

Perfil citotóxico e antioxidante do extrato hidroalcoólico de guaraná (*Paullinia cupana*) e seus metabólitos em linhagens celulares

Patricia Rayná Simas de Souza; Universidade Federal do Amazonas; p.simas777@gmail.com;

Fernanda Garcia Praia Santos; Universidade Federal do Amazonas;

Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria; Universidade Federal do Amazonas;

1. Introdução

O guaraná (*Paullinia cupana*) é um fruto de origem amazônica, usado comumente como uma bebida energética e estimulante pelos povos originários¹. De modo bem descrito, a alta concentração de cafeína confere a propriedade estimulante do sistema nervoso central² e melhora cognitiva³ associado ao seu consumo. Além da cafeína, outras metilxantinas, como teobromina e teofilina, e outros metabólitos secundários como catequinas e epigallocatequinas são definidos como marcadores químicos do guaraná¹. Neste sentido, as atividades biológicas descritas na literatura e associadas ao guaraná decorrem da elevada concentração de metilxantinas e taninos, como ação antioxidante⁴⁻⁶, antiadipogênica⁷, antitumoral⁸, anti-inflamatória⁹, antibacteriana¹⁰, hepatoprotetora¹¹ e anti-hiperglicêmico¹².

A cafeína apresenta atividade antitumoral, reduzindo *in vitro* o crescimento tumoral, prolongando a sobrevida e aumentando a atividade das células T CD8⁺ no câncer colorretal, devido a supressão da via das quinureninas¹³. Também é capaz de reduzir a viabilidade de células de câncer gástrico e induzir a apoptose¹⁴. De modo semelhante à cafeína, teobromina e catequina apresentaram efeito redutor significativo na proliferação celular em células de leucemia mieloide crônica¹⁵. A teofilina apresenta efeito redutor na viabilidade celular e formação de colônia, indução de apoptose e senescência em carcinoma cervical e de câncer de mama devido a supressão de *SRSF3* (Fator de *splicing* 3 rico em serina/arginina)¹⁶.

Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar a ação citotóxica e antioxidante do extrato hidroalcoólico do guaraná, bem como de seus metabólitos majoritários isolados em linhagens celulares tumorais e normais de pulmão e macrófagos.

2. Material e Métodos

O extrato hidroalcoólico de guaraná (EHG) foi obtido conforme Bittencourt *et al.* (2013)⁵. Os metabólitos cafeína (CFN), teobromina (THB) e epigallocatequina (ECG) foram adquiridos da Sigma -Aldrich.

Para a condução dos experimentos *in vitro* foram utilizadas as linhagens celulares A549 (célula epitelial de adenocarcinoma de pulmão) (ATCC® CCL-185™), BEAS-2B (célula epitelial pulmonar normal) (ATCC® CRL-9609™) e THP-1 (monócito de sangue periférico) (ATCC® TIB-202™) diferenciados em macrófagos por 48 horas com forbol-12-miristato-13-acetato (10 ng/ml).

Para o ensaio de viabilidade celular e obtenção da concentração inibitória 50% (CI50), as linhagens foram tratadas com EHG (0,01 - 50 mg/ml), CFN (0,01 - 200mM), THB (0,1 - 50mM) e ECG (0,01 - 20mM) por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com resazurina (3mM) por 3 horas e realizada a leitura das absorbâncias (570nm e 595nm) no leitor de microplaca (Chameleao™ V Multitecnológico) do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

O ensaio clonogênico foi realizado com o plaqueamento de 100 células da linhagem A549 por poço em placa de 12 poços. As células foram tratadas com concentrações elevadas e não citotóxica de EHG e metabólitos por 24 horas. Após esse período de tratamento, as células foram mantidas em cultivo por 10 dias, com renovação do meio cada 2 dias. Ao final, as

colônias foram coradas com solução de cristal violeta 1%, formaldeído 4% em tampão Fosfato-salina por 30 minutos. A contagem do número de colônias foi realizada manualmente com o auxílio de uma lupa de mão.

O ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizado utilizando a sonda fluorescente DCFDA (2',7'-Diclorofluoresceína diacetato). Células A549 e THP-1 diferenciadas em macrófagos (dTHP-1) foram tratadas com a maior dose não citotóxica de EHG e dos metabólitos por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com a sonda DCFDA e em seguida desafiadas ou não com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (200 mM) e realizada a leitura da fluorescência (488/535nm) no leitor de microplaca do CAM/UFAM.

Os dados foram obtidos pela realização de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 9.

3. Resultados e Discussão

O efeito do EHG e seus metabólitos na viabilidade celular foi avaliado pelo ensaio de metabolização da resazurina. O efeito do EHG e dos metabólitos isolados na viabilidade de diferentes linhagens possibilitou a obtenção das curvas dose-resposta e os valores de CI50 conforme apresentado na tabela 1.

Dentre as linhagens celulares avaliadas, a linhagem epitelial normal de pulmão humano BEAS-2B foi a mais resistente ao efeito citotóxico do EHG e dos metabólitos necessitando de 3,438 $\pm$ 11,11 mg/ml de EHG para atingir o valor de CI50, 22,96 $\pm$ 12,58 mM de CFN, 7,75 $\pm$ 4,17 mM de THB e 460,7 $\pm$ 13,34mM de ECG. Por outro lado, a linhagem mais sensível ao EHG foi a linhagem tumoral de pulmão A549 necessitando de 2,097 $\pm$ 23,80 mg/ml para atingir o valor de CI50. Esse perfil de sensibilidade foi também observado para os metabólitos CFN e ECG. Dentre os valores de CI50, o ECG se destaca por ser muito citotóxico nas linhagens celulares, visto que precisa de doses baixíssimas para atingir CI50, como 0,15 mM em A549 e 1,23 mM em macrófagos THP-1. Estudo com o extrato aquoso de guaraná relatou uma dose alta CI50 de 34,62 mg/ml em células de ovário de hamster chinês¹⁷. Em contrapartida, a análise da citotoxicidade do extrato bruto de guaraná e de sua fração acetato de etila em linhagem celular de leucemia obteve-se valores de CI50 baixos, 70,25 μ g/mL e 61,18 μ g/mL, respectivamente¹⁸.

Tabela 1 - Determinação dos valores de CI50 do EHG e metabólitos (CFN, THB e ECG) em diferentes linhagens celulares por ensaio de metabolização de resazurina. Os valores são descritos com média $\pm$ desvio padrão. Para obtenção da curva dose-resposta foi utilizada regressão não-linear. As concentrações de EHG são descritas em mg/ml e CFN, THB e ECG em mM. (n=4). dTHP-1, monócito diferenciado em macrófago.

	EHG (mg/ml)	CFN (mM)	THB (mM)	ECG (mM)
A549	2,097 $\pm$ 23,80	8,18 $\pm$ 6,09	7,26 $\pm$ 21,13	0,15 $\pm$ 11,94
BEAS-2B	3,438 $\pm$ 11,11	22,96 $\pm$ 12,58	7,75 $\pm$ 4,17	460,7 $\pm$ 13,34
dTHP-1	2,254 $\pm$ 21,77	14,72 $\pm$ 15,93	5,18 $\pm$ 16,36	1,23 $\pm$ 17,54

O ensaio clonogênico foi conduzido com o objetivo de avaliar a capacidade de uma única célula, previamente exposta aos tratamentos formar uma nova colônia. Células expostas por 24 horas a uma elevada, mas não citotóxica concentração do extrato e seus metabólitos apresentaram uma redução significativa na capacidade clonogênica (Figura 2). Em um estudo *in vitro* a cafeína em doses semelhantes a utilizada neste estudo reduziu significativamente a capacidade de formação de colônias em linhagens de câncer gástrico (MGC-803 e SGC-

7901)¹⁴. Isso demonstra que o efeito antiproliferativo do EHG pode ocorrer em função da alta concentração de cafeína.

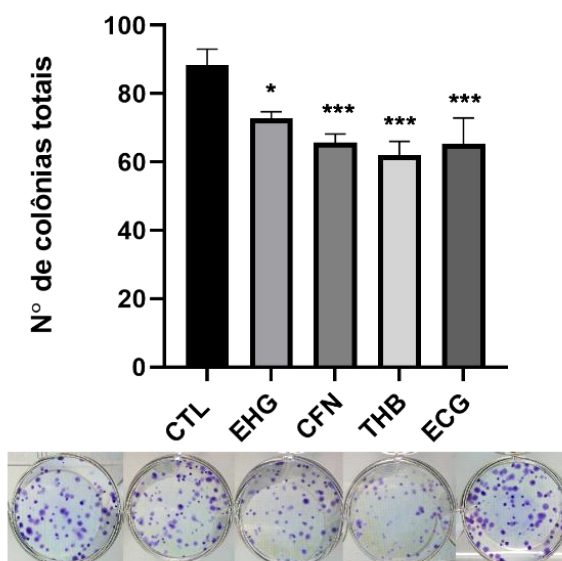


Figura 2. Ensaio Clonogênico em A549. Inicialmente, 100 células foram plaqueadas em placa de 12 poços, tratadas por 24 horas com EHG e seus metabólitos, após o tratamento as células foram mantidas em meio 5% por 10 dias. Após este período de cultivo, as células foram coradas com solução fixadora contendo cristal violeta e o número de colônias contadas manualmente com o auxílio do microscópio invertido. (n=3). Os tratamentos foram EHG 1mg/ml, CFN 1 mM, THB 1 mM e ECG 0,01 mM *p<0.05, ***p<0.001. CTL, controle; EHG, extrato hidroalcoólico de guaraná; CFN, cafeína; THB, teobromina; ECG, epigallocatequina.

A modulação pelo EHG e metabólitos no status oxidativo celular foi avaliado pelo ensaio de detecção dos níveis de ROS em células A549 (Figura 3A) e THP-1 (Figura 3B) tanto em condições basais quanto sob estresse oxidativo. Na detecção de ROS basal, o EHG foi capaz de reduzir os níveis de ROS semelhante ao controle antioxidante quercetina. Por outro lado, quando as células foram submetidas ao estresse oxidativo com H₂O₂, todos os grupos tratamento analisados foram capazes de reduzir os níveis de ROS intracelular em ambas as linhagens (Figura 3). Essa atividade antioxidante corrobora com os ensaios realizados em células NIH-3T3 no qual doses baixas do guaraná reverteu o estresse oxidativo causado por nitroprussiato de sódio⁵. De modo semelhante, o guaraná em doses baixas mostrou efeito protetivo frente ao tratamento de células cerebrais com vincristina, reduzindo a formação de ROS¹⁹.

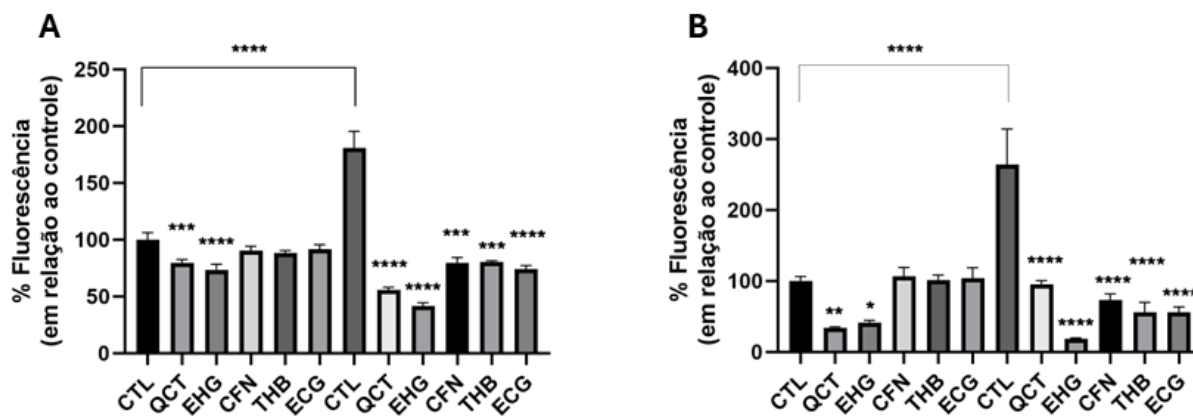


Figura 3. Detecção de ROS. As linhagens A549 (A) e THP-1 (B) foram cultivadas e tratadas com as doses não citotóxicas de EHG e metabólitos por 24 horas, o ROS intracelular foi quantificado para avaliar a atividade antioxidante. Quercetina foi utilizada como controle antioxidante. (n=4) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$. CTL, controle; QCT, quercetina; EHG, extrato hidroalcoólico de guaraná; CFN, cafeína; THB, teobromina; ECG, epigallocatequina.

4. Conclusões

A obtenção do CI50 demonstrou que as células apresentam um perfil heterogêneo de viabilidade frente aos tratamentos com EHG e seus metabólitos. Tanto o desafio com o extrato quanto com os metabólitos majoritários do guaraná levou a uma redução na capacidade clonogênica das células tumorais revelando o potencial antitumoral destes tratamentos. A determinação dos níveis de ROS intracelular mostrou a atividade antioxidante do EHG tanto a nível basal quanto sob condições de estresse oxidativo. Já para os metabólitos, a redução nos níveis de ROS somente é observada em células sob estresse oxidativo. Considerando os dados apresentados, efeitos mais expressivos foram observados para células tratados com EHG, tais dados parecem indicar que os efeitos citotóxicos e antioxidantes intracelular dos metabólitos do guaraná são decorrentes de uma ação sinérgica entre eles.

Palavras-Chave: extrato hidroalcoólico de guaraná; cafeína; metabólito; teobromina, antioxidante.

Divulgação

O (s) autor (es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste resumo, por meio eletrônico.

Referências

- MARQUES, L.L.M; *et al.* *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 29:77-110, 2019.
- SCHIMPL F.C.; *et al.* Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. J Ethnopharmacol., Oct 28;150(1):14-31. 2013.

3. KENNEDY, D. O.; et al.. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*, *Pharmacol., Biochem. Behav.*, 79, 401–411, 2004.
4. PEIXOTO, H.; et al.. Anti-Aging and Antioxidant Potential of *Paullinia cupana* var. *sorbilis*: Findings in *Caenorhabditis elegans* Indicate a New Utilization for Roasted Seeds of Guarana. *Medicines*, 4(3), 61, 2017.
5. BITTENCOURT, L. S.; et al.. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside, *Food Chem. Toxicol.*, 53, 119–125, 2013.
6. BASILE, A; et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart, *J. Ethnopharmacol.*, 102, 32–36, 2005.
7. PORTELLA, R. L.; et al. Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. *Lipids Health Dis*, 2013.
8. CARVALHO, L.V.N; et al. Evaluation of antibacterial, antineoplastic, and immunomodulatory activity of *Paullinia cupana* seeds crude extract and ethyl-acetate fraction. *Evid. Based Complement. Altern. Med*, 2016.
9. MACHADO, K. M.; et al. TNF- α inhibition, antioxidant effects and chemical analysis of extracts and fraction from Brazilian guaraná seed powder. *Food Chemistry*, 355, Sep, 129563, 2021.
10. MAJHENIC, L; , SKERGET, M; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry* 104, 1258–1268, 2007.
11. KOBER, H., et al.. Genoprotective and hepatoprotective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Drug. Chem. Toxicol.* 39, 48–52, 2016.
12. SILVA, C.P; et al.. Polyphenols from guaraná after in vitro digestion: Evaluation of bioaccessibility and inhibition of activity of carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *Food Chemistry*, 267, 405-409, 2018.
13. LIU, Y.; et al.. Caffeine enhances antitumor T-cell activity by suppressing kynurenine pathway in colorectal cancer. *Nature Communications*, 16, 5906, 2025.
14. LIU, H.; et al.. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 16: 2445-2454, 2017.
15. DUTRA, N. S.; et al.. Biological properties of caffeine, (+)-catechin, and theobromine: an in silico study. *3 Biotech.*, 14(4):94, 2024.
16. CHANG, Y.; et al.. Theophylline exhibits anti-cancer activity via suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines. *Oncotarget.*, 8:101461-101474, 2017.
17. SANTA MARIA, SANTA MARIA, A.; et al.. Evaluation of the Toxicity of Guarana with in Vitro Bioassays. *Ecotoxicology and environmental safety.* 39, 164—167, 1998.
18. CARVALHO, L.V.; et al. Evaluation of Antibacterial, Antineoplastic, and Immunomodulatory Activity of *Paullinia cupana* Seeds Crude Extract and Ethyl-Acetate Fraction. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 1203274, 2016.
19. VELOSO, C. F.; et al.. Neuroprotective Effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) against Vincristine in Vitro Exposure. *J Prev Alzheimers Dis.*, Nov 28;5(1):65–70, 2017.