

PERFIL FARMACOCINÉTICO DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS MAJORITÁRIOS E METABÓLITOS EM PLASMA E URINA DE HUMANOS APÓS INGESTÃO DE CAFÉ

Mariana C. MONTEIRO¹; Adriana FARAH¹, E-mail: afarah@iq.ufrj.br; Daniel PERRONE¹; Luiz Carlos TRUGO¹; Carmen M. DONANGELO¹

¹ Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Resumo:

Apesar das propriedades farmacológicas dos ácidos clorogênicos relatadas na literatura, pouco se sabe sobre sua biodisponibilidade em humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de distribuição dos principais isômeros de ácidos clorogênicos e seus metabólitos em plasma e urina de humanos, após a ingestão de café. Três isômeros dos ácidos cafeoilquínicos e três isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos foram identificados no plasma de todos os indivíduos do estudo após a ingestão de café, enquanto os ácidos feruloilquínicos foram identificados em apenas um indivíduo. Os principais metabólitos dos ácidos clorogênicos identificados na urina foram os ácidos: isoferúlico, gálico, dihidrocaféico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, *p*-cumárico, sinápico, caféico e ferúlico. Uma grande variação inter-individual do perfil farmacocinético foi observada no plasma e na urina dos indivíduos. Nossos resultados demonstram que os principais isômeros dos ácidos clorogênicos do café são biodisponíveis em humanos.

Palavras-chave: biodisponibilidade de ácidos clorogênicos, café, compostos fenólicos do café.

PHARMACOKINETIC PROFILE OF MAJOR CHLOROGENIC ACIDS AND METABOLITES IN HUMAN PLASMA AND URINE AFTER COFFEE CONSUMPTION.

Abstract:

Despite the potential pharmacological properties of chlorogenic acids reported in the literature, little is known about their bioavailability in humans. The goal of the present study was to evaluate the pharmacokinetic profile of the major chlorogenic acid isomers and their metabolites in human plasma and urine, after oral coffee administration. Three caffeoylquinic acid isomers and three dicaffeoylquinic acid isomers were identified in the plasma of all six volunteers after coffee consumption, while two feruloylquinic acids were identified in only one volunteer. There was a large interindividual variability in the pharmacokinetic profile of all compounds identified in plasma and urine. The main chlorogenic acids metabolites identified in urine were: isoferulic, gallic, dihydrocaffeic, *p*-hydroxybenzoic, vanillic, *p*-coumaric, sinapic, caffeic and ferulic acids. Our results show that the major chlorogenic acid isomers from coffee are bioavailable in humans.

Key words: chlorogenic acids bioavailability, coffee, phenolic compounds of coffee.

Introdução

Os ácidos clorogênicos (CGA) são um conjunto de compostos fenólicos formados pela esterificação de certos ácidos cinâmicos, como os ácidos caféico (CA), ferúlico (FA) e *p*-cumárico (*p*-CoA) com o ácido quínico. Os principais subgrupos de CGA no café são os ácidos cafeoilquínicos (CQA), feruloilquínicos (FQA) e dicafeoilquínicos (diCQA), com pelo menos três isômeros por grupo. Esses compostos têm recebido especial atenção nos últimos anos devido às propriedades farmacológicas observadas *in vitro* e *in vivo*, como as propriedades hipoglicemiante e antioxidante (Moreira et al., 2005; Shearer et al., 2003). No entanto, pouco se sabe a respeito da biodisponibilidade em humanos do principal isômero dos CGA, o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), e menos ainda sobre outros isômeros deste grupo, devido à inexistência de padrões comerciais. O ácido caféico, primeiro metabólito do CQA e diCQA, já foi identificado em plasma e urina de ratos e humanos, especialmente sob formas conjugadas (Azuma et al., 2000; Cremin et al., 2001; Rechner et al., 2001; Nardini et al., 2002; Olthof et al., 2003; Wittemer et al., 2005). A presença de formas livres e conjugadas de 5-CQA em plasma de ratos já foi reportada após administração intraperitoneal de 5-CQA (Azuma et al., 2000). Lafay et al., 2006 identificaram a presença de 5-CQA e CA em plasma de ratos 1,5h após o consumo de uma dieta suplementada com 5-CQA. Recentemente, Farah et al., 2004 identificaram 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA e outros cinamatos em fluidos digestivos após 12 horas de jejum noturno, indicando sua circulação no organismo. Até o presente momento, nenhum isômero de CQA, FQA ou diCQA foi identificado em plasma humano.

Material e Métodos

Uma infusão de café preparada com café Robusta descafeinado submetido a torra média clara contendo 3,6 mmol de CGA foi oferecida a seis indivíduos adultos. Amostras de sangue foram coletadas após jejum noturno de 10 horas (basal) e 0,5; 1; 1,5; 2; 3 e 4 horas após a ingestão do café. As amostras de plasma foram desproteinizadas, tratadas com β -

glicuronidase, extraídas com solução metanólica, clarificadas e analisadas por HPLC e LC-MS de fase reversa. Amostras de urina foram coletadas antes e nos intervalos de 0-2 horas e de 2-4 horas após a ingestão do café, clarificadas e analisadas por HPLC e LC-MS de fase reversa. A identificação dos picos foi feita por LC-MS e padrões (Trugo e Macrae, 1984; Farah et al., 2006). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Statistica® (versão 7, USA), utilizando teste t não pareado para amostras independentes. As razões molares dos isômeros, calculadas no plasma através da área abaixo da curva (AUC) dos isômeros de CGA e na bebida pelo conteúdo de isômeros de CGA, foram comparadas. Diferenças cujo $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados e Discussão

Caracterização da bebida oferecida aos indivíduos

Oito isômeros de CGA (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 4-FQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA) foram identificados e quantificados na bebida de café, sendo os CQA majoritários (86%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Teor dos principais isômeros de CGA identificados na bebida de café oferecida aos indivíduos do estudo*.

Composto	Teor ($\mu\text{mol}/200\text{ml}$ bebida)
3-CQA	903
4-CQA	1055
5-CQA	1117
4+5-FQA	239
3,4-diCQA	82
3,5-diCQA	75
4,5-diCQA	91
Total CGA	3562

*Análises realizadas em triplicatas, com coeficiente de variação < 4%.

Amostras de plasma

Nenhum CGA ou CA foi detectado no plasma antes da ingestão do café. Após a ingestão do café, dentre os 8 isômeros de CGA identificados na bebida, 6 CGA majoritários (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA) foram identificados nas amostras de plasma de todos os indivíduos. Em apenas um dos indivíduos foi possível identificar também o 4-FQA e o 5-FQA (Figura 1).

Uma grande variabilidade inter-individual foi observada na cinética de absorção de todos os isômeros de CGA identificados no plasma (Figura 2). Diferenças individuais na absorção e metabolismo do 5-CQA, CA e outros compostos fenólicos já haviam sido previamente relatadas na literatura (Farah et al., 2004; Rechner et al., 2004). A concentração plasmática máxima (C_{max}) média de CGA foi observada 2,25 h após a administração oral do café (Tabela 2). O ácido caféico – precursor e metabólito imediato do CQA e diCQA – também foi detectado e quantificado no plasma de todos os indivíduos após a administração oral do café, com C_{max} média 1,4 h após a ingestão do café (Tabela 2).

A presença de formas livres e conjugadas de 5-CQA em plasma de rato após a administração intraperitoneal de 5-CQA já foi reportada na literatura (Azuma et al., 2000). Formas conjugadas do CA já foram identificadas em plasma de ratos e humanos (Cremin et al., 2001; Nardini et al., 2002; Rechner et al., 2001; Olthof et al., 2003; Wittemer et al., 2005; Azuma et al., 2000). Os isômeros 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA foram recentemente identificados em fluidos digestivos humanos (Farah et al., 2004). A presença de 5-CQA e outros isômeros de CGA do café em plasma de humanos ainda não foi descrita na literatura.

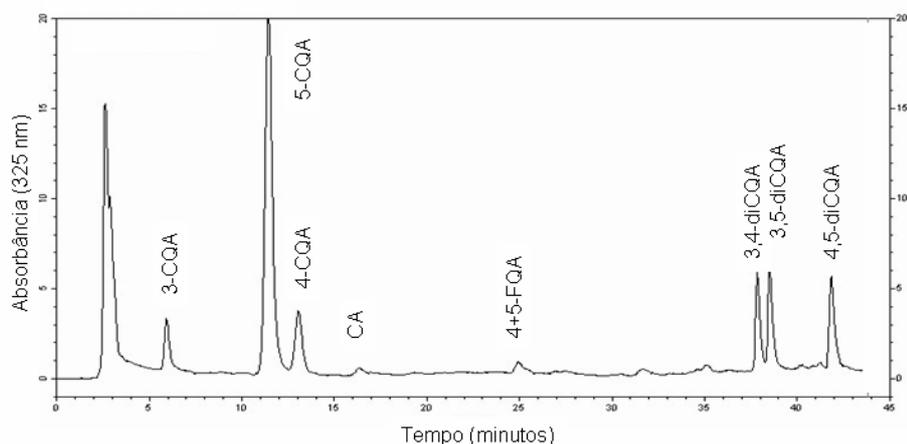
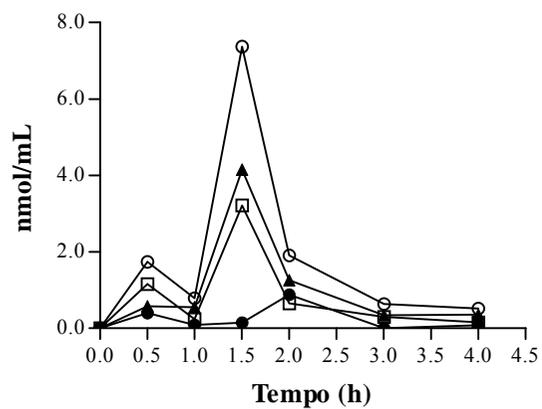
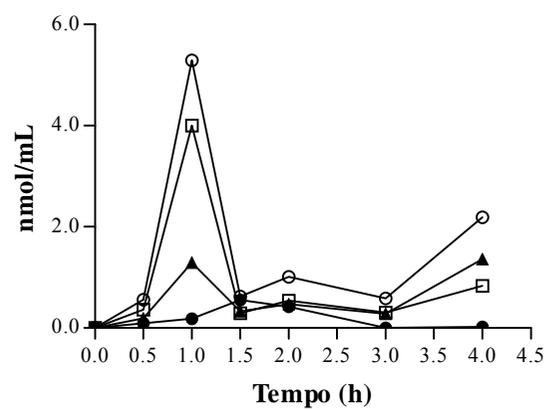


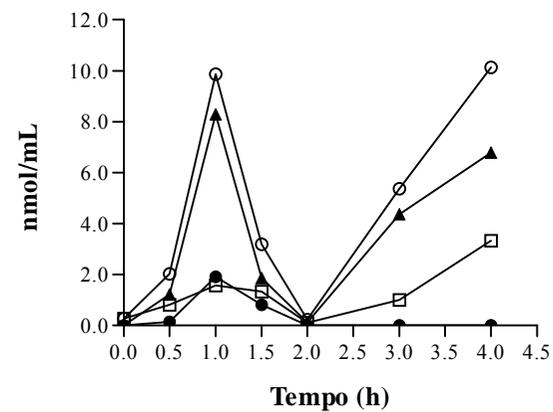
Figura 1 – Cromatograma típico de plasma obtido 1 hora após a ingestão de café.



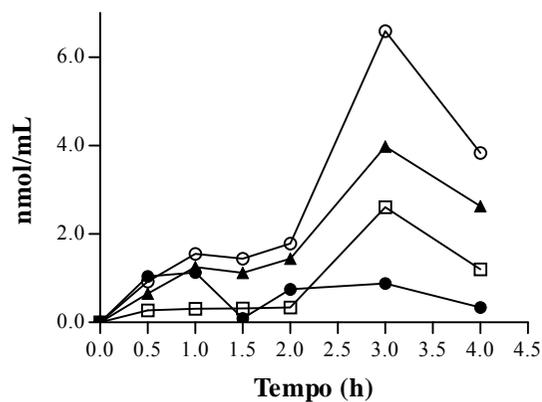
Indivíduo 1



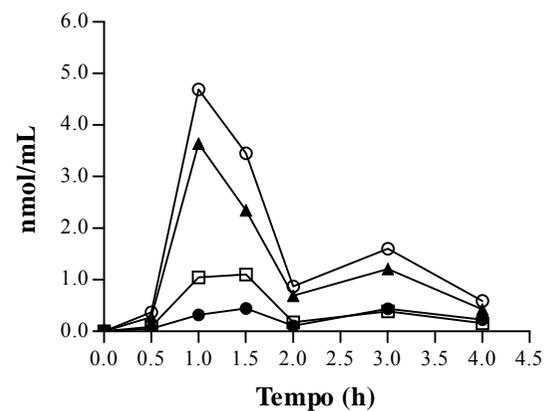
Indivíduo 2



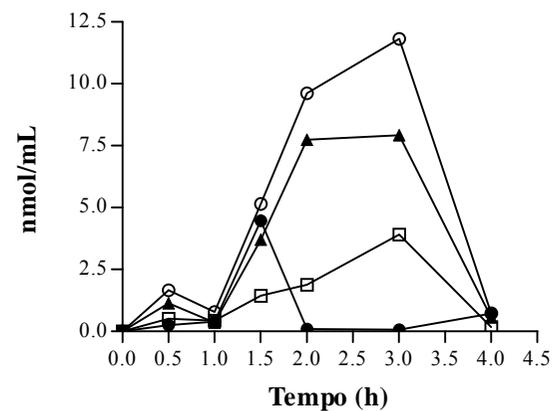
Indivíduo 3



Indivíduo 4



Indivíduo 5



Indivíduo 6

Figura 2 – Perfil farmacocinético do total de CGA (—○—), CQA (—▲—) e diCQA (—□—) e CA (—●—) em amostras de plasma após a ingestão de café.

Tabela 2 – T_{max} , C_{max} e AUC dos isômeros de CGA e CA identificados no plasma após a ingestão de café*.

Composto	T_{max} (h)	C_{max} (nmol/mL)	AUC (nmol/mL.h)
3-CQA	1,75 ± 0,99	1,00 ± 0,75	1,65 ± 0,96
4-CQA	2,08 ± 1,20	1,04 ± 0,68	1,85 ± 1,24
5-CQA	2,33 ± 1,17	3,14 ± 1,64	8,10 ± 5,05
3,4-diCQA	2,25 ± 1,25	0,92 ± 0,32	1,75 ± 0,58
3,5-diCQA	2,33 ± 1,17	1,17 ± 0,95	1,85 ± 0,83
4,5-diCQA	2,33 ± 1,17	1,11 ± 0,36	2,04 ± 0,67
Total CQA	1,75 ± 0,99	5,00 ± 2,53	11,48 ± 7,12
Total diCQA	2,33 ± 1,17	3,63 ± 1,28	5,63 ± 1,83
Total CGA	2,25 ± 1,25	8,00 ± 2,50	17,11 ± 8,41
CA	1,42 ± 0,38	1,56 ± 1,52	2,81 ± 1,75

C_{max} – Concentração plasmática máxima; T_{max} – Tempo correspondente ao C_{max} ; AUC – Área abaixo da curva.

* Média dos 6 indivíduos.

A média da razão molar CQA:diCQA foi cerca de seis vezes maior na bebida de café do que no plasma, sugerindo diferentes mecanismos de absorção e/ou metabolização desses compostos, onde os diCQA teriam sua absorção favorecida em relação aos CQA ou que a captação tecidual dos CQA após absorção pode ser favorecida em relação aos diCQA.

Da mesma forma, as razões molares 5-CQA:3-CQA e 5-CQA:4-CQA foram cerca de quatro vezes maior no plasma do que na bebida, sugerindo uma maior absorção do 5-CQA comprada à dos isômeros 3-CQA e 4-CQA ou então que os isômeros 3-CQA e 4-CQA sejam rapidamente metabolizados e/ou captados pelo fígado e/ou outros órgãos comparado ao 5-CQA.

Amostras de urina

O único isômero de CGA identificado na urina após a ingestão do café foi o 5-CQA, o CGA majoritário no café. Os metabólitos dos CGA identificados na urina após a ingestão do café foram os ácidos: isoferúlico, gálico, dihidrocafeico, ρ -hidroxibenzóico, vanílico, ρ -cumárico, sinapico, caféico e ferúlico. O ácido gálico foi o composto fenólico com maior incremento após a ingestão do café na urina de todos os indivíduos, seguido pelo dihidrocafeico. Em média, o ácido gálico e o dihidrocafeico somados, representaram cerca de 56% do total de fenólicos identificados na urina após a ingestão de café. Todos esses compostos fenólicos identificados na urina após a ingestão do café já haviam sido previamente identificados como metabólitos urinários do 5-CQA, outros cinamatos ou café em humanos (Rechner et al., 2001; Olthof et al., 2003; Hodgson et al., 2004; Ito et al., 2005).

Conclusões

As respostas plasmáticas e urinárias observadas após a ingestão da bebida de café indicam que os ácidos clorogênicos do café são absorvidos e metabolizados no organismo humano, havendo uma grande diferença entre os perfis farmacocinéticos plasmáticos e urinários dos indivíduos estudados.

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

- Moreira, D.P.; Monteiro, M.C.; Ribeiro-Alves, M.R.; Donangelo, C.M.; Trugo, L.C. (2005) Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1399-402.
- Azuma, K.; Ippoushi, K.; Nakayama, M.; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J. (2000) Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:5496-500.
- 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.
- Rechner, A.R.; Spencer, J.P.E.; Kuhnle, G.; Harn, U.; Rice-Evans, C.A. (2001) Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Biological Medicine*, 30:1213-22.
- 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.

- 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.
- Wittemer, S.M.; Ploch, M.; Windeck, T.; Muller, S.C.; Drewelow, B.; Derendorf, H.; Veit, M. (2005) Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans. *Phytomedicine*, 12:28-38.
- Lafay, S.; Gil-Izquierdo, A.; Manach, C.; Morand, C.; Besson, C.; Scalbert, A. (2006) Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *Journal of Nutrition*, 136:1192-7.
- Hodgson, J.M.; Chan, S.Y.; Puddey, I.B.; Devine, A.; Wattanapenpaiboon, N.; Wahlqvist, M.L.; Lukito, W.; Burke, V.; Ward, N.C.; Prince, R.L.; Croft, K.D. (2004) Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea- and coffee-derived polyphenol exposure in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 91:301-5.
- Ito, H.; Gonthier, M.P.; Manach, C.; Morand, C.; Mennen, L.; Rémésy, C.; Scalbert, A. (2005) Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *British Journal of Nutrition*, 94:500-9.
- Shearer, J.; Farah, A.; De Paulis, T.; Bracy, D.P.; Pencek, R.R.; Graham, T.E.; Wasserman, D. H. (2003) Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. *Journal of Nutrition*, 133(11): 529-32, 2003.
- Booth, A.N.; Emerson, O.H.; Jones, F.T.; Deeds, F. (1957) Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 229:51-9.
- Trugo, L.C.; Macrae, R. (1984) Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst*. 109:263-6.
- Farah, A.; De Paulis, T.; Trugo, L.C.; Martin, P.R. (2006) Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:374-81.
- Farah A. Distribuição nos grãos, importância na qualidade da bebida e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos do café. Ph.D. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, 2004.
- Rechner, A. R.; Smith, M. A.; Kuhnle, G.; Gibson, G. R.; Debnam, E. S.; Srai, S. K.; Moore, K. P.; Rice-Evans, C. A. (2004) Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biologic Medicine*, 36(2): 212-25.