

# FLUIDOS DIGESTIVOS COMO MARCADORES DE BIODISPONIBILIDADE E EXCREÇÃO DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS EM HUMANOS

Adriana FARAH<sup>1</sup>, E-mail: afarah@iq.ufrj.br; Fernando GUIGON<sup>1</sup>; Luiz Carlos TRUGO<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

<sup>†</sup>In memoriam

## Resumo:

O café é uma das maiores fontes de ácidos clorogênicos na natureza. Os ácidos clorogênicos são compostos fenólicos que têm recebido especial atenção nos últimos anos devido a propriedades biofarmacológicas observadas *in vitro* e *in vivo*, tais como hipoglicemiante e antioxidante. No entanto, pouco se sabe a respeito de sua biodisponibilidade em humanos. Este estudo objetivou investigar os fluidos digestivos de humanos como marcadores de biodisponibilidade e excreção dos ácidos clorogênicos. Os três isômeros principais dos ácidos cafeoilquínicos, responsáveis por cerca de 80% da composição do café torrado, foram identificados, na sua forma livre, em fluidos digestivos de mais de cem indivíduos após jejum noturno de 12 horas. Nossos resultados mostram que os ácidos cafeoilquínicos são absorvidos em humanos e circulam na corrente sanguínea, sendo parcialmente excretados via saliva e fluidos gastrintestinas.

Palavras-chave: Café, ácidos cafeoilquínicos, biodisponibilidade, compostos fenólicos, composição de fluidos digestivos, ácidos clorogênicos.

## DIGESTIVE FLUIDS AS BIOAVAILABILITY AND EXCRETION MARKERS OF CHLOROGENIC ACIDS IN HUMANS

### Abstract:

Coffee is one of the main sources of chlorogenic acids in nature. Chlorogenic acids are phenolic compounds that have been receiving a special attention in the last years due to their biopharmacological properties observed *in vitro* and *in vivo*, such as hypoglycemic and antioxidant. However, little is known about their absorption and metabolism in the human body. In this study, we investigated human digestive fluids as bioavailability and excretion markers of chlorogenic acids. The three main caffeoylquinic acid isomers, responsible for about 80% of roasted coffee composition, were identified in the digestive fluids of more than a hundred subjects after 12 hour night fasting. Our results show that the caffeoylquinic acids found in coffee are absorbed in humans and circulate in the blood stream, being partially excreted, in their unbound form, via saliva and gastrointestinal fluids.

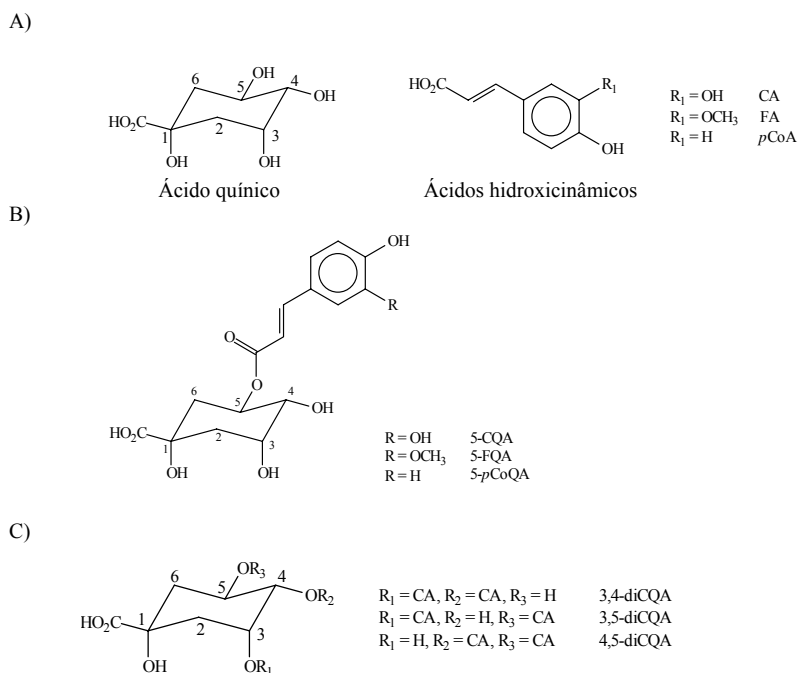
Key words: Coffee, caffeoylquinic acids, bioavailability, phenolic compounds of coffee, digestive fluids composition.

## Introdução

Há anos, o café tem sido um alvo de interesse científico devido à presença de importantes compostos bioativos, incluindo os ácidos clorogênicos (CGA), que são ésteres de ácidos *trans*-cinâmicos (tais como os ácidos cafeico, - CA, ferúlico - FA e *p*-cumárico - CoA) com o ácido (-)-quinico (Figura 1) (Farah & Donangelo, 2006). De fato, o café é considerado uma das principais fontes de CGA e, por isso, uma das principais fontes de antioxidantes em vários países (Svilas et al, 2004; Vinson, 2005), incluindo o Brasil. O ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) é o principal CGA do café, estando também presente, em pequenas concentrações em uma grande variedade de alimentos de origem vegetal (Farah & Donangelo, 2006).

Apesar dos resultados de pesquisa promissores sobre a capacidade antioxidante e outras propriedades biológicas dos CGA, dados sobre sua absorção e metabolismo são ainda bastante limitados. Entre os vários isômeros de CGA presentes no café, somente concentrações traço têm sido identificadas em plasma e urina de ratos em vários estudos realizados ao longo dos últimos anos. Recentemente, Monteiro et al (2007) identificaram seis isômeros de CGA em plasma de humanos, mostrando que eles são realmente biodisponíveis em humanos. Mesmo assim, somente o 5-CQA foi identificado na urina desses indivíduos. No entanto, segundo Choudhury et al, 1999, a urina não parece ser uma via de excreção preferencial de CGA, pelo menos em ratos.

Considerando que os metabólitos de CGA, bem como outros compostos fenólicos, foram anteriormente identificados na bile de humanos (Das & Sothy, 1971), neste estudo, investigamos fluidos gastrintestinais (GIF) e saliva como possíveis marcadores de biodisponibilidade e excreção. Como uma fração significativa da população mundial é portadora da bactéria *Helicobacter pylori* (HP) em seu estômago, comparamos fluidos contendo e não contendo esta bactéria.



**Figura 1.** Ácidos clorogênicos e precursores (A) Precursores imediatos dos ácidos clorogênicos (B) monoésteres de ácido quínico com ácidos hidroxicinâmicos (exemplos de isômeros de posição 5); (C) di-ésteres de ácido quínico com ácido cafeico. CA = Ácido cafeico; FA = Ácido ferúlico; *p*-CoA = Ácido *p*-cumaroilquínico.

## Material e Métodos

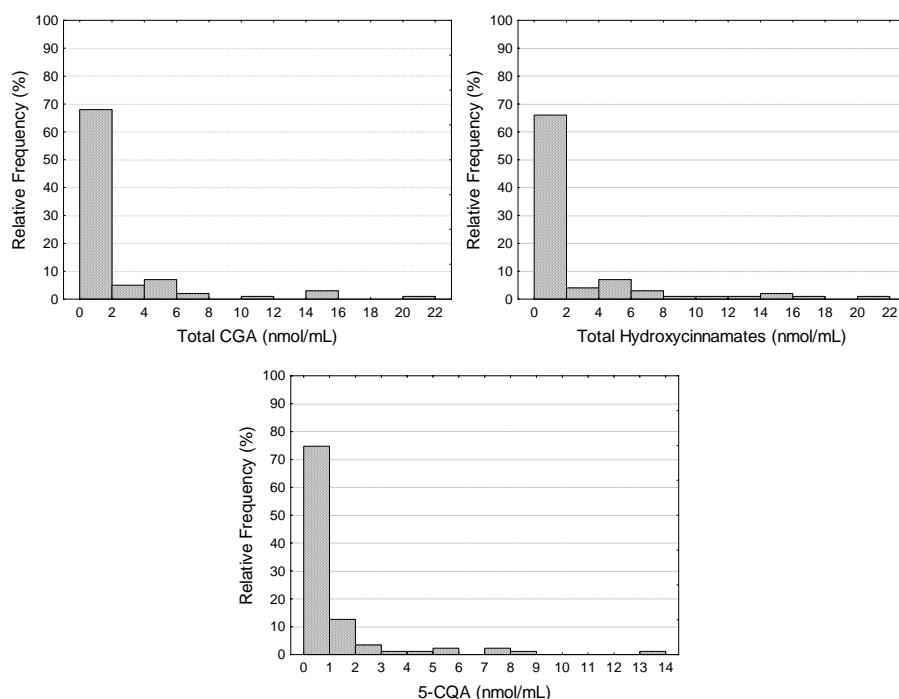
Amostras de GIF ( $n=87$ ) foram obtidas de adultos e idosos do sexo masculino e feminino (consumidores regulares e não regulares de café), após jejum noturno de 12 h, por ocasião de exame de endoscopia digestiva alta. Amostras de GIF foram divididas entre HP (-) e HP (+). Além disso, elas foram divididas em amostras com  $\text{pH} < 6$  (maior concentração de fluido gástrico) e  $\text{pH} \geq 6$  (maior concentração de fluido pancreático e bile).

Amostras de saliva foram coletadas de adultos saudáveis do sexo masculino e feminino ( $n = 15$ ) diretamente em tubos de ensaio de vidro após 12h de jejum noturno. As amostras foram clarificadas e analisadas para a identificação de compostos fenólicos em HPLC e LC-MS de fase reversa, conforme metodologia previamente descrita para café (Farah et al, 2005 e Farah et al, 2006). Análises estatísticas foram realizadas pelo STATISTICA®, (versão 7.0,USA) usando Teste de LSD e Teste T não pareado. Diferenças cujo  $p \leq 0,05$  foram consideradas significativas.

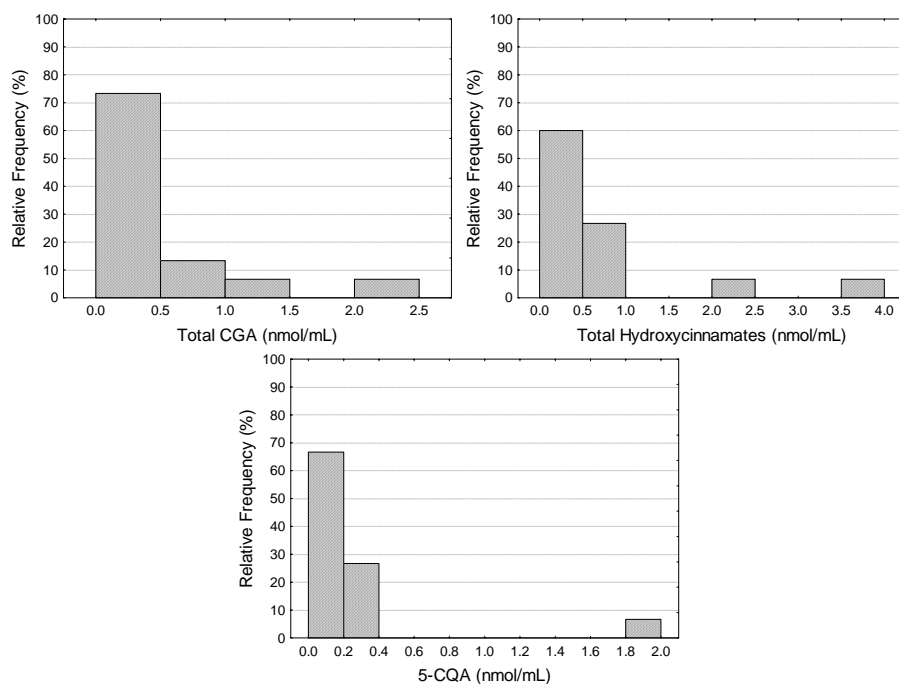
## Resultados e Discussão

Os resultados cromatográficos mostraram que os três isômeros principais de CGA do café (5-CQA, 4-CQA e 3-CQA), além de outros ácidos hidroxicinâmicos, estavam presentes tanto nas amostras de GIF quanto nas de saliva. Cerca de 97% das amostras de GIF continham 5-CQA, 66% continham 3-CQA, 55% 4-CQA e 55% CA. Somente 5% e 3% das amostras de GIF continham FA e *p*-CoA, respectivamente. Da mesma forma, 93% das amostras de saliva continham 5-CQA; 87% continham 3-CQA; 53% 4-CQA; 7% FA e 27% *p*-CoA. CA não foi identificado nas amostras de saliva.

Uma grande variação interindividual nas concentrações de CGA e de ácidos hidroxicinâmicos não esterificados foi observada nos fluidos digestivos, provavelmente devido à variabilidade interindividual na ingestão de CGA, além de possíveis diferenças no metabolismo dos indivíduos. Apesar dessa variabilidade, a maior parte dos voluntários apresentou até 2.0 nmol/mL de CGA totais e de hidroxicinamatos nos GIF e até 0.5 nmol/mL de CGA totais e hidroxicinamatos na saliva (Figura 2). As concentrações médias de ácidos clorogênicos totais em GIF e saliva foram, respectivamente,  $2.21 \pm 0.50$  nmol/mL e  $0.49 \pm 0.24$  nmol/mL, sendo o 5-CQA responsável por cerca de 50% dos CGA tanto em GIF quanto na saliva. A concentração média de hidroxicinamatos (incluindo CA, FA e *p*-CoA) foi de  $2.22 \pm 0.62$  nmol/mL e  $0.72 \pm 0.39$  nmol/mL, respectivamente.



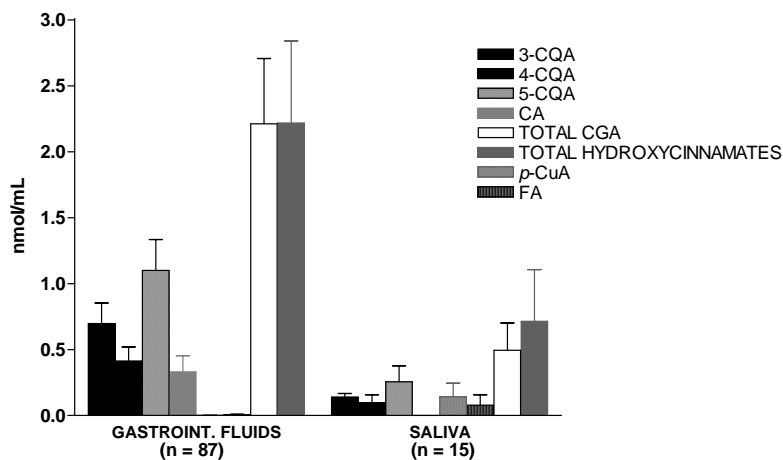
**Figura 2a** – Frequência relativa de ácidos clorogênicos totais (CGA), hidroxicinamatos totais e 5-CQA nos fluidos gastrintestinais de 87 voluntários.



**Figura 2b** – Frequência relativa de ácidos clorogênicos totais (CGA), hidroxicinamatos totais e 5-CQA na saliva de 15 voluntários.

Nenhuma diferença significativa foi observada entre indivíduos de diferente sexo e idade, portadores e não portadores de HP, ou entre fluido gástrico e entérico. Por outro lado, uma diferença significativa foi observada entre a composição fenólica das amostras de saliva e GIF. Enquanto CQA e CA foram preferencialmente excretados em GIF, a saliva continha concentrações mais elevadas de FA e de *p*-CoA, o que está refletido nas concentrações médias de hidroxicinamatos totais em GIF e saliva. Na saliva, não houve diferença significativa entre os teores de fenólicos dos indivíduos que haviam consumido café no dia anterior e os que não haviam. No entanto, nos fluidos gastrintestinais, os indivíduos não consumidores de café apresentaram concentrações mais baixas de CGA. Como não foi possível avaliar a questão do consumo de café em todos os fluidos gastrintestinais, esses dados serão investigada mais a fundo

posteriormente. Além, disso, a não diferença observada nas amostras de saliva pode se dever à grande variação nas concentrações de fenólicos nessas amostras. Um maior número de amostras será avaliado na tentativa de responder tal questão. A Figura 3 apresenta a distribuição média de ácidos clorogênicos e outros hidroxicinamatos nos GIF e na saliva de todos os voluntários - adultos e idosos, portadores e não portadores de *Helicobacter pylori*.



**Figura 3-** Distribuição média de ácidos clorogênicos e ácidos hidroxicinâmicos não esterificados em fluidos gastrintestinais e em saliva de adultos e idosos (portadores e não portadores de *Helicobacter pylori*).

A presença de hidroxicinamatos livres (não esterificados) em plasma e urina de ratos e de humanos foi previamente relatada (Bourne & Rice-Evans, 1998; Olthof et al, 2003; Nardini et al 2002; Cremin et al 2001). Considerando que nos testes analíticos a recuperação do 5-CQA foi muito alta, sem isomerização ou hidrólise deste composto, a identificação de 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA nos fluidos digestivos avaliados confirma que não somente o 5-CQA, mas outros isômeros de CQA circulam na corrente sanguínea, sendo excretados via fluidos digestivos.

Já que a maior parte dos ácidos hidroxicinâmicos previamente identificados no plasma foram conjugados com proteínas, ácido glicurônico ou sulfato, formas conjugadas de CGA nos fluidos digestivos serão investigadas.

### Conclusão

Nossos resultados mostram que os ácidos cafeoilquínicos são absorvidos em humanos e circulam na corrente sanguínea, sendo parcialmente excretados, juntamente com outros hidroxicinamatos, via saliva e fluidos gastrintestinais.

### Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNP&DCafé-EMBRAPA, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ).

### Referências Bibliográficas

Farah, Adriana and Donangelo, Carmen Marino (2006) Phenolic compounds in coffee. *Brazilian. Journal Plant Physiology*, 18(1):23-36.

Svilaas, A.; Sakhi, A. K.; Andersen, L. F.; Svillas, T.; Ström, E. C.; Jacobs, D. R.; Ose, L.; Blomhoff, R. (2004) Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *Journal of Nutrition*, 134(3): 562-7.

Vinson. Polyphenols: Total amounts in foods and beverages and US *per capita* consumption. The 23<sup>th</sup> ACS National Meeting; Washington, DC. Aug 28-Sept 1, 2005: American Chemical Society, 2005

Choudhury, R.; Srai, S. K.; Debnam, E.; Rice-Evans, C. (1999) Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radical Biological Medicine*, 27(3-4): 278-86.

Olthof, M. R.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal*

*of Nutrition*, 131(1): 66-71.

Das, N.P. and Sothy, S.P. (1971). Studies on flavonoid metabolism. Biliary and urinary excretion of metabolites of (+)-(U-14 C) catechin *Biochemical Journal*. 125:417-423.

Farah, A.; De Paulis, T.; Trugo, L. C.; Martin, P. R. (2005) Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5): 1505-13.

Bourne, L. C. & Rice-Evans, C. A. (1998) Urinary detection of hydroxycinnamates and flavonoids in humans after high dietary intake of fruit. *Free Radical Research*, 28(4): 429-38.

Olthof, M.R.; Hollman, P.C.H.; Buijsman, M.N.C.P.; Van Amelsvoort, J.M.M.; Katan, M.B. (2003) Chlorogenic acid, Quercetin-3-Rutinoside and black tea phenol are extensively metabolized in humans. *Journal of Nutrition*, 133:1806-14.

Nardini, M.; Cirillo, E.; Natella, F.; Scaccini, C. (2002) Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5735-41.

Cremin, P.; Kasim-Karakas, S.; Waterhouse, A.L. (2001) LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:1747-50.