

ÁCIDO CAFEICO COMO AGENTE BIOPROTETOR DE DANOS CAUSADOS PELA OCRATOXINA A EM RATOS WISTAR

Patrícia F.P.Goulart², Roseane M.E. Oliveira³, Carlos J. Pimenta⁴, Sara Maria Chalfoun⁵, Dallyane F.A. Soares⁶, Marcelo Cláudio Pereira⁷.

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

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

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

5 -Graduação (Inic. científica)Nutrição - Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS

6 -Doutor em Ciência dos Alimentos /UFLA /Bolsista/CBP&D/Café

RESUMO - Micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes da atividade metabólica de fungos que se desenvolvem em alimentos e em produtos agrícolas. As principais micotoxinas encontradas em produtos alimentares são a aflatoxina e a ocratoxina. Café tem sido conhecido como um produto quimioprotetor, reduzindo o risco de câncer, porque contém, naturalmente em sua composição, substâncias antioxidantes, anticarcinogênicas e antiteratogênicas. Este estudo objetivou avaliar mediante testes in vivo, o efeito bioprotetor do ácido cafeico em danos causados pela ocratoxina A em ratos. Os bioensaios foram conduzidos com ratos Wistar recém desmamados, em grupos de quatro animais acondicionados em gaiolas metabólicas. Durante quinze dias antes da ministração dos tratamentos, os animais tiveram acesso à dieta padrão e água potável *ad libitum*. Após este período, os animais receberam rações com diferentes combinações de cafeína e ocratoxina que constituíram oito tratamentos: (T), sendo: T1- Controle; T2 – Ácido cafeico 0,5% + ração; T 3 – Ácido cafeico 1,0% + ração; T4 – Ácido cafeico 1,5% + ração; T 5 – OTA + ração; T 6 – OTA + ácido cafeico 0,5% + ração; T 7 – OTA + ácido cafeico 1,0% + ração; T8 – OTA + ácido cafeico 1,5% + ração. Os animais foram pesados diariamente e no 42º dia do experimento o foram sacrificados e necropsiados. O sangue e a urina foram coletados para as dosagens de uréia e creatinina enquanto o fígado, rins e coração foram destinados para análise histopatológica. Os exames visuais revelaram uma acentuada perda de pêlos na segunda e terceira semana de tratamento nos grupos que ingeriram Ocratoxina A (OTA), e a análise de crescimento mostrou que houve um ganho crescente de peso em todos os animais, sendo que o maior ganho foi observado no grupo controle (T1) e o menor ganho de peso no grupo que ingeriu OTA + ácido cafeico 1,0% + ração (T7). Já em relação a creatinina na urina, o grupo T5, que ingeriu ocratoxina, apresentou maior nível, indicando que o ácido cafeico protegeu os demais grupos que receberam os tratamentos T6, T7 e T8. Não houve alterações anatomopatológicas em nenhum dos órgãos examinados. A análise conjunta dos dados mostra que ácido cafeico foi capaz de proteger os grupos que ingeriram ocratoxina A.

Palavra chaves: Café, Micotoxinas, Exames clínicos

CAFFEIC ACID AS BIOPROTETOR AGENT FOR DAMAGES CAUSED BY OCHRATOXIN A IN RATS

ABSTRACT: Mycotoxins are toxic substances resulting from the metabolic activity of fungi that develop in food and agricultural products. The major mycotoxins founded in food products are aflatoxin and ochratoxin (OTA). Coffee has been listed as chemical protector product, reducing risk of cancer, because it contain naturally in its composition, antioxidant substances, anticarcinogenics and antiteratogenicity. This study aimed to evaluate by tests in vivo the protective effect of caffeic acid on damages caused by ochratoxin A in rats. The biological tests were performed with rats newly weaned, wrapped in metabolic cages. The diets were (20 gr/day) ration inoculated with ochratoxin A and caffeic acid, comprising the following treatments: Ration plus 1. caffeic acid 0.5%; 2. caffeic acid 1.0%; 3. caffeic acid 1.5%; 4. OTA; 5. caffeic acid 0.5% + OTA; 6. caffeic acid 1.0% + OTA; 7. caffeic acid 1.5% + OTA and 8. control (only original ration). At the end of the experiment, blood and urine were collected for determination of urea and creatinine as the liver, kidneys and heart were used for histopathological analysis. The visual examination revealed a marked loss of hair in the second and third week of treatment in the groups that ingested ochratoxin A (OTA), and analysis of growth showed that there was an increasing weight gain in

all animals, with the largest gain was observed in the control group (T1) and lower weight gain in the group that ingested caffeic acid OTA + diet + 1.0% (T7). In relation to creatinine in urine, the T5 group that ingested ochratoxin, showed higher level, indicating that the caffeic acid protected the other groups that received the treatments T6, T7 and T8. There were no pathological changes in any of the organs examined. A analysis of the data shows that caffeic acid was able to protect the groups that ingested ochratoxin A.

KEYWORDS: coffee, chemical protector, ochratoxin A.

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabolitos secundários de fungos filamentosos e são tóxicas ao homem e animais em pequenas concentrações. Estima-se atualmente que 25% dos produtos agrícolas estejam contaminados com micotoxinas acarretando grandes perdas econômicas aos países produtores e colocando em risco a saúde dos consumidores. A ocratoxina A é a micotoxina de maior interesse para a cafeicultura brasileira e mundial. Esta toxina apresenta propriedades carcinogênicas, teratogênica, nefrotóxica, hepatóxica e mais recentemente comprovado o efeito imunossupressivo (Kuiper-Goodman, 1996).

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). 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 sequência, 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.

Vários estudos epidemiológicos têm sido realizados a fim de investigar relação entre consumo de café e incidência de câncer. De acordo com vários autores, 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 (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).

Os grãos da espécie *Coffea arabica* L após processados pela torrefação possuem em sua composição química compostos com propriedade antibacterianas, atuando sobre bactérias causadoras de cárie (Daglia et al 1998), compostos com ação antifúngica e fungistática como a cafeína e ácido cafêico (Buchanan et al. 1983), compostos com ação antioxidantes, podendo ser utilizados na indústria de alimentos (Atroshi et al, 2002), ácidos clorogênicos e cafêico que inibem a oxidação do LDL (Low Density Lipids) *in vitro* e podem conseqüentemente proteger contra doenças cardiovasculares (Olthof et al. 2001); compostos anticarcinogênicos, prevenindo a formação de câncer por substâncias tóxicas (Cavin et al, 2002).

Os ácidos clorogênicos constituem os principais compostos fenólicos do café, os quais são importantes para o sabor e aroma da bebida. A fração absorvida do ácido clorogênico e do ácido cafêico é suficiente para exercer ação protetora e antioxidante (Born et al., 1996; Daglia et al., 2000).

Durante a torrefação além das alterações que ocorrem, novos compostos são formados como o ácido cafêico e ácido nicotínico, como resultado das reações que ocorrem entre os compostos fenólicos e carboidratos. Segundo Daglia et al. (1994) a concentração do ácido 5-cafeoilquínico diminui conforme o grau de torrefação, o mesmo acontece com o ácido nicotínico, trigonelina e cafeína tanto para a espécie *C. arabica* como *C. canephora*. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar mediante testes *in vivo*, o efeito bioprotetor do ácido cafeico em danos causados pela ocratoxina A em ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Experimentação Animal do Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS, e o protocolo experimental, seguiu os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O experimento foi realizado no Laboratório de Experimentação Animal do Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS. Foram utilizados 24 ratos Wistar, oriundos de sete 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), sendo: (T1)- Controle; (T2) – Ácido cafeico 0,5% + ração; (T3) – Ácido cafeico 1,0% + ração; (T4) – Ácido cafeico 1,5% + ração; (T5) – OTA + ração; (T6) – OTA + ácido cafeico 0,5% + ração; (T7) – OTA + ácido cafeico 1,0% + ração; (T8) – OTA + ácido cafeico 1,5% + ração. A ocratoxina A foi inoculada na dieta por aspersão (20gr/ração/dia) nas dosagens de 14ng/kg de peso corpóreo/dia durante 6 semanas e o ácido cafeico nas doses de 0,5%, 1% e 1,5% foi ministrado homogeneizado com 6 gramas de leite em pó. Os animais foram pesados diariamente, além da observância de alteração do pêlo. No 42º dia do experimento, os animais foram conduzidos para o Laboratório de Patologia do Departamento de Veterinária da UFLA, onde coletou-se sangue e urina para as dosagens de uréia e creatinina, sendo sacrificados e necropsiados. Seus órgãos (fígado, rins, coração), foram destinados para confecções de lâminas para análise histopatológica. Os exames clínicos foram conduzidos no Laboratório de Análises Clínicas Santa Cecília, em Lavras-MG. Os dados percentuais obtidos foram comparados pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se um crescente ganho de peso em todos os animais, sendo que o maior ganho foi observado no grupo controle (T1) e o menor ganho de peso no grupo que ingeriu OTA + ácido cafeico 1,0% + ração (Figura 1). Através de exames visuais notou-se perda de pêlos na segunda e terceira semana de tratamento nos grupos que ingeriram Ocratoxina A (OTA). Com relação aos resultados dos exames clínicos observou-se que nas análises: creatinina no sangue (S) e uréia no sangue e na urina (U), não houve diferença significativa entre os tratamentos. Já em relação a creatinina na urina, o grupo T5 que ingeriu ocratoxina apresentou maior nível, indicando que o ácido cafeico protegeu os demais grupos (T6, T7 e T8) (Tabela 1). Não houve alterações anatomopatológicas em nenhum dos órgãos examinados. Na continuidade dos estudos outras doses e metodologias de administração serão testadas, visando a manifestação aguda dos efeitos da ingestão de OTA. De acordo com Lafay et al 2006, tanto os metabolitos de ácido cafeico quanto dos outros fenolicos componentes do café, são absorvidos ou hidrolizados no intestino delgado. Quando um percentual maior é hidrolizado ao invés de ser absorvido, pode-se sugerir que seus efeitos bioprotetores fiquem minimizados, e assim ocorrer a alteração de alguns parametros sanguíneos. De acordo com Chalfoun et al. (2000), o ácido cafeico teve pequeno efeito sobre o crescimento micelial e esporulação do fungo *A.ochraceus* e não inibiu a síntese de OTA, estimulando-as nas concentrações 0,25%; 0,50% e 0,75%.

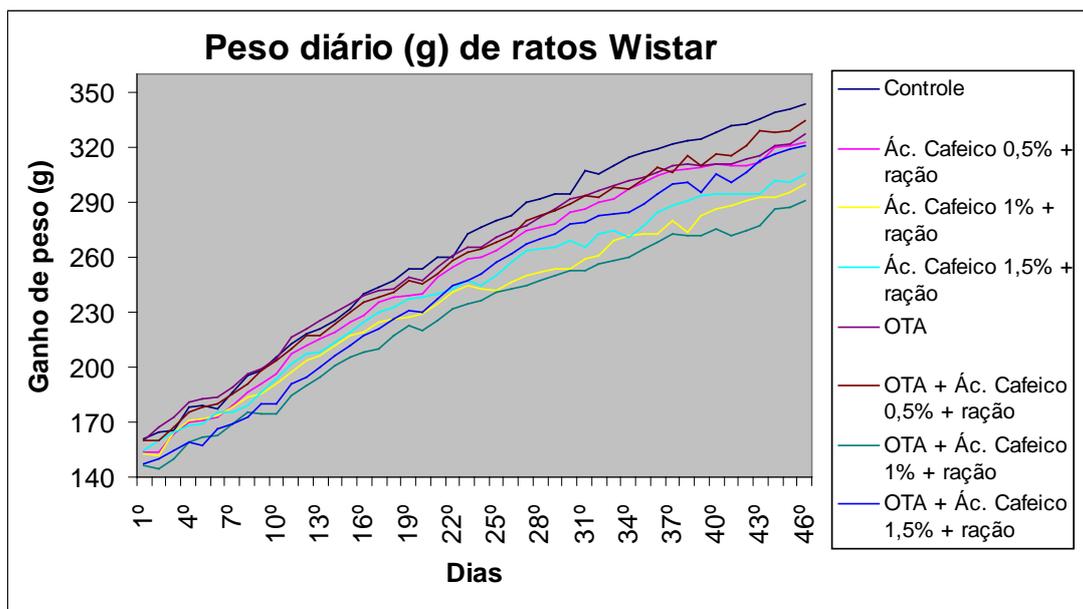


Figura 2 – Resultados de ganho de peso diário (g) de ratos Wistar pela ingestão de ácido cafeico e ocratoxina A (OTA) em diferentes dosagens.

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

Tratamento	Creatinina/U/ mg/dL	Ureia/U /mg/dL	Ureia/S /mg/dL	Creatinina/S/ mg/dL
1	148,7 a	7166 a	50,3 a	0,3 a
2	167,0 a	9850 a	54,7 a	0,5 a
3	152,7 a	9383 a	65,3 a	0,4 a
4	135,3 a	7433 a	51,0 a	0,3 a
5	194,0 b	8400 a	52,7 a	0,4 a
6	152,7 a	7783 a	47,7 a	0,4 a
7	153,7 a	9500 a	55,7 a	0,3 a
8	127,0 a	7966 a	58,7 a	0,4 a

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

Conclusão

O ácido cafeico foi capaz de proteger os grupos que ingeriram ocratoxina A, em relação aos níveis de creatinina na urina, uma vez que as doses de OTA ministradas, certamente provocariam danos mais visíveis quando na ausência deste bioprotetor.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATROSHI, F., RIZZO, A., WETERMARCK, T. ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p.151-167. 2002
- BUCHANAN, R.L.; HARRY, M.A.;GEALT, M.A. Caffeine inhibition of sterigmatocystin, citrinin and patulin production. **Journal of Food Science**, v.48, p.1226-1228, 1983.
- CAVIN, C., MACE, K., OFFORD, E. A. e SCHILTER, B. Protective effects of coffee diterpenes against B₁-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cell. **Food and Chemical Toxicology**. vol. 39, pag. 549-556, 2001.
- CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C. & ANGÉLICO, C. L. Efeito da cafeína (1, 3, 7 – trimethylxantina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**. VIÇOSA – ESPECIAL – (1): 50 – 53 – 2000.
- 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.
- DAGLIA, M., PAPETTI, A., DACARRO, C. e GAZZANI, G. Isolation of na antibacterial component from roasted coffee. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 18, p. 219-225, 1998.
- GIOVANNUCCI, E. Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. **American Journal of Epidemiology**,147:1043-1052,1998.
- KUIPER-GOODMAN, T. Risk Assessment of ochratoxin A: na update. **Food Aditive and Contaminants**. vol. 13. Suplemment, pag. S53-S57, 1996.
- LAFAY,S; MORAND, C.; MANACH, C.; BESSON, C.; SCALBERT, A. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. **British Journal of Nutrition**. v. 96, p.39–46. 2006

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, **15th ASIC International Colloquim on Coffee**, ASCI, Paris, France, pp. 420-425.

OLTHOF, M. R., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid are Absorbed in Humans. **Journal Nutrition**. v. 131, p.66-71. 2001.