

Avaliação da atividade inibidora de urease de chás comercializados em sachês

Evaluation of the urease inhibitory activity of tea commercialized in sachets

RESUMO

Guilherme Augusto Basconi Scandelai
gui_1397@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Adriano Lopes Romero
adrianoromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Rafaelle Bonzanini Romero
rbromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

A bactéria *Helicobacter pylori* é capaz de colonizar a mucosa gástrica causando infecção, sendo a urease produzida por ela responsável pelo mecanismo de sobrevivência. Com centenas de tipos e sendo amplamente consumido no mundo, os chás são referidos como um recurso a mais no tratamento de doenças. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inibidora de urease de chás comercializados em sachês. Para isso, as infusões preparadas foram submetidas a testes *in vitro* para determinação da amônia produzida no meio reacional por ação da enzima urease. Três dos oito chás avaliados - chás Preto, Verde e Mate - obtiveram os maiores valores de porcentagem de inibição enzimática: 91,68; 84,75; 83,32, respectivamente. Esses chás, obtidos das folhas das plantas *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis*, inibiram a enzima urease de forma mais eficiente do que o padrão tiourea, sugerindo que eles são potenciais inibidores da enzima produzida por *Helicobacter pylori*, podendo contribuir para o controle ou erradicação dessa bactéria.

PALAVRAS-CHAVE: Inibição enzimática. *Helicobacter pylori*. Produtos naturais.

ABSTRACT

Helicobacter pylori bacteria are able to colonize the gastric mucosa causing infection, and the urease produced by it is responsible for the survival mechanism. With hundreds of types and being widely consumed in the world, teas are referred to as an additional resource in the treatment of diseases. Therefore, the present study aimed to evaluate the urease inhibitory activity of tea commercialized in sachets. For this, the prepared infusions were subjected to *in vitro* tests to determine the ammonia produced in the reactional medium by the action of the enzyme urease. Three of the eight teas evaluated - Black, Green and Mate teas - had the highest values of percentage of enzyme inhibition: 91.68; 84.75; 83.32, respectively. These teas, obtained from the leaves of the plants *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis*, inhibited the urease enzyme more efficiently than the thiourea, suggesting that they are potential inhibitors of the enzyme produced by *Helicobacter pylori*, and may contribute to the control or eradication of this bacterium.

KEYWORDS: Enzymatic inhibition. *Helicobacter pylori*. Natural products.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Buscando uma maior expectativa de vida, a sociedade tem se tornado cada vez mais saudável, procurando mudar sua rotina, dieta e padrão de vida. Uma das vertentes que tem ganhado força na dieta moderna é a ingestão de alimentos funcionais que são apresentados como alimentos comuns numa dieta convencional (MORAES, 2006).

Alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, com a capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra diversas doenças (CÂNDIDO; CAMPOS, 2005).

O chá, uma das bebidas mais consumidas no mundo, é consumido principalmente nos países Asiáticos, onde seu significado vai além de uma simples bebida, pois se torna um ritual de grande importância social e cultural. Há aproximadamente um século essa bebida chegava ao Brasil pelas mãos dos imigrantes chineses, os quais introduziram os segredos do plantio, queima, manipulação e padronização (ROHMER, 2002).

Com centenas de tipos e sendo considerado um recurso a mais no tratamento de doenças, os chás são referidos na literatura como uma das melhores fontes de compostos fenólicos. São ricos em catequinas, flavonoides que apresentam propriedades biológicas como atividade antioxidante e sequestradoras de radicais livres. Os chás ingeridos na forma de infusão contribuem para a extração desses compostos fenólicos, considerados benéficos à saúde (HIGDON; FREI, 2003; MANDEL; YODIM, 2004).

Há indícios de que alguns chás podem contribuir para o combate de doenças causadas por *Helicobacter pylori*, uma bactéria Gram-negativa que coloniza a mucosa gástrica causando infecção. Essa bactéria é capaz de se fixar ao estômago e elevar o pH local, sendo a urease produzida por ela a responsável por esta fixação. Isso faz com que a urease seja considerada o atributo biológico mais importante dessa bactéria, uma vez que sem essa enzima ela não conseguiria colonizar a mucosa gástrica (SILVA, 2015).

Neste sentido, a busca por substâncias com potencialidade de inibição de urease pode contribuir para o desenvolvimento de fármacos para combater a *Helicobacter pylori*. Sabe-se que muitos mecanismos de ação de fármacos são baseados em inibição enzimática reversível ou irreversível. Na inibição reversível ocorre interações não-covalentes entre o inibidor e a enzima, enquanto na inibição irreversível envolve modificações na estrutura da enzima, levando a uma inativação definitiva (VOET et al., 2014).

Alguns estudos, tais como os reportados, indicam que a urease da soja é similar a produzida pela bactéria *Helicobacter pylori*, o que permite o uso da primeira em testes *in vitro* de inibição enzimática para estudo de substâncias com potencial de combater a bactéria *Helicobacter pylori*.

Uma das formas de estudar a inibição da enzima urease é quantificar a amônia, produzida no meio reacional, utilizando a reação de Berthelot modificada, que envolve a reação de fenol-hipoclorito catalisada por nitroprussiato de sódio. Nessa reação, a amônia reage com o fenol e o hipoclorito para formar uma

substância de coloração azul (indofenol, com absorvância em λ 630 nm), cuja intensidade é proporcional à concentração de amônia.

Diante do exposto, e levando em consideração o aumento do consumo de alimentos funcionais numa dieta convencional, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inibidora de urease de chás comercializados em sachês.

METODOLOGIA

Utilizou-se oito tipos de chás, adquiridos em um supermercado na cidade de Campo Mourão, Paraná: (i) chás Preto (*Camellia sinensis*), Erva Doce (*Pimpinella anisum*), Verde (*Camellia sinensis*) e Hortelã (*Mentha spicata*) da marca Dr. Oetker; (ii) chás de Boldo (*Peumus boldus*), Camomila (*Matricaria chamomilla*) e Capim Cidreira (*Melissa officinalis*) da marca Chá Prenda; (iii) chá Mate (*Ilex paraguariensis*) da marca Matte Leão.

Para o preparo dos chás utilizou-se 240 mL previamente aquecida até próximo ao ponto de ebulição. Após o aquecimento, os sachês foram mantidos em infusão por 5 minutos. Após o tempo indicado, o sachê foi retirado da solução, onde foi reservado até atingir a temperatura ambiente.

Para a obtenção do extrato enriquecido em urease, 10 gramas de soja (adquirida em mercado local em Campo Mourão, Paraná) foram trituradas em um liquidificador com 100 mL de água destilada por 5 minutos. Após a trituração, o extrato foi filtrado em papel filtro e diluído em um fator de 500, sendo esse o extrato final obtido para as análises.

A determinação da atividade inibidora da urease seguiu o procedimento *in vitro* proposto por Weatherburn (1967). O reagente A foi preparado dissolvendo 2,5 gramas de fenol e 12,5 mg de nitroprussiato de sódio em água destilada (q.s.p. 250 mL). O reagente B foi preparado dissolvendo 1,25 gramas de hidróxido de sódio e 1,05 mL de hipoclorito de sódio (10%) em água destilada (q.s.p. 250 mL).

Em tubos de ensaio foram colocados 200 μ L de solução urease e 200 μ L dos chás, sendo mantido em banho-maria à 37 °C por 20 minutos. Após o contato, foi adicionado 200 μ L de ureia 6 g/L, sendo mantido por mais 20 minutos em banho-maria. Após o tempo indicado, foram adicionados 1000 μ L do reagente A e 1000 μ L do reagente B, sendo novamente mantido por mais 20 minutos em banho-maria. Para o controle, foi adicionado 200 μ L de água destilada ao invés dos chás, sendo repetido todos os procedimentos acima. O padrão de inibição utilizado foi a tiourea (200 ppm). Ao término dos procedimentos, foi realizada leituras em um espectrofotômetro UV-Vis (PG Instruments, modelo T70+) no comprimento de onda de 630 nm. Os valores de absorção foram convertidos em porcentagem de inibição de urease, utilizando a equação 1:

$$I(\%) = 100 - \left[\left(\frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) * 100 \right] \quad (1)$$

na qual:

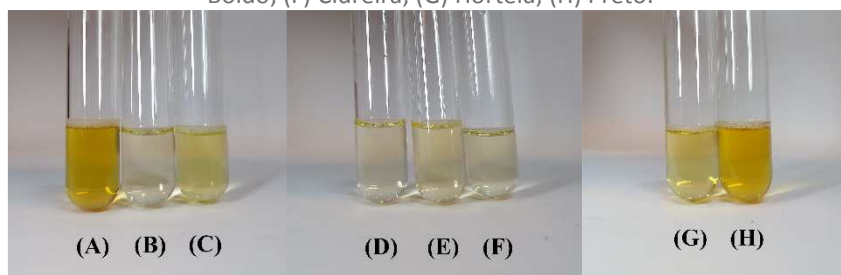
A_{amostra} : Valor da absorção apresentado no teste com o chá;

A_{controle} : Valor da absorção apresentado no teste com o controle.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1 pode-se observar os aspectos visuais dos chás preparados a partir da metodologia descrita, mostrando a diferença de cor entre eles.

Figura 1 - Aspectos visuais dos chás: (A) Mate; (B) Erva Doce; (C) Verde; (D) Camomila; (E) Boldo; (F) Cidreira; (G) Hortelã; (H) Preto.

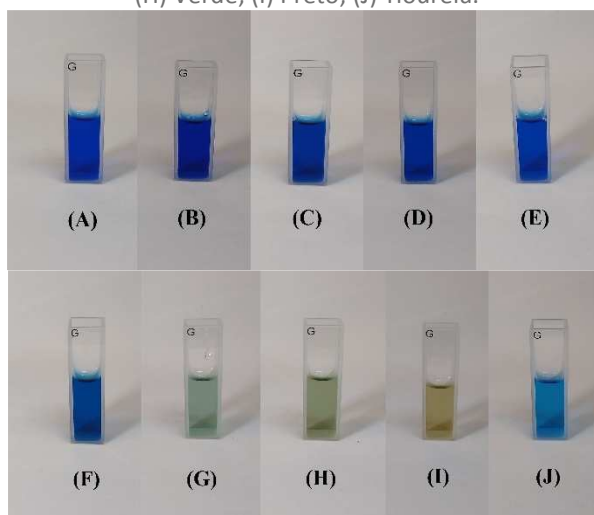


Fonte: Autoria Própria (2020).

É possível observar uma cor mais acentuada nos chás Mate e Preto, característicos de sua composição. Já os chás de Cidreira e Verde apresentaram uma cor um pouco menos intensa em relação ao Mate e o Preto, porém apresentou uma cor um pouco mais intensa que os demais chás, que não mostraram grandes diferenças entre si.

Na Figura 2 estão apresentados os aspectos visuais obtidos nos testes de inibição de urease com os oito chás avaliados no presente trabalho.

Figura 2 - Aspectos visuais observados nos testes de inibição da urease utilizando chás: (A) Controle; (B) Erva Doce; (C) Hortelã; (D) Cidreira; (E) Camomila; (F) Boldo; (G) Mate; (H) Verde; (I) Preto; (J) Tioureia.



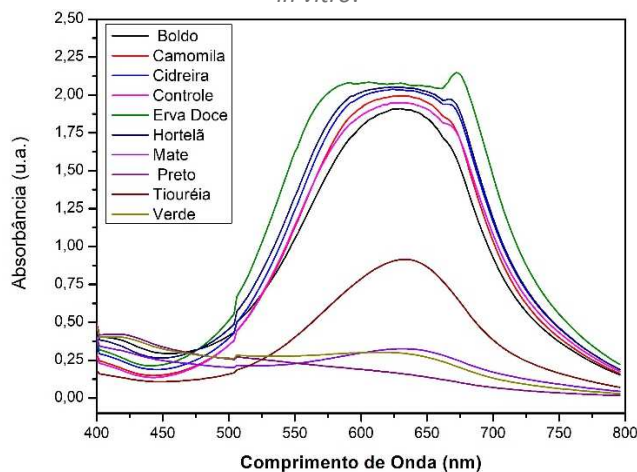
Fonte: Autoria Própria (2020).

A Figura 2 mostra que a maioria dos chás, ao serem submetidos ao teste de inibição urease, desenvolveram coloração azul, indicando que não houve inibição da urease. Os chás Mate, Verde e Preto não desenvolveram a coloração azul característica do indofenol, indicando que são potenciais inibidores de urease.

A Figura 3 apresenta os espectros de absorção obtidos após a realização dos testes *in vitro*. Pode-se observar que, para a maioria dos chás os espectros de absorção possuem um perfil espectral semelhante ao controle. Para os chás Mate,

Verde e Preto observa-se que a absorção na região de 630 nm é inferior ao observado para a tioureia, concordando com a observação visual relatada anteriormente.

Figura 3 - Espectros de absorção, na região do ultravioleta-visível, obtidos após os testes *in vitro*.



Fonte: Autoria Própria (2020).

Os valores de absorbância, no comprimento de onda de 630 nm, foram convertidos, utilizando a equação 1, em porcentagem de inibição de urease (Tabela 1).

Tabela 1 – Absorbância e porcentagem inibitória de urease dos chás avaliados.

Amostras	Absorbância em 630 nm	I (%)
<i>Pimpinella anisum</i>	2,078	-
<i>Mentha spicata</i>	2,051	-
<i>Melissa officinalis</i>	2,033	-
<i>Matricaria chamomilla</i>	1,994	-
<i>Peumus boldus</i>	1,909	2,00
Padrão (Tioureia)	0,914	53,08
<i>Ilex paraguariensis</i>	0,325	83,32
<i>Camellia sinensis</i>	0,297	84,75
<i>Camellia sinensis</i>	0,162	91,68

Fonte: Autoria Própria (2020).

Os percentuais de inibição de urease obtidos para os chás Mate (*Ilex paraguariensis*), Verde e Preto (*Camellia sinensis*), que são maiores do que o observado para a tioureia, indicam que estes chás possuem substâncias químicas, capazes de inibir a enzima, em quantidade maior do que no teste com tioureia ou de forma mais eficiente do que esta substância.

Os resultados observados no presente trabalho são, na sequência, comparados aos dados disponíveis na literatura.

Uma investigação antibacteriana *in vitro* realizada contra *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni* mostrou que o óleo essencial de *Pimpinella anisum* é ineficaz contra ambas as bactérias (CWIKLA et al., 2010).

Um estudo avaliou a suscetibilidade *in vitro* de 15 cepas de *H. pylori* a diferentes extratos vegetais, dentre eles, o extrato metanólico das folhas de *Mentha spicata*. O extrato de hortelã obteve uma fraca inibição, apresentando concentração mediana inibitória variando de 25 a 100 µg/mL (MAHADY et al., 2005).

Os estudos descritos anteriormente indicam que *Pimpinella anisum* e *Mentha spicata* são, assim como observado no presente trabalho, ineficazes para a inibição da urease.

Em uma investigação *in vitro* observou-se que o óleo essencial de *M. officinalis* possui atividade anti-*H. pylori*. No entanto, a atividade observada foi dependente não apenas da composição do óleo essencial, mas também das propriedades da cepa. Contendo predominantemente óxido de geranial (25,1%), neral (19,4%) e óxido de cariofileno (10,6%), *M. officinalis* inibiu o crescimento de duas cepas de *H. pylori* a partir da concentração de 4 µL/mL (KNEZEVIC et al., 2018).

Outra planta que apresenta alto efeito inibitório sobre a urease é a Camomila. Em um estudo *in vitro* utilizando o óleo essencial dessa planta observou-se inibição do crescimento de *H. pylori* em concentrações muito baixas (< 0,0075%). Os MIC₅₀ e MIC₉₀ relatados do extrato de óleo de *Matricaria chamomilla* para *H. pylori* foram 62,5 mg/mL e 125,0 mg/mL, respectivamente. É possível que os compostos ácidos graxos, cumarinas, terpenos, espiroéteres e flavonóides sejam responsáveis por estas alterações (WESELER et al., 2005).

Segundo Pastene et al. (2014), o extrato aquoso de *Peumus boldus* tem uma potente propriedade anti-*H.pylori* ao inibir a atividade da urease e sua adesão às células gástricas humanas. Em seu estudo, usando uma abordagem guiada por ensaios *in vitro* e *in vivo*, considerou que tais atividades estão associadas à presença de procianidinas oligoméricas. Esses compostos inibem a urease de *H. pylori* de uma maneira dependente da concentração, sendo uma inibição competitiva e reversível. Curiosamente, a inibição também resultou na dependência do flavan-3-ol que forma essas procianidinas.

Apesar de *M. officinalis* e *M. chamomilla* terem resultados positivos descritos na literatura para inibição de urease, no presente estudo encontrou-se uma fraca inibição para os chás dessas ervas. Esse fato pode estar relacionado ao método de extração, uma vez que a partir dos métodos de destilação obtêm-se substâncias com caráter apolar, enquanto a infusão ou maceração com água, por exemplo, produz extratos aquosos contendo, majoritariamente, substâncias com caráter polar. Além da possibilidade de ter compostos diferentes em ambas extrações, a concentração deles também pode ser diferente, podendo fazer com que o composto ativo que iniba a urease não esteja presente no extrato aquoso ou que ele esteja presente em uma pequena quantidade.

Já em relação ao *Peumus boldus*, o autor descreve uma metodologia e uma extração parecida com a utilizada neste artigo. Apesar da incoerência de resultados, a fraca inibição encontrada neste estudo pode ser explicada pela diversidade de métodos de crescimento, colheita, beneficiamento, clima e tipos de solo, o que muda em relação as marcas usadas e a localidade do plantio.

Cogo et al. (2010) investigou a atividade antibacteriana de extrato etanólico de *Ilex paraguariensis* frente a onze isolados clínicos de *H. pylori*. O teste *in vitro* mostrou uma inibição potente, MIC₅₀ < 0,625 mg/mL e MIC₉₀ de 2,5 mg/mL. É possível que os produtos secundários como compostos fenólicos, triterpenos e flavonóides sejam responsáveis por essa inibição.

O resultado obtido corrobora com o descrito na literatura, uma vez que o chá Mate obteve um dos maiores valores de inibição avaliados no presente trabalho.

Matsubara et al. (2003) verificou a inibição da urease a partir de *Camelia sinensis* (chá verde e chá preto). Em um estudo *in vitro* realizado com a *H. pylori*, o extrato metanólico do chá verde alcançou a maior inibição entre os 77 alimentos estudados, tendo um IC₅₀ = 13 µg/mL. Já o valor correspondente para o extrato metanólico do chá preto foi um IC₅₀ = 56 µg/mL. As catequinas dos chás verde e preto foram consideradas as substâncias responsáveis pela inibição observada, sendo as principais: galato de epigalocatequina, galato de galocatequina, galocatequina e epigalocatequina.

Apesar de serem produzidos a partir da mesma planta, os dois chás (Verde e Preto) resultaram em valores de inibição diferentes. Tal fato pode estar relacionado a diversidade de métodos de crescimento, colheita e beneficiamento utilizados para obtenção dos chás. A ordem relativa de inibição enzimática, diferente da observada na literatura, pode ser atribuída ao solvente de extração utilizado, assim como as particularidades da fonte vegetal utilizada para produção dos chás, que apesar de ser da mesma espécie produz metabólitos secundários ligeiramente diferentes ou em concentrações diferentes.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível constar que três tipos de chás (Mate, Verde e Preto), obtidos a partir da infusão de sachês comerciais, inibiram a atividade da enzima urease, de forma mais eficiente do que o padrão tioureia. Estes resultados sugerem que os chás obtidos das folhas das plantas *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis* são potenciais inibidores da enzima urease produzidos por *Helicobacter pylori*, podendo contribuir para o controle ou erradicação dessa bactéria.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação Araucária pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. **Boletim da Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA)**, v. 29, n. 2, p. 193-203, 2005.

COGO, L. L. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 304-309, 2010.

CWIKLA, C. et al. Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 24, n. 5, p. 649-656, 2010.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 89-143, 2003.

KNEZEVIC, P. et al. A colorimetric broth microdilution method for assessment of *Helicobacter pylori* sensitivity to antimicrobial agents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 152, p. 271-278, 2018.

MAHADY, G. B. et al. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 11, p. 988-991, 2005.

MANDEL, S.; YODIM, M. B. H. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 304-317, 2004.

MATSUBARA, S. et al. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, n. 3, p. 715-719, 2003.

MORAES, F. P. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

PASTENE, E. et al. Catechin-based procyanidins from *Peumus boldus* Mol. aqueous extract inhibit *Helicobacter pylori* urease and adherence to adenocarcinoma gastric cells. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 11, p. 1637-1645, 2014.

ROHMER, F. **O livro do chá**. São Paulo: Aquariana, 2002.

SILVA, D. A. **Screening de produtos naturais com potencialidade para tratamento de doenças ocasionadas por *Helicobacter pylori*: um estudo *in vitro* e *in silico***. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.

WESELER, A. et al. A novel colorimetric broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 7, p. 498-502, 2005.