



**CONSUMO E BIOPROTEÇÃO DE
COMPONENTES DO CAFÉ À PRESENÇA DE
MICOTOXINAS EM RATOS WISTAR**

**LAVRAS-MG
2011**

JULIANO SILVA ROCHA

**CONSUMO E BIOPROTEÇÃO DE COMPONENTES DO CAFÉ À
PRESENÇA DE MICOTOXINAS EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Dr. Carlos José Pimenta

**LAVRAS - MG
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Rocha, Juliano Silva.

Consumo e bioproteção de componentes do café à presença de micotoxinas em ratos Wistar / Juliano Silva Rocha. – Lavras : UFLA, 2011.

75 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Carlos José Pimenta.

Bibliografia.

1. Ácidos clorogênicos. 2. Cafestol. 3. Aflatoxina B1. 4. Ocratoxina A. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.93

JULIANO SILVA ROCHA

**CONSUMO E BIOPROTEÇÃO DE COMPONENTES DO CAFÉ À
PRESENÇA DE MICOTOXINAS EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 23 de Fevereiro de 2011

Dra. Patrícia de F. Pereira Goulart UNILAVRAS

Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza EPAMIG

Dr. Carlos José Pimenta

Orientador

**LAVRAS - MG
2011**

*Aos meus pais, João e Joana, por todo apoio e amor oferecidos durante toda
minha vida, incentivando sempre buscar mais. Aos meus avós, Euclides e
Gracia, pelo carinho e incentivo. Ao meu irmão, Thiago, por estar ao meu lado
nos momentos em que precisei.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por mais esta oportunidade entre tantas outras colocadas em meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa e pela bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Carlos José Pimenta pela orientação.

À professora Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart, por mais de oito anos, que serão seguidos agora de mais três, me ensinando, orientando e trabalhando em conjunto.

À professora Dra. Sara Maria Chalfoun, pelo apoio e confiança, além de iniciar todo este projeto.

À professora Dra. Maria Emília S. G. Pimenta, pela ajuda e sugestões.

À Roseane Maria Evangelista Oliveira, pela ajuda e incentivo.

Aos professores da Universidade Federal de Lavras e do Departamento de Ciência dos Alimentos, por todo conhecimento passado.

À equipe de trabalho, pelo esforço e dedicação.

Aos amigos e todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

O café é nada menos do que a segunda bebida mais consumida no mundo, sabor e aroma atrativo justificam sua aceitação. Diversos estudos têm sido realizados para determinar seus efeitos sobre a saúde humana. Diante das evidências observadas na literatura, o presente estudo buscou confrontar através de testes “*in vivo*” a ação bioprotetora de dois dos mais importantes compostos químicos presentes no café (ácidos clorogênicos e cafestol) e o efeito tóxico de duas conhecidas micotoxinas (ocratoxina A e aflatoxina B1). O experimento foi composto de quatro ensaios biológicos; para isso foram utilizados ratos Wistar jovens, machos, mantidos em ambiente controlado, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, todos em gaiolas metabólicas individuais, com acesso a alimentação controlada (15g/dia) e água “*ad libitum*”. Durante as quatro últimas semanas de cada ensaio, cada animal recebeu 50ng de toxina/dia em 3g de leite em pó, adicionado de 1,5ml de água destilada e moldado de forma esférica. Animais dos grupos negativos para toxina receberam o mesmo tratamento sem a adição de micotoxina. Foi possível observar ação bioprotetora frente às micotoxinas, com destaque para os ácidos clorogênicos, melhorando o ganho de peso e a síntese de glicogênio hepático e muscular. Sugerimos a realização de testes por um maior período de tempo para confirmação de todos os indícios encontrados, já que não foram encontradas diferenças nos exames bioquímicos e histopatológicos. Os dados percentuais obtidos foram comparados através de Análise de Variância, pelos Testes Scott Knott e T de *Student*, nível 5% de probabilidade.

Palavras-chave: Ácidos Clorogênicos. Cafestol. Aflatoxina B1. Ocratoxina A.

ABSTRACT

Coffee is nothing less than the second most consumed beverage in the world; its taste and attractive aroma justify its acceptance. Several studies have been conducted to determine their effects on human health. Confronted with evidence found in literature, this study sought to confront, by "*in vivo*" testing, the bioprotective action of two the most important chemical compounds in coffee (chlorogenic acids and cafestol) and two known mycotoxins (ochratoxin A and aflatoxin B1). The experiment was composed of four biological tests. The young Wistar male rats were used, kept in a controlled environment with 12 hours photoperiod and ambient temperature of about 25 °C, all in individual metabolic cages with access to controlled food (15g/day) and "*ad libitum*" water. During the each test last four weeks, each animal received 50ng of toxin/day on 3g of powdered milk, added by 1.5 ml of distilled water and shaped into a sphere.

Animals from the negative toxin groups received the same treatment without the addition of mycotoxin. It was possible to see bioprotective action forward to mycotoxins, especially by chlorogenic acids, improving the weight gain and the synthesis of muscle and liver glycogen. It is suggest testing for a longer period of time to confirm all the found evidences, especially because was not find difference on biochemical and histopathological exams. The percentage data were compared by Scott Knott and T of Student tests at 5% of probability.

Keywords: Chlorogenic acids. Cafestol. Aflatoxin B1. Ochratoxin A.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gaiola metabólica.....	33
Figura 2	Rato Wistar em gaiola metabólica.....	34
Figura 3	Animal ingerindo micotoxina.....	37
Figura 4	Pesagem animal.....	38
Figura 5	Necropsia.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ingredientes utilizados na produção da ração modificada.....	35
Tabela 2	Quantidades de ácidos clorogênicos e cafestol (mg) presentes em xícaras de café e classificados de acordo com níveis de consumo por um humano adulto de 60Kg.....	35
Tabela 3	Quantidades de ácidos clorogênicos e cafestol (mg) de acordo com consumo convertido de um humano adulto de 60Kg para um animal de 130g.....	35
Tabela 4	Denominação dos ensaios segundo o bioprotetor e a toxina utilizados	38
Tabela 5	Ganho de peso (g) médio dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I.....	41
Tabela 6	Ganho de peso (g) médio dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II.....	42
Tabela 7	Ganho de peso (g) médio dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III.....	42
Tabela 8	Ganho de peso (g) médio dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV.....	43
Tabela 9	Peso (g) médio do fígado dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I.....	44

Tabela 10	Peso (g) médio do fígado dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II	44
Tabela 11	Peso (g) médio do fígado dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III.....	45
Tabela 12	Peso (g) médio do fígado dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV.....	45
Tabela 13	Peso (g) médio do coração dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I.....	46
Tabela 14	Peso (g) médio do coração dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II	46
Tabela 15	Peso (g) médio do coração dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III.....	47
Tabela 16	Peso (g) médio do coração dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV.....	47
Tabela 17	Peso (g) médio dos rins dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I.....	48
Tabela 18	Peso (g) médio dos rins dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II	49

Tabela 19	Peso (g) médio dos rins dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III.....	49
Tabela 20	Peso (g) médio dos rins dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV.....	49
Tabela 21	Valores de referência para sangue de ratos Wistar.....	50
Tabela 22	Níveis médios de creatinina no sangue (mg/dL) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.....	51
Tabela 23	Níveis médios de ureia no sangue (mg/dL) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.....	52
Tabela 24	Níveis médios de TGO no sangue (U/L) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.....	54
Tabela 25	Níveis médios de TGP no sangue (U/L) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Café e saúde	16
2.2	Ácidos clorogênicos	18
2.3	Cafestol	19
2.4	Consumo atual de alimentos	20
2.4.1	Contaminação de alimentos por micotoxinas	21
2.4.2	Aflatoxinas	24
2.4.3	Ocratoxinas	27
2.5	Potencial do café	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Apresentação do projeto	32
3.2	Desenho experimental	32
3.2.1	Produção da ração	34
3.2.1.1	Formulação da ração	34
3.2.1.3	Modelagem e secagem	36
3.2.2	Tempo de exposição	36
3.2.3	Ministração das micotoxinas	36
3.2.4	Denominação dos ensaios biológicos e grupos experimentais	37
3.2.5	Controle de peso	38
3.2.6	Eutanásia e Necropsia	39
3.2.7	Exames bioquímicos	39
3.2.9	Análise estatística	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Ganho de peso total	41
4.2	Peso do fígado	43

4.3	Peso do coração.....	46
4.4	Peso dos rins.....	48
4.5	Exames bioquímicos.....	50
4.5.1	Creatinina.....	50
4.5.2	Ureia.....	52
4.5.3	Transaminase Glutâmico Oxalacética.....	53
4.5.4	Transaminase Glutâmico Pirúvica.....	55
4.6	Histopatologia.....	57
5	CONCLUSÃO.....	58
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

As facilidades da vida moderna trazem inúmeros benefícios ao homem, mas também podem afetar negativamente sua qualidade de vida. A grande disponibilidade de alimentos com baixo valor nutricional leva inúmeras pessoas a uma dieta rica em açúcares e gorduras de baixa qualidade, junto ao sedentarismo e ao estresse são as principais causas do desenvolvimento de doenças crônicas em grande parte da população portadora de comorbidades associadas ao desenvolvimento de doenças mais graves. Somado a isto, o consumo de alimentos contaminados pode gerar ainda mais problemas.

Alimentos podem ser contaminados de várias formas, mas principalmente por microrganismos; para evitar que isso aconteça, ao longo do tempo uma série de técnicas e medidas foram adotadas e desenvolvidas para melhorar a qualidade e durabilidade dos alimentos. Sabe-se hoje que algumas espécies de *Aspergillus* e de *Penicillium* são as principais produtoras de ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1, micotoxinas que podem causar intoxicação de evolução rápida, quando ingeridas em altas doses e quando ingeridas em doses mais baixas e frequentes, induzem o aparecimento de câncer e lesões nos tecidos responsáveis pela metabolização dessas substâncias. No caso da OTA, o principal alvo são os rins, já o mecanismo de ação da aflatoxina B1 ainda não está bem esclarecido.

Alimentos funcionais são considerados promotores de saúde por estarem associados à diminuição dos riscos de algumas doenças crônicas, uma vez que, são alimentos naturais ou preparados, contendo uma ou mais substâncias funcionais. O consumo regular de azeite de oliva, alho, vinho ou suco de uva tinto entre outros, é documentado na literatura como benéfico à saúde humana. Tendo em vista essa realidade, a conscientização da população sobre a importância do consumo de alimentos contendo substâncias que auxiliam a

promoção da saúde, trazendo com isso uma melhora no estado nutricional pode atuar na contramão e afetar positivamente a qualidade de vida moderna.

Pesquisas apontam o café como um produto quimioprotetor, diminuindo o risco de muitos tipos de câncer, contendo naturalmente em sua composição ou formadas durante o seu processamento, substâncias antioxidantes, anticarcinogênicas e antiteratogênicas. Não há associação positiva entre o consumo dessa bebida e a ocorrência de câncer em geral. Ao contrário, indica, em muitos casos, associação inversa.

Diante dessas informações o presente estudo objetivou avaliar os efeitos bioprotetores do consumo de dois compostos químicos presentes no café, ácidos clorogênicos e cafestol, na dieta de ratos Wistar perante o consumo simultâneo de micotoxinas, Aflatoxina B1 e Ocratoxina A, observando sua atuação no organismo animal através de testes “*in vivo*”.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Café e saúde

Nada menos que a segunda bebida mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da água, o café é apontado atualmente como integrante dos assim chamados alimentos funcionais (CAVIN et al., 2002). Seu sabor e aroma atrativo justificam toda sua aceitação, seu grão possui grande variedade de minerais, aminoácidos, lipídeos, polissacarídeos e vitaminas, em especial a niacina (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2005). Diante desta riqueza em micro e macronutrientes, sendo uma das bebidas mais populares do mundo, vale à pena considerar a contribuição do café na nossa dieta como promotor da saúde e bem-estar.

Alimentos funcionais são definidos como aqueles que afetam benéficamente uma ou mais funções do organismo, possuem efeitos nutricionais adequados de maneira que seja relevante tanto para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de doenças (ROBERFROID, 2002). Devem apresentar propriedades benéficas, além das nutricionais básicas, sendo apresentados na forma de alimentos comuns. São consumidos em dietas convencionais, mas demonstram capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (SOUZA; SOUZA NETO; MAIA, 2003).

Segundo Ramos (2007), os alimentos funcionais são considerados promotores de saúde por estarem associados à diminuição dos riscos de algumas doenças crônicas, uma vez que, são alimentos naturais ou preparados, contendo uma ou mais substâncias funcionais. Deve ressaltar-se a importância destes compostos no aumento da expectativa de vida da população, uma vez que o crescente aparecimento de doenças crônicas tais como: obesidade, aterosclerose,

hipertensão, osteoporose, diabetes e câncer têm ocasionado preocupação com a alimentação, por parte da população e dos órgãos públicos da saúde. Diversos autores defendem que o café deve constar na lista de alimentos funcionais devido aos seus efeitos (MACHADO; COSTA, 2006). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou em 11 de janeiro de 2005 um boletim em que define como alimento funcional aquele com propriedade relativa ao papel metabólico ou fisiológico onde o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.

O conceito de bioproteção pode ser englobado entre as características de um alimento funcional. Alimentos bioprotetores possuem componentes cujo consumo regular traz benefícios à saúde como: regular o metabolismo, exercer função antioxidante e prevenir ou atenuar sintomas de algumas doenças (MORAES; COLLA, 2006).

De acordo com a revisão realizada por Dórea e Costa (2005), envolvendo mais de 200 publicações relacionadas ao café, trabalhos estes produzidos por cientistas de vários países que consomem a bebida, nenhum dos trabalhos indica malefícios causados pelo produto, pelo contrário, a bebida proporciona aumento da capacidade de trabalho físico e mental, do estado de alerta e vigília, da memória e do bem-estar, equilibra a hiperatividade infantil, ajuda na concentração e também minimiza os efeitos do mal de Alzheimer e de Parkinson. Segundo esses mesmos autores, há ainda relatos que indicam que o café ajuda no aumento da temperatura corporal e na aceleração do metabolismo, sendo portanto, recomendável aos obesos que fazem dietas para emagrecer. Eles enfatizam ainda que o café não possui apenas funcionalidade no que diz respeito à saúde, mas também social.

Inúmeros estudos epidemiológicos têm sido realizados a fim de investigar a relação entre consumo de café e incidência de câncer. De acordo

com Cavin et al. (2002), a maioria deles chegou à 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 (GIOVANNUCCI, 1998; INOUE; TAJIMA, 1998; NISHI et al., 1996). 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., 1994) inibindo a ação de produtos carcinogênicos como as nitrosaminas (NISHIKAVA; TANAKA; MORI, 1986), 1,2-dimetilhidrazina (GERSHBEIN, 1994), 7,12-dimetil (a) antracena (DMBA) e 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol (4,5-b) piridina (PhIP) (WATTENBERG et al., 1983). De acordo com Nkondjock (2008) o consumo habitual desta bebida tem sido associado à redução do desenvolvimento de doenças crônicas e até mesmo o câncer, principalmente o hepático.

Cavin et al.(2002) relata também que um grande número de estudos tem sido realizado no intuito de identificar quais dos seus componentes são responsáveis pelos benefícios decorrentes do seu consumo regular. Dentre os componentes do café que foram identificados como potencialmente responsáveis por efeitos quimioprotetores, polifenóis como os ácidos clorogênicos e os produtos de sua degradação e diterpenos como o cafestol ganham destaque (SCHILTER; HOLZHACUSER; CAVIN, 2001).

2.2 Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos são polifenóis com ação antioxidante que no processo de torra formam quinóides, que atuam inibindo a re-captção de adenosina, melhorando assim a microcirculação (ABIC, 2005).

Na composição do grão de café, os ácidos clorogênicos são encontrados como ésteres do ácido químico com resíduos cinâmicos (NOGUEIRA; TRUGO, 2003).

Os ácidos clorogênicos constituem os principais compostos fenólicos do café, os quais são importantes para o sabor e aroma da bebida. A fração absorvida dos ácidos clorogênicos e do ácido cafeico são suficientes para exercerem ação protetora e antioxidante (BORN et al., 1996; DAGLIA et al., 2000; LARANJINHA; ALMEIDA; MADEIRA, 1994), provocar alterações na circulação sanguínea e inibir a oxidação de LDL *in vitro*, protegendo assim o organismo contra doenças cardiovasculares (OLTHOF et al., 2001) e contra efeitos inibitórios *in vitro* e *in vivo* induzidos por produtos carcinogênicos (KASAI et al., 2000; TANAKA; KOJIMA; KAWAMORI, 1993). A fração não absorvida, no cólon, inibe a formação de compostos mutagênicos N-nitrosos (nitrosaminas) exercendo assim efeito anticancerígeno (CLARKE; MACRAE, 1989; NOGUEIRA; TRUGO, 2003).

2.3 Cafestol

Em modelos com animais e sistemas de culturas de células, os diterpenos do café, cafestol e caveol, demonstraram produzir uma grande diversidade de efeitos bioquímicos resultando em uma redução da genotoxicidade de vários agentes carcinogênicos, incluindo micotoxinas (CAVIN et al., 2002; HUBER et al., 1997). Dentre os mecanismos envolvidos durante a ação quimioprotetora desses componentes presentes no grão de café, destacam-se a indução das enzimas transferase glutatona e transferase glucoronosil, conjugando compostos eletrofílicos tóxicos (LAM; SPARNINS; WATTENBERG, 1982), a síntese de proteínas que atuam como antioxidantes como a glutamylcisteinyl synthetase e hemoxidase, bem como a inibição da síntese e/ou

ativação do citocromo P450, um ativador carcinogênico (MULCAHY et al., 1997; PRESTERA et al., 1995).

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que a exposição diária a 10 mg de diterpenos presentes no café, contidos em até 5 xícaras, não provoca elevação nos níveis de colesterol no sangue (URGERT; KATAN, 1997). Desse modo, Cavin et al. (2002), em estudo de dose-resposta com diferentes níveis de cafestol e caveol sobre a atividade anticancerígena em ratos concluíram que esses produtos funcionaram como potentes quimioprotetores ao aparecimento da doença sem aumentar a taxa de colesterol. Segundo os autores, dado a semelhança de resposta clínica entre ratos e humanos a chance da manifestação desses efeitos benéficos no homem, provocados por esses diterpenos é grande.

2.4 Consumo atual de alimentos

Inúmeros fatores afetam negativamente a qualidade de vida moderna. O consumo elevado de alimentos de baixo valor nutricional, o sedentarismo e o estresse são as principais causas do desenvolvimento de doenças crônicas em grande parte da população portadora de patologias como hipertensão e diabetes, comorbidades associadas a doenças mais graves. Somado a tudo isso, o consumo de alimentos contaminados pode gerar ainda mais problemas (MORAES; COLLA, 2006).

Mais além, alimentos podem ser contaminados das mais diferentes formas: metais pesados, infestação parasitária, pesticidas, agentes químicos e por microrganismos. Para evitar que isso aconteça, ao longo do tempo uma série de técnicas e medidas foram adotadas e desenvolvidas para melhorar a qualidade e durabilidade dos alimentos. Mesmo com todos esses cuidados ou em muitas

vezes, quando há alguma falha em qualquer que seja a fase de produção dos alimentos, podem surgir contaminações (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.4.1 Contaminação de alimentos por micotoxinas

A penetração de microorganismos se inicia no grão do cereal, pela sua exposição ao ar, após a colheita, pelo seu contato com quaisquer superfícies durante o transporte ou com o solo. Quando armazenados em certas condições de temperatura, umidade, umidade relativa do ar e pH, os cereais e leguminosas estando na sua forma "*in natura*" ou já processados, podem ser contaminados (EVANGELISTA, 2001).

Fungos possuem grande facilidade em se proliferar em alimentos, quando isso ocorre é comum que sejam encontradas toxinas produzidas pelas mais diferentes espécies. Micotoxinas são metabólitos secundários de fungos, sua produção está diretamente relacionada com a sobrevivência e perpetuação da espécie, já que são produzidas e lançadas no meio com o objetivo de inibir a multiplicação de outros microorganismos (LAZZARI, 1993). Mais de 50.000 espécies de fungos já foram descritas, das quais somente 200 são produtoras de micotoxinas e dentre essas apenas 30 são responsáveis por quadros micotoxicológicos (CORRÊA, 1995). Micotoxinas se tornam tóxicas quando a ingestão de alimentos contaminados excede uma dose tolerável (BERTAIL; TRESSOU, 2006), seus efeitos principais em animais são: imunossupressão, carcinogenicidade, mutagenicidade e teratogenicidade. Além de tudo isso o crescimento fúngico em leguminosas e cereais está associado à baixa dos níveis nutricionais desses alimentos.

Os gêneros de fungos mais encontrados em grãos e cereais são: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Gibberella* e *Claviceps*, centenas de micotoxinas produzidas por esses gêneros de fungos já foram detectadas em

cereais destinados ao consumo animal; sendo comum encontrar diferentes tipos no mesmo cereal; sendo produzidas ou não por espécies e até por gêneros diferentes, em diversas fases de produção (CRUZ, 1995).

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 a morte (SCUSSEL, 1998). Segundo Pitt (2000), a ingestão de produtos contaminados com doses mais baixas e frequentes induz o aparecimento de câncer, principalmente no fígado, e a diminuição da resistência de animais às doenças. 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 (BAPTISTA, 2005).

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., 2003). Nem todas as espécies de fungos são toxigênicas, mas sabe-se que mais de 300 espécies podem produzir algum tipo de toxina. Dentre as principais micotoxinas encontradas em produtos alimentícios e grãos como o amendoim e subprodutos, milho, farelo de algodão, castanhas em geral, sementes oleaginosas, feno, sorgo e feijão têm-se a aflatoxina e a ocratoxina (CHALFOUN; PEREIRA; ANGÉLICO, 2000).

A presença de fungos toxigênicos, além de alterar a qualidade do café pode colocar em risco a segurança do produto. Isto pode ocorrer devido à produção de micotoxinas, que são metabólitos secundários que mesmo em pequenas concentrações, são tóxicas ao homem e aos animais. Atualmente, as micotoxinas mais estudadas e de maior importância para a saúde humana presentes em alimentos e bebidas são aflatoxinas, fumonisinas, patulina, ocratoxina e zearalenona (FRISVAD et al., 2004).

Os resultados obtidos por Chalfoun, Pereira e Angélico (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 destas 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 (2003) 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.

No Brasil a seleção tradicional dos cafés de boa qualidade inclui uma dimensão organoléptica que elimina qualquer material com significativa presença de fungos, sendo que em tais casos a detecção de micotoxinas, mesmo em traços é rara. Por outro lado, remessas altamente contaminadas de café são improváveis de serem concretizadas e aceitas porque odores e sabores indesejáveis fazem-nas organolepticamente inaceitáveis. Em outros cafés, sem o mesmo rigor na seleção do produto, ainda que muito raramente, níveis significantes de ocratoxina podem ser detectados (VIANI, 1996).

Levi, Trenk e Mohr (1974), realizaram o primeiro trabalho avaliando a presença de micotoxinas em grãos de café crus. Das 68 amostras avaliadas, três apresentaram contaminações que variaram de 20 µg/kg a 80 µg/kg. Das 10 amostras enviadas diretamente do Brasil para análise, nenhuma apresentou contaminação acima do limite de detecção do método. Resultados de pesquisas

subsequentes realizadas em vários países, utilizando amostras de café cru e processado de diversas procedências confirmam o fato de que relativamente há outros produtos vegetais, a ocorrência de micotoxinas em grãos e produto processado é rara, colocando o café como fonte irrisória de micotoxinas na dieta.

2.4.2 Aflatoxinas

Segundo Heathcote (1984), as aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos por algumas linhagens de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, além de outras espécies com *Aspergillus nomius* (FRISVAD; THRANE, 1986). Sob condições favoráveis de temperatura e umidade, esses fungos podem crescer em certos alimentos, resultando na produção de aflatoxinas (FORTNUM, 1986; LILLEHOJ, 1986).

São conhecidos atualmente 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B1, B2, G1 e G2 (COULOMBE, 1991). As aflatoxinas, no entanto, apresentam diferentes graus de atividade biológica: a aflatoxina B1 (AFB1), além de ser a mais frequentemente encontrada em substratos vegetais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de G1, B2 e G2 (LEESON et al., 1995). O nível máximo permitido pela legislação brasileira é de 20 µg/Kg para a soma das aflatoxinas B1+G1+B2+G (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2002).

No mundo todo, há uma crescente conscientização das sérias consequências que a ingestão de concentrações elevadas de aflatoxinas pode causar à saúde humana e dos animais (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 1993) e mesmo as concentrações baixas, desde que continuamente.

As aflatoxinas podem afetar os metabolismos de carboidratos, lipídios e também dos ácidos nucleicos e das proteínas. Podem promover ainda carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, hepatotoxicidade, e aflatoxicoses (BRADBURN; COKER, 1993; ELLIS et al., 1991).

O impacto econômico resultante da contaminação por aflatoxina ocorre em duas etapas da produção vegetal e animal, comercialização e utilização dos produtos (KUBENA; HARVEY; PHILLIPS, 1990). A facilidade e frequência com que as aflatoxinas contaminam os produtos agrícolas, e ao mesmo tempo a exposição de animais a níveis crônicos destes compostos químicos, via dieta contaminada, podem ser as principais diferenças entre o lucro e o prejuízo para a atividade agroindustrial (HAMILTON, 1984; JONES; HAGLER; HAMILTON, 1982; NICHOLS, 1983).

A ingestão de alimentos contaminados com doses significativas de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ é classificada como carcinogênica para humanos (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER - IARC, 2002).

As aflatoxinas, substâncias lipofílicas e de baixo peso molecular, são quase totalmente absorvidas por difusão passiva no intestino, passando para a corrente sanguínea. No sangue cerca de 90% da AFB₁ liga-se à albumina e pequenos volumes são distribuídos para diversos tecidos. O metabolismo hepático é a principal rota de detoxificação. Entretanto, a mucosa do estômago e os microrganismos ruminais e entéricos possuem enzimas catalíticas capazes de reduzir a toxicidade da AFB₁ (GALTIER; ALVINERIE; CHARPENTEAU, 1991).

Após serem absorvidas, as aflatoxinas são biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). Estas enzimas, pertencentes à superfamília de enzimas do citocromo P-450, constituem parte do processo de detoxificação de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo. A

biotransformação da AFB₁, particularmente, tem sido estudada com maior interesse, uma vez que guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica (FORRESTER et al., 1990).

Tais toxinas causam alteração no metabolismo de carboidratos e prejudicam o transporte de lipídios, resultando em diminuição das concentrações de glicose e acúmulo de lipídios dentro dos hepatócitos (HEATHCOTE; HIBBERT, 1978; NABER; WALLACE, 1979; RODRICKS; STOLOFF, 1977; WOGAN, 1973).

Também podem se ligar com o DNA afetando a sua atividade, em alguns casos, na forma epóxido, se liga ao DNA impedindo a transcrição (CLIFFORD; REES, 1967). Pode-se ligar ainda ao RNA impedindo a síntese de proteínas, além de unir-se ao RNAm impedindo que a RNA polimerase faça reparos e com isso ocorrer a formação de células anormais (SMITH; MOSS, 1985).

A carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxicidade crônica das aflatoxinas. Esta capacidade tem sido demonstrada extensivamente, sobretudo em relação à AFB₁, em muitas espécies animais, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas (BUSBY; WOGAN, 1984).

Embora o fígado seja o alvo primário, em muitos casos, lesões cancerígenas foram observadas nos rins, cólon, pulmão e glândulas lacrimais de vários animais alimentados com rações contaminadas por aflatoxinas (STOLOFF, 1977).

Em animais, os sintomas clínicos mais comuns são: anorexia, diminuição dos ganhos de peso, diminuição da utilização do alimento ingerido, hemorragia e suscetibilidade ao meio ambiente, além do estresse por microrganismos (EDDS; BORTEL, 1983).

Segundo Barnes e Butler (1964), os ratos parecem ser em parte, resistentes à aflatoxina, uma vez que são capazes de sobreviver por um curto período experimental alimentando-se com uma dieta contendo altas concentrações de farelo tóxico. Entretanto, em investigação por período prolongado com ingestão, de cerca de 20% da dieta contaminada com a toxina, foram observadas reduções na taxa de crescimento dos animais e do consumo do alimento. Uma alimentação prolongada, de várias semanas, poderá originar lesões no fígado e hepatomas (LANCASTER et al., 1961).

2.4.3 Ocratoxinas

Também metabólitos secundários de fungos, as ocratoxinas foram primariamente isoladas de *Aspergillus ochraceus*, de onde se originou sua nomenclatura, porém são produzidas por mais de doze espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (SANTIN, 2000).

Erroneamente vários estudos mostraram que a ocratoxina A também era produzida por várias espécies desses dois gêneros (IARC, 1993). Uma comissão internacional utilizando estudos extensivos sobre metabólicos de *Penicillium* mostrou que a OTA é produzida por uma única espécie de *Penicillium*, *P. verrucosum* (IARC, 1993). Entre os *Aspergillus*, *A. ochraceus* é a mais importante espécie produtora de OTA; entretanto raras espécies no grupo dos *ochraceus*, incluindo *A. sclerotiorum*, *A. melleus*, *A. alliaceus* e *A. sulphureus*, também são produtores OTA (IARC, 1993). Sendo que entre as ocratoxinas, somente a OTA tem sido isolada em cereais (GIBSON et al., 1995).

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* IUPAC, *N*-[[[(3*R*)-5-Cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-7-isocromanil]carbonil]-3-fenil-L-alanina ou simplesmente Ocratoxina A pode ser encontrada em qualquer uma das fases de consumo de alguns alimentos, seja no campo, armazenamento,

transporte ou industrialização; basta que o fungo produtor, no caso *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* entre outros, encontre condições de temperatura, umidade, umidade relativa do ar e pH favoráveis (IARC, 1993).

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* ou Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, a OTA é classificada como nefrotóxica, hepatotóxica e com propriedades carcinogênicas para animais e possivelmente para humanos (IARC, 1993).

A ocratoxina A é absorvida pelo organismo animal em sua forma ionizada, por ser altamente solúvel em lipídeos, sofre absorção passiva no trato gastrointestinal. Sendo em seguida encaminhada ao fígado através da veia porta-hepática e após passar pela circulação sistêmica, sofre reabsorção ativa pelos túbulos proximais e distais dos rins (POHLAND; NESHEIM; FRIEDMAN, 1992).

Uma vez na corrente sanguínea, a ocratoxina é transportada ligada a proteínas séricas, principalmente a albumina, o que aumenta consideravelmente sua “meia-vida” (ÁLVARES et al., 2004). A “meia-vida” da OTA varia de acordo com a espécie, podendo chegar a até 840 h em macacos (GALTIER; ALVINERIE; CHARPENTEAU, 1991).

A OTA além de afetar a síntese proteica, interferindo com o RNA e DNA, também afeta o metabolismo de carboidratos, particularmente na gliconeogênese. A OTA interfere na síntese proteica por inibir de maneira competitiva a enzima fenilalanina-tRNA sintetase, devido a também possuir uma molécula de fenilalanina em sua composição, competindo assim com seu análogo na cadeia de aminoácidos durante a produção desta enzima (IARC, 1993). Pouco, além disso, a OTA causa um distúrbio na homeostase do cálcio, inibe a respiração mitocondrial e sua produção de ATP, diminuindo assim a formação da aminoacil-RNAt, outra enzima diretamente envolvida na síntese proteica (GENTLES et al., 1999).

A gliconeogênese é uma via especial para síntese de glicose em situações de jejum prolongado ou falta desse nutriente de forma exógena. Sendo que cerca de 90% desta via acontece no fígado e o restante nos rins, mas, em casos prolongados, os rins se tornam importantes produtores de glicose. Sua regulação é determinada pelos níveis séricos de glucagon e depende, certamente, da disponibilidade de substrato.

O substrato para que haja gliconeogênese é o piruvato, que durante todo o processo é primeiramente convertido em oxaloacetato pela piruvato carboxilase, que em seguida é convertido em fosfoenolpiruvato pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase, enzima que sofre interferência direta da OTA (IARC, 1993), e segue por uma série de reações até o produto final que é a glicose.

As concentrações sanguíneas de proteínas totais, albumina, ureia, colesterol, triglicérides, cálcio e fósforo inorgânico são diminuídas pela ação da OTA. E o aumento das concentrações de ureia e creatinina urinária são sinais de catabolismo proteico, diretamente ligado aos distúrbios metabólicos causados pela OTA (ÁLVARES et al., 2004).

As principais alterações observadas na administração de ocratoxina A em animais estão presentes nos rins, órgão alvo responsável por seu metabolismo, que se apresentam edemaciados e pálidos; sendo que o fígado pode também mostrar-se edemaciado (ÁLVARES et al., 2004).

Nos estudos histopatológicos, novamente as alterações mais proeminentes são vistas nos rins e fígado dos animais. Sob microscopia de luz, observa-se uma hipertrofia dos túbulos proximais dos rins e espessamento da membrana glomerular, podendo haver também material celular no lúmen dos túbulos renais. No fígado, a vacualização gordurosa é sinal de lesão primária, e um aumento dos níveis de glicogênio nos hepatócitos e periferia dos lóbulos hepáticos, possivelmente sinal do aumento dos níveis de glucagon (Santin,

2000). E por mais que a síntese de glicogênio seja normal, provavelmente haverá falhas na sua mobilização devido à ocratoxina A inibir as enzimas responsáveis pela ativação da fosforilase (ÁLVARES et al., 2004).

Um estudo realizado na Bulgária examinou 65 amostras de feijões e milho de pequenos produtores de áreas com grande incidência de Nefropatia Endêmica dos Balkans (BEN); uma doença tubulointersticial crônica de incidência lenta e progressiva que leva até a falência renal total; ela foi primeiramente descrita em dois países, Sérvia e Bulgária, em seguida vieram relatos de diversos países às margens do rio Danúbio, Bósnia, Croácia, Bulgária e Romênia, todos eles localizados nos Balkans; e 65 amostras de produtores de áreas não endêmicas, buscando contaminações por ocratoxina A. Como resultado observou-se que 16,7% das amostras de feijões das áreas endêmicas apresentavam alta contaminação por OTA (27µg/kg) e das amostras de milho 27,3%, enquanto nas áreas não endêmicas apenas 7,1% das amostras de feijões e 9,0% das de milho. Outro estudo também realizado nos Balkans mostrou que uma proporção significativa (26,7%) de 105 pacientes com tumores no trato urinário e/ou BEN apresentavam ocratoxina A em suas amostras de sangue (IARC, 1993).

2.5 Potencial do café

Cada dia aumenta a preocupação das pessoas com a qualidade de vida, a produção e o aproveitamento de alimentos saudáveis têm participação importante para o bem estar de pessoas e animais (BAPTISTA, 2005). É cada vez maior a consciência da população sobre a importância do consumo regular de alimentos contendo substâncias que auxiliam na promoção da saúde, proporcionando melhor estado nutricional, atuando na contramão e afetando positivamente a qualidade de vida moderna (MORAES; COLLA, 2006). Este

fato unido às recentes pesquisas realizadas com o café na área da saúde; apontando-o como um alimento nutricional e farmacêutico, capaz de incrementar a qualidade da vida humana e prevenir doenças; demonstram o grande potencial do produto em abraçar uma grande fatia desse mercado que tem cada vez mais espaço na mesa do consumidor. O conceito de alimento bioprotetor estimula o consumo e agrega valor de mercado ao café.

Durante muitos anos o café foi visto como um “vilão” e diante de todas as evidências disponíveis hoje, faz-se necessária ampla divulgação, a desmistificação, mostrando que na verdade o café é sim um “benfeitor” em relação à saúde humana. Justificam-se assim a realização deste e mais trabalhos, que visem esclarecer como atuam o café e seus componentes no organismo humano e animal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Apresentação do projeto

O presente projeto de pesquisa foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal do Centro Universitário de Lavras/Unilavras, protocolo CEP número: 108589 em 17/10/2006. A proposta do estudo foi avaliar o efeito bioprotetor do consumo de diferentes concentrações de compostos químicos presentes no café frente aos danos causados pelas micotoxinas: ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) em ratos Wistar. Dos compostos químicos presentes no café e tidos como possíveis bioprotetores, foram testados: o ácido cafeico, a cafeína, os ácidos clorogênicos e o cafestol.

Entre 2007 e 2008, ácido cafeico e cafeína foram testados frente à OTA e AFB1; durante este período foram feitas adequações metodológicas para melhor condução do estudo. O trabalho realizado neste período produziu um artigo original e oito resumos em congressos até a presente data.

A partir de 2009 foram realizados ensaios biológicos com ácidos clorogênicos e cafestol, um com cada uma das toxinas utilizadas, os quais têm seus resultados expressos neste trabalho.

3.2 Desenho experimental

Para melhor condução, os ensaios biológicos foram realizados separadamente, com cada combinação dos potenciais bioprotetores do café e micotoxinas utilizadas. Cada um foi conduzido utilizando 32 ratos Wistar jovens, machos, com peso inicial de aproximadamente 130g.

Cada ensaio teve duração de seis semanas e durante este período os animais foram mantidos em ambiente controlado, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, todos em gaiolas metabólicas individuais (Figuras 1 e 2), onde tinham acesso a alimentação controlada (15g/dia) e água “*ad libitum*”.

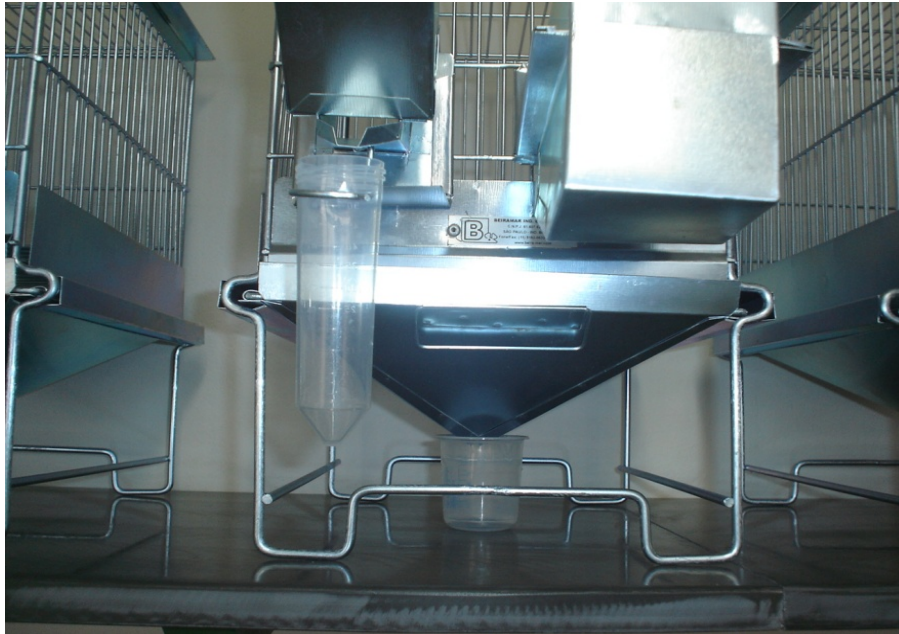


Figura 1 Gaiola metabólica



Figura 2 Rato Wistar em gaiola metabólica

3.2.1 Produção da ração

Durante todo experimento os animais foram alimentados com ração animal modificada, desenvolvida com o objetivo de adicionar o composto bioprotetor a ser testado em cada ensaio à dieta dos animais.

3.2.1.1 Formulação da ração

Inicialmente, a ração animal padrão para ratos de laboratório de nome comercial Nuvilab (produzida pela Nuvital Rações S.A.) foi moída e triturada em multiprocessador, até que resultasse em um pó fino. Em seguida a este pó foi adicionado fécula de mandioca, óleo de soja e água fervente com o devido composto bioprotetor, de acordo com as quantidades expressas na tabela 1. Técnica esta desenvolvida pelo próprio grupo de pesquisa e publicada por Oliveira et al. (2008).

Tabela 1 Ingredientes utilizados na produção da ração modificada

	Quantidades para 1000g de ração triturada
Fécula de Mandioca	135g
Óleo de soja	81 ml
Água + bioprotetor	810 ml

3.2.1.2 Adição dos bioprotetores

Foi definida a utilização de quatro concentrações (sendo uma delas zero) de cada um dos dois compostos químicos do café a serem testados. A Abic considera duas, quatro e seis xícaras de café/dia, como consumo baixo, médio e alto de café, respectivamente, isso para um humano adulto de 60kg. A Tabela 2 traz as quantidades de ácidos clorogênicos e cafestol presentes em cada uma destas doses.

Tabela 2 Quantidades de ácidos clorogênicos e cafestol (mg) presentes em xícaras de café e classificados de acordo com níveis de consumo por um humano adulto de 60Kg

Composto bioprotetor	Nível de Consumo		
	Baixo (2 xícaras/dia)	Médio (4 xícaras/dia)	Alto (6 xícaras/dia)
Ácidos clorogênicos	2.400	4.800	7.200
Cafestol	202	404	606

Fonte: Dias et al. (2009); Fernandes et al. (2001); Trugo et al. (2003)

Posteriormente, foi calculado o quanto de cada bioprotetor deveria estar presente na dieta diária para cada um desses níveis de consumo, não para um humano e sim para um rato com cerca de 130g (Tabela 3).

Tabela 3 Quantidades de ácidos clorogênicos e cafestol (mg) de acordo com consumo convertido de um humano adulto de 60Kg para um animal de 130g

Composto bioprotetor	Nível de Consumo		
	Baixo	Médio	Alto
Ácidos clorogênicos	5,20	10,40	15,60
Cafestol	0,43	0,86	1,29

Foram então quatro diferentes formulações de ração em cada ensaio biológico, cada um dos compostos químicos foi adicionado para que em cada 15g de ração seca, houvesse o correspondente ao consumo diário zero, baixo, médio e alto de café, agora adequado ao peso do animal. Cada bioprotetor foi diluído em água fervente e com ela adiciona a ração.

3.2.1.3 Modelagem e secagem

Após a mistura de todos os ingredientes e homogeneização da massa, a ração foi moldada em bastonetes e levada para secagem em estufa a 60 °C por 48 horas.

3.2.2 Tempo de exposição

Cada ensaio teve duração de seis semanas, período em que os animais receberam 15g/dia da ração com bioprotetor e somente nas quatro últimas semanas eles receberam uma das micotoxinas.

3.2.3 Ministração das micotoxinas

Para manipulação, tanto OTA quanto AFB1 foram diluídas em solução de benzeno/acetonitrila 2%. Durante o período de exposição, cada animal recebeu 50 nanogramas de toxina/dia. Procedimento realizado junto à Fundação Ezequiel Dias do Estado de Minas Gerais, pelo pesquisador Guilherme Prado.

Cada dose individual de toxina foi inoculada em 3g de leite em pó e levada para volatilização da solução de benzeno/acetonitrila em capela de exaustão de gases por 24 horas. Após volatilização cada 3g de leite em pó foi adicionado de 1,5ml de água destilada, e moldado de forma esférica e resfriada,

e oferecida aos animais diariamente (Figura 3). Os animais dos grupos que não consumiram toxina durante o experimento receberam exatamente o mesmo tratamento, mas a solução de benzeno/acetonitrila utilizada foi sem a adição de micotoxina. Esta técnica também foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa com trabalhos de café e saúde de pesquisa e publicada por Oliveira et al. (2008).



Figura 3 Animal ingerindo micotoxina

3.2.4 Denominação dos ensaios biológicos e grupos experimentais

Cada um dos ensaios biológicos foi desenvolvido com 32 animais divididos em 8 grupos com 4 animais cada.

A ração com diferentes quantidades de bioprotetor utilizada foi chamada de: controle, aquela com concentração zero de bioprotetor; 1%, aquela com concentração referente ao consumo baixo de café; 2%, aquela com concentração referente ao consumo médio de café; e 3%, para aquela com concentração referente ao alto consumo de café.

A Tabela 4 representa como foi denominado cada um dos ensaios biológicos segundo o bioprotetor e a micotoxina utilizada.

Tabela 4 Denominação dos ensaios segundo o bioprotetor e a toxina utilizados

Ensaio	Bioprotetor	Micotoxina
I	ácidos clorogênicos	aflatoxina B1
II	ácidos clorogênicos	ocratoxina A
III	cafestol	aflatoxina B1
IV	cafestol	ocratoxina A

3.2.5 Controle de peso

Os animais tiveram seu peso acompanhado, durante todo experimento foram feitas três pesagens por semana (Figuras 4).



Figura 4 Pesagem animal

3.2.6 Eutanásia e Necropsia

Ao final de cada ensaio, todos os ratos foram sacrificados de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.

Um a um os animais foram anestesiados com hidrato cloral (70 mg/ml na quantidade de 0,5 ml/100g de peso vivo) via intraperitoneal. Após alguns minutos e certificação da anestesia os animais passaram por tricotomia. Em seguida foi feita incisão ventral (aproximadamente 8 cm) para coleta do sangue, feita através de punção da artéria aorta e necropsia.



Figura 5 Necropsia

3.2.7 Exames bioquímicos

Após a coleta, o sangue de cada animal foi armazenado em tubo próprio e imediatamente encaminhado para realização de exames bioquímicos em laboratório credenciado. Foram pesquisados transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), creatinina e ureia sanguínea.

Ambos marcadores de catabolismo proteico, reação esperada quando há ingestão de micotoxinas.

3.2.8 Histopatologia

Rins, fígado, coração e pulmões foram as vísceras coletadas e armazenadas em solução de formaldeído 10% durante a necropsia. O Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras foi responsável pela realização de exames histopatológicos, onde uma equipe treinada avaliou a presença de tumores, lesões e microlesões.

3.2.9 Análise estatística

Foi feito um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), todos os dados encontrados foram tratados por Análise de Variância (ANAVA), num fatorial 4 X 2 (níveis de bioprotetor X presença ou não de toxina), sendo quatro repetições para cada tratamento, perfazendo um total de 32 animais para cada ensaio. Todos os animais utilizados eram irmãos ou meio-irmãos, filhos de um mesmo macho reprodutor com diferentes fêmeas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ganho de peso total

Bergès et al. (2004), relatam que o consumo de AFB1 por ratos Wistar interfere no crescimento e desenvolvimento dos animais. Ao final de dez semanas, animais que consumiram AFB1 apresentaram menor peso em relação aos animais que não consumiram. Resultados que corroboram os encontrados no Ensaio I (Tabela 5).

Tabela 5 Ganho de peso (g) médio dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I

Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
	Ausência			Presença		
Ácidos clorogênicos						
0	205,375 (± 5,083)	a	B	184,875 (± 5,083)	b	A
1	197,625 (± 5,083)	a	B	178,500 (± 5,083)	b	A
2	197,750 (± 5,083)	a	A	222,875 (± 5,083)	c	B
3	209,500 (± 5,083)	a	B	156,875 (± 5,083)	a	A

CV = 5,24

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Foi observado que os animais dos grupos negativos para o consumo de AFB1 não apresentaram diferença no ganho de peso, assim o consumo de ácidos clorogênicos por si só não causou alterações no ganho de peso. Ao tempo que os animais dos grupos positivos para o consumo de AFB1 apresentaram um padrão com diferenças significativas no seu ganho de peso. Os animais que consumiram a quantidade média de ácidos clorogênicos demonstraram ganho de peso superior aos demais, sendo essa talvez a concentração ideal que proteja contra os efeitos tóxicos desta toxina.

Álvarez et al. (2004) afirmam que a administração oral de OTA em ratos Wistar prejudica o desenvolvimento dos animais. Ao final do Ensaio II não

houve diferença estatística no ganho de peso dos animais que consumiram ou não OTA. Fato que sugere tempo insuficiente de exposição dos animais à toxina, já que mesmo aqueles que consumiram OTA e não consumiram ácidos clorogênicos não tiveram seu desenvolvimento prejudicado.

Tabela 6 Ganho de peso (g) médio dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II

Níveis de ¹	Ocratoxina A ²					
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença		
0		120,875 (± 5,808)	a	A	130,000 (± 5,808)	a A
1		136,625 (± 5,808)	a	A	126,250 (± 5,808)	a A
2		124,000 (± 5,808)	a	A	126,750 (± 5,808)	a A
3		131,125 (± 5,808)	a	A	124,000 (± 5,808)	a A

CV = 9,11

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Tabela 7 Ganho de peso (g) médio dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III

Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
	Cafestol	Ausência		Presença		
0		151,250 (± 4,261)	b	A	154,750 (± 4,261)	c A
1		132,375 (± 4,261)	a	A	138,750 (± 4,261)	b A
2		129,000 (± 4,261)	a	A	117,875 (± 4,261)	a A
3		138,375 (± 4,261)	a	A	135,000 (± 4,261)	b A

CV = 6,21

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Eaton e Gallagher (1994) definem AFB1 como uma micotoxina altamente hepatotóxica e hepatocarcinogênica em animais. Já Groopman, Cain e Kensler (1988) publicaram uma revisão crítica e demonstraram que seu consumo por seres humanos representa um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de fígado. No Ensaio III, dos animais que não receberam AFB1, os que consumiram cafestol ganharam mais peso em relação aos que não consumiram;

Huber et al. (1997), relatam que cafestol e caveol podem incrementar o metabolismo lipídico; o que pode ter levado aos resultados encontrados.

Tabela 8 Ganho de peso (g) médio dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV

Níveis de ¹ Cafestol	Ocratoxina A ²					
	Ausência			Presença		
0	190,875 (± 5,461)	a	B	167,750 (± 5,461)	a	A
1	182,750 (± 5,461)	a	A	180,375 (± 5,461)	b	A
2	189,000 (± 5,461)	a	B	165,125 (± 5,461)	a	A
3	182,750 (± 5,461)	a	A	183,375 (± 5,461)	b	A

CV = 6,06

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Observa-se que no Ensaio I, ácidos clorogênicos + AFB1 e no Ensaio IV, cafestol + OTA, de maneira geral, os animais do consumo negativo para toxina ganharam mais peso, demonstrando que ambas as toxinas podem prejudicar o desenvolvimento animal.

4.2 Peso do fígado

Observando os resultados do Ensaio I (Tabela 9) e principalmente do Ensaio II (Tabela 10) é possível ver que o consumo de ácidos clorogênicos fez com que o fígado dos animais apresentasse maior peso em relação aos não que consumiram os ácidos.

Tabela 9 Peso (g) médio do fígado dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I

Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença		
0	2,5350 (± 0,0598)	a	B	2,3150 (± 0,0598)	a	A
1	2,3600 (± 0,0598)	a	A	2,2725 (± 0,0598)	a	A
2	2,4300 (± 0,0598)	a	A	2,4000 (± 0,0598)	b	A
3	2,5075 (± 0,0598)	a	A	2,6125 (± 0,0598)	b	A
CV = 4,93						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Diversos estudos demonstraram que o consumo do café e/ou alguns de seus componentes atua de maneira positiva no controle glicêmico e no metabolismo lipídico em ratos (PARI; KARTHIKESAN; MENON, 2010; VAN DIJK et al., 2009).

Tabela 10 Peso (g) médio do fígado dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II

Níveis de ¹	Ocratoxina A ²					
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença		
0	2,8450 (± 0,0205)	a	A	2,8475 (± 0,0205)	a	A
1	2,9975 (± 0,0205)	b	B	2,9325 (± 0,0205)	b	A
2	2,9500 (± 0,0205)	b	A	2,9375 (± 0,0205)	b	A
3	2,9300 (± 0,0205)	b	A	2,9700 (± 0,0205)	b	A
CV = 4,42						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Cho et al. (2010) observaram que o consumo de ácidos clorogênicos por ratos Wistar atua melhorando níveis hormonais, o metabolismo lipídico e glicídico e diminuindo o peso e a quantidade de gordura visceral, que é em parte, responsável pela resistência à insulina. Lin et al. (2010) afirmam que um melhor metabolismo glicêmico pode resultar em menores níveis séricos de glicose e maior síntese de glicogênio muscular e principalmente hepático. Kraegen et al.

(2001) demonstram relação positiva entre o peso do fígado de animais e seu conteúdo de glicogênio. Assim é possível dizer que o maior peso deste órgão quando foram consumidos os ácidos clorogênicos é justificado pela melhora do metabolismo glicídico e maior acúmulo de glicogênio hepático.

As Tabelas 11 e 12 trazem o peso médio do fígado dos animais dos Ensaio III e IV, onde foi utilizado cafestol.

Tabela 11 Peso (g) médio do fígado dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III

Níveis de ¹ Cafestol	Aflatoxina B1 ²					
	Ausência			Presença		
0	3,5025 (± 0,0673)	a	B	3,3000 (± 0,0673)	a	A
1	3,5100 (± 0,0673)	a	A	3,3325 (± 0,0673)	a	A
2	3,3150 (± 0,0673)	a	A	3,4245 (± 0,0673)	a	A
3	3,4900 (± 0,0673)	a	A	3,4000 (± 0,0673)	a	A

CV = 3,95

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Tabela 12 Peso (g) médio do fígado dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV

Níveis de ¹ Cafestol	Ocratoxina A ²					
	Ausência			Presença		
0	3,3325 (± 0,0980)	a	A	3,4450 (± 0,0980)	a	A
1	3,4150 (± 0,0980)	a	A	3,4125 (± 0,0980)	a	A
2	3,4450 (± 0,0980)	a	A	3,4975 (± 0,0980)	a	A
3	3,5525 (± 0,0980)	a	A	3,5125 (± 0,0980)	a	A

CV = 5,69

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

É possível ver que o consumo de OTA não afetou o fígado dos animais, já que não há diferença entre os animais que tiveram o consumo zero de ácidos clorogênicos e cafestol. Já o consumo de AFB1 representa um importante fator de risco hepatocelular (EATON, 1994), nos Ensaio I e III, quando comparados

o consumo ou não da toxina, somente foi encontrada diferença nos níveis zero de bioprotetores. Pode-se assim dizer que ácidos clorogênicos e cafestol inibiram possíveis efeitos nocivos da AFB1 ao fígado dos animais.

4.3 Peso do coração

A Tabela 13 traz o peso médio do coração dos animais que foram expostos ao consumo de ácidos clorogênicos e AFB1.

Tabela 13 Peso (g) médio do coração dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I

Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença		
0		0,3100 (± 0,0072)	b	A	0,2950 (± 0,0072)	b A
1		0,2800 (± 0,0072)	a	A	0,2675 (± 0,0072)	a A
2		0,2775 (± 0,0072)	a	A	0,2900 (± 0,0072)	b A
3		0,3025 (± 0,0072)	b	A	0,2925 (± 0,0072)	b A
CV = 4,99						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Na Tabela 14 observa-se o peso médio do coração dos animais que foram expostos ao consumo de ácidos clorogênicos e OTA.

Tabela 14 Peso (g) médio do coração dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II

Níveis de ¹	Ocratoxina A ²					
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença		
0		0,3550 (± 0,0184)	a	A	0,3900 (± 0,0184)	a A
1		0,4125 (± 0,0184)	b	A	0,4325 (± 0,0184)	a A
2		0,5025 (± 0,0184)	c	B	0,4275 (± 0,0184)	a A
3		0,4675 (± 0,0184)	c	A	0,5025 (± 0,0184)	b A
CV = 5,79						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

É possível ver nos Ensaios I e II que os animais que não consumiram ácidos clorogênicos apresentaram corações de menor peso quando comparados aos animais que consumiram. Não há relação na literatura entre consumo de ácidos clorogênicos e peso do coração, mas sendo este um órgão formado por músculo estriado esquelético que armazena glicogênio entre suas miofibrilas, os benefícios do consumo de ácidos clorogênicos relatados por Cho et al. (2010) justificam os resultados encontrados.

As Tabelas 15 e 16 representam o peso médio do coração dos animais que foram expostos ao consumo de cafestol.

Tabela 15 Peso (g) médio do coração dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III

Níveis de ¹ Cafestol	Aflatoxina B1 ²					
	Ausência			Presença		
0	0,3175 (± 0,0061)	A	A	0,3150 (± 0,0061)	a	A
1	0,3225 (± 0,0061)	A	A	0,3100 (± 0,0061)	a	A
2	0,3225 (± 0,0061)	A	A	0,3375 (± 0,0061)	b	A
3	0,3175 (± 0,0061)	A	A	0,3375 (± 0,0061)	b	B

CV = 3,77

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Tabela 16 Peso (g) médio do coração dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV

Níveis de ¹ Cafestol	Ocratoxina A ²					
	Ausência			Presença		
0	0,3600 (± 0,0099)	A	A	0,3500 (± 0,0099)	a	A
1	0,3675 (± 0,0099)	A	A	0,3550 (± 0,0099)	a	A
2	0,3550 (± 0,0099)	A	A	0,3625 (± 0,0099)	a	A
3	0,3525 (± 0,0099)	A	A	0,3700 (± 0,0099)	a	A

CV = 5,52

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Também não há relação na literatura entre o consumo de cafestol e peso de coração. Os resultados encontrados demonstram tanto que não houve benefícios do consumo deste composto em relação ao órgão como que não houve prejuízos pelo consumo das toxinas.

4.4 Peso dos rins

A OTA possui conhecido potencial nefrotóxico, interferindo diretamente no ciclo de diversas enzimas responsáveis pela síntese proteica renal, entre outras funções (ÁLVARES et al., 2004). Enquanto lesões agudas de fígado podem afetar a absorção e a distribuição de aminoácidos para todo organismo, podendo afetar diretamente a síntese proteica em diferentes tecidos (VAIDYA; FERGUSON; BONVENTRE, 2008). É esperado que o consumo de AFB1 e OTA possa interferir de diferentes maneiras nos rins dos animais, as Tabelas 17 e 18 representam o peso médio dos rins dos animais que consumiram ácidos clorogênicos.

Tabela 17 Peso (g) médio dos rins dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I

Níveis de ¹ Ácidos clorogênicos	Aflatoxina B1 ²					
	Ausência		Presença			
0	0,7075 (± 0,0195)	a	A	0,7150 (± 0,0195)	a	A
1	0,6560 (± 0,0195)	a	A	0,6750 (± 0,0195)	a	A
2	0,6750 (± 0,0195)	a	A	0,7150 (± 0,0195)	a	A
3	0,6725 (± 0,0195)	a	A	0,7225 (± 0,0195)	a	B
CV = 5,65						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Tabela 18 Peso (g) médio dos rins dos animais submetidos a diferentes concentrações de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II

Níveis de ¹	Ocratoxina A ²					
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença		
0	0,6575 (± 0,0104)	a	A	0,6450 (± 0,0104)	a	A
1	0,6575 (± 0,0104)	a	A	0,6525 (± 0,0104)	a	A
2	0,6550 (± 0,0104)	a	A	0,6300 (± 0,0104)	a	A
3	0,6650 (± 0,0104)	a	A	0,6350 (± 0,0104)	a	A

CV = 5,96

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

As Tabelas 19 e 20 trazem o peso médio dos rins dos animais que consumiram cafestol.

Tabela 19 Peso (g) médio dos rins dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III

Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
	Cafestol	Ausência		Presença		
0	0,8525 (± 0,0147)	b	A	0,8300 (± 0,0147)	a	A
1	0,8625 (± 0,0147)	b	B	0,8150 (± 0,0147)	a	A
2	0,8100 (± 0,0147)	a	A	0,8375 (± 0,0147)	a	A
3	0,8250 (± 0,0147)	a	A	0,8600 (± 0,0147)	a	A

CV = 3,50

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Tabela 20 Peso (g) médio dos rins dos animais submetidos a diferentes concentrações de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV

Níveis de ¹	Ocratoxina A ²					
	Cafestol	Ausência		Presença		
0	0,7850 (± 5,461)	a	A	0,8050 (± 5,461)	a	A
1	0,7925 (± 5,461)	a	A	0,7950 (± 5,461)	a	A
2	0,8100 (± 5,461)	a	A	0,8075 (± 5,461)	a	A
3	0,7925 (± 5,461)	a	A	0,7950 (± 5,461)	a	A

CV = 5,44

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Não há relação na literatura entre peso de rins e o consumo de ácidos clorogênicos ou cafestol. Ao final dos ensaios, não houve diferença entre os animais que receberam os diferentes tratamentos, mesmo sendo esperado que o consumo de AFB1 e em especial o consumo de OTA interferisse diretamente nestes órgãos, o fato sugere possível tempo insuficiente de exposição.

4.5 Exames bioquímicos

Creatinina, ureia, TGO e TGP, são marcadores bioquímicos que quando alterados indicam algum tipo de estresse metabólico no organismo. Ao administrar micotoxinas, como OTA e AFB1, pela via oral em ratos, espera-se uma elevação nestes parâmetros de controle. A Tabela 21 traz os níveis considerados normais para ratos Wistar e as tabelas seguintes mostram os resultados encontrados durante os ensaios realizados.

Tabela 21 Valores de referência para sangue de ratos Wistar

Uréia	Creatinina	TGO	TGP
28 - 49 mg/dL	0,3 - 0,6 mg/dL	261 - 372 U/L	55 - 75 U/L

Adaptado de: Matsuzawa, Nomura & Unno; 1993

4.5.1 Creatinina

A creatinina sanguínea é um excelente indicador da função renal, determina a eficiência com que os rins eliminam a creatinina do sangue (LABES, 2010). Quando em condições normais, a creatinina produzida pelo catabolismo muscular de creatina é transportada no plasma e excretada na urina em até 24 horas, se o organismo apresenta uma taxa filtração glomerular ineficiente, os níveis de creatinina sanguínea se elevam; sinal de algum tipo de disfunção ou até lesão renal aguda (VAIDYA; FERGUSON; BONVENTRE, 2008). Assim para avaliar danos causados pelo consumo de micotoxinas,

principalmente OTA, a avaliação dos níveis séricos de creatina demonstra-se importante (Tabela 22).

Tabela 22 Níveis médios de creatinina no sangue (mg/dL) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos

Diferentes níveis de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I						
Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
Ácidos clorogênicos	Ausência			Presença		
0	0,4250 (± 0,0198)	a	A	0,4250 (± 0,0198)	a	A
1	0,4000 (± 0,0198)	a	A	0,4000 (± 0,0198)	a	A
2	0,4250 (± 0,0198)	a	A	0,3750 (± 0,0198)	a	A
3	0,4000 (± 0,0198)	a	A	0,3750 (± 0,0198)	a	A
CV = 9,81						
Diferentes níveis de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II						
Níveis de ¹	Ocratoxina A ²					
Ácidos clorogênicos	Ausência			Presença		
0	0,4250 (± 0,0190)	a	A	0,4250 (± 0,0190)	a	A
1	0,4000 (± 0,0190)	a	A	0,4000 (± 0,0190)	a	A
2	0,4250 (± 0,0190)	a	A	0,4000 (± 0,0190)	a	A
3	0,3750 (± 0,0190)	a	A	0,3750 (± 0,0190)	a	A
CV = 9,65						
Diferentes níveis de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III						
Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
Cafestol	Ausência			Presença		
0	0,4250 (± 0,0255)	a	A	0,4000 (± 0,0255)	a	A
1	0,4000 (± 0,0255)	a	A	0,4000 (± 0,0255)	a	A
2	0,4000 (± 0,0255)	a	A	0,4000 (± 0,0255)	a	A
3	0,3750 (± 0,0255)	a	A	0,3750 (± 0,0255)	a	A
CV = 12,86						
Diferentes níveis de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV						
Níveis de ¹	Ocratoxina A ²					
Cafestol	Ausência			Presença		
0	0,4250 (± 0,0234)	a	A	0,3750 (± 0,0234)	a	A
1	0,3750 (± 0,0234)	a	A	0,4000 (± 0,0234)	a	A
2	0,4250 (± 0,0234)	a	A	0,3750 (± 0,0234)	a	A
3	0,3750 (± 0,0234)	a	A	0,3750 (± 0,0234)	a	A
CV = 11,97						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Não houve diferença entre os tratamentos, com destaque para os ensaios II e IV onde foi utilizada OTA, as concentrações séricas de creatinina dentro da normalidade demonstram que não houve a ação esperada das micotoxinas; demonstram também; que o consumo de ácidos clorogênicos e cafestol não interferiu neste parâmetro.

4.5.2 Ureia

É através da ureia que o organismo humano, e também de ratos Wistar, elimina a amônia produzida pelo metabolismo, altamente tóxica ao organismo. Produzida pelos hepatócitos e excretado pelos rins, quando elevada, a concentração sanguínea de ureia indicada, disfunção hepática e/ou renal (LABES, 2010). O consumo de AFB1 e OTA pode lesar ambos os órgãos, o que faz da ureia sanguínea um importante parâmetro de controle (VAIDYA; FERGUSON; BONVENTRE, 2008). A Tabela 23 representa os níveis séricos de ureia dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

Tabela 23 Níveis médios de ureia no sangue (mg/dL) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos

Diferentes níveis de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I						
Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença		
0	43,250 (± 1,0078)	a	A	44,750 (± 1,0078)	a	A
1	44,000 (± 1,0078)	a	A	45,250 (± 1,0078)	a	A
2	43,750 (± 1,0078)	a	A	43,750 (± 1,0078)	a	A
3	45,250 (± 1,0078)	a	A	45,500 (± 1,0078)	a	A
CV = 4,54						

“continua”

Tabela 23 “conclusão”

Diferentes níveis de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II						
Níveis de ¹		Ocratoxina A ²				
Ácidos clorogênicos		Ausência		Presença		
0	42,750 (± 1,3665)	a	A	42,750 (± 1,3665)	a	A
1	43,750 (± 1,3665)	a	A	43,750 (± 1,3665)	a	A
2	40,750 (± 1,3665)	a	A	41,250 (± 1,3665)	a	A
3	42,750 (± 1,3665)	a	A	44,000 (± 1,3665)	a	A
CV = 6,40						
Diferentes níveis de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III						
Níveis de ¹		Aflatoxina B1 ²				
Cafestol		Ausência		Presença		
0	42,250 (± 1,1308)	a	A	42,250 (± 1,1308)	a	A
1	42,250 (± 1,1308)	a	A	45,000 (± 1,1308)	a	A
2	42,250 (± 1,1308)	a	A	42,000 (± 1,1308)	a	A
3	43,500 (± 1,1308)	a	A	45,250 (± 1,1308)	a	A
CV = 5,17						
Diferentes níveis de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV						
Níveis de ¹		Ocratoxina A ²				
Cafestol		Ausência		Presença		
0	43,250 (± 1,4280)	a	A	44,750 (± 1,4280)	a	A
1	44,750 (± 1,4280)	a	A	43,500 (± 1,4280)	a	A
2	45,250 (± 1,4280)	a	A	45,000 (± 1,4280)	a	A
3	43,250 (± 1,4280)	a	A	45,500 (± 1,4280)	a	A
CV = 6,43						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Assim como a creatinina, os níveis sanguíneos de ureia não apresentaram diferença entre os tratamentos e se mantiveram dentro dos padrões de normalidade, demonstrando que não houve danos causados pelo consumo das micotoxinas ou do consumo de ácidos clorogênicos e cafestol.

4.5.3 Transaminase Glutâmico Oxalacética

TGO é uma das duas enzimas que catalisam a conversão da porção nitrogenada do aminoácido alanina para seu resíduo de aminoácido. Encontrada

no citoplasma e mitocôndrias de muitas células, primariamente, no fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e hemácias (LABES, 2010). Os níveis séricos de TGO auxiliam na detecção e diagnóstico diferencial de doença hepática aguda e também a monitorar o progresso do paciente e o prognóstico em doenças cardíacas e hepáticas (HUANG et al., 2006). Segundo relata Eaton (1994) o consumo de AFB1 representa um importante risco hepatocelular, portanto, o esperado seria a elevação dos níveis séricos de TGO nos animais que foram expostos a esta toxina. A Tabela 24 representa os níveis séricos de TGO dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

Tabela 24 Níveis médios de TGO no sangue (U/L) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos

Diferentes níveis de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I						
Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença		
0	298,00 (± 4,7912)	a	A	305,00 (± 4,7912)	a	A
1	292,00 (± 4,7912)	a	A	309,50 (± 4,7912)	a	B
2	294,75 (± 4,7912)	a	A	301,00 (± 4,7912)	a	A
3	307,50 (± 4,7912)	a	A	298,50 (± 4,7912)	a	A
CV = 3,19						
Diferentes níveis de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II						
Níveis de ¹	Ocratoxina A ²					
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença		
0	281,50 (± 7,2410)	a	A	304,75 (± 7,2410)	a	B
1	293,00 (± 7,2410)	a	A	301,50 (± 7,2410)	a	A
2	300,50 (± 7,2410)	a	A	301,00 (± 7,2410)	a	A
3	283,50 (± 7,2410)	a	A	303,25 (± 7,2410)	a	A
CV = 4,89						

“continua”

Tabela 24 “conclusão”

Diferentes níveis de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III						
Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²					
Cafestol	Ausência			Presença		
0	301,00 (± 5,3641)	a	A	304,25 (± 5,3641)	a	A
1	296,50 (± 5,3641)	a	A	310,75 (± 5,3641)	a	A
2	294,50 (± 5,3641)	a	A	299,50 (± 5,3641)	a	A
3	305,50 (± 5,3641)	a	A	300,25 (± 5,3641)	a	A
CV = 3,56						
Diferentes níveis de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV						
Níveis de ¹	Ocratoxina A ²					
Cafestol	Ausência			Presença		
0	295,50 (± 4,9943)	a	A	294,25 (± 4,9943)	a	A
1	290,50 (± 4,9943)	a	A	299,25 (± 4,9943)	a	A
2	298,25 (± 4,9943)	a	A	297,75 (± 4,9943)	a	A
3	294,25 (± 4,9943)	a	A	296,75 (± 4,9943)	a	A
CV = 3,38						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Novamente não houve diferença entre os tratamentos, demonstrando segurança no consumo de ácidos clorogênicos e cafestol nas doses estudadas. Quanto ao efeito das micotoxinas, pouco tempo de exposição e/ou baixa dose de consumo são hipóteses viáveis diante dos resultados.

4.5.4 Transaminase Glutâmico Pirúvica

TGP, a segunda das duas enzimas que catalisam uma reação de transferência de grupo amina reversível no ciclo de Krebs, aparece, primariamente, em citoplasma hepatocelular, com quantidades menores nos rins, coração e músculos esqueléticos e é um indicador de comprometimento hepatocelular agudo (LABES, 2010). Sua medição tem como objetivo detectar e avaliar o tratamento de doença hepática aguda, especialmente hepatite ou cirrose sem icterícia, distinguir entre comprometimento tecidual miocárdico e hepático,

além de avaliar a hepatotoxicidade de algumas substâncias (Huang et al., 2006). A Tabela 23 representa os níveis séricos de TGP dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

Tabela 25 Níveis médios de TGP no sangue (U/L) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos

Diferentes níveis de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de AFB1: Ensaio I					
Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²				
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença	
0	71,000 (± 1,6638)	a	A	68,250 (± 1,6638)	a A
1	71,500 (± 1,6638)	a	A	72,500 (± 1,6638)	a A
2	70,250 (± 1,6638)	a	A	69,750 (± 1,6638)	a A
3	69,750 (± 1,6638)	a	A	69,750 (± 1,6638)	a A
CV = 4,73					
Diferentes níveis de ácidos clorogênicos em ausência ou presença de OTA: Ensaio II					
Níveis de ¹	Ocratoxina A ²				
	Ácidos clorogênicos	Ausência		Presença	
0	68,500 (± 1,8435)	a	A	69,500 (± 1,8435)	a A
1	68,000 (± 1,8435)	a	A	69,000 (± 1,8435)	a A
2	68,250 (± 1,8435)	a	A	69,000 (± 1,8435)	a A
3	68,750 (± 1,8435)	a	A	70,750 (± 1,8435)	a A
CV = 5,37					
Diferentes níveis de cafestol em ausência ou presença de AFB1: Ensaio III					
Níveis de ¹	Aflatoxina B1 ²				
	Cafestol	Ausência		Presença	
0	71,250 (± 1,6607)	a	A	69,750 (± 1,6607)	a A
1	71,750 (± 1,6607)	a	A	69,500 (± 1,6607)	a A
2	70,000 (± 1,6607)	a	A	72,500 (± 1,6607)	a A
3	68,250 (± 1,6607)	a	A	70,000 (± 1,6607)	a A
CV = 4,72					

“continua”

Tabela 25 “conclusão”

Diferentes níveis de cafestol em ausência ou presença de OTA: Ensaio IV						
Níveis de ¹ Cafestol	Ocratoxina A ²					
	Ausência			Presença		
0	70,250 (± 1,6739)	a	A	69,500 (± 1,6739)	a	A
1	70,500 (± 1,6739)	a	A	67,500 (± 1,6739)	a	A
2	69,250 (± 1,6739)	a	A	68,500 (± 1,6739)	a	A
3	69,250 (± 1,6739)	a	A	68,250 (± 1,6739)	a	A

CV = 4,84

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott (1) e T de Student (2) a nível de 5% de probabilidade

Os resultados dos exames TGP, assim como os demais realizados ao final do experimento estavam todos dentro dos parâmetros normais, e mesmo dentro da normalidade não foi observada nenhuma tendência ou comportamento que indicasse a ação esperada das micotoxinas e demonstra segurança no consumo de ácidos clorogênicos e cafestol.

4.6 Histopatologia

Não foi dado nenhum laudo conclusivo que indicasse alterações decorrentes do consumo de AFB1 e OTA nos órgãos coletados. Provavelmente, por um período de exposição insuficiente dos animais às micotoxinas.

5 CONCLUSÃO

O consumo de ácidos clorogênicos promoveu um aumento no peso dos animais e também no peso de fígado e coração, fato justificável devido aos seus benefícios, relacionados na literatura, ao metabolismo glicídico e aumento no acúmulo de glicogênio.

A ausência da diferença encontrada nos exames bioquímicos, todos dentro dos padrões de normalidade, e aos resultados negativos da histopatologia sugerem tempo de exposição e/ou dosagem insuficiente de toxina durante o experimento. Como também demonstram que o consumo de ácidos clorogênicos e cafestol é seguro e não causou problemas ao organismo dos animais nas dosagens testadas.

Assim, não foi observada bioproteção dos ácidos clorogênicos ou cafestol frente aos efeitos das micotoxinas AFB1 e OTA.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi observada uma ótima aceitação dos animais a todos os procedimentos utilizados, inclusive à metodologia não encontrada na literatura e desenvolvida para os ensaios; como a administração das toxinas juntamente ao leite em pó e a formulação da ração para adição dos ácidos clorogênicos e cafestol.

Sugerimos que futuros ensaios envolvendo o consumo de AFB1 e OTA por ratos Wistar sejam estendidos por um maior período para uma observação e comparação efetiva de seus efeitos nocivos frente a possíveis compostos bioprotetores.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n° 274 de 15 de outubro de 2002. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, de 16 out. 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: fev. 2011.

ÁLVAREZ, L. et al. Immunotoxic effects of Ochratoxin A in wistar rats after oral administration. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, p. 825-834, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Café e saúde**. Disponível em: <www.abic.com.br>. Acesso em: fev. 2011.

BAPTISTA, A. P. **Saccharomyces cerevisiae na redução de aflatoxicoses e o efeito na distribuição na excreção da radioatividade de AFB13H em ratos**. São Paulo: USP, 2005.

BARNES, J. M.; BUTLER, W. H. Carcinogenesis activity of aflatoxina in rats. **Nature**, London, v. 202, n. 493, p. 1016, 1964.

BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BERTAIL, P.; TRESSOU, J. Incomplete generalized *U*-Statistics for food risk assessment. **Biometrics**, Washington, v. 62, p. 66-74, Mar. 2006.

BORN, M. et al. Electrochemical behaviour and antioxidant activity of some natural polyphenols. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 79, p. 1147-1158, 1996.

BRADBURN, N.; COKER, R. D. Aflatoxin contamination in maize. **Tropical Science**, London, v. 33, n. 44, p. 418-428, 1993.

BUSBY, W. F.; WOGAN, G. N. Aflatoxins. In: SEARLE, C. E. (Ed.). **Chemical carcinogens**. 2nd ed. Washington: American Chemical Society, 1984. v. 2, p. 945-1136.

CAVIN, C. et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, n. 40, p. 1155-1163, 2002.

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, MG, n. 3, p. 50-53, 2000.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee: chemistry**. 2. ed. New York: Elsevier, 1989. p. 305.

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos em rações: biologia, ocorrência e controle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1., 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: [s. n.], p. 15-20, 1995.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC, 1991. p.103-143.

CRUZ, L. C. H. Características gerais das micotoxinas e micotoxicozes. reflexos na indústria avícola. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1., Curitiba. **Anais...** Curitiba: [s. n.], 1995. p. 1-14.

DAGLIA, M. et al. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 48, p. 1449-1454, 2000.

DÓREA, J. D.; COSTA, T. H. M. Is coffee a functional food? *British Journal of nutrition*, London, v. 93, p. 773-782, 2005.

EATON, D. L.; GALLAGHER, E. P. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Portland, v. 34, p. 135-172, 1994.

EDDS, G. T.; BORTELL, R. A. **Biological effects of aflatoxins**: poltry aflatoxina and *Aspergillus flavus* in corn. Alabama: Agricultural Experiment Station, 1983. p. 64-66. (Bulletin of the Alabama Agricultural Experiment Station).

ELLIS, W. O. et al. Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 30, n. 4, p. 403-439, 1991.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 663 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn**. Roma, 1993. p. 75.

FORRESTER, L. M. et al. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B₁ metabolism in human liver. **Proceedings of the national academy of sciences**, Washington, v. 87, p. 8306-8310, 1990.

FORTNUM, B. A. Effect of environment on aflatoxina development in preharvest maize. In: WORKSHOP ON AFLATOXIN IN MAIZE, 1., 1986, El Batan. **Proceedings...** El Batan: CIMMYT, 1986. p.145-151.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in mycology**, Utrecht, v. 50, p. 23-43, 2004.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Mycotoxin production by food-born fungi. In: SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-borne fungi**. Dordrecht: [s. n.], 1996. cap. 4, p. 251.

GALTIER, P. M.; ALVINERIE, M.; CHARPENTEAU, J. L. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. **Food Cosmetic Toxicology**, Amsterdam, v. 19, p. 735-738, 1991.

GENTLES, A. et al. Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. **Poultry Science**, College Station, v. 78, p. 1380-1384, 1999.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

GERSHBEIN, L. L. Action of dietary trypsin, pressed coffee oil, silymarin and iron salt on 1,2-dimethylhydrazine tumorigenesis by gavage. **Anticancer Research**, Athens, v. 14, p. 1113-1116, 1994.

GIBSON, R. M. et al. Impact of L-phenylalanine supplementation on the performance of three-week-old broilers fed diets containing ochratoxin A. Effects on body weight, feed conversion, relative organ weight, and mortality. **Poultry Science**, College Station, v. 69, p. 414-419, 1995.

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

GROOPMAN, J. D.; CAIN, L. G.; KENSLER, T. W. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 19, p. 113-145, 1988.

HAMILTON, P. B. Determining safe concentrations of mycotoxins. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 47, n. 7, p. 570-575, 1984.

HEATHCOTE, J. G. Aflatoxins and related toxins. In: BETINA, V. (Ed.). **Mycotoxins: production, isolation, separation and purification**. Amsterdam: Elsevier, 1984. p. 89-130.

HEATHCOTE, J. G.; HIBBERT, J. R. **Aflatoxins: chemical and biological aspects**. New York: Elsevier Science, 1978.

HUBER, W. W. et al. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol(4,5) pyridine (PhIP) in the rat. **Mutation Research**, Amsterdam, n. 1, p. 115-122, 1997.

INOUE, M.; TAJIMA, K. Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers: data from a comparative case-referent study in Japan. **Cancer Causes and Control**, Oxford, v. 9, p. 209-216, 1998.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Weight control and physical activity. Lyon, 2002. v. 6.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Ochratoxin A. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, Lyon, v. 56, p. 489-521, 1993.

JONES, F. T.; HAGLER, W. M.; HAMILTON, P. B. Association of low concentrations of aflatoxina in feeds with productivity losses in commercial broiler operations. **Poultry Science**, Ithaca, v. 61, n. 5, p. 861-868, 1982.

KASAI, H. et al. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in a rat carcinogenesis model. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, p. 467–471, 2000.

KUBENA, L. E.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; et al. Diminution of aflatoxicoses in growing chickens by dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Poultry Science**, Ithaca, v. 69, p. 727-735, 1990.

LAM, L. K. T.; SPARNINS, V. L.; WATTENBERG, L.W. Isolation and identification of kahwcol and cafestol palmitic as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione s-transferase activity in the mouse. **Cancer Research**, Baltimore, v. 42, p. 1193-1198, 1982.

LARANJINHA, J.A.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 48, p. 487–494, 1994.

LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association Official Analytical Chemists**, Washington, v. 57, n. 4, p. 866-870, 1974.

MILLER, E. G. et al. Inhibition of oral carcinogenesis by roasted beans and roasted coffee beans fractions. In: ASSOCIATION SCIENTIFIC INTERNATIONAL DU CAFÉ, 15., 1993, Paris. **Anais...** Paris: ASCI, 1993. p. 420-425.

MULCAHY, R. T. et al. Constitutive and B-naphthoflavone-induced expression of the human γ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response elements/TRE sequence. **Chemistry**, Weinheim, v. 272, p. 7445-7454, 1997.

NABER, E. C.; WALLACE, H. D. Interactions of mycotoxins in animal production. Washington: **National Academic Science**, 1979. p. 3-76.

NICHOLS, T. E. Economic effects of aflatoxina in corn. In: DIENER, R.; ASQUITH, R.; DICKENS, J. (Ed.). **Aflatoxin and Aspergillus falvus in corn**. Alabama: Auburn University, 1983. p. 67-71.

NISHI, M. et al. Dose response relationship between coffee and the risk of pancreas cancer. **Japanese Journal of Oncology**, Tokio, v. 26, p. 42-48, 1996.

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**, London, v. 3, p-161-166, 1986.

NKONDJOCK, A. Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. **Cancer Letters**, Virgínia, v. 277, p. 121-125, 2008.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 417-424, ago. 1997.

OLIVEIRA, R. M. E. et al. Efeito bioprotetor do ácido cafeico sobre danos causados pela ocratoxina A em ratos. **Revista Universidade Rural**, Seropédica, v. 28, p.95-97, 2008.

OLTHOF, M. R. et al. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p. 532-538, 2001.

PITT, J. I. Toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 1, n. 38, p. 17-22, 2000.

POHLAND, A. E.; NESHEIM, S.; FRIEDMAN, L. Ochratoxin A: a review. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 64, n. 7, p. 1029-1046, 1992.

PRESTERA, T. et al. Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemioprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). **Molecular Medicine**, New York, n. 1, p. 827-837, 1995.

RODRICKS, J. V.; STOLOFF, L. Aflatoxins residues from contaminated Feed in edible tissues of food-producing animals. In: RODRICKS, J. V. C.; HESSELTINE, W.; MEHLMAN, M. A. (Ed.) **Mycotoxins in human and animal health**. Illinois: Park Forest South, 1977. p. 67-69.

SANTIN, E. **Aspectos clínicos, patológicos, bioquímicos e zootécnicos em frangos de corte inoculados experimentalmente com ocratoxina A e vacinados contra a Doença de Newcastle. Emprego do aluminossilicato como adsorvente de micotoxina**. 2000. 94 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

- SCHILTER, B.; HOLZHACUSER, D.; CAVIN, C. Health benefits of coffee. **Proceedings of the 19th** In: ITNTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 19., 2001, Trieste. **Anais...** Trieste: ASCI, 2001. p. 14-18.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p. 144.
- SILVA, M. S. et al. Os efeitos da cafeína relacionados à atividade física: uma revisão. **Revista digital Buenos Aires**, Buenos Aires, v. 9, n. 66, nov. 2003.
- SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins: formation, analysis and significance**. Chichester: J. Wiley, 1985. p. 148.
- SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.
- STOLOFF, L. Aflatoxin: a overview. In: RODRICKS, J. V. C.; HESSESTINE, W.; MEHLMAN, M. A. (Ed.). **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Patholox, 1977. p. 7-28.
- TANAKA, T.; KOJIMA, T.; KAWAMORI, T. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxideinduced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 14, n. 7, p. 321-325, July 1993.
- URGERT, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 17, p. 305-324, 1997.
- VIANI, R. Fate of ochratoxin A (OTA) during processing of coffee. **Food additives and contaminants**, London, v. 13, p. 29-33, 1996. Supl.
- WOGAN, G. N. Aflatoxin carcinogenesis. **Methods Cancer Research**, Baltimore, v. 7, p. 303-344, 1973.