

## OCRATOXINA A EM RATOS WISTAR: ATUAÇÃO DA CAFEÍNA COMO AGENTE BIOPROTETOR

Patrícia F.P.Goulart<sup>2</sup>, Roseane M.E. Oliveira<sup>3</sup>, Carlos J. Pimenta<sup>4</sup>, Lílian de Oliveira<sup>5</sup>, Adolfo de Oliveira Avezedo<sup>5</sup>, Priscilla Silva Abreu<sup>6</sup>, Tatiana Abreu Reis<sup>6</sup>.

- 1-Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café  
2- Professora Dra. - Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS - [patriciagoulart@unilavras.edu.br](mailto:patriciagoulart@unilavras.edu.br)  
3-Mestre em Ciência dos Alimentos /UFLA /Bolsista/CBP&D/Café - [roseaneevangelista@hotmail.com](mailto:roseaneevangelista@hotmail.com)  
4 -Professor Adjunto – Departamento de Ciência dos Alimentos – UFLA- [carlos\\_pimenta@ufla.br](mailto:carlos_pimenta@ufla.br)  
5-Prof. Msc - Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS  
6 - Graduação Nutrição (Inic. Científica/PIBIC/CNPq) - Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS

**RESUMO** - As micotoxinas são responsáveis por grandes perdas econômicas que ocorrem mundialmente, devido aos problemas que causam à saúde humana e animal, além dos prejuízos que causam na produção agrícola. Existem várias ocratoxinas que causam danos aos alimentos e produtos agrícolas, dentre estas a principal micotoxina é a Ocratoxina A (OTA), que é considerada substância carcinogênica, produzidas pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*. Dentre vários alimentos, o café, principalmente em sua fase de armazenamento, é atacado por fungos que produzem micotoxinas, mais especificamente as ocratoxinas. Ainda assim, o café, tem sido relacionado como produto quimioprotetor, diminuindo o risco de muitos tipos de câncer, por conter, naturalmente em sua composição, ou formadas durante o seu processamento, substâncias antioxidantes, anticarcinogênicas e antiteratogênicas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar mediante testes “in vivo” em ratos Wistar, os benefícios do consumo de café e de compostos bioprotetores (cafeína) presentes nesta bebida, sobre os danos causados por ocratoxina em relação a taxa de ganho de peso e sobre as análises clínicas de TGO, TGP, G-GTA, creatinina e uréia. Os testes foram realizados, com 24 ratos Wistar, recém desmamados, do sexo masculino que foram separados em gaiolas metabólicas, mantidos em ambiente controlado. O experimento teve duração de 42 dias, sendo os tratamentos (T) aplicados com ração comercial reformulada com vários ingredientes e mais a cafeína em doses equivalentes a xícaras de café de 100 mL. A ocratoxina A (OTA) foi aspergida na ração (20gr/ração/dia) perfazendo os seguintes tratamentos (T): T 1- Controle- ração com 0% de cafeína; T 2 – ração suplementada com cafeína a 1%; T 3 – ração suplementada com cafeína a 1,5%; T 4 – ração suplementada com cafeína a 2%; T 5- ração sem cafeína + OTA; T 6 – ração suplementada com cafeína a 1% + OTA; T 7 – ração suplementada com cafeína a 1,5% + OTA; T 8 – ração suplementada com cafeína a 2% + OTA. Os animais foram pesados diariamente durante o período da pesquisa. No final do experimento, coletou-se urina e sangue dos animais para realização das análises clínicas de : Creatinina e uréia através da urina (U) e também uréia, creatinina, e hemograma completo através do sangue (S). Todos animais foram sacrificados no final do experimento. Os dados percentuais obtidos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. De acordo com os resultados, com relação à bioproteção, a cafeína, não se apresentou totalmente eficiente no que se refere a danos causados pela ocratoxina.

**Palavra chaves:** Café, Micotoxinas, Exames clínicos

## OCRATOXIN A IN WISTAR RATS: CAFFEINE ACTION AS BIOPROTECTIVE AGENT

**ABSTRACT:** Mycotoxins are responsible for large economic losses that occur worldwide due to the problems they cause to human and animal health, in addition to causing losses in crops. There are several ochratoxin cause damage to food and agricultural products, among these is the main mycotoxin Ochratoxin A (OTA), which is considered carcinogenic, produced by the fungi *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*. Among various food, coffee, especially in their stage of storage, is attacked by fungi that produce mycotoxins, specifically the ocratoxin. Coffee, has been listed as quimioprotetor product, reducing the risk of many types of cancer, by contain, of course in its composition, or formed during its processing, antioxidant substances, anticarcinogenic and antiteratogênic. Therefore, this study aimed to evaluate through testing in vivo in rats, the benefits of consumption of coffee and consequently caffeine, like one bioprotector present in this drink, about the damage caused by ocratoxin on the rate of weight gain and the clinical analysis of GOT, GPT, G-GTA, urea and creatinine. Tests were performed with 24 Wistar rats, recently weaned, males that were separated into metabolic cages, maintained in a

controlled environment. The experiment lasted for 42 days, the treatments (T) applied with commercial diets reformulated with some ingredients and caffeine in doses equivalent to 100 cups of coffee (100 mL). Ochratoxin A (OTA) was sprayed in the diet (20gr / feed / day) making the following treatments T: (T1) - Control-diet with 0% of caffeine; (T2) - diet supplemented with caffeine at 1%, (T3) - diet supplemented with caffeine at 1.5%, (T4) - diet supplemented with caffeine and 2%, (T5) - caffeine free diet + OTA, T6 - diet supplemented with caffeine at 1% + OTA, (T7) - diet supplemented with caffeine at 1.5% + OTA, (T8) - diet supplemented with caffeine and 2% + OTA. Animals were weighed daily during the experiment. At the end, of the experiment, urine and blood was collected, to perform the clinical analysis of: Creatinine and urea in the urine (U) and urea, creatinine and complete blood count with blood (S). All animals were sacrificed at the end of the experiment. The percentage data were compared by Tukey test at 5% probability. According to the results, caffeine, did not appear fully efficient against damage caused by ochratoxin.

Key words: Coffee, Mycotoxins, Clinical Investigations

## INTRODUÇÃO

Micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes da atividade metabólica de fungos (bolores, mofo) que se desenvolvem em alimentos e produtos agrícolas quando as condições de temperatura, pH e umidade relativa do ar são favoráveis, podendo intoxicar seres humanos e animais (Soliman, 2002). A síntese desses metabólitos pode ocorrer em qualquer momento da fase de produção seja ela no campo, no armazenamento, durante o transporte, ou na fase de industrialização. Sua atividade tóxica persiste por um longo tempo nos alimentos, mesmo após o desaparecimento dos bolores que as originaram (Soliman, 2002). Os alimentos contaminados com doses elevadas, quando ingeridos pelo animal e/ou homem, podem causar intoxicações de evolução rápida com comprometimento de vários órgãos provocando distúrbios e/ou até morte (Scussel, 1998). A ingestão de produtos contaminados com doses mais baixas e freqüentes induz o aparecimento de câncer, principalmente no fígado, e a diminuição da resistência de animais às doenças (Pitt, 2000). Um grave problema é a possibilidade da transferência de micotoxinas para a cadeia alimentar humana, através de carne e laticínios produzidos por animais que ingerem rações contaminadas. Uma única espécie de fungo pode produzir inúmeros tipos de micotoxinas, podendo uma mesma amostra conter mais de um tipo de micotoxina (Silva et al., 2004). Nem todas as espécies de fungos são toxigênicas, mas sabe-se que mais de 300 espécies podem produzir algum tipo de toxina.

As ocratoxinas, que foram descobertas na África do Sul, em 1965 por um grupo de cientistas, isolando cepas de *A. ochraceus*, são responsáveis por muitos efeitos tóxicos em animais de laboratório. A OTA tornou-se um problema de saúde pública mundial desde que foi associada com nefropatologia dos Balcãs (Krogh et al., 1997). Pode ser encontrada principalmente em: milho, cevada, feijão, amendoim, café, soja, trigo sarraceno, centeio, arroz, sorgo, castanha do Pará, superfície de presunto, pimentões, pimenta do reino, vegetação em decomposição, solo e ervilha. Os níveis comumente encontrados são abaixo de 27.5 µg/Kg. A ocratoxina A é uma nefrotoxina, que causa nefropatia com excessiva eliminação de urina, provocando muita sede, seu alvo secundário é o fígado.

A toxicidade da ocratoxina A pode ter três grandes efeitos: a) inibição na síntese de proteínas, b) inibição na síntese de ATP e c) peroxidação lipídica. A inibição na síntese de proteínas é o resultado de uma inibição competitiva pela fenilalanina tRNA sintetase. O aumento da peroxidação lipídica em animais tratados com ocratoxina A tem sido observado, sugerindo que radicais livres ou espécies ativas de oxigênio podem estar envolvidos em ocratoxicoses.

As ocratoxinas que tem como principal micotoxina a Ocratoxina A (OTA) são substâncias carcinogênicas, produzidas pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* e estão presentes em cereais e leguminosas, sendo o café uma das espécies afetadas (Chalfoun e Batista, 2002; Frisvad et al., 2004). Estes autores afirmam, entretanto, que apesar desta micotoxina ser a mais comum em café, ela tem sido detectada em pequenas quantidades. Esta toxina promove em seres humanos o acúmulo de gordura no fígado e sérios danos renais. Inicialmente demonstrou-se que a OTA inibe a síntese protéica *in vivo* e *in vitro*, ocupando a posição da fenilalanina. Como seqüência, atinge a função gênica inibindo a síntese de RNA. A OTA age também sobre outras enzimas da síntese protéica, inibindo amplamente o metabolismo protéico no citosol, eleva a peroxidação lipídica *in vivo* e *in vitro*, o que implicará na desorganização celular a começar pelas membranas das mitocôndrias.

Dado a importância dessas toxinas na saúde humana e animal, a Comunidade Européia mantém a Comissão Científica de Alimentos (Scientific Commission on Food) dedicada ao estudo e proposições de limites de quantidade da OTA contida nos alimentos e inclusive café. Também o "Food and Drug Administration" (FDA) dos Estados Unidos está sugerindo medidas legislativas para limitar a quantidade da

toxina. Segundo, Egmond et al. (2007), aproximadamente 100 países no mundo, a partir de 2003, criaram regulamentações específicas de alimentos. O número de países que normatizou as questões referentes às micotoxinas, tem aumentado significativamente; se comparado com o ano de 1995, a situação mundial em relação aos prejuízos causados por micotoxinas, tem sido praticamente controlada dentro de limites toleráveis, com tendência a reduzir. Inúmeros estudos epidemiológicos têm sido realizados a fim de investigar a relação entre consumo de café e incidência de câncer. De acordo com Schilter et al. (2002) a maioria deles chegou a conclusão de que 2 a 5 xícaras diárias não promovem nenhum risco dessa doença e que ao contrário do que se pensa, o seu consumo moderado pode proteger o organismo contra certos tipos de câncer (Nishi et al., 1996; Giovannucci, 1998). Desse modo, estudos em animais têm mostrado que o café promove um efeito quimioprotetor para inúmeros tipos de câncer (Miller et al., 1993; Stalder et al. 1990).

Dentre os componentes do café que foram identificados como potencialmente responsáveis pelos efeitos quimioprotetores contra o desenvolvimento de câncer, encontram-se a cafeína e vários polifenóis como os ácidos clorogênicos e os produtos de sua degradação que se complexam a compostos carcinogênicos anulando a sua atividade (Schildler et al., 2001). A cafeína é uma substância presente no café que possui propriedade anti-micotoxigênica, comprovadamente, "in vitro", 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 fungos envolvidos (Batista, 2005).

O presente estudo teve como objetivo avaliar mediante testes "in vivo" em ratos Wistar, os benefícios do consumo de café e da cafeína (composto bioprotetore) presentes nesta bebida, sobre os danos causados por ocratoxina A em relação a taxa de ganho de peso e sobre as análises clínicas de TGO, TGP, G-GTA, creatinina e uréia

### MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental deste estudo seguiu os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os testes foram realizados no Laboratório de Pesquisa com animais do UNILAVRAS, utilizando 24 ratos Wistar, oriundos de seis ninhadas nascidos no mesmo dia. Recém desmamados e do sexo masculino foram separados em gaiolas metabólicas, com funil para coleta de urina e mantidos em ambiente controlado com fotoperíodo de 12 horas a 23°C e 55% de umidade relativa. 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 42 dias, sendo os tratamentos (T) aplicados com ração comercial (triturada no multiprocessador, sendo acrescentada água fervente, óleo de soja, fécula de mandioca e suplementada com cafeína em seguida moldada em cubos e levada à estufa a 40° até secar completamente) e a ocratoxina A (OTA) foi aspergida na ração (20gr/ração/dia) perfazendo os seguintes tratamentos (T), sendo: (T1)- Controle ração com 0% de cafeína; (T2) – ração suplementada com cafeína a 1%; (T3) – ração suplementada com cafeína a 1,5%; (T4) – ração suplementada com cafeína a 2%; (T5)- ração sem cafeína + OTA; (T6) – ração suplementada com cafeína a 1% + OTA; (T7) – ração suplementada com cafeína a 1,5% + OTA; (T8) – ração suplementada com cafeína a 2% + OTA. Sendo que ingestão de cafeína usada como referência foi equivalente ao valor contido em xícaras de café (100mL): 1% -2 xícaras, 1,5% - 4 xícaras e 2% -6 xícaras. Os animais foram pesados diariamente durante o período da pesquisa. No final do experimento, coletou-se urina e sangue dos animais para realização das análises clínicas de : Creatinina e uréia através da urina (U) e também Uréia, Creatinina, e hemograma completo através do sangue (S). Todos animais foram sacrificados no final do experimento. Os dados percentuais obtidos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação aos resultados da média de ganho de peso e análises clínicas: hemograma completo, TGO e G-GTA, uréia(S) e creatinina (S), não houve diferença significativas entre os tratamentos. Já em relação à TGP no sangue e uréia (U) e creatinina na urina, os animais pertencentes aos grupos que receberam os tratamentos T5, T6, T7 e T8 que ingeriram ocratoxina, apresentaram valores mais elevados em relação aos demais grupos (Tabela 1). Portanto, a cafeína, não se apresentou totalmente eficiente no seu efeito bioprotetor em relação aos danos causados pela ocratoxina.

Segundo Scussel, (1998) alimentos contaminados com doses elevadas de micotoxinas, quando ingeridos pelo animal e/ou homem, podem causar intoxicações de evolução rápida com comprometimento de vários órgãos provocando distúrbios como falha do fígado e rins devido à destruição das células parenquimatosas, o que pode ser acompanhado de hemorragias, podendo levar até a morte. De acordo com

Tsubouchi et al (1985), nem todos os isolados de fungos são sensíveis à cafeína. Em seus estudos isolaram de grãos de café, uma linhagem de *Aspergillus ochraceus* resistente à cafeína. Observou-se que a atividade de inibição da cafeína é altamente específica, o isolado ocratoxigênico deste estudo teve a capacidade de crescer bem em meio de cultura com extrato de café, degradou a cafeína e produziu a ocratoxina A.

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

Tratamento	Ureia (S)	Creatinina (S)	GGT	TGO	TGP	Uréia (U)	Creatinina (U)
1	38,3 a	0,37 a	0,20 a	329,7 a	63,0 a	3566,7 a	72,7 a
2	39,3 a	0,37 a	0,27 a	330,0 a	67,7 a	3516,7 a	82,7 b
3	39,0 a	0,43 a	0,20 a	336,0 a	70,3 a	4150,0 a	71,3 a
4	36,0 a	0,37 a	0,17 a	302,0 a	68,3 a	3983,3 a	72,0 a
5	40,0 a	0,37 a	0,27 a	396,7 a	79,0 b	5416,7 b	85,0 b
6	41,0 a	0,40 a	0,20 a	383,3 a	73,3 b	4883,3 b	83,7 b
7	35,0 a	0,37 a	0,17 a	302,0 a	76,0 b	5133,3 b	80,0 b
8	36,3 a	0,40 a	0,23 a	351,0 a	76,7 b	4816,7 b	78,0 b

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

## CONCLUSÃO

A ingestão de ocratoxina provocou aumento no índice de TGP no sangue, Uréia e Creatinina na urina em ratos Wistar, mesmo em associação com cafeína.

## AGRADECIMENTOS

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café (CBP&D/ Café), pelo apoio financeiro

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L.R. O papel dos microrganismos na qualidade e segurança do café. **In: Anais do VIII Encontro Sul Mineiro de Cafeicultura e III Simpósio de Pesquisa Cafeeira do Sul de Minas.** Lavras: EMATER/EPAMIG/ UFLA, 2002.p.200.

EGMOND, H.P.; SCHOOTHORST, R.C.; JONKER, M.A. Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. **Anal Bioanal Chem** .389:147–157, 2007.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, [S.l.], v. 50, p. 23-43, 2004.

GIOVANNUCCI, E. Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. **American Journal of Epidemiology**, 147:1043-1052, 1998.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

KROGH, P.; HALD, B.; PLESTINA, R. AND CEOVIC, S. Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs, **Acta Pathologica Microbiol. Scandinavia**, Sect. (B) 85, p.238–240, 1977.

MILLER, E. G., GONZALES-SANDERS, A. P., COUVILLON, A. M., BINNIE, W. H., SUNAHARA, G. I., BERTHOLET, R., 1993. Inhibition of oral carcinogenesis by roasted beans and roasted coffee beans fractions. In: Association Scientific International du café, **15<sup>th</sup> ASIC International Colloquim on Coffee**, ASCI, Paris, France, pp. 420-425.

NISHIKAVA, A., TANAKA, T., MORI, H. An inhibitory effect of coffee on nitrosamine-hepatocarcinogenesis with aminopyrine and sodium nitrite in rats. **Journal of Nutrition, Growth and Cancer** v.3, p-161-166. 1986.

PITT, J.I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, n. 38. Supplement 1, p. 17-22. 2000.

SOLIMAN, K. M. Incidence, level, and behavior of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.25,p. 7477-7481, 2002.

STALDER, R., BEXTER, A., WURZNER, H. P., LUGINBUHL, H. A carcinogenicity study of instant coffee in Swiss mice. **Food and Chemical Toxicology**, n.28 p.829-837, 1990.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.144p.

SILVA, C. F., BATISTA, L. R., SCHWAN, R. F. Incidência de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) **Revista Brasileira de Armazenamento, Especial Café**, n.7,p.30-36, 2004.

SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**. 40: 1155-1163, 2002.