decréscimo deste marcador nos indivíduos que consumiam habitualmente duas ou mais xícaras de café. Bravo e colaboradores (2013), trataram células da linhagem Hela com peróxido de hidrogênio por 2 horas e em seguida adicionaram extrato aquoso de café por 24 horas e então realizaram análise dos níveis de Espécies Reativas, observando que o tratamento com café diminuiu a formação de radicais livres.

1.4.2 Chá verde e preto

Os principais produtores mundiais de *Camellia sinensis*, são a China e a Índia. Na América do Sul, o principal produtor é a Argentina, que ocupa lugar de destaque como o 9º maior produtor mundial de chá. Em 2010, a produção da Argentina de chá foi de 90,7 mil toneladas, enquanto a produção brasileira foi de apenas 7,7 mil toneladas (CAMARGO, 2011).

A *Camellia sinensis* é uma planta perene do tipo arbustiva pertencente à família das Theaceae, sendo a mais importante dessa família, podendo chegar até 3-4 m de altura. Trata-se de uma planta originária da China, tendo seu uso difundido para Índia e o Japão inicialmente seguido, então, da Europa e da Rússia. São cultivadas principalmente duas variedades da planta para a produção de chá a *Camellia sinensis sinensis*, que cresce extensivamente na China, Japão e Tailândia, enquanto que a *Camellia sinensis assamica* cresce predominantemente no sul e sudeste da Ásia, incluindo a Malásia, a Austrália e Brasil. Para a produção do chá são utilizados as folhas e brotos apicais, ambos colhidos manualmente após o surgimento das duas primeiras folhas e, em seguida processados (CAMARGO, 2011).

Tanto chá verde quanto o chá preto, que são popularmente ingeridos em várias partes do mundo sendo produzido das folhas da planta *Camellia sinensis*. O que difere o chá verde do chá preto é a forma de colheita e preparo dos mesmos (Figura 2). O chá verde produzido principalmente pela China é manufaturado a partir de folhas, onde a simples secagem e estabilização das folhas inativa a enzima polifenoloxidase, inibindo assim a oxidação de muitas das moléculas bioativas do chá verde o que preserva o seu potencial antioxidante além de outras propriedades (BARCIROVA, 2010).

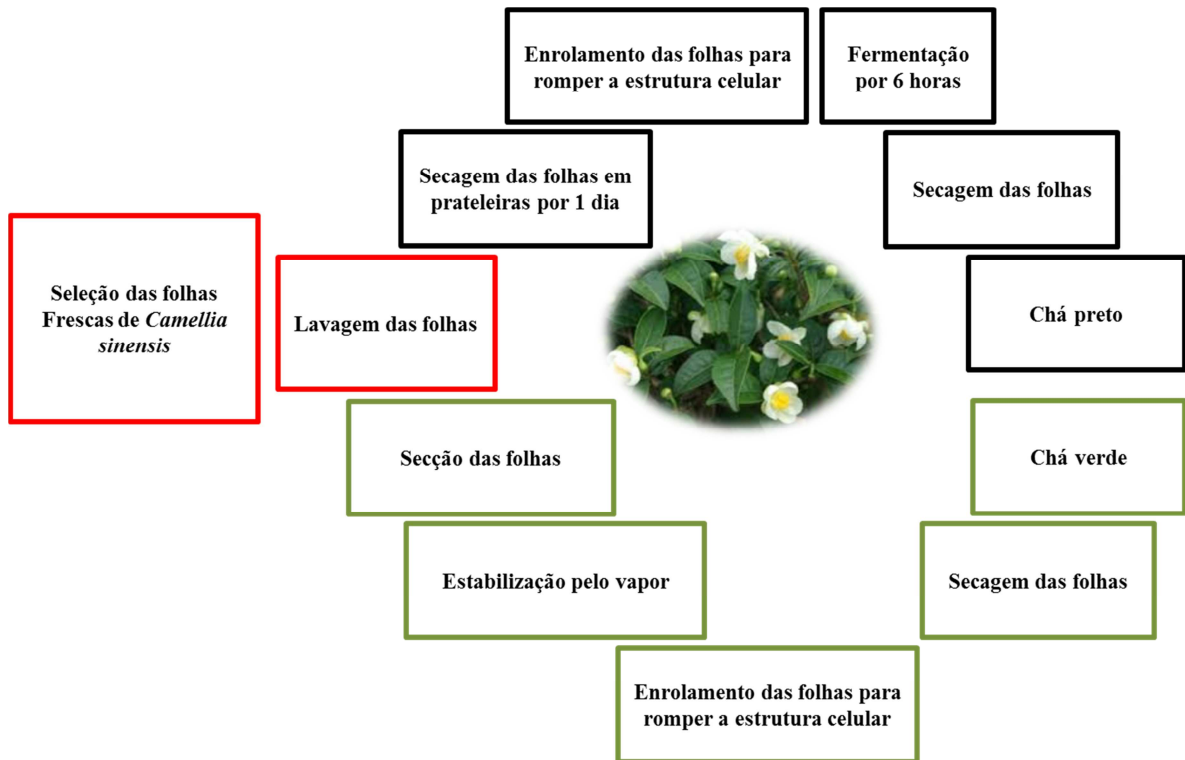


Figura 2: Etapas do processamento das folhas de *Camellia sinensis*, para obtenção do chá verde e chá preto
 Fonte: O arquivo pessoal do autor

A composição química das folhas de chá é bastante complexa. Sendo que carboidratos celulósicos, proteínas e lipídios são os maiores constituintes. Uma vez que são insolúveis, eles não se tornam parte da bebida de chá; apenas componentes de baixo peso molecular, tais como polifenóis, cafeína, teobromina, vitamina C, metais e íons fluoreto passam à infusão (BARCIROVA, 2010).

Diversos estudos vêm sendo realizados evidenciando as propriedades benéficas a saúde do chá verde tais como: hipoglicêmico e hipocolesterolêmico (VELAYUTHAM et al., 2008), anti-inflamatório (SALEH et al., 2014), antibacteriano, antifúngico e antiviral (YIANNAKOPOULOU, 2012), antimutagênico (GUPTA et al., 2002), prevenção de doenças degenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson (CHACKO et al., 2010).

É sabido que cafeína e catequinas são capazes de aumentar o metabolismo energético do organismo e favorecer a oxidação de ácidos graxos, assim o chá verde tem sido amplamente utilizado para a perda de peso. Quando associado à prática de exercícios físicos seu efeito termogênico é potencializado (DULLOO et al., 2009).

A propriedade antitumoral do chá verde se deve à interferência na indução, desenvolvimento e progressão do tumor através da modulação de diversos mecanismos,

incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástase. Segundo Chen e Ping-Dou, (2008) um dos principais componentes do chá, a Epigallocatequina galato (EGCG) é um inibidor potente e específico da atividade da via proteosômica / ubiquitina, proteína essencial para a proliferação do tumor e desenvolvimento de resistência às drogas antineoplásicas. A EGCG, também inibe a atividade da DNA metiltransferase, responsável pela metilação do DNA e consequente indução do processo carcinogênico (CAMARGO, 2011).

As catequinas possuem propriedades cardioprotetoras, devido à inibição da oxidação da LDL, ocasionando assim a redução da sua captação pelos macrófagos, e da inflamação vascular, os riscos de trombogênese e da reatividade vascular (VELAYUTHAM et al., 2008).

Outro efeito observado é de que o chá verde parece restaurar a função endotelial por promover o balanço entre os vasodilatadores como Óxido Nítrico e os vasoconstritores como os tromboxanos e os isoprostanos, melhorando a resistência vascular acarretando na diminuição dos níveis pressóricos. Um estudo realizado por Kim e colaboradores (2006), com 1500 indivíduos, de idade superior a 20 anos que consumiam pelo menos 600 mL de chá verde ao dia, obtiveram uma redução de 65% do risco de adquirir hipertensão arterial sistêmica.

Já o chá preto produzido principalmente na Índia, é obtido pela fermentação completa das catequinas das folhas da *Camellia sinensis* pela enzima polifenoloxidase. A fermentação resulta em dímeros e polímeros das catequinas, que conferem o sabor e cor característicos a esse produto (SHARANGI, 2009).

O chá preto apresenta na sua composição, além de polifenóis, outros compostos orgânicos como aminoácidos, metilxantinas, carboidratos, proteínas, compostos voláteis e elementos minerais. A oxidação enzimática das catequinas gera uma mistura complexa de dímeros e polímeros das catequinas monoméricas, constituída de teaflavinas, teasinesinas e tearubiginas, fenômeno esse conhecido como "escurecimento enzimático". Dos polifenóis oxidados há no chá preto cerca de 2-6% de teaflavinas e mais de 20% de tearubiginas, comparado ao chá verde que é composto de 20-42% de catequinas monoméricas (CAMARGO, 2011).

O chá preto possui muitas propriedades comprovadamente benéficas à saúde dentre elas: antioxidantes (MANIANN et al., 2007), antiateroscleróticas (PEREIRA e ABDALLA, 2006), redução de peso e circunferência da cintura, e diminuição no colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (BARCIROVA, 2010), hipoglicemiantes e anticancerígenas (MACHADO et al., 2008; WANG et al., 2000).

1.4.3 Erva-mate

Das folhas da planta *Ilex paraguariensis* (figura 3) pertencente a família Aquifoliaceae, é produzida a erva-mate, utilizada para produzir bebidas quentes ou frias que são tradicionalmente consumidas na América do Sul, principalmente no Brasil, Paraguai, Argentina, Uruguai, Bolívia e Chile (BRACESCO et al., 2011)

No Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul a erva-mate é utilizada para fazer o tradicional chimarrão que é consumido habitualmente por um grande número de pessoas. É neste Estado que se concentra a maior produção do país de erva-mate.

Atribui-se aos índios Guaranis e Quichua que viviam na região nordeste da Argentina o descobrimento e uso da erva-mate como bebida. No século XVI estes indígenas passaram este conhecimento para os colonizadores espanhóis que acabaram disseminando o seu uso e consumo para toda a Bacia do Prata. Relatos históricos descreveram que, a erva-mate chegou a ser considerada como uma “erva do diabo” pelos padres jesuítas. Entretanto, a partir do século XVII esta situação mudou e os mesmos passaram a estimular o consumo da erva-mate a fim de que a mesma substituísse a ingestão de bebidas alcoólicas que já era bastante alta (MATSUMOTTO, 2008).

A produção da erva-mate consistia em torrar as folhas de uma certa árvore silvestre, fragmentá-las e coloca-las num pequeno porongo, com água morna, quase quente e chupar com um canudinho de taquara (BRACESCO et al., 2011).

Percebendo o apreço pela erva-mate os colonizadores jesuítas decidiram promover o cultivo de erva-mate como uma indústria, e mais tarde a bebida foi adotada por pessoas brancas que a nomearam “Chimarrão” ou “mate” no Brasil, “mate” na Argentina e no Uruguai e “tereré” no Paraguai, onde diferentemente dos demais países a bebida é preparada com água fria no verão (BRACESCO et al., 2011).

Hoje o chimarrão ainda é preparado principalmente em cuias de porongos que são frutos da espécie *Lagenaria siceraria*, sendo adicionado $\frac{3}{4}$ da cuia de erva-mate, em seguida toda a erva deve ser direcionada para um lado da cuia, inclinando-a com auxílio da mão ou algum utensílio plano, em seguida deve ser adicionada a água quente (± 80 °C) e por último deve ser inserida a bomba, um tubo estreito que tem uma extremidade aberta achatada que entra em contato com a boca de quem está tomando o mate e termina com uma extremidade

com o tamanho aproximado de uma colher de sopa com perfurações, as quais evitam que a erva seja aspirada com a água (Figura 3).



Figura 3: A esquerda Folhas de *Ilex paraguariensis*. A direita: Tradicional Chimarrão, um dos principais modos de consumo da *Ilex paraguariensis*

Fonte: O autor

Este método de uso da erva-mate permite a extração contínua dos compostos, a cada cuia cerca de 20 a 40 mL de água com os compostos recém-extraídos da erva-mate são ingeridos. O processo de beber é contínuo e acompanha as atividades diárias, assim como o café em outras regiões do mundo, assim mesmo que em baixas concentrações os compostos benéficos à saúde extraídos da erva-mate permanecem em concentrações séricas contínuas no organismo (BRACESCO et al., 2011).

No Sudeste do Brasil, as folhas da *Ilex paraguariensis* são consumidas na forma de chá-mate, no qual se coloca erva-mate tostada em uma infusão de água quente, adiciona-se açúcar, aguarda-se o resfriamento da bebida, que é servida gelada, podendo ser consumido com leite ou suco de limão. O chá-mate é altamente consumido nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, havendo inclusive franquias de lojas especializadas na bebida.

Quanto a composição química da erva mate, tem-se os grupos: fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Desta última, destacam-se a cafeína, a teobromina e a teofilina, aos quais é atribuída a ação estimulante do mate ao Sistema Nervoso Central. Dentre as saponinas destacam-se as agliconas, ácido ursólico e oleoanólico, sendo estas substâncias responsáveis pelo sabor amargo e espuma do mate. (MATSUMOTO, 2008).

Em relação aos compostos fenólicos, tem-se um elevado número de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico e seus isômeros, atribui-se a estes compostos o sabor adstringente da bebida. É fundamental ressaltar, que os flavonoides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e cafeoilglicosé também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (MATSUMOTO, 2008).

As pesquisas sobre as propriedades biomédicas da erva-mate tiveram início há cerca de 20 anos, sendo ainda bastante escassas em relação ao chá verde, chá preto e café, dos quais se tem um vasto conhecimento e literatura, acredita-se que esta diferença seja reflexo do desenvolvimento econômico e tamanho das populações que consomem as referidas bebidas (HECK E DE MEJIA, 2007).

Gugliucci (1996), analisou oxidabilidade de LDL no plasma de seres humanos saudáveis em jejum antes e após a ingestão de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, concluindo que antioxidantes da erva são absorvidos e atingem elevados níveis no plasma, inibindo a auto-oxidação de LDL. Já em 2006, Mosimann e colaboradores realizaram estudo com coelhos alimentados com dieta rica em colesterol e tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (mate). Após 2 meses de tratamento a área de lesão aterosclerótica foi 30% menor no grupo hipercolesterolêmico tratado com mate em relação ao não tratado, assim como o colesterol aórtico que sofreu redução de 50%. Demonstrando que a erva é capaz de inibir a progressão da aterosclerose em coelhos alimentados com colesterol, embora neste estudo não houvesse diminuição do colesterol no soro.

Ainda no contexto do metabolismo lipídico, no combate a formação da placa aterosclerótica, responsável pela maioria das doenças cardiovasculares a enzima antioxidante Paraoxonase 1 (PON 1) tem um papel fundamental na oxidação da LDL. A PON 1 é capaz de inibir a formação de lipídios oxidativos pró-inflamatórios ou degradá-los se houver formação. Diante disso, a relevância do estudo realizado por Menini e colaboradores (2007), com voluntários saudáveis que ingeriram uma única vez 500 mL de extrato aquoso de erva mate, e tiveram aumento de 10% da atividade da enzima PON1 em relação aos voluntários que ingeriram água ou café.

Em estudo desenvolvido por De Moraes et al., (2009), com seres humanos em tratamento com estatinas que ingeriram por 2 meses extrato aquoso de erva mate mostrou que o consumo melhorou os parâmetros de lipídios séricos em indivíduos saudáveis com dislipidemia, com redução significativa dos níveis de LDL-colesterol, em paralelo com um aumento no colesterol HDL.

Um recente artigo mostrou que o extrato de *Ilex paraguariensis* é capaz de inibir a atividade da lipase pancreática *in vitro*, a lipase pancreática atua na clivagem e absorção dos ácidos graxos (SUGIMOTO et al., 2009). Estudos *in vivo* demonstraram que os ratos alimentados com extratos de *Ilex paraguariensis* e dietas ricas em lipídios ganharam menos peso do que os controles, demonstrando atividade anti-obesogênica, foi observado também um aumento na atividade da enzima AMPK, que desempenha papel central no metabolismo energético (ARCARI et al., 2009). A Estimulação de AMPK por produtos naturais constitui uma alternativa terapêutica ao combate a obesidade, efeito similar ao observado com a erva já foi descrito em estudo utilizando o resveratrol substância fenólica encontrada no vinho. (ACTIS-GORETTA et al., 2002).

A erva-mate também apresenta atividades antioxidantes proporcionando o aumento da expressão dos genes das enzimas antioxidantes, diminuição da lipoperoxidação e melhora no balanço antioxidantes (MATSUMOTO et al., 2009). Ainda, ação anti-inflamatória por bloqueio da enzima Ciclo Oxigenase 2 (COX-2) (PUANGPRAPHANT e DE MEJIA, 2009), diminuição da inflamação em pulmões de ratos expostos a fumaça de cigarro (LANZETTI et al., 2008) e ação antimutagênica (MIRANDA et al., 2008), na figura 4, pode-se observar um resumo dos benefícios a saúde propiciados pela erva mate.

Alguns estudos relacionam o consumo do chimarrão ao desenvolvimento de câncer, entretanto, este fator parece ser devido ao consumo da água em temperatura elevada. REF

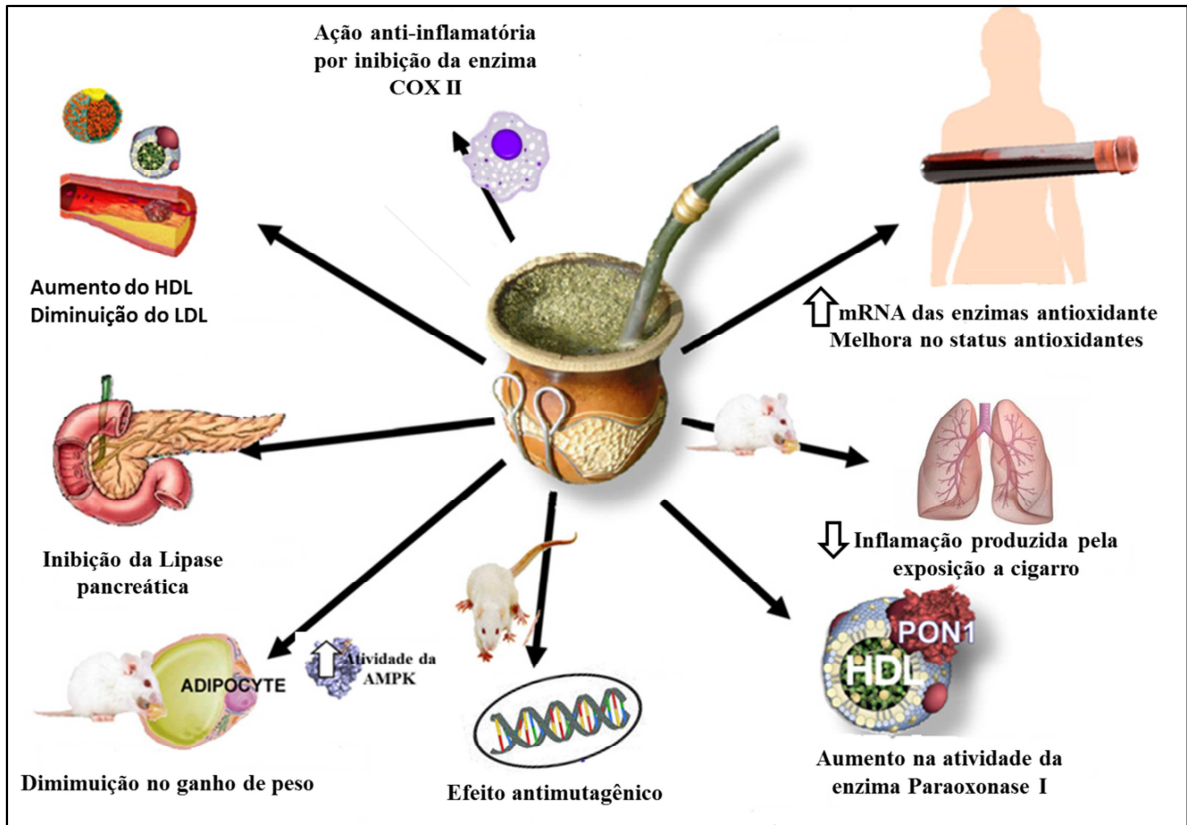


Figura 4: Diagrama resumando os benefícios da *Ilex paraguariensis* em estudos realizados.

Fonte: Adaptada de Bracesco et al., 2011

1.4.4 Guaraná

O guaraná (*Paullinia cupana*), que pertence à família Sapindaceae é uma planta nativa da Amazônia que possui diversas propriedades medicinais, estimulantes, energéticas e afrodisíacas, as quais têm garantido o consumo e comercialização do fruto a nível nacional e internacional (KUSKOSKI et al., 2005). A planta do guaraná (Figura 5) não é somente encontrada no Brasil, mas também na Peru, Colômbia e Venezuela. Entretanto, o seu cultivo em termos comerciais é feito somente pelo Brasil, no município amazonense de Maués, na Bahia e Mato Grosso.



Figura 5: Guaranazeiro e a direita baga de guaraná composto pelos frutos em preto.
Fonte: Adaptada de Embrapa

O guaraná foi domesticado por povos indígenas amazônicos com destaque aos Saterê-Maués, que possuem uma lenda relacionada a este fruto, estando a reserva indígena deste povo situada dentro do município de Maués do Estado do Amazonas. Na medicina tradicional o guaraná é utilizado como energético, afrodisíaco e no tratamento de distúrbios gastrointestinais (HENMAN, 1982).

O seu uso para a produção de bebidas do tipo cola data do início do século XX (1906) em uma fábrica de refrigerantes localizada em Santa Maria-RS, a Guaraná Cyrilla. O refrigerante foi desenvolvido por um químico alemão (Franz Diefenthaler). Inicialmente a bebida era muito adstringente e amarga e por isto não se tornou muito popular. Somente em 1921 é que a empresa de produção de bebidas Antarctica desenvolveu um processo para eliminar o sabor desagradável do guaraná lançando assim o refrigerante guaraná, consumido até os dias atuais (SMITH e ATROCH, 2007).

Os estudos em revistas indexadas sobre o guaraná emergiram -ainda na década de 40 (GAGNO, 1947; BASTO LIRA, 1947). Entretanto, a partir da revisão dos artigos verificou-se a citação de investigações sobre o guaraná e suas propriedades gerais que datam da década de 30 como é o caso da do trabalho feito por Cabral em 1932 e sobre estudo de caracterização de alcalóides no guaraná feito pelo próprio Gagno no ano de 1942.

A continuidade das investigações levou a identificação e quantificação da cafeína como um dos principais compostos bioativos do guaraná. Maravalha et al. (1965) quantificou uma percentagem de 2,7% a 3,5% de cafeína presente na amêndoa do guaraná e de 2,7% a 3,0% na casca do fruto, descrevendo também dois outros compostos, a teobromina e a teofilina. Posteriormente, Belinardo et al (1985) utilizando método de cromatografia por

CLAE confirmaram e quantificaram as concentrações de cafeína, teofilina e teobromina (alcaloides púricos) em amostras comerciais de guaraná. Outro estudo investigou a quantidade de cafeína em 13 diferentes marcas de suplemento de guaraná mostrou uma concentração média de cafeína encontrada entre 14,18 a 28,79 mg/g de pó de guaraná (TFOUNI et al., 2007). Além destas metaxantinas, outros compostos com atividade antioxidante foram identificados no guaraná como as saponinas, catequinas, epicatequinas, proantocianóides e taninos (COSTA, 1972; SIMEARY et al., 1982; YOSHIZAWA et al., 1987).

Uma investigação conduzida por Angelo et al. (2008) avaliou o transcriptoma do guaraná, em que foram detectados mais de 15 mil transcritos a partir de DNA complementar relacionados com diversas rotas metabólicas. O estudo mostrou grande similaridade entre o conteúdo de transcritos de metabólicos secundários observados no guaraná com o do café, chá (verde e preto) e chocolate, indicando compartilhamento de propriedades funcionais do guaraná com estes alimentos.

Uma série de propriedades funcionais relacionadas ao guaraná foram testadas a partir de modelos experimentais, celulares (*in vitro*) e em animais (*in vivo*). Diversas funções biológicas têm sido atribuídas ao guaraná o que o inclui na categoria de plantas adaptogênicas (MENDES e CARLINI, 2007).

Neste contexto foram descritas propriedades antioxidantes do guaraná (MATTE et al., 1998; BASILE et al., 2005; JIMOH et al., 2007) bem como ação anti-microbiana (FONSECA et al., 1994) incluindo efeito inibitório do guaraná na evolução da placa bacteriana dental (PINHEIRO et al., 1987; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), assim como efeito anti-alérgico (JIPPO et al., 2009). Resultados também sugeriram efeitos fisiológicos do guaraná na cascata de coagulação sanguínea uma vez que foi averiguada sua ação antiplaquetária (HALLER et al., 2005; RAVI et al., 2008).

Estudos sobre o potencial efeito anticarcinogênico têm sido realizados, sendo relatados efeitos protetores do guaraná contra dano no DNA, efeitos quimiopreventivos na hepatocarcinogenese (FUKUMASU et al., 2006), efeitos anticarcinogênicos na inibição do crescimento de células tumorais de melanoma de pulmão (FUKUMASU et al., 2008). Um outro estudo descreveu proteção do guaraná ao dano testicular causado pela exposição ao cádmio (LEITE et al., 2010). Adicionalmente, o estudo feito por Campos et al. (2003) sugere efeito gastroprotetor do guaraná.

Entretanto, foi somente em 2011 que uma pesquisa realizada pelo Laboratório de Biogenômica da Universidade Federal de Santa Maria descreveu o potencial efeito do guaraná em idosos que habitualmente consumiam este alimento (KREWER et al., 2011). O estudo foi

conduzido em uma população ribeirinha de Maués-AM e demonstrou que o fruto possui importante papel na redução dos níveis plasmáticos de colesterol LDL (Lipoproteína de baixa densidade), pressão sanguínea, marcadores do metabolismo oxidativo e peso corporal. Investigações adicionais do mesmo grupo de pesquisa mostraram que o guaraná é capaz de modular níveis de óxido nítrico em uma linhagem de células embrionárias (BITTENCOURT et al., 2013), diminuir os níveis de LDL-oxidado (PORTELLA et al., 2013), apresenta importante atividade anti-inflamatória similar a moléculas bioativas que reconhecidamente agem sobre o organismo humano como o resveratrol (KREWER et al., 2014), possui ação hepatoprotetora (KOBBER et al., 2015), tem a capacidade de reverter indicadores de senescência celular de células tronco mesenquimais humanas oriundas de lipoaspirados (MACHADO et al., 2015), possui efeito antitumoral contra a linhagem MCF7 de câncer de mama (HERTZ et al., 2014). Além disto, estudos complementares publicados na literatura sugerem atividade neuroprotetora do guaraná (BITTENCOURT et al., 2014).

1.5 Nutrigenômica: hipótese do estudo

A nutrição moderna centra-se na prevenção de doenças e manutenção da saúde. Objetivando, compreender como os diferentes meios de interação entre genes e dieta podem contribuir para alcançarmos longevidade aliada a qualidade de vida e saúde.(REF)

A genômica nutricional emergiu como uma nova área da ciência que estuda a interação entre genes e nutrição. Podendo ser entendida de duas maneiras: como a alimentação poderia influenciar a estrutura e expressão dos genes, que compõe o genoma humano - Nutrigenômica. (REF)

A segunda maneira refere-se à nutrigenética que busca compreender às interações entre hábitos dietéticos e o perfil genético de cada indivíduo. Assim, ela é baseada em observações das respostas individuais à determinada modificação na dieta e também em hipóteses que estas diferentes respostas sejam associadas à presença ou ausência de marcadores biológicos específicos, geralmente polimorfismos genéticos, que poderiam, então, prever a resposta individual a dieta. Com isso, será possível, no futuro, a prescrição de uma “dieta personalizada” de acordo com a constituição genética do paciente (SCHUCH et al., 2009).

Portanto, a nutrigenômica é uma área da nutrição que utiliza ferramentas moleculares para entender como a dieta age sobre o metabolismo humano, através da análise da sua influência na regulação gênica (suprimindo ou estimulando a sua expressão) ou mesmo na regulação da produção e atividade de proteínas e enzimas. Por exemplo, investigações com as vitaminas A, D e ácidos graxos mostraram que estes compostos conseguem ativar receptores nucleares e induzir a transcrição de diversos genes (FIALHO e MORENO, 2008; DAUNCEY, 2013; SALLE et al., 2014).

Uma vez que bebidas cafeinadas apresentam propriedades funcionais similares, uma questão em aberto é se as mesmas teriam efeitos nutrigenômicos quando estudadas da maneira como são geralmente preparadas para o consumo.

Deste modo, a hipótese geral deste estudo é a de que todos os extratos aquosos destes alimentos possuem capacidade de modular diferencialmente a expressão dos genes das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD1 dependente de cobre e zinco e SOD2 dependente de manganês), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (CAT).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito nutrigenômico de extratos aquosos á quente oriundos de cinco alimentos cafeinados citar os compostos na modulação *in vitro* dos genes das enzimas antioxidantes.

2.2 Objetivos Específicos

A partir da obtenção de extratos aquosos de café, chá preto, chá verde, erva-mate e guaraná:

- quantificar as concentrações de cafeína, teobromina, catequina, polifenóis alcaloides e taninos totais;
- determinar a capacidade antioxidante dos extratos;
- avaliar o efeito na modulação da expressão dos genes das enzimas SOD1, SOD2, GPX e CAT em culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) obtidas de adultos saudáveis;

3 RESULTADOS

A metodologia e os resultados do estudo são apresentados sob a forma de um manuscrito que será submetido ao *Journal Food and Chemical Toxicology*, fator de impacto 3,28 correspondendo ao Qualis B1, segundo critérios da CAPES.

THE *IN VITRO* EFFECTS OF FIVE CAFFEINATE BEVERAGE ON TRANSCRIPTIONAL MODULATION OF ANTIOXIDANT ENZYME GENES

A.F.Lenz^{a#}, T.C. Unfer^{b#}, A.O. Alves^c, F.Barbisan^d, G.C. Weise^e, E.B.Dornelles^f,
M.A.Mostardeiro^g, C.F. Teixeira^h, F.C.Cadonáⁱ, Rosa S.R.^j, E.E.Ribeiro^l, Morel, A.F^m,
I.B.M.da Cruz^{n*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Email: adrianoflenz@hotmail.com

^bUniversidade Federal de Sergipe - Departamento de Farmácia
Campus Universitário Prof. Antônio Garcia Filho, Rua Padre Alvares Pitangueira, nº 258, Centro, Zip Code: 49.400-000 - Lagarto –SE , Brazil Email: unfer.tc@gmail.com

^c Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Email: audreyalves77@gmail.com

^dPrograma de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 21, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Email: fernandabarbisan@gmail.com

^ePrograma de Pós-Graduação em Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Email: grazielle.castagna@gmail.com

^fPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Email: dornellesedu@gmail.com

^g Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Email: marcomostardeiro@hotmail.com

^hLaboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Email: cibelefteixeira@hotmail.com

ⁱPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Email: fran.cine.bio@hotmail.com

^j Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Email: beadasilvarosa@gmail.com

^l Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas, Av. Carvalho Leal, 1777 Cachoeirinha 69065-001, Manaus, Amazonas Brazil. Email: unatieuler@gmail.com

^m Programa de Pós-Graduação em Química , Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Telephone: 55-55-3220 8163. Email: ademirfariasm@gmail.com

^m Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Telephone: 55-55-3220 8163. Email: ibmcruz@hotmail.com.

* Corresponding author; # The two authors contributed equally in the present study

Abstract

Caffeinate beverages are broadly consumed by human populations presenting important antioxidant effects. Probably this effect occurs by chemical reductions of oxidative molecules and by differential modulation of antioxidant genes. However, until moment, these properties were determined from isolated studies. For this reason we performed an *in vitro* investigation that evaluated the effect of hot aqueous extracts of five caffeinate beverages (coffee, black and green tea, yerba mate and guaraná) on gene modulation of four antioxidant genes (SOD1, SOD2, CAT and GPX). Hot aqueous extracts were produced in similar conditions that generally human beings consume these beverages. Their main bioactive compounds were quantified by HPLC and the antioxidant capacity was determined DPPH assay. Peripheral blood mononuclear cells were cultivated in controlled conditions and exposed at 5 mg/mL of each extract. After 6 h exposure, the gene expression was evaluated by Real-Time PCR analysis. The effect of isolated caffeine, theobromine and catechin in the concentrations estimated to be found in each extract was also evaluated. The results showed an important up regulation of SOD1, CAT and GPX genes in the extracts. These results suggest that a cup of any caffeinate beverage tested here has a potentially nutrigenomic effect on antioxidant genes.

Key words: coffee, black tea, green tea, guaraná, yerba mate, nutrigenomics, antioxidant genes

1. Introduction

Beverages rich in caffeine and other bioactive molecules such as catechin are produced by different plants originated from several geographic places of the world. Currently coffee, black and green tea, yerba mate and guaraná are broadly and habitually consumed by human societies (Figure 1), *in natura* or from industrialized products such as energetic beverages. Besides these foods share many bioactive molecules, a large number of results obtained from experimental models and humans beings studies suggest occurrence of similar biological properties among extracts produced from these caffeinate/catechin food beverages. These properties include antioxidant, antiinflammatory, antiobesogenic, antimutagenic, antitumoral, hypolipemiant effects among others (Bracesco et al., 2011; Schimpl et al., 2013; Bathi et al., 2013; Cano-Marquina et al., 2013; Bhardwaj and Khanna, 2013; Santesso and Manheimer, 2014). For this reason, the moderate consumption of these caffeine/catechin-richest foods is indicate to prevent chronic diseases age-related such as cardiovascular, neurodegenerative diseases and cancer and potentially decrease total mortality (Bhatti et al, 2013; Je and Giovannucci, 2014).

The causal mechanisms that become these caffeine/catechin-richest foods important to diseases prevention include the capacity of these bioactive molecules in trigger differential transcriptional modulation of genes involved with several biochemical and molecular pathways including genes related to oxidative and inflammatory metabolisms.

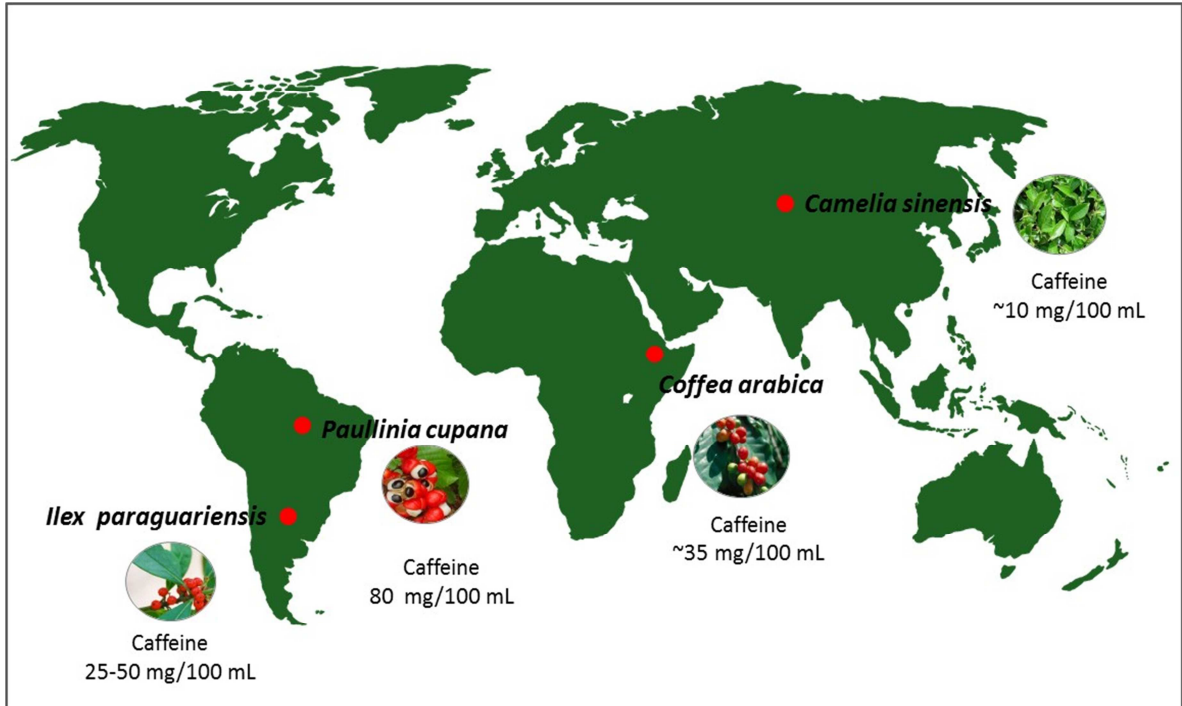


Fig.1 Map indicating world origin of species broadly used as caffeinate beverages and the estimative of caffeine concentration (mg/100 mL) of each specie. Caffeine concentration estimative from each food were obtained from Bhatti et al., 2013; Schimpl et al., 2013; Je and Giovannucci, 2014.

However, the most of the investigations performed that had analyzed the genomic action of these foods were made in an isolate way, and generally using extracts obtained from different solvents as ethanol, methanol and others. Therefore, an open question is whether, in fact the habitual preparation of these caffeine/catechin-richest foods, which generally involves a hot-aqueous infusion extract produce a sufficient bioactive molecules to act on gene modulation. To answer this question we performed an *in vitro* protocol using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy subjects to evaluate nutrigenomic action on transcriptional modulation of antioxidant metabolism genes, for hot-aqueous beverages produced in a similar way with coffee (*Coffea arabica*), black/green tea (*Camelia sinensis*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and guaraná (*Paulinia cupana*).

Materials and Methods

Chemicals

All chemicals used in this study were purchased from Gibco® Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA and Sigma® St. Louis, MO, USA.

Plant Material

To produce hot-aqueous extracts, the coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canefora* containing) was donated by the Yémen Indústria e Comércio de café Co. (Agudo, Rio Grande do Sul, Brazil), in a form of roasted beans to be ground at the time. The *Camellia sinensis* tea (green and black) was donated by Chá Prenda do Brasil Co (Senador Salgado Filho, Rio Grande do Sul, Brazil). Yerba mate, leaves and parts of *Ilex paraguariensis*, was obtained from Barão Comércio & Indústria de erva mate Co (Barão de Cotegipe, Rio Grande do Sul, Brazil). Guaraná powder was supplied by EMBRAPA Oriental (Agropecuária Research Brazilian Enterprise) located in the Western Amazon in Maués, Amazonas-Brazil. The coffee, teas, yerba mate and guaraná powder were stored in dry conditions at - 20°C until the extract preparations.

Hot-aqueous infusion preparation and bioactive molecules determination

The extracts of caffeinate foods studied here were obtained by infusing 100g of each dries samples powder in 1000 ml of distilled and deionized water by 10 minutes of infusion with temperature being approximately 90°C and, 3 gentle agitation (times: 0, 5 and 10'). After extraction, the resulting solution was filtered through Whatman No. 8 paper, placed in amber glass (capacity to 1.5 L) containers protected from light, stored at -8°C, and hereafter lyophilized. The extracts produced were equivalent to instant tea or coffee and were keep at -20°C in plastic tubes, sealed with parafilm and protected from light until to be used in the experiments.

Phenolic, Alkaloids and Tanins Total Levels- Grazi Chromatographic analysis was performed with detection by UV absorbance at 272 nm on an HPLC system consisting of a Shimadzu Prominence LC – 20A, an LC-20AT quaternary pump, a SIL 20 auto sampler– A, a DGU-20A5 on-line degasser, a CBM-20A integrator and a SPD-20AV DAD detector according to Andrews et al. (2007). A 150 mm × 4.6 mm i.d. ODS-3 column (Phenomenex Prodigy ODS-3 100A, 5-µm particle size; Torrance, CA, USA) was used for the separation.

The Bempong & Houghton (1992) to guaraná bioactive compound analysis was used as a reference. A stock solution of caffeine (250 µg/mL) was prepared and stored at 5°C. Working level standards were prepared by diluting the stock solution in mobile phase at the following ratios: 200 µL to 100 mL, 400 µL to 100 mL, 2 mL to 100 mL, 4 mL to 100 mL and 8 mL to 100 mL. The least concentrated standard was designed to achieve a limit of detection of 0.005% based on a 1 g sample diluted to 100 mL (LOD = 0.05 mg/g). The guaraná sample extract was filtered through a 0.45-µm filter into an autosampler vial for

analysis. The HPLC conditions were: flow rate, 1 mL/minute; mobile phase A, 0.1% H₃PO₄ in water; mobile phase B and, 100% ACN. The chromatographic system was calibrated with at least a five-point standard curve for each set of samples analysed (Belinaro et al., 1985; Bittencourt et al., 2013). Standards were run after every fourth sample. Excellent reproducibility was seen in the standards; typically, the R value for the calibration curve was 0.9999 or better. From these results, we prepared the guaraná compound to add to the culture medium according to the Santa Maria et al. (1998) protocol. The lyophilised extract was diluted in distilled water and prepared at a concentration of 200 mg/mL. The mixture was infused for 7 min by boiling, centrifuged (1500 rpm, 15 min) and filtered. The solution was sterilised by filtration (0.20 µM) before adding to the culture medium.

The estimation of condensed tannins in the guaraná extract was measured spectrophotometrically (Morrison et al., 1995). The contents were expressed as milligram equivalents of gallic acid/ mL of grape juice. The equation obtained for the standard curve of gallic acid in the range of 2.5 – 20 mg/mL was $y = 0.0434x + 0.1359$ ($R^2 = 0.9819$).

General experiment design and PBMC culture conditions

The *in vitro* study was performed using PBMCs cells obtained from four non-smokers healthy adult volunteers (26 ± 6 years old), therefore this investigation was approved by the Universidade Federal de Santa Maria Ethical Board under number 0146.0.243.000-07. All participants signed the consent term. The *in vitro* assay was similar to previously described in Krewer et al (2014) and Barbisan et al (2014). Briefly, 20 mL blood samples were collected by venipuncture using heparinized vials and then transferred to tubes with Ficoll histopaque (1:1). The tubes were centrifuged for 30 min at $252 \times g$ and PBMCs were positioned in the interfase, PBMCs were centrifuged again (10 minutes at 2000 rpm) and transferred to culture

medium containing 1 ml RPMI 1640 (GIBCO) with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin. Culture tubes for each subject were prepared at a final concentration of 1×10^6 cells/mL. The PBMC cultures were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h before performing the experiments. Further cells were distributed in 96-well plate and exposed at 5 mg/mL concentration of all extracts. This concentration was chosen based on previous studies performed by Bittencourt et al (2013), Krewer et al (2014) and Machado et al (2015) that found antioxidant, anti-inflammatory and improvement in cellular proliferative rate of cells exposed to guaraná.

Antioxidant capacity evaluation

The antioxidant capacity of caffeine beverage hot aqueous extracts was confirmed by spectrophotometric DPPH assay that monitors the ability of the extracts to scavenge the stable free radical DPPH. The assay was performed according to a slightly modified method previously described by Choi et al. (2002). DPPH scavenging ability was also calculated as EC₅₀ (the concentration that yields 50% free radical scavenger).

The ethanolic solution of DPPH $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was prepared at the time of analysis, being stored and protected from light. A concentrated ethanolic solution ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of the freeze-dried material, equivalent to instant tea, obtained from hot-aqueous infusion (coffee, black/green tea, yerba mate and guarana) was used to prepare the analyzed concentrations (10, 20, 50, 100 and $150 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) REF. For the standard preparation was used the same conditions as the sample preparation, however, rutin used a different final concentrations (6, 10, 15, 20, 25 and $30 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Different ethanol dilutions (2.5 mL) were mixed with 1.0 mL of a 0.3 mol/L^{-1} DPPH ethanol solution. The reaction occurred upon incubation in the dark at room temperature for

30 minutes, after this period, the absorbance was measured at 730 nm. All determinations were performed in triplicate. The DPPH solution (1.0 mL, 0.3 mol/L₁) plus ethanol (2.5 mL) was used as a negative control.

We used the linear regression analysis to calculate the sample concentration effective for removal of 50% of DPPH[•](EC₅₀). Analysis of variance (ANOVA) was performed to identify differences between the antioxidant capacities of the sample.

Viability assay

The potential effect of aqueous extracts on PBMCs viability after 24 h exposure was performed by the MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) reduction assay as described by Mosmann (1983). Briefly, treated cells were incubated for 4 h with MTT reagent. After the formazan salt was dissolved, the absorbance was measured at 570 nm. The cells were photographed before the addition of DMSO in order to observe the formazan crystals. The MTT assay was performed using a 96-well plate in three independent replications. The results were expressed as a percentage of the untreated control values. The test was performed in triplicate.

mRNA expression analysis by quantitative QT-PCR assay

The expression levels of four genes belonging to oxidative metabolism [superoxide dismutase genes (SOD1, SOD2), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX)] were measured by QT-PCR assay in PBMCs cultures exposed for six hour to five different

caffeinated-food extracts , similar to described in Barbisan et al (2014) and Machado et al (2015).

Total RNA was isolated using TRIZOL reagent. RNA yields were measured using a Nanodrop 2000 spectrophotometer. First strand cDNA was synthesized from total RNA (2 µg) using a First Strand cDNA Synthesis Kit and oligo dT primers. Q-PCR was performed in a 10 µl reaction that contained 0.5 µl of the cDNA and 1× KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) using the following PCR parameters: 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s followed by a melt curve of 65°C to 95°C in 0.5°C increments for 5 s. The expression level of beta-actin was used as an internal control. The relative expression was calculated using the comparative C_T and was expressed as the fold expression compared to the control. The specific primer pairs of antioxidant enzymes gene used in this study were presented in Table 1 (Barbisan et al., 2015).

Table 1 Primers used to perform QT-PCR analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) exposed to 5 mg/mL of aqueous extract of caffeinate beverages.

Gene	Sequences 3'-5'
SOD1	Forward- GCACACTGGTGGTCCATGAA Reverse- ACACCACAAGCCAAACGACTT
SOD2	Forward- GCCCTGGAACCTCACATCAA Reverse- GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT
CAT	Forward- GATAGCCTTCGACCCAAGCA Reverse- ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT
GPX	Forward- GGTTTTTCATCTATGAGGGTGTTC Reverse- GCCTTGGTCTGGCAGAGACT

Statistical analysis

The statistical analyses were carried out using the Graph Pad Prism 5 software, and the results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The comparison of all PBMC samples exposed to different food-caffeinate extracts was performed using the two-way analysis of variance followed by *a post hoc* Tukey's test or Dunnet test. All *p* values were two-tailed. The alpha value was set to < 0.05 to determine statistical relevance.

Results

A quantification of main bioactive compounds of coffee, green/black tea, yerba mate and guaraná using same hot-aqueous extraction method is presented in Table 2. Black tea presented higher total polyphenol concentration and hydrolysed tannins; coffee presented higher alkaloids concentrations and yerba mate presented higher theobromine concentration than other extracts. Caffeine, condensed tannins and total catechins were higher in guaraná in comparison with other food extracts. In coffee and yerba mate extracts were not detected presence of total catechins.

The antioxidant capacity of caffeinated extracts were confirmed by DPPH assay. Green tea showed similar antioxidant capacity than positive control used in the test (rutin). Lower antioxidant capacity was detected in coffee extracts when compared to rutin. The other extracts (black tea, yerba mate and guaraná) presented an intermediary antioxidant capacity near to levels observed in rutin and green tea (Figure 2A).

The viability of PBMCs exposed to different aqueous caffeine extracts was performed, and it was similar to untreated control group as can see in Figure 2B. This result confirmed that the dose used here was not cytotoxic.

The effect on gene expression of these extracts was analysed considering two aspects: occurrence of up or down regulation in relation to untreated control cells and intensity of differential gene regulation.

Table 2 Bioactive compounds concentration of hot-aqueous extracts produced from five caffeinate foods

Compounds	Food extracts				
	Coffee	Green tea	Black tea	Yerba mate	Guaraná
Total polyphenols	403.2 ± 17.9 ^a	525.1 ± 34.8 ^b	652.7 ± 3.9 ^c	510.9 ± 42.2 ^b	452.7 ± 19.1 ^b
Alkaloids	570.0 ± 5.0 ^a	299.3 ± 5.2 ^b	65.5 ± 5.7 ^c	128.6 ± 1.0 ^d	77.5 ± 23.9 ^c
Tannins hydrolysed	275.4 ± 15.4 ^a	880.5 ± 68.7 ^b	1027.0 ± 56.8 ^c	770.9 ± 71.2 ^d	169.2 ± 5.3 ^e
Tannins condensed	181.5 ± 9.2 ^a	557.3 ± 28.1 ^b	989.3 ± 63.1 ^c	15.9 ± 4.2 ^d	1198.0 ± 121.4 ^e
Caffeine (extract µg/0.002 g)	146.8 ± 1.3 ^a	24.1 ± 2.2 ^b	123.6 ± 6.3 ^c	89.9 ± 3.4 ^d	223.5 ± 13.8 ^e
Caffeine (dry weight/ mg.100 g ⁻¹)	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
Theobromine (extract µg/0.002 g)	0.6 ± 0.2 ^a	2.1 ± 1.2 ^b	11.1 ± 2.1 ^c	19.9 ± 3.1 ^d	3.67 ± 1.1 ^e
Theobromine (dry weight mg.100 g ⁻¹)	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
Total catechin (extract µg/0.002 g)	ND	0.9 ± 0.02 ^a	0.8 ± 0.1 ^a	ND	39.9 ± 2.3 ^b
Total catechin (dry weight mg.100 g ⁻¹)	ND	6.5 ± 1.3 ^a	6.1 ± 0.9 ^a	ND	233.3 ± 12.7 ^b

Caffeine; theobromine and total catechin were quantified by HPLC; other molecules by spectrophotometric assays. ND= non detected;

Data are present as mean ± SD. Different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's *post hoc* test at $p \leq 0.05$.

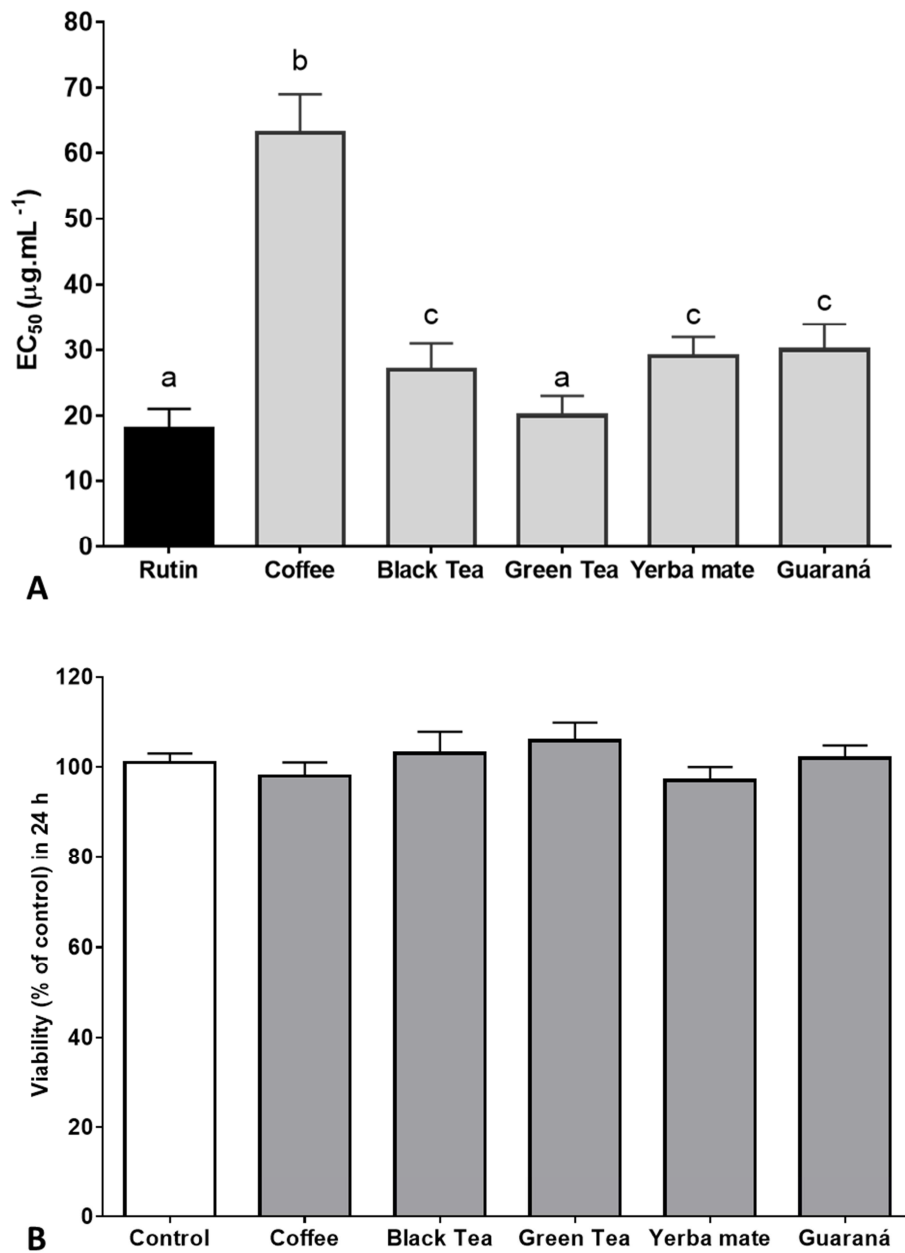


Fig 2. Hot aqueous extracts of caffeinate beverages antioxidant capacity estimated by 50% effective concentration to scavenger (EC₅₀) DPPH radicals (A) and PBMCs viability after 24 h exposure determined by MTT assay (B). Different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's *post hoc* test at p<0.05

Considering antioxidant genes, the aqueous extracts presented a significant effect on SOD1, CAT and GPX antioxidant enzyme genes (Figure 3). These genes were upregulated for all extracts. However, the intensity of gene expression was dependent of type of extract. Yerba mate triggered the higher SOD1 and GPX gene expression than other extracts. Catalase gene was also higher expressed when exposed to yerba mate and green tea extracts. Differently, SOD2 gene was not responsive to extracts with exception of yerba mate that up regulated slight this gene.

The potential effect of isolated main molecules presented in the aqueous extracts on antioxidant genes was also evaluated (Figure 4). Cells treated with different caffeine concentrations estimated to be present in each extract tested here was able to up regulate the SOD1 gene. At 90 to 147 $\mu\text{g}/0.02\text{ g}$ extract concentrations occurred higher SOD1 gene regulation. These concentrations corresponding to PBMCs exposure to yerba mate, black tea and coffee, respectively.

The SOD2 gene was not significantly affected by caffeine exposure in the concentrations tested here. Catalase gene was highly responsive to caffeine exposure mainly in the lower concentration estimated to be found in green tea extract (24 $\mu\text{g}/0.02\text{ g}$ extract). At contrary, GPX gene presented higher expression in the presence of higher caffeine concentrations (124, 147 and 223 $\mu\text{g}/0.02\text{ g}$ extract) found respectively in the black tea, coffee and guaraná extracts.

Theobromine exposure also upregulated SOD1 and GPX genes in PBMCs exposed to concentrations determined in all extracts (Figure 5). However, this effect was higher at higher theobromine concentration found in yerba mate (20 $\mu\text{g}/0.02\text{ g}$ extract).

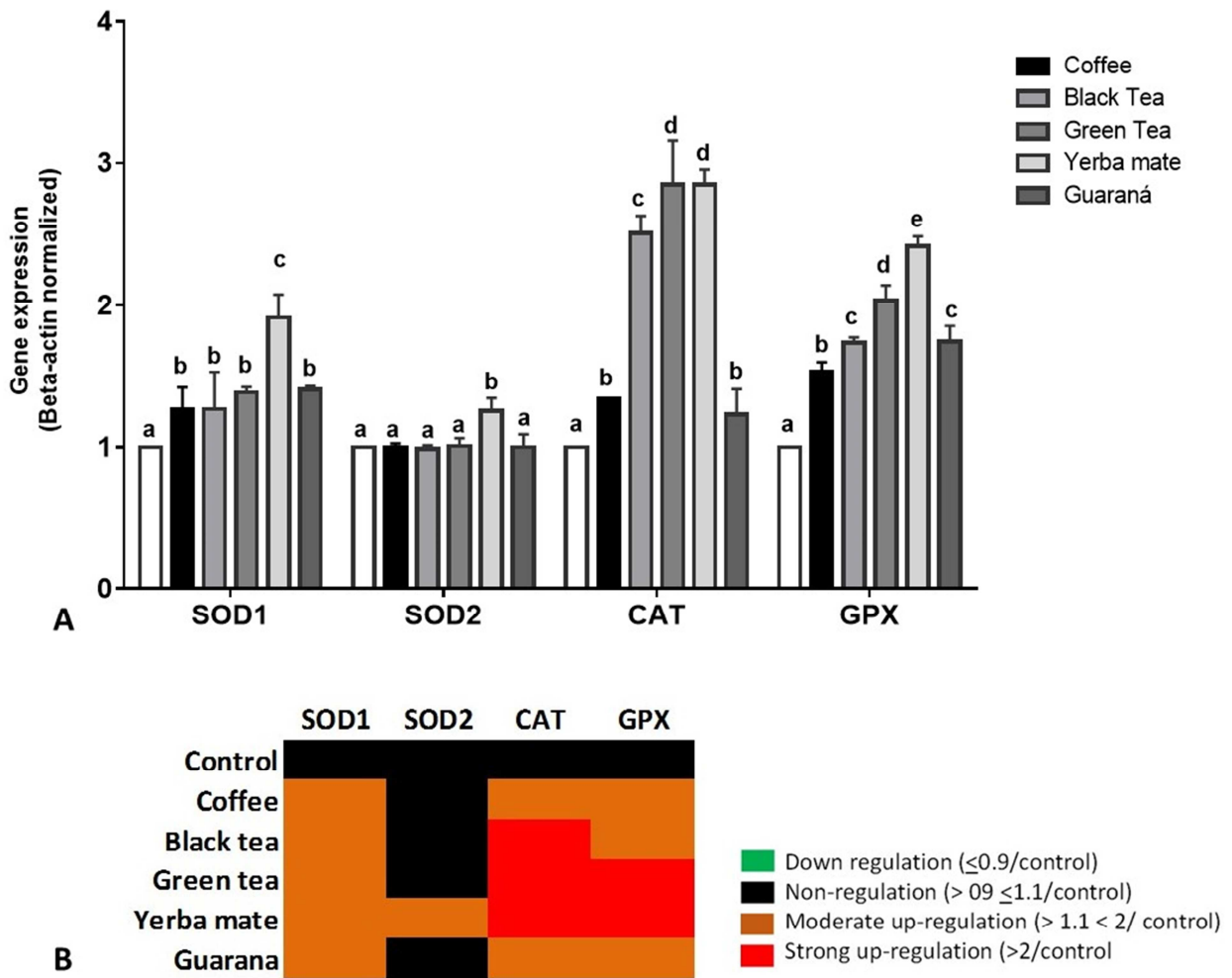


Fig. 3. Effect of different hot aqueous extracts of caffeinate beverages at 5 mg/mL concentration on expression of antioxidant enzymes genes (SOD1= superoxide dismutase Cu/Zn-dependent; SOD2= superoxide dismutase Mn-dependent; CAT- catalase; GPX= glutathione peroxidase). Data were normalized by Beta-actin expression (A) Quantitative graphic indicating gene expression (mean \pm SD) presented as comparison of gene expression observed in untreated cells (value =1). Different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's *post hoc* test at $p < 0.05$; (B) color graphic of beverage extracts effect on modulation of antioxidant genes. In general, all beverages presented similar up-regulation effect on SOD1, CAT and GPX genes.

Theobromine exposure was able to upregulate slightly the SOD2 gene expression in PBMCs exposed to all extracts. Again, this effect was more intense in cells exposed to higher theobromine concentration (20 $\mu\text{g}/0.02$ g extract) found in yerba mate. CAT gene was also upregulated by theobromine mainly in the higher concentrations (20 and 11 $\mu\text{g}/0.02$ g extract) found in yerba mate and back tea extracts.

The effect of isolated catechin at concentrations found in guaraná, green tea and black tea on antioxidant gene expression was also determined. As coffee and yerba mate did not presented catechin in the aqueous extracts, we analysed just the catechin concentrations found in guaraná, black and green tea extracts. As can see in Figure 6 the SOD1, CAT and GPX genes were upregulated by this bioactive molecule. This effect was higher in SOD1 gene when exposed to catechin concentration found in guaraná extract (19 $\mu\text{g}/0.02$ g extract) than other low concentrations found in green and black tea. Catechin down regulated SOD2 gene in all concentrations tested here and estimated to be found in guaraná, green and black tea extracts.

Discussion

Caffeinate beverages are highly consumed in the world and several investigations suggest their action on human healthy and low mortality risk (Costa Krewer et al., 2011; Bathi et al.; 2013; Je and Giovannucci, 2014). Due the polyphenol and other bioactive molecules present in the nutritional matrix, these foods have an important antioxidant activity, and for such reason we investigated here the *in vitro* antioxidant effect of hot aqueous extracts of five caffeinate beverages.

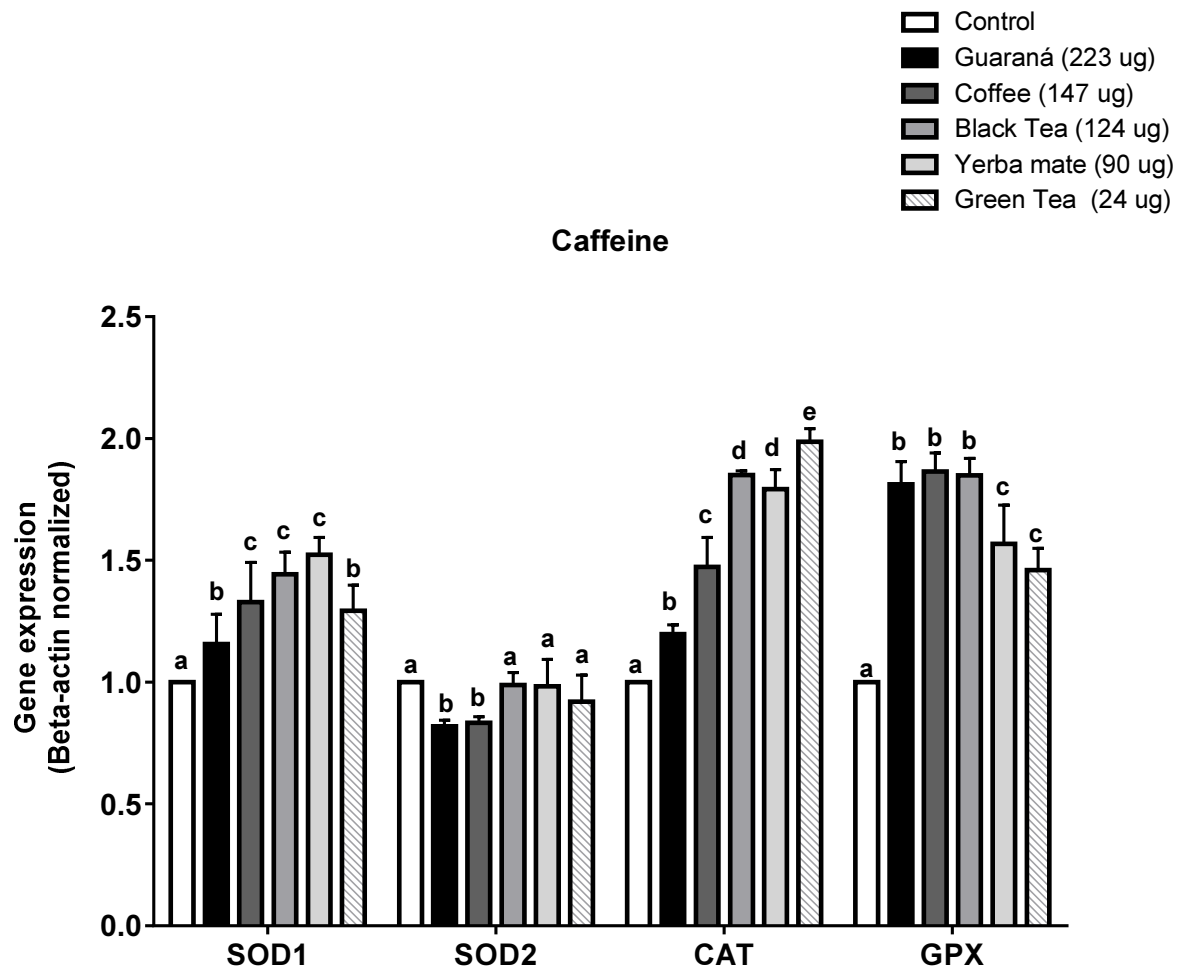


Fig. 4. Effect of different caffeine concentrations ($\mu\text{g}/0.02\text{ g}$ extract) estimated to be found in the five beverages at 5 mg/mL concentration on expression of antioxidant enzymes genes (SOD1= superoxide dismutase Cu/Zn-dependent; SOD2= superoxide dismutase Mn-dependent; CAT- catalase; GPX= glutathione peroxidase). Data were normalized by Beta-actin expression. Gene expression (mean \pm SD) presented as comparison of gene expression observed in untreated cells (value =1). Different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's *post hoc* test at $p < 0.05$.

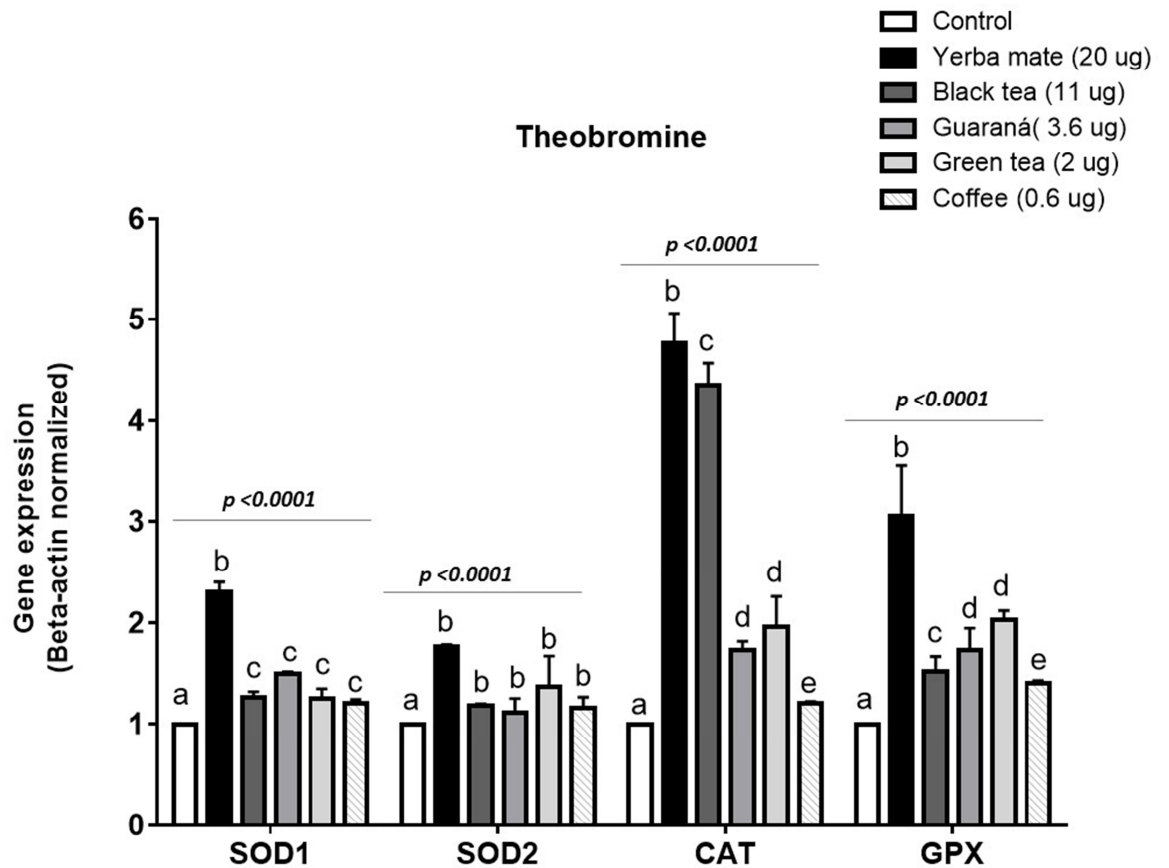


Fig. 5. Effect of different theobromine concentrations ($\mu\text{g}/0.02\text{ g}$ extract) estimated to be found in the five beverages at 5 mg/mL concentration on expression of antioxidant enzymes genes (SOD1= superoxide dismutase Cu/Zn-dependent; SOD2= superoxide dismutase Mn-dependent; CAT- calataase; GPX= glutathione peroxidase). Data were normalized by Beta-actin expression. Gene expression (mean \pm SD) presented as comparison of gene expression observed in untreated cells (value =1). Different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's *post hoc* test at $p < 0.05$.

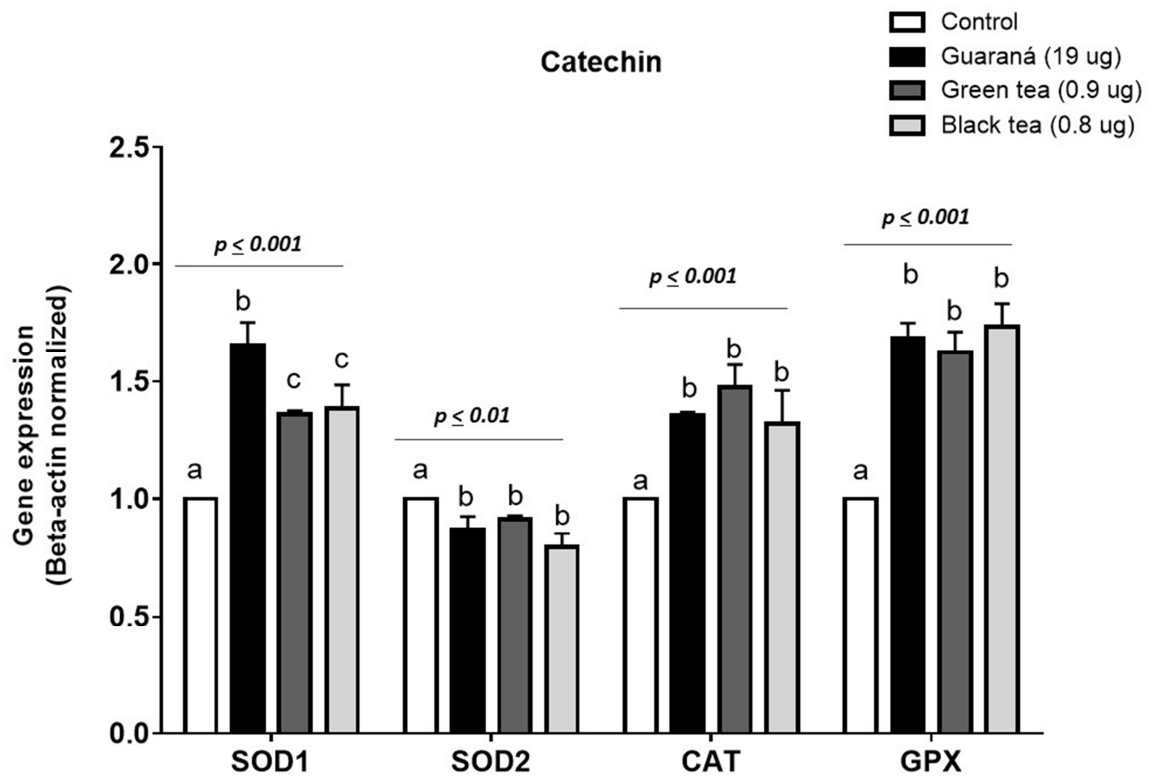


Fig. 6. Effect of different catechin concentrations ($\mu\text{g}/0.02\text{ g}$ extract) estimated to be found in the five beverages at 5 mg/mL concentration on expression of antioxidant enzymes genes (SOD1= superoxide dismutase Cu/Zn-dependent; SOD2= superoxide dismutase Mn-dependent; CAT- calatase; GPX= glutathione peroxidase). Data were normalized by Beta-actin expression. Gene expression (mean \pm SD) presented as comparison of gene expression observed in untreated cells (value =1). Different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's *post hoc* test at $p < 0.05$.

The results suggested that hot aqueous extracts of these caffeinate beverages are able to modulate antioxidant enzyme gene. The results described here about antioxidant enzyme gene modulation associated with caffeine and theobromine corroborate the previous investigation performed by Johnson et al (2012), which suggested these molecules are able to bind to DNA indicating and induce or repress gene expression.

Before we discuss main details about caffeinate beverages effect on gene modulation is important to comment some aspects related to our methodological design.

Despite we recognize the *in vitro* methodological limitations; in the present investigation, we tried to produce coffee, black tea, green tea, yerba mate and guaraná hot aqueous extracts in a similar way that human beings consume these food beverages. The only exception is the guaraná that is popularly consumed as powder or as component of energetic beverages (Schimpl et al., 2013). However, in the traditional Amazon population guaraná powder is generally diluted in room temperature water before consumption, but can also to be consumed as tea by hot infusion.

Generally, investigations of biological activity of plant foods use other solvents such as ethanol and methanol to extract. Several epidemiological studies have suggested that consumption of caffeinate beverages including coffee, tea, yerba mate and guaraná are associated with a reduced risk of chronic and degenerative diseases such as cardiovascular disorders, diabetes, obesity (Ferruzi et al., 2010; Bracesco et al., 2011; Costa Krewer et al., 2011). Despite, investigations using other solvents to be important in the identification of main bioactive molecules present in food extracts, studies using preparations similar to human consumption are also relevant considering that are more close to the real effect in human biology.

Another important aspect related with our methodological design is about to exposure time before we performed the genomic analysis. We opted to evaluate the influence of caffeinate beverages after six hour of exposure to determine the first impact of extracts and isolated molecules on cellular antioxidant metabolism. Probably, after 24 hours or more the cell metabolism regulates the antioxidant imbalance induced by the exposure and the results represent a secondary impact and not a primary impact of these extracts on cell.

As expected, all extracts presented antioxidant capacity evaluated by a traditional DPPH assay, although this property was more or less intense according to each beverage. Despite to be a limited test, DPPH assay is used as an indicator of the radical nature of that

reaction (Sharma and Bhat, 2009) and the results confirmed the DPPH reduction effect of all extracts tested here. Moreover, as commented before our results indicated an important nutrigenomic effect of these infusions on antioxidant enzyme gene modulation. The regulatory effects occurred mainly from up regulation of three genes, SOD1, CAT and GPX. Here, we also tested the contribution of three isolated bioactive molecules, caffeine, theobromine and catechin on oxidative gene modulation. To perform this assay we used the estimated concentration of these molecules present in each extract. In the antioxidant genes, the extracts and bioactive molecules upregulated the antioxidant genes (SOD1, CAT, GPX).

Some previous investigation also described the effect of caffeinate beverages on antioxidant enzyme gene modulation. This is the case of study performed by Sinha et al (2007) that exposed human lymphocytes to sodium arsenite intoxication with and without supplementation of isolated polyphenols and extracts of green and black tea. Yazheng and Kitts (2012) when analyzed the roasted and non-roasted coffee effect on antioxidant genes in cultured human colon adenocarcinoma Caco-2 cells, they observed that roasted coffee extracts were able to modulated several genes involved with oxidative stress response, including the up regulation of GPX gene. A recent investigation performed by Machado et al (2015) described guaraná effects on modulation of antioxidant genes on senescent adipocyte stem cells obtained from human lipoaspirates (Machado et al., 2015).

With exception of yerba mate extract that caused a slight up regulation, SOD2 gene expression was not influenced by other extracts. SOD2 was the gene that presented more high variation on its regulation when exposed to isolated bioactive molecules. The high caffeine doses found in guaraná and coffee extracts were able to down regulates this gene. The catechin exposure also caused down regulation in all concentrations tested here. Yerba mate contains high concentrations of theobromine (Vieira et al., 2010). Since we observed that

SOD2 was upregulated in cells treated just with theobromine we believe that this molecule at higher concentration (20 µg/0.02 g extract) can induces SOD2 gene modulation.

As methylxanthines such as caffeine, the theobromine is a blockers of adenosine receptors which are G-protein-coupled receptors that sense the presence of extracellular adenosine (Martinez-Pinilla et al., 2015). Therefore, these molecules are antagonists of adenosine receptors. However, theobromine presents some important differences when compared to caffeine. For example, half-life of theobromine is higher than caffeine. Several evidences indicate that theobromine presents psychoactive actions and effect on blood pressure that are qualitatively different of caffeine (Mitchel et al., 2011; Baggott et al., 2013) and for this reason, theobromine is useful in asthma and other respiratory tract problems (Martínez-Pinilla et al., 2015).

Therefore, the whole of results suggest that independent of bioactive concentration and other molecules present in these caffeinate beverage, the effect of these food on antioxidant modulation present high similarity, at least in the *in vitro* conditions tested here.

4 Conclusions

From these results is possible to suggest that hot aqueous extracts of caffeinate beverages exert their antioxidant effects by direct chemical reduction of ROS molecules and regulatory mechanisms of antioxidant genes in a similar mode.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are grateful for Clarice Pinheiro Mostardeiro (*in memoriam*) that helped in the extract preparations and HPLC analysis. This research was supported by the Brazilian research agencies (CNPq, CAPES, FAPERGS and FAPEAM).

References

- Baggott, M.J., Childs, E., Hart, A.B., de Bruin, E., Palmer, A.A., Wilkinson, J.E., de Wit, H., 2013. Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 228, 109-118.
- Barbisan, F., Motta, J.de R., Trott, A., Azzolin, V., Dornelles, E.B., Marcon, M., Algarve, T.D., Duarte, M.M., Mostardeiro, C.P., Unfer, T.C., Schott, K.L., da Cruz, I.B., 2014. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One* 9, e107299.
- Bhardwaj, P., Khanna, D., 2013. Green tea catechins: defensive role in cardiovascular disorders. *Chin J Nat Med* 11, 345-53.
- Bhatti, S.K., O'Keefe, J.H., Lavie, C.J., Coffee and tea: perks for health and longevity? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 688-697.
- Bempong, D.K., Houghton, P.J., 1992. Dissolution and absorption of caffeine from guaraná. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 44, 769-771.
- Bracesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gugliucci, A., 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol* 136, 378-384
- Cano-Marquina, A., Tarín, J.J., Cano, A., T 2013. The impact of coffee on health. *Maturitas* 75, 7-21.

Costa Krewer C., Ribeiro, E.E., Ribeiro, E.A., Moresco, R.N., Ugalde Marques da Rocha, M. I., Santos M., G.F., Machado, M. M., Viegas, K., Brito, E., Cruz. I.B.M., 2011. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. *Phytotherapy Res* 25, 1367-1374.

Costa Krewer, C., Suleiman, L., Duarte, M.M.F., Ribeiro, E.E., Mostardeiro, C.P., Montano, M.A.E., Marques da Rocha, M.I.U., Algarve, T.D., Bresciani, G., da Cruz, I.B.M., 2011. Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: evidence from human in vitro and in vivo protocols. *European Food Research and Technology* 239, 49-57.

Je, Y., Giovannucci, E., 2014. Coffee consumption and total mortality: a meta-analysis of twenty prospective cohort studies. *Br J Nutr* 111, 1162-73.

Johnson, I.M., Prakash, H., Prathiba, J., Raghunathan, R., Malathi, R., 2012. Spectral analysis of naturally occurring methylxanthines (theophylline, theobromine and caffeine) binding with DNA. *PLoS One* 7:e50019.

Machado, A.K., Cadoná, F.C., Azzolin V.F., Dornelles, E.B., Barbisan, F., Ribeiro, E.E., Manica-Cattani, M.F., Duarte, M.M.F., Saldanha, J.R.P. 2015. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Research International* 67, 426-433.

Martínez-Pinilla, E., Oñatibia-Astibia, A., Franco, R., 2015. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Front Pharmacol* 20, 6-30.

Morrison, M., Asiedu, E. A., Stuchbury, T., Powell, A. A., 1995 Determination of Lignin and Tannin contents of cowpea seeds coats. *Annals of Botany* 76: 287-290..

RAYSSA GABRIELA COSTA LIMA PORTO. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN. 2014 Dissertação de mestrado

Santesso, N., Manheimer, E., 2014. A summary of a cochrane review: green and black tea for the primary prevention of cardiovascular disease. *Glob Adv Health Med* 3, 66-67.

Schimpl, F.C., da Silva, J.F., Gonçalves, J.F., Mazzafera, P., 2013. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *J Ethnopharmacol* 150,14-31.

Vieira, M.A., Maraschin, M., Pagliosa, C.M., Podestá, R., de Simas, K.N., Rockenbach, I.I., Amboni, R.D., Amante, E.R., 2010. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. *J Food Sci* 75, C280-5,

Yazheng, L., Kitts, D.D., 2012. Activation of antioxidant response element (ARE)-dependent genes by roasted coffee extracts. *Food Funct* 3,950-4.

4 DISCUSSÃO

Bebidas cafeinadas são consumidas em todo o mundo. Evidências sugerem que estas bebidas apresentam diversas ações benéficas a saúde humana (KREWER, 2011;. BATHI et al.; 2013; JE e GIOVANNUCCI, 2014), como redução no risco de desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson (FERRUZI et al, 2010;. BRACESCO et al. de 2011;. KREWER et al, 2011).

Devido a presença dos polifenóis, taninos, catequinas e metilxantinas dentre outras moléculas bioativas na matriz nutricional, estes alimentos apresentam, importante atividade antioxidante, e por tal razão, investigamos aqui o efeito antioxidante *in vitro* de extratos aquosos de cinco bebidas cafeinadas consumidas em todo o planeta.

Na presente investigação, procuramos produzir os extratos aquosos do café, chá preto, chá verde, erva-mate e guaraná de maneira bastante similar a que as pessoas consomem diariamente. A exceção é o guaraná que popularmente é consumido na forma de pó ou como componente de bebidas energéticas (SCHIMPL et al., 2013). No entanto, no Amazonas o guaraná em pó é diluído em água à temperatura ambiente ou em água quente para o consumo, tal qual como foi realizado neste trabalho.

Geralmente, as investigações de atividade biológica de alimentos vegetais utilizam solventes, como etanol, metanol, acetona para extração dos compostos, e é sabido que investigações utilizando-se solventes químicos são importantes na identificação de moléculas bioativas presentes em plantas e seus extratos, pois estes solventes tem capacidade de retirar da planta maior número de substâncias.

Entretanto, estudos utilizando preparações semelhantes ao que é utilizado habitualmente no consumo humano também são relevantes, considerando que os resultados estarão mais próximos ao efeito real na biologia humana.

Outro aspecto importante relacionado com a nossa concepção metodológica é a respeito ao tempo de exposição das CMSP aos extratos antes da realização da análise genômica. Optou-se por avaliar a influência de bebidas cafeinadas após 6 horas de exposição para determinar o primeiro impacto de extratos e moléculas isoladas no metabolismo antioxidante celular.

Provavelmente, se analisarmos as células tratadas após 24 horas ou mais o metabolismo celular, terá regulado o desequilíbrio antioxidante induzido pela exposição e os

resultados representariam um impacto secundário destes extratos sobre as células. Vale destacar aqui que estas bebidas são consumidas várias vezes ao dia, também levamos em conta este fato, para optarmos pela análise genômica após 6 horas de exposição.

Na análise da composição química dos extratos aquosos realizada via CLAE, nos extratos aquosos de café e erva-mate não foi identificada a presença de catequinas. A ausência de catequinas no extrato aquoso de erva-mate está em concordância com os dados obtidos por Bastos et al., (2007), no qual os autores buscaram extrair compostos da erva-mate e do chá-verde, utilizando como solventes éter e água, realizando análise da composição do extraído via Espectrofotometria de massas. Os resultados demonstraram que independente do solvente utilizado não houve detecção da presença de catequinas.

Como esperado, todos os extratos apresentaram capacidade antioxidante avaliada por um ensaio de DPPH tradicional, embora esta propriedade era mais ou menos intensa em função de cada bebida. Apesar de ser um teste limitado, o método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) baseia-se no seguinte pressuposto: o DPPH é um radical pouco estável, de cor púrpura intensa, no qual mede-se a capacidade antioxidante de substâncias para sequestrar este radical, que pode ser avaliada medindo a diminuição da sua absorbância por espectrofotometria, assim quanto mais purpura a relação estiver menor a capacidade antioxidante do extrato testado (DUARTE-ALMEIDA et. al., 2006).

O composto antioxidante utilizado como controle positivo no teste DPPH foi à rutina, um flavonóide pertencente à subclasse dos flavonóis que tem sido intensamente pesquisada e, os resultados indicam forte atividade antioxidante (PEDRIALI et al., 2005). Todas as bebidas cafeinadas testadas apresentaram efeito antioxidante, entretanto o chá verde apresentou a maior atividade no sequestro do radical DPPH, com níveis de sequestro do radical, bastante similares a rutina, antioxidante utilizado como controle positivo. O chá preto, erva-mate e guaraná apresentaram atividade antioxidante, entretanto de menor intensidade em relação ao chá verde Já o extrato aquoso de café, apresentou a menor capacidade antioxidante.

Há uma boa quantidade de estudos já descritos na literatura que avaliaram a capacidade antioxidante do café, chá verde e preto, erva mate e guaraná, entretanto nenhum estudo havia avaliado os 5 produtos conjuntamente da maneira em que são preparados para o consumo humano.

A atividade antioxidante dos chás verde e preto obtidos de diferentes regiões produtoras e épocas sazonais, foi avaliada por Zhao e colaboradores (2014), no estudo, os autores postulam que a capacidade antioxidante dos chás é proporcional a quantidade de catequinas em sua composição. Neste trabalho, observamos quantidades de catequinas

bastante similares na avaliação por CLAE, houve uma pequena diferença em relação ao DPPH, favorável a capacidade do chá preto, perfeitamente explicável devido maiores níveis de polifenóis totais e taninos encontrados.

Bastos e colaboradores (2007) demonstram alta capacidade antioxidante do extrato aquoso de erva mate. Sasaki e colaboradores (2007) comprovaram a capacidade antioxidante do guaraná.

Quanto a capacidade antioxidante do café, cito Santos e colaboradores, (2007) que avaliaram a capacidade antioxidante do café (*Coffea arabica*) produzido em Minas Gerais, Brasil, e observaram potencial antioxidante bastante similar ao ácido ascórbico, utilizado como antioxidante padrão. No referido estudo os diferentes graus de torrefação do café foram capazes de influenciar sua capacidade antioxidante, sendo que as amostras de torrefação com grau mais claro apresentaram melhores resultados.

Também testamos, se os extratos afetavam a viabilidade celular em 24 horas de exposição de CMSP obtidas de adultos jovens saudáveis aos extratos aquosos. Após análise da viabilidade celular pelo teste do MTT, verificamos que não houve diferença significativa entre as células não tratadas e as tratadas com os extratos, assim pode-se inferir que em 24 h, não houve indução de citotoxicidade pelos tratamentos, resultado este, que já era esperado.

Verificamos um importante efeito nutrigenômico destas infusões sobre a modulação dos genes das enzimas antioxidantes. Os efeitos da regulação ocorreram principalmente a partir do aumento da expressão dos genes das enzimas SOD1, CAT e GPX.

Também testamos a contribuição de três moléculas bioativas isoladas, cafeína, teobromina e catequina na modulação dos genes oxidativos. Para realizar este ensaio nos baseamos nas concentrações destas moléculas presentes em cada extrato, conforme resultados de quantificação via CLAE, para que então pudéssemos calcular as doses para o tratamento das CMSP.

Tanto os extratos quanto as moléculas bioativas padrões foram capazes de regular positivamente os genes antioxidantes.

Estudos anteriores descreveram os efeitos das bebidas cafeínadas sobre a modulação dos genes das enzimas antioxidantes. Este é o caso de estudo realizado por Sinha et al (2007) que expôs linfócitos humanos a intoxicação por arsenito de sódio com e sem suplementação com polifenóis isolados e extratos de chá verde e preto. Yazheng Kitts e colaboradores (2012), analisaram o efeito de café torrado e não torrado em genes antioxidantes em adenocarcinoma do cólon humano linhagem celular Caco-2, observando que os extratos de café torrados modularam vários genes envolvidos no metabolismo oxidativo, incluindo o

aumento da expressão do gene da GPX. Um estudo recente realizado por Machado et al (2015) descreveu efeitos do extrato-alcóolico de guaraná sobre a modulação de genes das enzimas antioxidantes em células-tronco obtidas a partir de tecido adiposo de lipoaspirados humanos (MACHADO et al., 2015).

Com exceção do extrato de erva-mate que causou uma ligeira elevação na expressão do gene SOD2, os demais extratos não influenciaram na expressão do referido gene.

Matsumoto e Bastos, (2009), avaliaram a ação da erva mate, sob a expressão dos genes das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX em mulheres adultas jovens e saudáveis. As voluntárias permaneceram sem ingerir nenhum tipo de bebida ou alimento cafeinado, além do chá mate, preparado com erva mate oferecido pelos pesquisadores, por 1 semana. Após o período do estudo SOD, CAT e GPX haviam elevado consideravelmente sua expressão em relação aos dados iniciais.

A SOD2 foi o gene que apresentou a mais alta variação na sua regulação quando exposta a moléculas bioativas isoladas. As altas doses de cafeína encontradas nos extratos de guaraná e café foram capazes alterar a regulação deste gene. Já a exposição a catequina causou a diminuição na expressão do gene da SOD2.

Observamos que a SOD2 foi regulada em células tratadas apenas com teobromina acreditamos que esta molécula em maior concentração (20 g / 0,02 g extrato) na erva-mate pode ter induzido a modulação do gene SOD2.(REF)

Metilxantinas, como a cafeína e a teobromina são bloqueadoras de receptores de adenosina (MARTINEZ-PINILLA et al., 2015). No entanto, a teobromina apresenta algumas diferenças importantes quando comparada com a cafeína. Por exemplo, a meia-vida da teobromina é mais elevada que a cafeína. Várias evidências indicam que a teobromina apresenta ações psicoativas e efeito sobre a pressão arterial que são qualitativamente diferentes de cafeína (MITCHEL et al, 2011;BAGGOTT et al., 2013) e, por essa razão, a teobromina é utilizada no tratamento da asma e outros problemas do trato respiratório (MARTINEZ-PINILLA et al., 2015).

Quanto à análise das moléculas bioativas cafeína, teobromina e catequina, em concentrações baseadas naquelas encontrada nos extratos aquosos, verificou-se que a cafeína em concentrações presentes em todos os extratos foi capaz de elevar a expressão das enzimas antioxidantes, a exceção é que os níveis de cafeína presentes no café e guaraná não causaram aumento na expressão do gene da SOD2.

Em relação à teobromina, a concentração relativa em todos os extratos foi capaz de causar aumento na expressão dos genes antioxidantes aqui avaliados, e quanto à catequina

identificada apenas no guaraná, chá verde e chá preto, foi capaz de induzir o aumento na expressão dos genes SOD1, CAT e GPX, e queda na expressão do gene da SOD2, tendo comportamento similar nos extratos testados.

Portanto, o conjunto dos resultados sugere que independente da concentração dos compostos bioativos e outras moléculas presentes nas bebidas cafeinadas o efeito do extrato aquoso obtido apresentou alta similaridade na modulação dos genes das principais enzimas do metabolismo antioxidante.

5 CONCLUSÃO

Os resultados aqui descritos sugerem efeito nutrigenômico dos extratos aquosos de café, chá verde, chá preto, erva mate e guaraná, na modulação *in vitro* dos genes das enzimas antioxidantes, SOD1, SOD2, CAT e GPX. Efeito similar foi verificado quando analisamos as concentrações relativas de cafeína, teobromina e catequina de cada extrato.

Adicionalmente, concluímos que as concentrações de cafeína, teobromina, catequina, polifenóis alcaloides e taninos totais, encontrados nos extratos das cinco bebidas cafeinadas, foram bastante similares ao que havia sido descrito previamente na literatura.

Quanto à atividade antioxidante o chá verde mostrou resultados mais significativos no teste DPPH, com atividade antioxidante similar ao controle com rutina, quanto a citotoxicidade em 24 horas nenhum composto causou morte celular significativa.

Assim, nossos dados corroboram a ideia de que a ingestão de infusões a partir das bebidas cafeinadas aqui citadas colabora para a prevenção de doenças, principalmente via combate de espécies reativas e conseqüentemente estresse oxidativo. Sendo que mais estudos necessitam ser realizados principalmente com a erva-mate e o guaraná, bastante consumidas, mas ainda pouco estudadas.

6 REFERÊNCIAS

- ACTIS-GORETTA, L., et al. Comparative study on the antioxidant capacity of wines and other plant-derived beverages. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.957, p. 279–283,2002.
- ASCHERIO, A.; CHEN, H. Caffeinated clues from epidemiology of Parkinson's disease. **Neurology**. v.61,p.S51–S54, 2003.
- ALVES,C. R.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade ? **.Química Nova**. v. 32, n. 8, p.2169-2180, 2009.
- BARCIROVA, M. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea.**Food Research International**. v. 43, p. 1379-1382, 2010.
- BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. **Molecules**. v.12, p. 423-432,2007.
- BRAVO, J., et al. Antioxidant and genoprotective effects of spent coffee extracts in human cells.**Food Chemical Toxicology**. v. 60, p.397-403, 2013.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.**Nature**. v.414, p.813–820,2001.
- CAMARGO, L.E. A. **Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze obtida por diferentes formas de produção**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná. Guarapuava,2011.
- CHACKO, S.M., et al. Beneficial effects of green tea: a literature review. **Chinese Medicine**.v. 5, p. 1-9, 2010.
- CHAN, C.Y., et al..Epigallocatechin-3-gallate blocks 3T3-L1 adipose conversion by inhibition of cell proliferation and suppression of adipose phenotype expression. **Life Science**.V 89, p 779-785, 2011.
- CHEN, D.; PING DOU, Q. Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. **International Journal of Molecules Sciences**, v. 09, p. 1196-1206, 2008.
- CROZIER, A. et al. Coffee: biochemistry and potential impact on Health. **Food & Function**. v.5, 2014.
- DE MORAIS, E.C., et al.Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 8316–8324, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J.M., et al . Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006 .

DUARTE, M.M. et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. **Clinical Biochemistry**.v.42, n.7, p.666-677, 2009.

DULLOO, A.G., et al. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**.v.70, p.1040-1045, 1999.

GIOVANNUCCI, E. Meta-analysis of Coffee Consumption and Risk of Colorectal Cancer. **American Journal of Epidemiology**.v.147,p.1043-1052,1997.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**. v.53, p.110-118, 2004.

GUERRA, R. O; BERNARDO, G. C; GUTIERREZ, C.V. Cafeína e Esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v.6, n.2, p. 60-62, 2000.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*, induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.224, p. 338–344, 1996.

GALLUS, S., et al. Does coffee protect against hepatocellular carcinoma? **British Journal Cancer**.v.87, p.956–959, 2002.

GUPTA, S.; SAHA, B.; GIRI, A.K. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. **Mutation Research**.v.512, p.37-65,2002.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. v.142, p.231-255, 2004.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: A review of recent human research, *Crit. Rev. Food Science Nutrition*. v.46, p.101–123, 2006.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**. v. 259, p.87-91, 1993.

HORI, A., et al. Coffee intake is associated with lower levels of oxidative DNA damage and decreasing body iron storage in healthy women. **Nutrition and Cancer**.v.66, p.964-969,2014.

INOUE, M., et al. Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: A prospective study in Japan. **Journal of National Cancer of Institute**. v.97, p.293–300, 2005.

KIM, WET., et al. Effect of green tea consumption on endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in chronic smokers. **Circulation Journal**. v.70, p.1052- 1057, 2006.

KREWER, C.C., et al. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. **Phytotherapy Research**.v.25, p.1367-1374, 2011.

KUSKOSKI, E. M., et al. Propriedades químicas y farmacológicas del fruto Guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista de la facultad de química farmacéutica**. v. 12, n. 2,2005.

LANZETTI, M., et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**. v.24, p. 375–381, 2008.

LEE; M.J. et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. **Cancer epidemiological biomarkers Prevention**. v.11, p.1025-1032, 2002.

LUCAS, M., et al. Coffee, caffeine, and risk of completed suicide: Results from three prospective cohorts of American adults. **World Journal of Biological Psychiatry**. v.15, p. 377-386, 2014.

MACHADO, H., et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.27, p.33-39,2008.

MADDUX, B.A., et al. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alfa-lipoic acid. **Diabetes**. v.50:p.404-410, 2001.

MANIAN, R., et al. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemical**.v.107, p.1000-1007, 2007.

MATSUMOTO, R.L., et al. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.57, p.1775–1780, 2009.

MENINI, T. et al. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. **Planta Medica**. v. 73, p.1141–1147,2007.

MIRANDA, D.D., et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**. v. 23, p.261–265, 2008.

MOSIMANN, A.L.; WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**. v.26, p.59–70,2006.

NAGAO, T. et al. A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. **Obesity**. v.17, p.310-317, 2009.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Bioquímica Farmacêutica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREIRA, I.R.O, ABDALLA, D.S.P. Soy isoflavones reduce heat shock proteins in experimental atherosclerosis. **European Journal of Nutrition**. p.45, v.178–186, 2006.

PUANGPRAPHANT, S., DE MEJIA, E.G. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFKappaB pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, 8873–8883, 2009.

PURNELL, J. Q., et al. Enhanced cortisol production rates, free cortisol, and 11 β -HSD-1 expression correlate with visceral fat and insulin resistance in men: effect of weight loss. **American Journal of Physiology**. v. 296, n. 2, p. 351–357, 2009.

RUDICH, A., et al. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetes**. v.47, p.1562–1569, 1998.

SALEH, F., et al. Analysis of the effect of the active compound of green tea (EGCG) on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.30, p.314:322, 2014

SANTOS, M.H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**. v. 30, n.3, pp. 604-610, 2007.

SASAKI, et al. Antioxidant Capacity and *In Vitro* Prevention of Dental Plaque Formation by Extracts and Condensed Tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules** v. 12, p.1950-1963, 2007.

SILVA, M. L. C, et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SHARANGI, A.B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. **Food Research International**, v. 42, p.529-535, 2009.

SUGIMOTO, S., et al. Brazilian natural medicines. III. structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 57, p.257–261, 2009.

VELAYUTHAM, P.; BABU, A.; LIU, D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p.1840-1850, 2008.

WANG, H.; PROVAN, G.J.; HELLIWELL, K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. **Trends in Food Science e Technology**. v.11, p.152-160, 2000.

WANG, J.Q. et al. Preventive effects of total flavonoids of *Litsea coreana* leave on hepatic steatosis in rats fed with high fat diet. **Journal of Ethnopharmacology**. v.121, p. 54–60, 2009.

WEISBERG, S.P., et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**. v. 112, n.12, p.1796-1808, 2003.

WOZNIAK, S. E., et al. Adipose tissue: the new endocrine organ? a review article. **Digestive Diseases and Sciences**.v.54, n. 9, p. 1847–1856, 2009.

YIANNAKOPOULOU, E.C.H. Recent patents on antibacterial, antifungal and antiviral properties of tea. **Recent Patents Ant-iinfective Drug Discovery**. v.7, p. 60-65, 2012.

ZHANG, Y.et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**.1994; 372:425-31.

ZHAO, C. et al. The Galloyl Catechins Contributing to Main Antioxidant Capacity of Tea Made from *Camellia sinensis* in China. **The Scientific World Journal**. v.2014, 2014.