



INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DA CAFEÍNA E N-ACETIL-L-TIROSINA ISOLADOS E EM COMBINAÇÃO

^{1,2}Priscila da Silva Lima (IC-UNIRIO) ; ³Eduardo Kennedy Carrão Dantas (Coorientador, doutorado-CAPEs), ³Israel Felzenszwalb ²Carlos Fernando Araújo Lima (orientador);

1 – Escola de Nutrição; Centro de Ciências Biológicas e da Saúde; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2 – Departamento de Genética e Biologia Molecular; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

3 - Departamento de Biofísica e Biometria; Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes; Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq, CAPES, UNIRIO, UERJ.

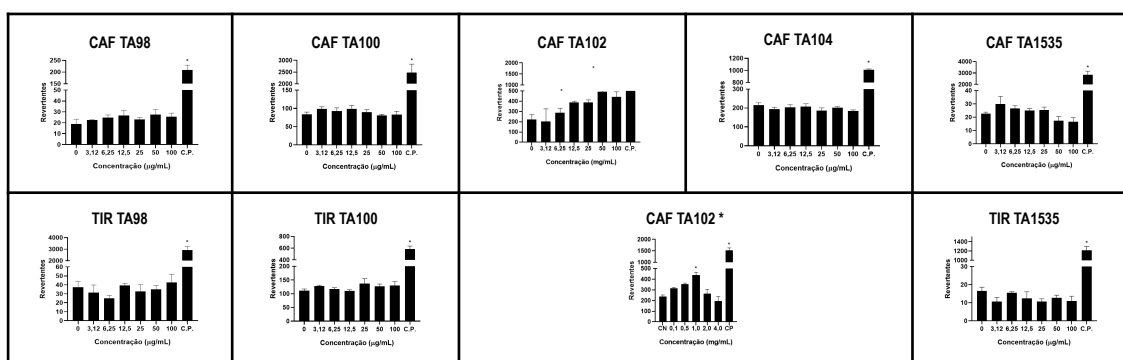
Palavras-chave: cafeína, tirosina, mutagênese, termogênicos, suplementos alimentares

Introdução: O consumo de suplementos estava, no ano de 2021, presente na dieta de pelo menos uma pessoa em 59% das famílias brasileiras, sendo que o consumo de suplementos aumentou 10% em relação ao ano de 2015 (ABIAD, 2024). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a responsável pela regulamentação e controle de suplementos alimentares (ANVISA, 2021). Entretanto, a ANVISA não regula a segurança, eficácia ou rotulagem desses suplementos, o que transfere para os fabricantes a responsabilidade de fornecer informações precisas sobre segurança e uso desses produtos (ANVISA, 2019). Além disso, o uso de suplementos dietéticos, incluindo pré e pós-treino, pode conter doses elevadas de substâncias ou combinações de ingredientes potencialmente perigosos à saúde humana. As recomendações de consumo no rótulo podem levar ao consumo excessivo de alguns compostos ainda não totalmente testados, o que pode representar riscos à saúde devido a utilização desses suplementos dietéticos. (Guest, N.S. et al, 2021). A cafeína e a tirosina são frequentemente usadas em suplementos dietéticos devido aos seus efeitos benéficos no desempenho mental e físico (Zaragoza, J. et al, 2019; Guest, N.S. et al, 2021). A cafeína age como estimulante do sistema nervoso central, provocando aumento da atenção e da ergogênese, sendo naturalmente encontrada na fruta, folhas e grãos de café, cacau e plantas de guaraná (Harvard T.H.). Já a N-acetil-L-tirosina (NALT) é a forma acetilada e mais hidrossolúvel da L-tirosina (Hase, A. et al, 2015), aminoácido não essencial presente tanto em proteínas animais quanto em vegetais (Attipoe, S. et al, 2015; Chen, H.-Y et al, 2020). A L-tirosina é um precursor das catecolaminas, como a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina (Zaragoza, J. et al, 2019; Guest, N.S. et al, 2021), que atuam como neurotransmissores ou hormônios e modulam diversas funções corporais, sendo fundamentais em processos como cognição, emoção, memória e aprendizado, controle motor e regulação do sistema endócrino (Kobayashi, K., 2001). É de grande importância a avaliação toxicogenética de suplementos alimentares, já que esses produtos são tipicamente regulamentados como alimentos e, assim, não estão sujeitos aos mesmos critérios de segurança e eficácia que os medicamentos. Isso resulta em uma lacuna sobre o uso seguro desses produtos (Carrão Dantas *et al.*, 2022). Esperando-se uma melhor performance durante a prática esportiva, a cafeína e a NALT são frequentemente encontradas em suplementos pré-treino (Zaragoza, J. et al, 2019; Guest, N.S. et al, 2021). Nosso grupo de pesquisa recentemente investigou a toxicidade de suplementos alimentares pré-treino à base de cafeína, os quais mostraram uma capacidade de induzir mutagenicidade e citotoxicidade significativa (Carrão Dantas *et al.*, 2022). Com o uso cada vez mais comum desses suplementos, especialmente em formulações com misturas complexas, e os resultados obtidos em estudos prévios sobre esses produtos, mostra-se importante a avaliação dessas substâncias frequentemente presentes em produtos do tipo pré-treino, como a cafeína e a tirosina, quanto à sua toxicidade tanto de forma individual como em combinação.

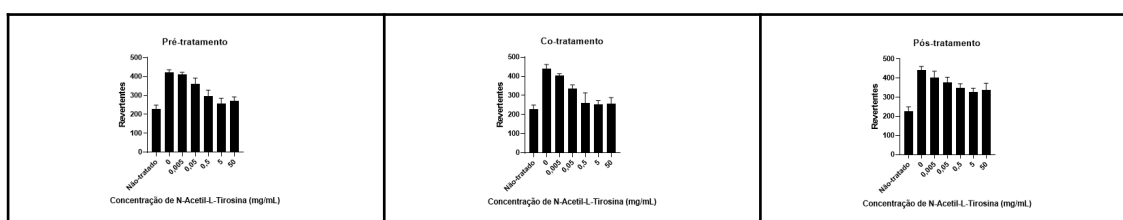
Objetivo: Avaliar o potencial mutagênico de amostras de cafeína e de N-acetil-L-tirosina tanto de forma individual quanto em combinação, em diferentes concentrações.

Metodologia: Uma amostra pura de cafeína (CAS 58-08-2) e uma de NALT (CAS 537-55-3) foram previamente adquiridas. Cada amostra foi diluída em água destilada estéril em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 ug/mL). Para a amostra de cafeína foram realizados ensaios adicionais, com a amostra diluída em 100, 500, 1000, 2000 e 4000 ug/ml, para verificação de mutagenicidade em concentrações maiores. Para análise da mutagenicidade dessas amostras foi utilizado o Teste de Ames, um ensaio bacteriano utilizado para identificar substâncias que podem provocar danos ao DNA (Mortelmans; Zeiger, 2000). Também foram realizados testes de antimutagenicidade pelo método de pré-incubação também desenvolvido por Ames em 1983. Todos os ensaios foram conduzidos sem metabolização exógena (Press; Maron; Ames, 1983). As cepas de *Salmonella* utilizadas nos ensaios realizados neste trabalho foram a TA98, TA100, TA1535, TA102 e TA104. Foram realizados ensaios para cada cepa teste, em triplicata, e o número de colônias revertentes foi contado para cada grupo de tratamento. Os resultados foram considerados positivos para mutagenicidade quando o número médio de colônias revertentes em cada grupo tratado atingiu pelo menos o dobro do controle negativo, de forma a seguir uma curva dose-resposta e ser estatisticamente significativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes. As diferenças estatísticas entre os grupos serão analisadas por ANOVA unidirecional ($P < 0,05$) e teste post hoc de Tukey (Araujo-Lima et al., 2017).

Resultados: A seguir são apresentados os gráficos com os resultados dos ensaios de ames:



Com exceção do ensaio realizado com a cepa TA102 exposta a cafeína, não houve indícios de mutagenicidade nas concentrações testadas para ambas as amostras. Entretanto, observou-se mutagenicidade no teste onde a cepa TA102 foi exposta à cafeína nas concentrações de 50 e 100 ug/ml/placa, o que pode indicar também mutagenicidade em concentrações maiores de cafeína. A TA102 detecta mutações de troca de pares A:T (adenina-timina) para G:C (guanina-citosina) (Mortelmans; Zeiger, 2000). Para melhor investigação, foram realizados novos ensaios expondo a TA102 a concentrações maiores de cafeína (0; 100; 500; 1000; 2000; 4000 ug/ml/placa) para verificar possível mutagenicidade dose-dependente (CAF TA102*), onde não foi observada mutagenicidade. Por fim, foi realizado teste de antimutagenicidade onde a amostra de NALT foi incubada junto a cafeína em três condições: pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento. No pré-tratamento, a NALT foi incubada com a TA102, e posteriormente a cafeína, neste ensaio atuando como controle positivo (CP) foi adicionada; no co-tratamento, a NALT foi incubada com a cepa e o CP; e no pós-tratamento, a TA102 e o CP são incubados, e posteriormente a NALT foi adicionada. Observou-se uma tendência da diminuição do número de revertentes com o aumento da concentração de NALT principalmente no pré e co-tratamento, o que indica um possível efeito protetor da NALT na presença da cafeína.





Conclusões: A NALT na forma isolada não induziu mutagenicidade e a Cafeína induziu mutagênecidade em baixa potência. Contudo, quando em combinação, os compostos apresentaram efeito sinérgico, o que sugere um efeito quimioprotetor em relação a mutações do tipo substituição de pares de bases AT:GC no DNA.

Referências:

ABIAID. Associação Brasileira Da Indústria de Alimentos Para Fins Especiais. Pesquisa de Mercado – Suplementos Alimentares. Disponível em: <https://abiad.org.br/pesquisa-de-mercado-suplementos-alimentares/>. Acesso em: 07 fev 2024.

ANVISA (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia nº23/2019 para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5355698/Guia+Seguran%C3%A7a+de+Alimentos.pdf/dae93caa-7418-4b9a-97f2-2ec9ebc139e2/>. Acesso em: 01 set 2024.

ANVISA (2021). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Suplementos alimentares: documento informativo atualizado. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/suplementos-alimentares-documento-informativo-atualizado/>. Acesso em: fev 2024.

ARAUJO-LIMA, C. F.; CHRISTONI, L. S. A. ; JUSTO, M. G. ; SOEIRO, M. N. ; AIUB, C. A. F. ; FELZENSZALB, I. . Atorvastatin Downregulates Methyl Methanesulfonate and Cyclophosphamide Alkylation-Mediated Cellular and DNA Injuries. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, p. 1-11, 2018.

Araujo-Lima, C.F., Nunes, R.J.M., Carpes, R.M., Aiub, C.A.F., Felzenszwalb, I., 2017. Pharmacokinetic and toxicological evaluation of a zinc gluconate-based chemical sterilant using in vitro and in silico approaches. *BioMed Res. Int.* 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/5746768>. 2017.

Attipoe, S., Zeno, S. A., Lee, C., Crawford, C., Khorsan, R., Walter, A. R., & Deuster, P. A. (2015). Tyrosine for Mitigating Stress and Enhancing Performance in Healthy Adult Humans, a Rapid Evidence Assessment of the Literature. *Military Medicine*, 180(7), 754–765. Disponível em: <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-14-00594>.

CARRÃO-DANTAS, E. K. ; Araujo-Lima, C.F. ; FERREIRA, C. L. S. ; GOLDSTEIN, A. ; Aiub, C.A.F. ; Coelho, M. G. P. ; Felzenszwalb, I. . Toxicogenetic assessment of a pre-workout supplement: In vitro mutagenicity, cytotoxicity, genotoxicity and glutathione determination in liver cell lines and in silico ADMET approaches. *MUTATION RESEARCH-GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS* , v. 881, p. 503517, 2022.

Chen, H.-Y., & Yeh, Y.-C. (2020). Detection of tyrosine and monitoring tyrosinase activity using an enzyme cascade-triggered colorimetric reaction. *RSC Advances*. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0RA05581F>.

Guest, N. S., VanDusseldorp, T. A., Nelson, M. T., Grgic, J., Schoenfeld, B. J., Jenkins, N. D. M., Arent, S. M., Antonio, J., Stout, J. R., Trexler, E. T., Smith-Ryan, A. E., Goldstein, E. R., Kalman, D. S., & Campbell, B. I. (2021). International society of sports nutrition position stand: caffeine and exercise performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18, Article number: 1. Disponível em: <https://jissn.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12970-020-00383-4>.

Harvard T.H. Chan School of Public Health. Caffeine | The Nutrition Source. Disponível em: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/caffeine/>. Acesso em: 24 fev 2024.

Hase, A., Jung, S. E., & aan het Rot, M. (2015). Behavioral and cognitive effects of tyrosine intake in healthy human adults. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 133, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.03.008>.

Kobayashi, K. (2001). Papel da sinalização da catecolamina nas funções do cérebro e do sistema nervoso: novas idéias do estudo genético molecular de camundongos. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6 (1): 115-21.

Maron, D. M., Ames, B. N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1983, 113(3-4), 173–215. [https://doi:10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi:10.1016/0165-1161(83)90010-9).

Mortelmans, K, and E Zeiger. "The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay." *Mutation research* vol. 455,1-2 (2000): 29-60. doi:10.1016/s0027-5107(00)00064-6.

Zaragoza, J., Tinsley, G., Urbina, S., Villa, K., Santos, E., Juaneza, A., Tinnin, M., Davidson, C., Mitmesser, S., Zhang, Z., & Taylor, L. (2019). Effects of acute caffeine, theanine and tyrosine supplementation on mental and physical performance in athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 16, Article number: 56. Disponível em: <https://jissn.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12970-019-0326-3>.