

INGESTÃO DE CAFEINA COMO AGENTE BIOPROTETOR EM RELAÇÃO AOS DANOS CAUSADOS PELA AFLATOXINA B1 EM RATOS WISTAR

Priscilla Silva Abreu² Patrícia F.P.Goulart³, Roseane M.E. Oliveira⁴, Carlos J. Pimenta⁵, Tatiana Abreu Reis², Ademir F. Alves⁶, Taíse A.C.Licas⁷

1-Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

2- Graduação - Nutrição (Inic. Científica/PIBIC/CNPq) - Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS

3- Professora Dra. - Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS - patriciagoulart@unilavras.edu.br

4-Mestre em Ciência dos Alimentos /UFLA /Bolsista/CBP&D/Café - roseaneevangelista@hotmail.com

5 -Professor Adjunto – Departamento de Ciência dos Alimentos – UFLA- carlos_pimenta@ufla.br

6- Biólogo - Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS

7 -Graduação (Inic. científica) - Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS - taiselicas@hotmail.com

RESUMO: Aflatoxinas são metabólitos secundários sintetizados por fungos, principalmente *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Tais toxinas são responsáveis por graves intoxicações e tem se mostrado carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas a diversas espécies animais, inclusive o homem. O efeito inibitório da cafeína sobre o crescimento do fungo *A. parasiticus* e síntese de aflatoxina B1 e B2, já foi constatado em estudos recentes. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar mediante testes “in vivo” em ratos Wistar, o efeito bioprotetor da ingestão da cafeína sobre a toxicidade da Aflatoxina B, além de testar e validar metodologias relacionadas a diferentes formas de administrar a micotoxina. Os testes foram realizados com ratos Wistar recém desmamados, separados em grupos de quatro animais, acondicionados em gaiolas metabólicas. Durante quinze dias antes do experimento, os animais tiveram acesso à dieta padrão e água potável *ad libitum*. Após este período foram separados em grupos de três animais para compor os oito tratamentos. O experimento teve duração de 60 dias, sendo os tratamentos aplicados com ração comercial suplementada com diferentes doses de cafeína. A aflatoxina B1 (100 µL), foi ministrada aos animais, por via oral, inoculada na dieta em 5g de leite em pó e 2mL de água, correspondendo à dosagem de 50 ng/kg de peso corpóreo/dia respectivamente. A cafeína foi adicionada à dieta nas dosagens de 0%, 1%, 1,5% e 2%, perfazendo os oito tratamentos (T) (T1, T2, T3 T4 T5 T6 T7 E T8). Durante seis semanas os animais foram alimentados com ração suplementada com cafeína e a partir da sétima semana os grupos T5; T6; T7; T8 passaram a consumir também aflatoxina. Os animais foram pesados diariamente. No final do experimento, coletou-se urina e sangue dos animais para realização das análises clínicas de: creatinina e uréia através da urina e as amostras do sangue (soro) foram utilizadas para determinar a atividade das transaminases hepáticas, aspartato aminotransferase (TGO) e alanina aminotransferase (TGP), gama-glutamyl transferase animal (GGT). Todos animais foram sacrificados e autopsiados no final do experimento e avaliados os desenvolvimentos dos danos causados aos rins, coração, pulmão e fígado através de lâminas histológicas. Os dados percentuais obtidos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As concentrações de TGP, uréia (U) e creatinina(U) dos animais que consumiram OTA confirma a toxicidade da micotoxina em relação ao sistema renal. As lâminas histopatológicas, comprovam, que a aflatoxina causou danos aos rins. A cafeína na dosagem de 2% foi capaz de controlar a ação da micotoxina.

Palavras-chave: Café, Micotoxinas, análises clínicas

INGESTION OF CAFFEINE AS AGENT QUIMIOPROTETOR REGARDS DAMAGE BY AFLATOXIN B1 IN WISTAR RATS

ABSTRACT: Aflatoxins are secondary metabolites synthesized by fungi, particularly *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. These toxins are responsible for severe problems and have been carcinogenic, mutagenic and teratogenic to different animal species, including humans. The inhibitory effect of caffeine, was verified on the growth of the fungus *A. parasiticus* and synthesis of aflatoxin B1 and B2. This study aimed to evaluate through testing “in vivo” in wistar rats, the quimioprotector effect, about the intake of caffeine on the toxicity of aflatoxin B, in addition to test and validate methodologies relating to different way of administering the mycotoxin. The tests were conducted with newly weaned rats, separated into groups of four animals, placed in metabolic cages. During fifteen days before the experiment, the animals had access to standard diet and water *ad libitum*. After this period were separated into groups of three animals to produce eight treatments. The experiment lasted for 60 days and the treatment were supplemented with different caffeine doses. Aflatoxin B1 (100 µL), was given orally, to animals, injected at 5g in the diet mixed with milk powder and 2 mL of water, corresponding to the dosage of 50 ng/kg of body weight/ day respectively. Caffeine was added to the diet at doses of 0%, 1%, 1,5% and 2%, for the eight treatments (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 and T8). For six weeks the animals were fed diet supplemented with caffeine and from the seventh week the groups T5, T6, T7, T8 also have started to consume aflatoxin. Animals were weight daily, at the end of the experiment, urine was collected and blood of animals to perform the clinical analysis of: creatinine and urea in the urine and blood samples (serum) were used to determine the activity of hepatic transaminases, aspartate amino transferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transferase animal (GGT). All animals were sacrificed and autopsied at the end of experiment. The

developments of damage to the kidneys, heart, lung and liver were verified, through histological slides. The percentage data were compared by Tukey at 5% probability. The concentrations of ALT, urea (U) and creatinine of the animals that have confirmed the toxicity of OTA mycotoxin in the renal system. The histopathological slides, show that aflatoxin caused damage to the kidneys. Caffeine in doses of 2% was able to control the action of the mycotoxin.

Key words: Coffee, Mycotoxin, Clinical Analysis

INTRODUÇÃO

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência. Embora 17 compostos, todos designados aflatoxinas, tenham sido isolados, aflatoxina é um termo coletivo usado para designar um grupo de micotoxinas: aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2). Os mesmos são metabólitos heterocíclicos altamente oxigenados derivados da difurano cumarina. Os principais fungos produtores de aflatoxinas são *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, conhecidos como aflatoxigênicos desde o início da década de 60. As aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 são as mais estudadas. A AFB1 é conhecida como a mais potente micotoxina produzida e um dos mais tóxicos carcinógenos conhecidos, podendo ser encontrada em concentrações significativas nos diferentes ingredientes de rações animais como farelo de amendoim, algodão e milho. É considerada de grande importância em saúde pública e animal (Jung *et al.*, 2000).

As aflatoxinas são letais quando consumidas em altas doses; entretanto, exposições subletais podem induzir a toxicidade crônica e resultar em neoplasia em muitas espécies animais. A carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxicidade crônica dessas substâncias. Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, como pulmões, rins, cólon, pâncreas e intestino, têm sido observado em animais alimentados com rações contendo aflatoxinas (Busby & Wogan, 1984; Coulombe, 1991).

No entanto, deve-se considerar que o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de metabólitos tóxicos depende entre outros fatores, da composição química do substrato. Dessa forma, levantamentos efetuados sobre amostras de café quanto à presença de micotoxinas (aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina A, citrinina e patulina) demonstram que a frequência de contaminação é extremamente baixa e quando a toxina é encontrada, o nível de contaminação é baixo (Levi & Bocker, 1968; Levi, 1980; Batista, 2000; 2005).

Os resultados obtidos por Chalfoun *et al.* (2000), justificam a inexistência do problema de aflatoxinas e os baixos níveis de OTA detectados em café, confirmando ser estes grãos substrato quimicamente adverso ao desenvolvimento dos fungos *A. ochraceus* e *A. parasiticus* potencialmente produtores dessas micotoxinas. Confirmou-se a ação inibitória parcial (dose dependente) da cafeína sobre o desenvolvimento micelial e esporulação do fungo *Aspergillus ochraceus*. A síntese de OTA foi inibida totalmente nas concentrações a 1,5% e 2,0% e muito reduzidas nas concentrações de 0,5% e 0,8% de cafeína. A cafeína inibiu totalmente o crescimento micelial e esporulação do fungo *Aspergillus parasiticus* potencialmente produtor de aflatoxinas.

Batista (2005), detectou baixos níveis de ocratoxina A em café e não detectou aflatoxinas como indicadores de que vários componentes químicos do café são, definitivamente, potenciais inibidores do desenvolvimento e esporulação dos fungos e síntese de micotoxinas. A cafeína é encontrada em uma variedade de alimentos e bebidas consumidos cotidianamente como: folhas de chá, grãos de café, chocolate, grãos de cacau e nozes de cola, refrigerantes e, sendo acrescidos frequentemente a bebidas efervescentes e formulações farmacêuticas, não tendo qualquer valor nutricional para o organismo humano, restringindo-se apenas aos seus efeitos estimulantes. (Powers & Howley, 2000; McCardle *et al.*, 1998).

Muitas pesquisas têm demonstrado que a cafeína, um dos constituintes do café, provoca várias respostas celulares e farmacológicas num largo espectro de sistemas biológicos. Além da cafeína, o café contém uma série de outras substâncias, como polímeros fenólicos, ácidos clorogênicos, lipídeos, terpenos que possuem diferentes efeitos biológicos, como ação antioxidante, antimutagênica, antibiótica, antihipercolesterolemica e antihipertensiva, (Sakamoto *et al.*, 2001).

O modo de ação pelo qual a cafeína inibe a síntese de micotoxinas tem sido estudado por Buchanan *et al.* (1983), que chegaram à conclusão de que o efeito inibitório da cafeína sobre o *Aspergillus parasiticus*, reduzindo o crescimento do fungo e a produção de aflatoxina, não envolve a inibição do ciclo da fosfodiesterase AMP ou a quelatação de íons metálicos. A especificidade da cafeína parece ser a de inibir a frutose-1,6-difosfatase pelo carbono catabólico, resultando em um decréscimo na atividade glicolítica e alterando a carga de energia do microrganismo. A síntese de aflatoxina tem sido relatada por ser altamente dependente do catabolismo ativo de certos carboidratos; reduzindo a atividade glicolítica, será esperada uma forte redução na síntese de policetídeos.

Hasan (1996), estudando as propriedades antitoxigênicas do chá e do café, concluiu que além da cafeína, o ácido tânico apresenta propriedades anti-aflatoxigênicas. A síntese de aflatoxina e o crescimento do *Aspergillus parasiticus* foram afetados pela presença dos taninos e da cafeína presentes no chá e no café; o mecanismo pelo qual os dois compostos provocam tal inibição pode ser devido à redução na atividade glicolítica. A cafeína é uma substância presente no café que possui propriedade anti-micotoxigênica, inibindo tanto a produção de micotoxinas como patulina, esterigmatocistina, citrinina, aflatoxinas e as ocratoxinas como o crescimento do fungo, agindo, assim, como um composto fungistático, entretanto, esta inibição é altamente específica, dependendo principalmente dos fatores genéticos

dos fungo envolvidos (Batista, 2005). Portanto, o presente estudo objetivou-se, avaliar mediante testes “in vivo” em ratos Wistar, o efeito bioprotetor da ingestão da cafeína sobre a toxicidade da Aflatoxina B, além de testar e validar metodologias relacionadas a diferentes formas de administrar a micotoxina.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental deste estudo seguiu os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os testes biológicos foram desenvolvidos no biotério do UNILAVRAS, foram utilizados 24 ratos Wistar, recém desmamados e do sexo masculino foram separados em gaiolas metabólicas, com funil para coleta de urina e mantidos em ambiente controlado. Durante quinze dias antes do experimento, os animais tiveram acesso à dieta padrão e água potável *ad libitum*. Após este período foram separados em grupos de três animais para compor os oito tratamentos. O experimento teve duração de 60 dias, sendo os tratamentos aplicados com ração comercial suplementada com diferentes doses de cafeína. A aflatoxina B1(100 µL) da marca Sigma, foi ministrada aos animais, por via oral, inoculada na dieta em 5g de leite em pó e 2mL de água, correspondendo à dosagem de 50 ng/kg de peso corpóreo/dia respectivamente. A cafeína foi adicionada à dieta nas dosagens de 0%, 1%, 1,5% e 2%, perfazendo os seguintes tratamentos, T1- ração com 0% de cafeína + leite em pó + água (controle); T2 – ração com 1% de cafeína + leite em pó +100 µL de solução sem aflatoxina + água; T3 - ração com 1,5% de cafeína + leite em pó +100 µL de solução sem aflatoxina + água; T4 - ração com 2% de cafeína + leite em pó +100 µL de solução sem aflatoxina + água ; T5 – ração com 0% de cafeína + leite em pó + 100 µL de solução de aflatoxina + água; T 6 – ração com 1% de cafeína + leite em pó + 100 µL de solução de aflatoxina + água; T 7- ração com 1,5% de cafeína + leite em pó + 100 µL de solução de aflatoxina + água; T 8 – ração com 2% de cafeína + leite em pó + 100 µL de solução de aflatoxina + água. Durante seis semanas os animais foram alimentados com ração suplementada com cafeína e a partir da sétima semana os grupos T5; T6; T7; T8 passaram a consumir também aflatoxina. Os animais foram pesados diariamente. No final do experimento, coletou-se urina e sangue dos animais para realização das análises clínicas de: creatinina e uréia através da urina e as amostras do sangue (soro) foram utilizadas para determinar a atividade das transaminases hepáticas, aspartato aminotransferase (TGO) e alanina aminotransferase (TGP), gama-glutamil transferase animal, além da concentração de uréia e creatinina. Todos animais foram sacrificados e autopsiados no final do experimento e avaliados os desenvolvimentos dos danos causados aos rins, coração, pulmão e fígado através de lâminas histológicas. Os dados percentuais obtidos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à média de ganho de peso, análises clínicas de sangue: uréia, creatinina, TGO, G-GTA. Já em relação à uréia e creatinina na urina, houve efeito significativo para os tratamentos T5, T6, T7 e T8 e para TGP que apresentaram aumento T3, T5, T6, T7 e T8 (tabela 1). Para as análises histopatológicas das vísceras: fígado e coração, não houve alterações em nenhum tratamento. Observou-se em relação aos rins alterações nos tratamentos: T5, T6 e T7, esses tratamentos apresentaram no córtex renal, raríssimos túbulos com material fortemente eosinofílico (proteínáceo) na sua luz, já no T8 (cafeína a 2% + Aflatoxina), não se detectou nenhuma alteração. No pulmão, houve alterações em todos os tratamentos onde os mesmos apresentaram raros focos com infiltrado mononuclear discreto a moderado perivascular. De acordo com Ostry, (1999); Peraica, Plestina (2000) as aflatoxinas primeiramente afetam fígado e rim, causando cirrose e câncer no fígado. Já Garland e Reagor (2000), relatam que em estudos com cães com intoxicação crônica, verificaram nos exames químicos altos níveis de alanina aminotransferase (TGP), leve aumento na gama glutamil transferase (GGT) e bilirrubina total com variações na aspartato aminotransferase (TGO) e nas atividades da creatina fosfoquinase (CK). As lesões histológicas incluem hiperplasia biliar, colestase, lipidose e necrose.

Tabela 1 – Resultados das análises clínicas de sangue e urina de ratos Wistar com ingestão de Cafeína e Aflatoxina B1

Tratamento	Ureia (S)	Creatinina (S)	GGT	TGO	TGP	Ureia (U)	Creatinina (U)
1	39,3 a	0,37 a	0,20 a	208,7 a	63,3 a	3567,6 a	87,0 a
2	39,7 a	0,37 a	0,27 a	257,0 a	65,7 a	3876,7 a	81,0 a
3	44,3 a	0,43 a	0,20 a	305,0 a	81,7 b	4151,0 a	71,3 a
4	35,3 a	0,37 a	0,17 a	260,3 a	70,3 a	4183,3 a	76,0 a
5	37,7 a	0,37 a	0,27 a	260,3 a	78,3 a	4683,3 b	105,0 b
6	41,7 a	0,33 a	0,20 a	188,7 a	72,0 b	4900,0 b	97,7 b
7	39,3 a	0,33 a	0,17 a	203,7 a	75,0 b	5466,7 b	102,7 b
8	35,0 a	0,40 a	0,23 a	247,0 a	78,3 b	4850,0 b	106,0 b

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

As concentrações de TGP, uréia (U) e creatinina(U) dos animais que consumiram Afltoxina, confirmam a toxicidade da micotoxina em relação ao sistema renal. As lâminas histopatológicas, comprovam, que a aflatoxina causa danos aos rins. A cafeína na dosagem de 2% foi capaz de controlar essa ação e as alterações provocadas nos pulmões dos animais podem ser atribuídos aos solventes utilizados

AGRADECIMENTOS

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café (CBP&D/ Café), pelo apoio financeiro.
Ao CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de iniciação científica PIBIC/CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, L.R. **Incidência de fungos e ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arábica* L.) submetidos aos métodos de pré-processamento via seca e via úmida.** 2005.231p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BUCHANAN, R.L.; HOOVER, D.G.; JONES, S.B. Caffeine inhibition of aflatoxin production.. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.46, n.5, p.1193-1200, May 1983.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K. **Mycotoxins and phytoalexins.** BocaRaton: CRC Press, 1991, p.103-143.

BUSBY, W.F.Jr.; WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: SEARLE, C.E. (Ed.) **Chemicals Carcinogens**, Washington, DC: American Chemical Society, 1984, p.945-1136.

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C. & ANGÉLICO, C. L. Efeito da cafeína (1, 3, 7 – trimethylxantina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento.** VIÇOSA – ESPECIAL – (1): 50 – 53 – 2000.

GARLAND, T.; REAGOR, J. Chronic canine aflatoxin and management of an epidemic. In: X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 2000, Guarujá. **Official Program and Abstract Book**, May 2000, p.110.

HASAN, H.A.H. Anti-toxicogenic properties of coffee and tea. In: **International Conference on Fungi**, 1., 1996, Cairo. **Proceedings...** Cairo: Hopes & Chal.engs., 1996. v.1, p.75-78.

JUNG, I.L. et al. Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by inhibitory action of antagonistic bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.154-160, 2000.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do exercício energia, nutrição e desempenho humano.** 4. ed. Guanabara: Koogan, 1998.

LEVI, C. P. & BOKER, E. Survey of green coffee for potential aflatoxins contamination. **Journal of Association Official Analytical Chemistry.** v.51, p. 600-602, 1968.

LEVI, C. P. Mycotoxins in coffee. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry**, Washigton, v.63, n.6, p.1282-1285, june 1980.

OSTRY, V. Micromycetes, mycotoxins and human health, **Casopis Lekaru Ceskych**, v.138, p.515-521, 1999.

PERAICA, M.; PLESTINA, R. Exposure to mycotoxins and malignant tumors. **Arhivza- Higijenu-Rada-i Toksikologiju**, 51 (Supplement), p.131-139, 2000.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T., **Fisiologia do exercício.** 3. ed. São Paulo: Manole, 2000.

SAKAMOTO, W.; NISHIHARA, J.; FUJIE, K.; IZUKA, T.; HANDA, H.; OZAKI, M.; YUKAMA, S. Effect of Coffee Consumption on Bone Metabolism. **Bone**, New York, v. 28, n.5, p. 332–336, 2001. Suplemento.