

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUCIANA SILVANA D'AMORE ADAM

00163198

Trabalho a ser submetido à Revista *Phytotherapy Research* sob o título:
ANÁLISE DOS EFEITOS DO EXTRATO COMERCIAL DE
GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA*) SOBRE O ESTADO REDOX E
COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR OBESOS E NÃO OBESOS

Porto Alegre
2019

LUCIANA SILVANA D'AMORE ADAM

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO EXTRATO COMERCIAL DE
GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA*) SOBRE O ESTADO REDOX E
COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR OBESOS E NÃO OBESOS**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas com ênfase em bioquímica na
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador(a): Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Co-orientador(a): Mestre Alexandre Kleber Silveira

**Porto Alegre
2019**

Agradecimentos:

Gostaria de agradecer principalmente à minha família, em especial minha mãe e meu irmão que foram minhas âncoras, sempre e quando meus pensamentos se afastaram em demasia do meu objetivo, e minhas asas sempre que precisei de impulso ao longo desta trajetória por vezes conturbada e repleta de surpresas. Obrigada por permanecerem sempre ao meu lado, principalmente quando muitos quilômetros se fizeram presentes. Somos um só. Agradeço também com imensa admiração ao professor José Cláudio, que ao longo da minha graduação se fez presente de forma ou outra, seja em cadeiras que tanto ajudaram na minha formação, ou através de conselhos que por vezes me fizeram ver o caminho ideal a seguir. Obrigada por mostrar a todos teus alunos, de maneira tão simples que a biologia é um mundo incrível e o conhecimento é nossa maior conquista. Ao meu co-orientador que com tanta paciência e algumas caras feias me acompanhou realmente a cada passo deste estudo, só tenho a agradecer. Este trabalho e conquista não seriam possíveis sem teus ensinamentos e parceria, obrigada por tudo Xande. Às amigas, aquelas que são minhas irmãs de alma, eu nada seria sem vocês. Obrigada por serem minhas mais fiéis conselheiras e escudeiras, por sempre terem me acompanhado em cada aventura, mas também terem me trazido à terra quando preciso. Não se faz necessária a citação, estamos juntas. Agradeço por último, mas certamente sem ordem em particular, a minha segunda família, com a qual no meu último ano de faculdade convivi mais do que com a minha própria. Ao laboratório 32 e seus integrantes, todo meu amor. Lucas, finalmente me faltam palavras, então uso esta: cumplicidade. Tem amizades que chegam tarde, mas ficam. Bruna, que tu voes longe, mas cada vez mais perto. Cami, Carol e Nau, tão diferentes e complementares sempre com as palavras certas e prontas para partilhar conhecimentos, principalmente os de vida. Por todos os conselhos, risadas e desabafos, eu agradeço de coração. Pedro, obrigada pelas risadas, mas principalmente por me lembrar que presença é declaração e que tudo vai ficar bem. Juci, obrigada por tudo, mas principalmente pela tua energia que sem nem perceber deixa tudo mais leve. Helena e Martha, obrigada por tanto, sem vocês eu não estaria aqui.

INTRODUÇÃO ESTENDIDA

A prevalência da obesidade tem ocorrido em todo o mundo (Flegal et al., 2002), de acordo com o ministério da saúde do ano de 2006 a 2018 o índice de pessoas obesas no Brasil teve um aumento de 67,8%. Em contrapartida, o consumo de frutas e verduras teve um aumento de 15,5% nos últimos 10 anos, demonstrando um interesse da população em ter hábitos mais saudáveis (MS, 2019). A obesidade é uma doença que pode acarretar prejuízos graves à saúde (Pinheiro et al. 2004) e seu diagnóstico é feito através do índice de massa corporal total do indivíduo e a circunferência abdominal, onde é avaliada a presença de excesso de adiposidade na região abdominal (National Heart et al., 1998). Esta doença pode ser acarretada por diversos fatores, sendo eles genéticos, metabólicos, comportamentais ou ambientais (Malnick et al., 2006). O indivíduo que possui esta doença apresenta uma alteração na homeostase corporal, onde uma disparidade no balanço redox ocorre, como o excesso de peroxidação lipídica nas membranas celulares, formando diversos radicais livres (França et al., 2013). Quando ocorre um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes no corpo favorecendo a geração de radicais livres, começa o processo de estresse oxidativo (Barbosa et al., 2010). Entendem-se então, de forma mais aprofundada, as diferentes causas e consequências da obesidade porém não existe um protocolo exato para tratar a doença (North American Association for the Study of Obesity et al., 2000).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para tentar diminuir os efeitos da obesidade. Vemos como uma das estratégias mais comuns a modificação da dieta (Bray et al., 2012). Dentre essas modificações, é muito comum a adição de frutas e verduras, as quais são ricas em antioxidantes (de Almeida Melo et al., 2008). Segundo a definição de Halliwell & Gutteridge (1989) podemos considerar como antioxidantes “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada com a de um substrato oxidável

atrasa significativamente ou impede a oxidação desse substrato”. Antioxidantes na maioria dos casos não causam perda de peso, mas podem gerar certo nível de proteção contra a modificação oxidativa, fazendo deles uma boa estratégia terapêutica para a obesidade (Vincent et al., 2007). Uma espécie promissora para fins medicinais é o guaraná (*Paullinia cupana*) (Espinola, E. B., et al., 1997), porém também observam-se alguns efeitos tóxicos provavelmente devido ao elevado teor de alguns compostos secundários nesta planta (Posadzki et al., 2005). O guaraná é uma fruta rica em polifenóis e xantinas (Bittencourt Lda et al., 2014). Os polifenóis são produtos secundários do metabolismo vegetal, constituindo um grande e complexo grupo de fitoquímicos que possuem capacidade antioxidante. Essa capacidade se dá devido a suas propriedades redutoras, as quais tem intensidade variável dentre cada fitoquímico (Rice-Evans et al., 1997). Devido a grande quantidade de cafeína presente em sua semente, o guaraná é conhecido e difundido principalmente por seus efeitos estimulantes (Bittencourt Lda et al., 2014). Pela cafeína em sua composição o guaraná possui um efeito termogênico (Bortolin et al., 2019), o qual poderia ser importante no contexto da obesidade e seus efeitos sobre o corpo, como a inflamação crônica (Park et al., 2010) e aumento no estresse oxidativo (Lechuga-Sancho et al., 2018). Existem, por exemplo, estudos realizados com populações amazônicas que demonstram uma relação entre o consumo de guaraná e a diminuição de marcadores de estresse oxidativo (Krewer C da et al., 2011). Tendo em vista que a cafeína pode influenciar o comportamento aumentando o estado de alerta (Fredholm et al., 1999) acredita-se que o guaraná também poderia causar alterações comportamentais devido a cafeína presente em sua composição. Existe uma conexão entre dieta hipercalórica e comportamento, estudos recentes demonstram que tratamentos com dieta ocidental evocam efeitos ansiolíticos em camundongos (Del Rio et al., 2016). Foram encontradas relações entre obesidade e psicopatologias entre pessoas obesas que procuram tratamento (Stunkard et al., 2003),

sendo uma delas o fato de que a obesidade é um estado inflamatório visto que o ganho de peso ativa as vias inflamatórias e a inflamação, por sua vez, foi associada a transtornos comportamentais como a depressão (Luppino et al., 2010). Devido à relação entre obesidade e alterações comportamentais, uma avaliação do comportamento de animais obesos se faz necessária, visto que esses resultados são uma boa medição do bem estar animal (Foltz et al., 2007).

Outro fator que é influenciado por uma dieta rica em calorias é a microbiota intestinal (Daniel et al., 2014). Estudos pré clínicos sugerem que a microbiota intestinal modula a atividade e o comportamento do cérebro por meio de vias neuroendócrinas, neuroimunes, neurais e humorais (Cryan and Dinan, 2012; Dinan and Cryan, 2013). Ao transplantar o microbioma de um animal obeso para um animal controle, podemos ver uma alteração significativa no comportamento do mesmo, o qual demonstra comportamentos similares a ansiedade (Kelly et al., 2016). Sabe-se também, que o aumento ou diminuição de diferentes tipos de bactérias no organismo está relacionado à saúde do indivíduo (Mayer et al., 2017).

Apesar do grande consumo de produtos vegetais pela população, ainda são escassos estudos que comprovam a sua eficácia e totais efeitos sobre o organismo. Trabalhos que levem em consideração o efeito desse consumo nos parâmetros microbianos, toxicológicos e comportamentais se fazem necessários.

ANÁLISE DOS EFEITOS DO EXTRATO COMERCIAL DE GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA*) SOBRE O ESTADO REDOX E COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR OBESOS E NÃO OBESOS

**Luciana Silvana D'Amore Adam¹ | Alexandre Kleber Silveira¹ | José Cláudio Fonseca
Moreira¹**

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondência:

Luciana Silvana D'Amore Adam, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ramiro Barcelos, Porto Alegre, RS 2600, Brasil. E-mail: lucianadamore@gmail.com

Abstract

O consumo de guaraná (*Paullinia cupana*) entre a população é muito comum, ainda sendo escassos os estudos sobre o efeito do mesmo. Sua semente é rica em alcalóides e polifenóis que possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, sendo a cafeína seu principal composto. Uma dieta balanceada é de suma importância para a homeostase dos processos bioquímicos do corpo. Pessoas com um fenótipo obeso geralmente desenvolvem síndrome metabólica, que está relacionada com desbalanço redox e outras modificações no organismo. Este estudo visa analisar os efeitos da administração do extrato comercial de guaraná no balanço redox, no comportamento e na microbiota de animais saudáveis e obesos após 90 dias de tratamento. O estado redox foi avaliado por testes de grupamentos SH total, carbonil e TBARs, os testes comportamentais foram analisados com o software Anymaze e as análises de microbiota utilizando sequenciamento

do rDNA 16S. No Intestino o tratamento não foi capaz de reverter os efeitos da dieta enquanto no fígado observamos um efeito hepatoprotetor do guaraná. O tratamento com guaraná também foi capaz de modular positivamente o comportamento e alterar a microbiota dos animais.

Palavras chave:

Guaraná, cafeína, estresse oxidativo, microbiota, comportamento.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo excesso de gordura corporal acumulada, a qual pode acarretar prejuízos graves à saúde do indivíduo (Pinheiro et al. 2004). O paciente que possui esta doença apresenta uma alteração na homeostase corporal, onde uma disparidade no balanço redox ocorre, como o excesso de peroxidação lipídica nas membranas celulares, formando diversos radicais livres (França et al., 2013). Quando ocorre um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes no corpo favorecendo a geração de radicais livres, começa o processo de estresse oxidativo (Barbosa et al., 2010).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para tentar diminuir os efeitos da obesidade sobre o corpo. Uma prática muito comum é a adição de frutas e verduras ricas em antioxidantes na dieta. Os antioxidantes podem não causar perda de peso, mas sim gerar certo nível de proteção contra a modificação oxidativa de lipídios (Vincent et al., 2007). Compostos secundários são utilizados pela população com diferentes finalidades, o guaraná (*Paullinia cupana*) é conhecido e altamente difundido principalmente por seus efeitos estimulantes, os quais são atribuídos a grande quantidade de cafeína presente em sua semente (Bittencourt Lda et al., 2014). Devido à cafeína, o guaraná possui um efeito termogênico (Bortolin et al., 2019), o qual poderia ser importante no contexto da obesidade

e seus efeitos sobre o corpo, como a inflamação crônica (Park et al., 2010) e um aumento no estresse oxidativo (Lechuga-Sancho et al., 2018). Existem, por exemplo, estudos que demonstram que o consumo de guaraná está relacionado a diminuição de marcadores de estresse oxidativo em populações amazônicas (Krewer C da et al., 2011).

Tendo em vista que a cafeína pode influenciar o comportamento aumentando o estado de alerta (Fredholmet et al., 1999) acredita-se que o guaraná também poderia causar alterações comportamentais devido a cafeína presente em sua composição. Sabe-se que, por exemplo, índios da tribo Maués consumiam uma bebida a base de Guaraná quando realizavam longas caçadas (Smith e Atroch, 2010). As plantas, em geral, são conhecidas e utilizadas por diferentes povos com as mais diversas finalidades, sendo o Guaraná (*Paullinia cupana*) uma espécie promissora para fins medicinais (Espinola, E. B., et al., 1997), porém também observam-se alguns efeitos tóxicos provavelmente devido ao elevado teor de alguns compostos secundários nesta planta (Posadzki et al., 2005). Os trabalhos publicados sobre a toxicidade de extratos vegetais ainda são escassos, sendo importante analisar os efeitos destes compostos devido ao grande uso dessa planta na medicina popular.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais

As amostras biológicas utilizadas neste trabalho são oriundas de cinquenta e quatro (54) ratos machos Wistar com 90 dias de vida, provenientes do biotério do Departamento de bioquímica – UFRGS após a aprovação do projeto de número 23900 pelo CEUA. Todas as normas de bem estar em animais de laboratório e biossegurança em experimentação animal foram respeitadas, de acordo com a Sociedade Brasileira de Experimentação e Ciência em Animais de Laboratório, assim como as leis de uso e

manipulação de animais em pesquisa: A Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e a resolução de nº 879, de 15 de fevereiro de 2008.

2.2. Dieta e tratamento

Os animais foram divididos em 6 grupos, formando três tratamentos com duas dietas distintas, os quais são: Controle dieta Chow e dieta ocidental (Solução Salina), Cafeína (60mg/Kg) dieta Chow e dieta ocidental, *Paullinia cupana* (0,021g/Kg) dieta Chow e dieta ocidental.

Os animais pertencentes ao grupo de dieta Chow receberam ração comercial própria do biotério, enquanto os animais pertencentes ao grupo de dieta ocidental receberam uma ração preparada no laboratório 32 do departamento de bioquímica. Para o preparo desta ração utilizou-se um modelo que mimetiza a dieta ocidental (Bortolin, R. C. *et al.*, 2018), composta por uma grande quantidade de gordura, açúcar e sal e pobre em fibras. Todos os animais tiveram acesso à dieta correspondente ad libitum e foram mantidos em gaiolas, sendo a dieta ocidental trocada a cada 72h ocorrendo um controle dos restos de alimento deixados na caixa para verificar o consumo alimentar. O tratamento com guaraná se iniciou trinta (30) dias após o início da dieta ocidental nos grupos obesos para que fosse possível observar se o extrato seria capaz de modular de alguma maneira a microbiota intestinal após a mesma já ter sofrido um desequilíbrio devido a dieta. Após 90 dias de tratamento foi realizada a eutanásia e foram retiradas cirurgicamente e armazenadas diversas estruturas dos animais, as quais foram armazenadas a -80°C para posterior utilização.

2.3. Dieta ocidental

A ração utilizada na dieta ocidental foi composta por:

Proteína de soja - 200g	Mix Vitamínico - 10g
Banha de porco - 180g	Mix de Minerais - 40g
Amido de Milho - 170g	Mix de Aminoácidos - 8g
Açúcar Refinado - 300g	Óleo de Soja - 40g
Fibras - 25g	Água - 200mL
Sal refinado - 14,5g	

Tabela 1: Composição e quantidades presentes na dieta ocidental.

2.4. Extrato de guaraná

O extrato de sementes secas do Guaraná utilizado foi da marca LifarTM e a dose utilizada no tratamento corresponde ao consumo humano indicado pelo fornecedor, 1g de extrato diluído em água e consumido uma vez ao dia. Para esta dose foi feito o cálculo de 1g por dia para um ser humano adulto de 70kg, quantificando 0,021g/kg. O extrato foi administrado via gavagem diariamente em volume máximo de 700uL, calculando-se a dosagem de acordo com o peso individual de cada animal.

2.5. Cafeína

A dose de cafeína administrada corresponde à quantidade presente na dose do extrato de guaraná, agindo então como um controle interno do extrato.

2.6. Análises e experimentação

2.6.1. Testes comportamentais

Foram realizados testes de campo aberto (open-field test) com a finalidade de avaliar o estado de ansiedade (Prut *et al.*, 2003) e a capacidade motora dos animais. Primeiramente foi realizada uma habituação, onde os animais foram mantidos por 40

minutos na sala onde seria realizado o teste. Após este tempo os animais foram colocados, de quatro em quatro, cada um em uma caixa com 100cm de aresta onde podiam caminhar livremente enquanto eram monitorados via vídeo por 10 minutos. Foi computado, com a utilização do software Anymaze, os comportamento de grooming. Este é um modelo de teste de grau leve segundo o guia de severidade de procedimentos científicos da CEUA-UFRGS (2009).

2.6.2. Análises do balanço redox

Foram utilizados para a realização destas análises os seguintes órgãos: fígado e intestino delgado homogeneizados em tampão fosfato (PBS 50mM) e sobre tais estruturas foram realizados os seguintes testes de estresse oxidativo: Grupamentos SH total, carbonil e TBARs (Espécies reativas de ácido barbitúrico). Estas técnicas foram utilizadas para avaliar o dano oxidativo a biomoléculas a partir da quantificação de marcadores de dano oxidativo a lipídios e proteínas.

2.6.3. Grupamentos SH total (tiol reduzido)

Esta técnica foi utilizada para dosar grupamentos SH proteicos e não protéicos utilizando a reação entre os mesmos e (Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) , de acordo com Ellman, GL. (1959). Para a realização dos experimentos foi utilizada uma quantidade específica de amostra dependendo da concentração proteica das mesmas, a qual foi então combinada com 30µL de tampão forte, 10µL de DTNB 10mM e completada com PBS 10mM até atingir 200µL em cada poço de uma placa de 96 poços. Essa placa deve ser incubada por uma hora a temperatura ambiente e então lida em espectrofotômetro a 412nm.

2.6.4. Carbonil (Determinação de grupamentos carbonilados)

A quantificação de grupamentos carbonil foi baseada em uma reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH), na qual, de maneira resumida, as proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 20%, centrifugadas a 4000xg por 5 minutos e descartado o sobrenadante, de acordo com Levine RL, *et al.* (1990). O restante de amostra foi ressuscitado em 100µL de NaOH 0,2 e depois adicionados 100µL de DNPH 10mM. Após incubação e adição de 100µL de TCA 20% e centrifugação a 16.000xg por 5 minutos são realizadas 3 lavagens com etanol/acetato de etila (1:1). O material deverá então ser ressuscitado com 1mL de uréia (M pH 2,3 e centrifugados a 16.000xg por 4 minutos, para então poder ser transferido para uma placa de 69 poços. Desta forma, o conteúdo de grupamentos carbonil será determinado por sua absorvância em um espectrofotômetro a 370nm.

2.6.5. TBARS (Espécies reativas de ácido barbitúrico)

Esta técnica foi utilizada como parâmetro de lipoperoxidação. As espécies reativas foram quantificadas por uma reação ácida de aquecimento com ácido tiobarbitúrico, de acordo com Esterbauer e Chessman – *Methods in Enzimology* (1990). De maneira resumida, as amostras foram misturadas com ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugadas a 10,000xg por 10 min. O sobrenadante resultante foi pipetado em uma placa de 96 poços e misturado a 100µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Após ser pipetada também a curva que consiste em 1,1,3,3, tetrametoxipropano (TMP), água miliQ e TBA a placa é coberta com tampa de silicone, incubada em banho seco (dryblock) durante 20min a 100°C. Após a placa esfriar, o conteúdo de TBARS é determinado por sua absorvância em um espectrofotômetro a 532nm. Os resultados das absorvâncias computadas pelo espectrofotômetro após cada leitura foram então utilizados para a realização de diferentes cálculos e análises de acordo com o protocolo de cada técnica.

2.6.6. Coleta e análise de microbiota

Foi coletado e armazenado o conteúdo cecal em microtubos esterilizados após a eutanásia dos animais. Foram realizadas extrações de DNA utilizando *QIAmp DNA Stool Mini Kit* da marca QIAGEN, e o material genético proveniente da extração foi armazenado a -20°C para amplificação e posterior purificação. A amplificação foi realizada através da técnica PCR utilizando os primers oligos F515 e R806 e os fragmentos dos genes 16S provenientes do PCR foram sequenciados utilizando o sequenciador *IonPersonalGenomeMachine (PGM) System* (Life Technologies). Para a análise da microbiota foi utilizada a pipeline desenvolvida no Brazilian Microbiome Project (*Pylro et al., 2016*). Para gerar a leitura do 16S rRNA foi utilizado um sequenciamento de alto rendimento e as mesmas foram submetidas a um controle de qualidade onde as sequências com comprimento mínimo de 100 pb foram triadas, removendo bases de baixa qualidade. Disso obtivemos sequências replicadas lidas e classificadas por ordem decrescente e depois filtradas para excluir singletons usando USEARCH v7.0.1090 (Edgar, 2013). Para realizar a atribuição taxonômica foi utilizado o software QIIME v1.7 (Edgar, 2013) e os dados taxonômicos foram alcançados a partir do algoritmo de classificação usando o 97% de GreenGenes OTUs Versão 13.8 (Desantis *et al.*, 2006). Para poder realizar as análises de agrupamentos filogenéticos e a contribuição de cada gênero foi utilizado o software R Studio Versão 1.0.153.

3. Discussão e resultados

3.1. Análises do balanço redox

3.1.1. Intestino delgado: TBARs

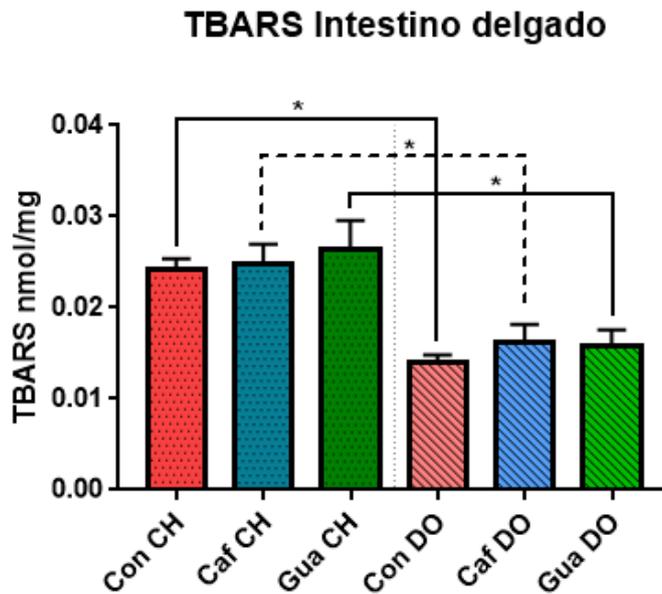


Figura 1: Análise de dano oxidativo do intestino delgado. CH: Dieta chow; DO: Dieta ocidental; Com: Controle; Caf: Cafeína; Gua: Guaraná.

O tratamento não surtiu efeito sobre os grupos de diferentes dietas, porém, observa-se uma diferença significativa entre os grupos da dieta controle e ocidental. Mesmo estando a obesidade atrelada ao aumento do estresse oxidativo no organismo em diversos estudos (Savini et al., 2013), os grupos obesos, neste órgão, apresentaram menor estresse oxidativo do que os animais não obesos. Isso pode ser explicado, em parte, pelo fato dos resultados da análise de TBARs estarem atrelados a um indicativo de nível de funcionamento metabólico da amostra, além do estado redox. Animais com fenótipo obeso podem apresentar um metabolismo mais lento no intestino, o que pode acarretar em um menor estresse oxidativo em comparação aos animais controle, pelo fato da obesidade acabar ocasionando uma menor atividade mitocondrial e conseqüentemente menos reações de oxirredução do que em animais não obesos.

Questões fisiológicas do órgão também corroboram com essa hipótese, visto que o intestino delgado tem função de absorção de nutrientes, que serão encaminhados para

serem metabolizados no fígado. Sendo assim, as gorduras e açúcares ingeridos em excesso pelo animal por não serem metabolizados por este órgão, somadas a um fenótipo obeso e um metabolismo possivelmente mais lento, acabariam não acarretando um dano tão alto quanto o observado em animais não obesos. Nas quantidades utilizadas neste estudo, o guaraná e a cafeína não apresentaram efeito.

3.1.2. Intestino delgado: Sulfidril

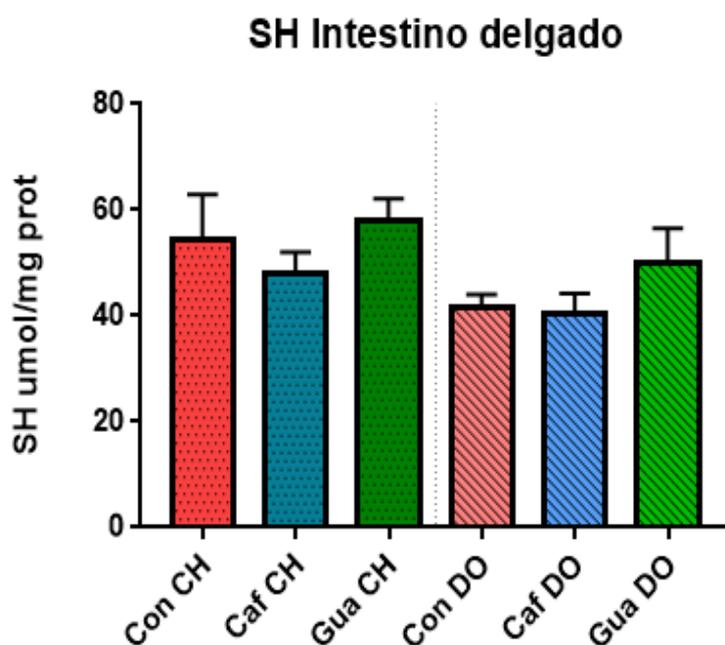


Figura 2: Análise de dano oxidativo do intestino delgado. SH: sulfidril; CH: Dieta chow; DO: Dieta ocidental; Com: Controle; Caf: Cafeína; Gua: Guaraná;

Nas quantidades utilizadas neste estudo não foram observados resultados significativos na análise de sulfidril realizadas no intestino delgado dos animais, independente da dieta consumida ou do tratamento ao qual foram submetidos.

3.1.3. Intestino delgado: Carbonil

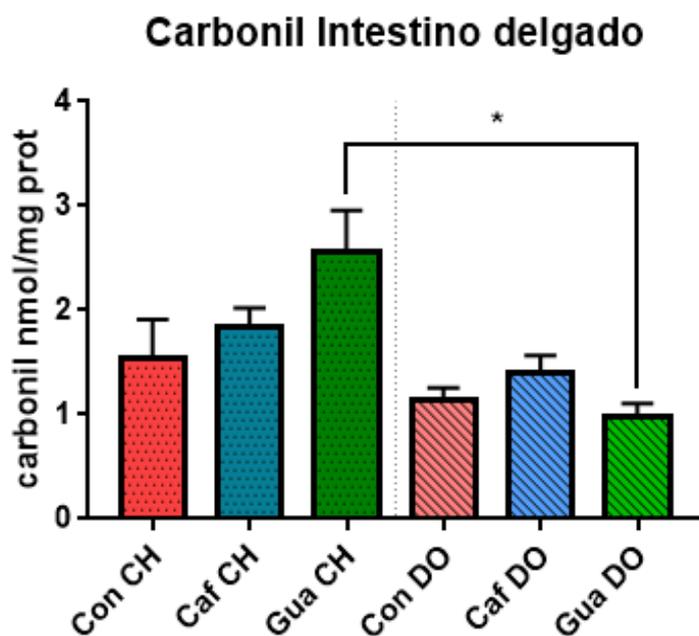


Figura 3: Análise de dano oxidativo do intestino delgado. CH: Dieta chow; DO: Dieta ocidental; Com: Controle; Caf: Cafeína; Gua: Guaraná;

Observa-se uma diferença significativa entre as diferentes dietas ocasionada pela suplementação contínua com guaraná. Entretanto, mesmo não havendo uma diferença significativa entre os outros parâmetros analisados, podemos ver uma tendência nos resultados, onde, assim como nas outras análises realizadas no intestino delgado, o grupo obeso aparenta apresentar um índice menor de oxidação proteica, ou seja, havendo maior dano em proteínas nos animais não obesos tratados com guaraná do que nos obesos. Em geral o guaraná aparenta desempenhar um efeito de proteção em relação à oxidação proteica quando utilizado em conjunto com a dieta ocidental. Mais estudos seriam necessários para entender melhor tais resultados.

3.1.4. Fígado: TBARS

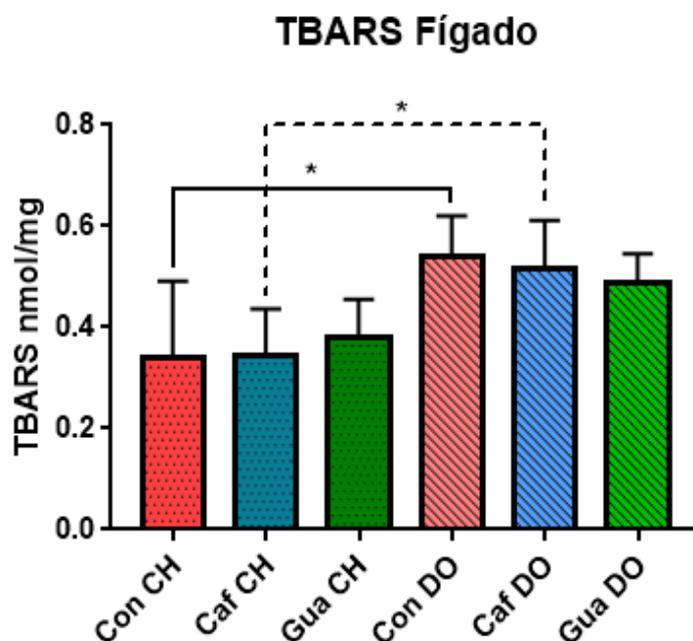


Figura 4: Análise de dano oxidativo do fígado. CH: Dieta chow; DO: Dieta ocidental; Com: Controle; Caf: Cafeína; Gua: Guaraná;

Nesta análise podemos observar resultados significativos demonstrando diferenças no nível de estresse oxidativo entre todos os grupos, com exceção dos grupos tratados com guaraná. Este resultado poderia indicar um efeito protetivo do guaraná sobre a oxidação relacionado aos outros componentes do guaraná que não a cafeína, visto que a mesma não obteve tais resultados. Podemos observar o efeito da dieta sobre o balanço redox do órgão, onde os animais obesos apresentam maior estresse oxidativo. Este resultado inverso aos resultados encontrados no intestino delgado pode ser explicado também por questões fisiológicas. Devido ao sistema porta hepático o fígado será o órgão responsável por metabolizar toxinas, macro e micronutrientes (Arias et al., 2011). Sendo assim, a obesidade causada pela dieta ocidental levará a sobrecarga do fígado, um acúmulo de ácidos graxos sobrecarregando as células e causando uma maior produção de espécies reativas. Esse aumento de espécies reativas gera estresse oxidativo. Este resultado é observado também

em animais tratados com outras dietas hiperlipídicas, nos quais se é observado um aumento nos peroxissomos do fígado (Ishii et al., 1989), os quais também irão gerar espécies reativas em excesso.

3.1.5. Fígado: Sufidril

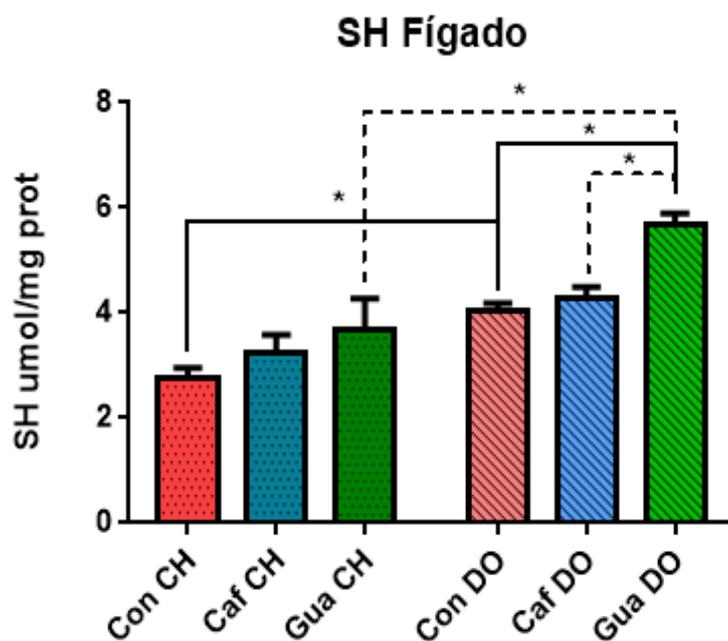


Figura 5: Análise de dano oxidativo do fígado. SH: sulfidril; CH: Dieta chow; DO: Dieta ocidental; Com: Controle; Caf: Cafeína; Gua: Guaraná; Prot: proteínas

Nesta análise vemos um menor estresse oxidativo nos animais submetidos a dieta ocidental quando comparados com os animais submetidos a dieta controle. Os animais controle da dieta chow e controle da dieta ocidental apresentam diferenças significativas, onde os animais do grupo Con DO apresentam menor estresse oxidativo. Podemos observar também uma diferença entre os grupos tratados com guaraná dentro das diferentes dietas, onde os animais obesos tratados com guaraná apresentam um menor estresse oxidativo do que aqueles da dieta controle, demonstrando um efeito de proteção do guaraná sobre o

balanço redox. Este resultado está ligado aos componentes exclusivos presentes no guaraná, visto que se observa uma diferença entre os grupos Caf DO e Gua DO, excluindo a ideia de que esse resultado poderia ser causado pela cafeína presente no guaraná. Ainda nesta análise podemos observar que os animais controle e os animais submetidos ao tratamento com guaraná dentro da mesma dieta (dieta ocidental) apresentam diferenças, onde os animais tratados com guaraná apresentam menor estresse oxidativo, sugerindo um efeito de proteção do guaraná, sendo esta comparação não significativa entre o controle e os animais tratados com cafeína que receberam a dieta ocidental.

3.1.6. Fígado: Carbonil

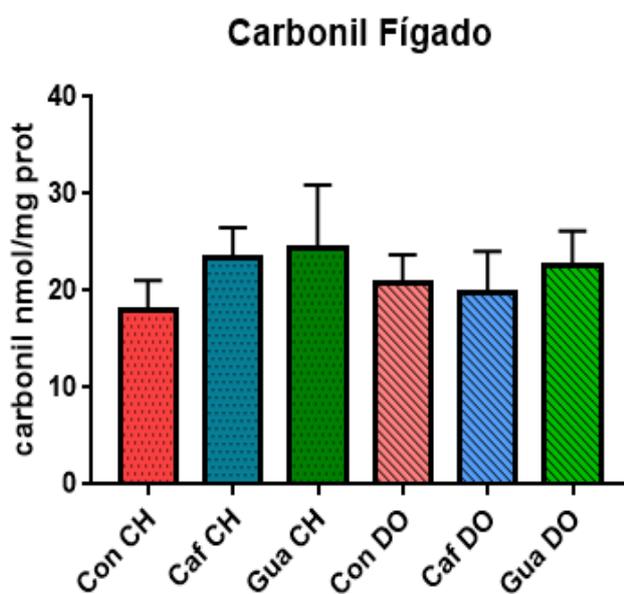


Figura 6: Análise de dano oxidativo do fígado. CH: Dieta chow; DO: Dieta ocidental; Com: Controle; Caf: Cafeína; Gua: Guaraná;

Nas quantidades de extrato utilizadas neste estudo não foram observados resultados significativos nas análises de carbonil realizadas no fígado dos animais.

3.2. Escore Z

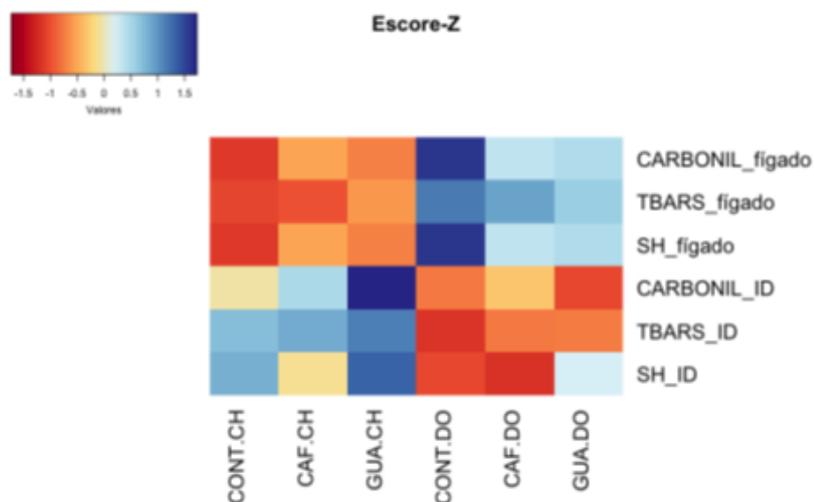


Figura 7: Heat map. ID: Intestino Delgado

O escore-Z possibilita comparar resultados de escalas diferentes ao criar uma escala relativa entre as análises. O mapa demonstra conjuntamente as tendências inversas das análises de estresse oxidativo entre fígado e intestino, mostrando que os órgãos respondem de maneira diferente à dieta, onde observamos uma tendência a maior estresse oxidativo no fígado (representado pela cor azul) e uma tendência a um menor estresse oxidativo no intestino delgado (representado pela cor laranja). Este resultado, como já citado anteriormente nas análises de balanço redox se dá devido às funções fisiológicas de cada órgão, onde temos o intestino delgado realizando funções de absorção de nutrientes sendo afetado de maneira diferente pela dieta ou tratamentos. Em contrapartida o fígado, devido a sua função de metabolização de nutrientes, paga o preço pela dieta rica em gordura e açúcares, apresentando um estresse oxidativo maior.

3.3. Análises comportamentais

3.3.1. Grooming

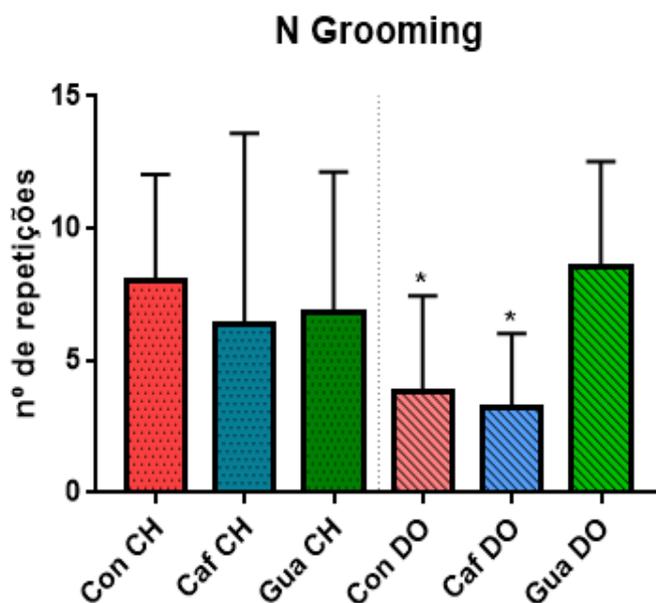


Figura 8: Análise comportamental grooming (campo aberto). CH: Dieta chow; DO: Dieta ocidental; Com: Controle; Caf: Caféina; Gua: Guaraná;

Grooming é um comportamento inato realizado por alguns roedores e está envolvido na manutenção da higiene e em outros processos fisiologicamente importantes, incluindo termorregulação e comunicação social (Denmark et al., 2010). Este comportamento está intimamente relacionado com sensações de bem estar e relaxamento destes animais. Animais que sofrem de transtornos comportamentais tendem a realizar este comportamento com menos frequência ou de maneira exacerbada (Kalueff et al., 2004). Estudos demonstram que a obesidade e tais transtornos, como por exemplo ansiedade e depressão, não necessariamente conduzem um ao outro, mas em diversos casos estão relacionados (Stunkard et al., 2003; Luppino et al., 2010).

Nesta análise observa-se um aumento deste comportamento nos animais obesos tratados com guaraná quando relacionados aos outros dois grupos tratados com a dieta

ocidental. Podemos também observar que os valores do grupo Gua DO assemelham-se aos do grupo controle CH o que indica um efeito positivo do guaraná em cima do déficit comportamental que a dieta tem sobre os animais. Visto que apenas os animais tratados com guaraná retornaram ao controle de comportamento, pode-se observar que esse efeito não se deve a quantidade de cafeína presente na mesma, mas sim dos outros compostos presentes no guaraná. Mais estudos precisam ser realizados sobre a ligação entre guaraná e os efeitos antidepressivos ou ansiolíticos que o mesmo aparenta desempenhar sobre animais obesos.

3.4. Análises de microbiota

3.4.1. Enterobacteriaceae

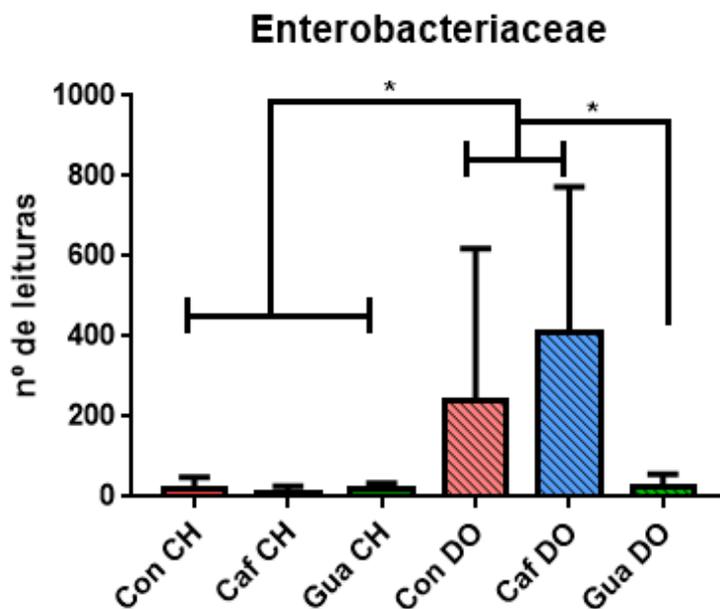


Figura 9: Análise de microbiota. CH: Dieta chow; DO: Dieta ocidental; Com: Controle; Caf: Cafeína; Gua: Guaraná.

Enterobacteriaceae é uma família onde podemos encontrar diversos tipos de bactérias relacionadas a situações patogênicas, como por exemplo, *Escherichia coli*,

Salmonella sp., Edwardsiella tarda, entre outras (Oliveira et al., 2015). Visto que diversos estudos corroboram a ideia de que a microbiota está intimamente ligada a alterações na atividade neural e comportamento (Cryan et al., 2012; Dinan et al., 2013), é de grande interesse traçar um paralelo entre as análises comportamentais e de microbiota dos animais. Nesta análise podemos ver que os animais submetidos a dieta ocidental apresentam um padrão contrário àqueles que receberam a dieta controle, onde os animais obesos tratados com guaraná, assim como na análise comportamental, demonstram ter retornado seus níveis de leituras aos padrões do controle. Novamente o guaraná aparenta possuir um efeito protetivo, desta vez relacionado a diminuição desta família de bactérias quando comparados aos outros grupos que receberam a dieta ocidental.

3.4.2. Lactobacillaceae

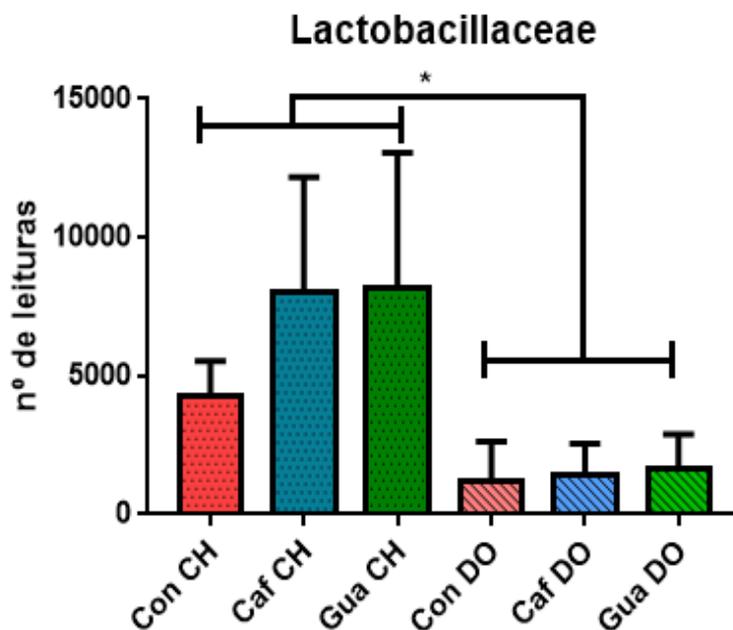


Figura 10: Análise de microbiota. CH: Dieta chow; DO: Dieta ocidental; Com: Controle; Caf: Cafeína; Gua: Guaraná;

Ao contrário da família citada anteriormente, Lactobacillaceae é uma família associada a saúde e bem estar, na qual podemos encontrar algumas espécies (ex: *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus gasseri*) que demonstram ter a capacidade de diminuir a adiposidade em casos de obesidade (Fåk et al., 2012; Kadooka et al., 2010). Esta família também está relacionada ao bom funcionamento gastrointestinal (Benno et al., 1996). Podemos verificar uma diferença significativa da presença destas bactérias entre os grupos que receberam a dieta controle e ocidental, onde os animais obesos apresentam uma presença menor desta família do que os animais controle,. Entretanto, ao contrário da família Enterobacteriaceae, não se observam diferenças significativas entre os animais tratados com guaraná e cafeína e os animais controle, demonstrando que neste caso e nestas dosagens os dois tratamentos não foram capazes de reverter o efeito da dieta.

4. Conclusão

Nossos resultados sugerem que a dieta ocidental causa disbiose e altera o balanço redox dos órgãos digestivos. O tratamento com extrato de guaraná ou a cafeína não foram capazes de reverter a adipogênese e o ganho de peso. O guaraná entretanto apresentou efeitos positivos, atenuando o estresse oxidativo no fígado, modulando o comportamento e a microbiota dos animais obesos. As alterações na microbiota e comportamento estão associadas ao bem estar dos animais, porém mais estudos se fazem necessários para podermos avaliar os mecanismos de efeito do guaraná.

REFERÊNCIAS

Arias, I. M., Wolkoff, A. W., Boyer, J. L., Shafritz, D. A., Fausto, N., Alter, H. J., & Cohen, D. E. (Eds.). (2011). *The liver: biology and pathobiology*. John Wiley & Sons.

Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*.

Benno, Y., He, F., Hosoda, M., Hashimoto, H., KOJIMA, T. U., Yamazaki, K., ... & Salminen, S. (1996). Effects of Lactobacillus GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. *Nutrition Today*, 31(6), 12S.

Bittencourt, L. D. S., Zeidán-Chuliá, F., Yatsu, F. K. J., Schnorr, C. E., Moresco, K. S., Kolling, E. A., ... & Moreira, J. C. F. (2014). Guarana (Paullinia cupana Mart.) prevents β -amyloid aggregation, generation of advanced glycation-end products (AGEs), and acrolein-induced cytotoxicity on human neuronal-like cells. *Phytotherapy research*, 28(11), 1615-1624.

Bortolin, R. C., Vargas, A. R., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Schnorr, C. E., Martinello, K. B., ... & Moreira, J. C. F. (2018). A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *International Journal of Obesity*, 42(3), 525.

Bortolin, R. C., Vargas, A. R., de Miranda Ramos, V., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Schnorr, C. E., ... & Grunwald, M. S. (2019). Guarana supplementation attenuated obesity, insulin resistance, and adipokines dysregulation induced by a standardized human Western diet via brown adipose tissue activation. *Phytotherapy Research*, 33(5), 1394-1403.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Brasileiros atingem maior índice de obesidade nos últimos treze anos**. Brasília, DF, 2000.

Bray, G. A. (2012). 4 Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity. *Obesity: Prevention and Treatment*, 47.

Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews neuroscience*, 13(10), 701.

da Costa Krewer, C., Ribeiro, E. E., Ribeiro, E. A. M., Moresco, R. N., de Ugalde Marques da Rocha, M. I., dos Santos Montagner, G. F. F., ... & da Cruz, I. B. M. (2011). Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population. *Phytotherapy research*, 25(9), 1367-1374.

Daniel, H., Gholami, A. M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., ... & Böhm, C. (2014). High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *The ISME journal*, 8(2), 295.

de Almeida Melo, E., Maciel, M. I. S., de Lima, V. L. A. G., & do Nascimento, R. J. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(2), 193-201.

Del Rio, D., Morales, L., Ruiz-Gayo, M., & Del Olmo, N. (2016). Effect of high-fat diets on mood and learning performance in adolescent mice. *Behavioural brain research*, 311, 167-172.

Denmark, A., Tien, D., Wong, K., Chung, A., Cachat, J., Goodspeed, J., ... & Bartels, B. (2010). The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behavioural brain research*, 208(2), 553-559.

Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression?. *Neurogastroenterology & Motility*, 25(9), 713-719.

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.

Espinola, E. B., Dias, R. F., Mattei, R., & Carlini, E. A. (1997). Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *Journal of ethnopharmacology*, 55(3), 223-229.

Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 407-421). Academic Press.

Fåk, F., & Bäckhed, F. (2012). *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in *ApoE*^{-/-} mice. *PloS one*, 7(10), e46837.

França, B. K., Alves, M. R. M., Souto, F. M. S., Tiziane, L., Boaventura, R. F., Guimarães, A., & Alves Jr, A. (2013). Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *GE jornal português de gastroenterologia*, 20(5), 199-206.

Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L., & Johnson, C. L. (2002). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *Jama*, 288(14), 1723-1727.

Foltz, C., Carbone, L., DeLong, D., Rollin, B. E., Van Loo, P., Whitaker, J., & Wolff, A. (2007). Considerations for determining optimal mouse caging density. *Lab Animal*, 36(10), 40.

Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., & Zwartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews*, *51*(1), 83-133.

Ishii, H., Fukumori, N., Horie, S., & Suga, T. (1980). Effects of fat content in the diet on hepatic peroxisomes of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, *617*(1), 1-11.

Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., ... & Tsuchida, T. (2010). Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *European journal of clinical nutrition*, *64*(6), 636-643.

Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, *13*(3), 151-158.

Kelly, J. R., Borre, Y., O'Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., ... & Hoban, A. E. (2016). Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of psychiatric research*, *82*, 109-118.

Lechuga-Sancho, A. M., Gallego-Andujar, D., Ruiz-Ocaña, P., Visiedo, F. M., Saez-Benito, A., Schwarz, M., ... & Mateos, R. M. (2018). Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. *PloS one*, *13*(1), e0191547.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., ... & Stadtman, E. R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 464-478). Academic Press.

Luppino, F. S., de Wit, L. M., Bouvy, P. F., Stijnen, T., Cuijpers, P., Penninx, B. W., & Zitman, F. G. (2010). Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Archives of general psychiatry*, 67(3), 220-229.

Malnick, S. D., & Knobler, H. (2006). The medical complications of obesity. *Journal of the Association of Physicians*, 99(9), 565-579.

Mayer, E. A., & Hsiao, E. Y. (2017). The gut and its microbiome as related to central nervous system functioning and psychological wellbeing: Introduction to the Special Issue of Psychosomatic Medicine. *Psychosomatic medicine*, 79(8), 844.

Miranda, M. V., & Metzner, B. S. (2010). Paullinia cupana: revisão da matéria médica. *Revista de Homeopatia*, 73(1/2), 1-17.

National Heart, Lung, Blood Institute, National Institute of Diabetes, Digestive, & Kidney Diseases (US). (1998). *Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report* (No. 98). National Heart, Lung, and Blood Institute.

North American Association for the Study of Obesity, National Heart, Lung, Blood Institute, & NHLBI Obesity Education Initiative. (2000). *The practical guide: identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults*. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, NHLBI Obesity Education Initiative, North American Association for the Study of Obesity.

Oliveira, M. A., Takamura, A. E., Arias Vigoya, A. A., & Araújo, F. E. (2015). Enterobacteriaceae: bactérias intestinais de organismos aquáticos, um risco à saúde pública revisão de literatura. *R. cient. eletr. Med. Vet.*, 1-20.

Park, E. J., Lee, J. H., Yu, G. Y., He, G., Ali, S. R., Holzer, R. G., ... & Karin, M. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, *140*(2), 197-208.

Pinheiro, A. R. D. O., Freitas, S. F. T. D., & Corso, A. C. T. (2004). Uma abordagem epidemiológica da obesidade.

Posadzki, P., Watson, L. K., & Ernst, E. (2013). Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews. *Clinical medicine*, *13*(1), 7-12.

Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, *463*(1-3), 3-33.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, *2*(4), 152-159.

Savini, I., Catani, M. V., Evangelista, D., Gasperi, V., & Avigliano, L. (2013). Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *International journal of molecular sciences*, *14*(5), 10497-10538.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, *82*(2), 291-295.

Sies, H. (2000). What is oxidative stress?. In *Oxidative stress and vascular disease* (pp. 1-8). Springer, Boston, MA.

Silveira, A. K. (2018). Alterações na microbiota intestinal de ratos Wistar obesos e não-obesos através da administração do extrato comercial de guaraná (*Paullinia cupana*).

Smith, N., & Atroch, A. L. (2010). Guaraná's journey from regional tonic to aphrodisiac and global energy drink. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 7(3), 279-282.

Stunkard, A. J., Faith, M. S., & Allison, K. C. (2003). Depression and obesity. *Biological psychiatry*, 54(3), 330-337.

Vincent, H. K., Innes, K. E., & Vincent, K. R. (2007). Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, obesity and metabolism*, 9(6), 813-839.