

ÁCIDO CLOROGÊNICO E OCRATOXINA EM CAFÉ: UM ESTUDO SOBRE O PESO DE ÓRGÃOS E O GANHO DE PESO EM RATOS WISTAR¹.

Patrícia de Fátima Pereira Goulart; Juliano Silva Rocha ;Carlos José Pimenta; Roseane Maria Evangelista de Oliveira; Sara Maria Chalfoun ;Ademir Felício Alves

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro e Pesquisa e Desenvolvimento do Café - Consórcio Pesquisa Café e Fundação Educacional de Lavras/FELA/UNILAVRAS

²Professora D.Sc.UNILAVRAS- patriciagoulart@unilavras.edu.br

³Doutorando USP.- rocha_js@hotmail.com

⁴ Professor D.Sc. UFLA -carlos_pimenta@ufla.br

⁵Doutoranda UFLA- roseane-ufla@hotmail.com

⁶ Pesquisadora EPAMIG/Lavras -

⁷Biólogo-Técnico Biotério

RESUMO- O café é nada menos do que a segunda bebida mais consumida no mundo, sabor e aroma atrativo justificam sua aceitação. Diversos estudos tem 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 do ácido clorogênico e o efeito tóxico da (ocratoxina A) no peso dos órgãos de ratos wistar. O experimento foi composto de um ensaio biológico com Trinta e dois ratos Wistar machos, jovens, com peso inicial de aproximadamente 130g. Divididos em oito diferentes grupos com quatro animais; 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*”.A ração com diferentes quantidades de ácido clorogênico 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. Durante as 4 últimas semanas, 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. Os animais que consumiram OTA e ácidos clorogênicos simultaneamente apresentaram pulmões com menor peso em relação ao demais. Os animais que não consumiram ácidos clorogênicos apresentaram corações e fígados de menor peso quando comparados aos animais que consumiram. Os animais que consumiram OTA apresentaram rins com menor peso frente aos que não consumiram.

Palavras Chave: bioproteção; bioensaios; composição do café.

CLHOROGENIC ACID AND OCHRATOXIN IN COFFEE: A STUDY ON THE WEIGHT OF ORGANS AND WEIGHT GAIN IN WISTAR RATS

ABSTRACT- Coffee is nothing less than the second most consumed beverage in the world; his 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 (chlorogenic acids) and the toxicity from (ochratoxin A). The experiment was composed of 32 young Wistar male rats, 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 4 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. In general, the animals had great response to treatment and we could see bioprotective action forward to mycotoxins, especially by chlorogenic.

Key Words: bioprotection; bioassays; coffee composition

INTRODUÇÃO

O café constitui uma bebida de grande popularidade, que é consumida mundialmente, com aroma e sabor característicos. Em vista disso, numerosos estudos concernentes à sua segurança e às implicações na saúde têm sido realizados. Muitas pesquisas têm demonstrado que os componentes presentes na composição do café, são representados por uma série de substâncias, alcalóides como a cafeína, polímeros fenólicos, ácidos clorogênicos, lipídeos, terpenos que possuem diferentes efeitos biológicos, como ação antioxidante, antimutagênica, antibiótica, antihipercolesterolêmica e antihipertensiva, (Sakamoto et al., 2001).

Recentemente, os compostos presentes no café têm despertado interesse de diversos pesquisadores, devido às suas funções biológicas. Os polifenóis, por exemplo, classificados no grupo dos ácidos clorogênicos, parecem

desempenhar papel relevante. Todos apresentam intensa atividade antioxidante que, por si só, já desfruta de relevância na neutralização de radicais livres no organismo. Os ácidos clorogênicos, consistem em uma família de compostos fenólicos, oriunda da esterificação do ácido quínico com derivados do ácido cinâmico como os ácidos caféico, ferúlico e p-cumárico, (Moreira et al., 2000). Do total de ácido clorogênico no café, o ácido cafeoilquínico total representa cerca de 80% e o 5-cafeoilquínico, 60%. Sendo assim justificam-se estudos onde tais compostos sejam preservados, garantindo aos consumidores um produto onde suas características sensoriais mas principalmente bioquímicas sejam mantidas.

Durante a cadeia produtiva do café, diante de manejo inadequado, vários fungos podem contaminar este alimento. A presença destes fungos toxigênicos, além de alterar a qualidade do café pode colocar em risco a segurança do produto. Isto pode ocorrer devido a 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). Nos grãos e produtos de café, a única que representa o maior perigo e é a mais estudada é a ocratoxina (OTA). As ocratoxinas que tem como principal micotoxina a Ocratoxina A (OTA) são substâncias carcinogênicas, produzidas pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* (Chalfoun e Batista, 2002; Batista et al., 2003; Frisvad et al., 2004). Estes autores afirmam, entretanto, que apesar desta micotoxina ser a mais comum em café, ela tem sido detectada em pequenas quantidades. Esta toxina promove em seres humanos o acúmulo de gordura no fígado e sérios danos renais. Inicialmente demonstrou-se que a OTA inibe a síntese protéica in vivo e in vitro, ocupando a posição da fenilalanina. Como seqüência, atinge a função gênica inibindo a síntese de RNA. A OTA age também sobre outras enzimas da síntese protéica, inibindo amplamente o metabolismo protéico no citosol, eleva a peroxidação lipídica in vivo e in vitro, o que implicará na desorganização celular a começar pelas membranas das mitocôndrias. Nos últimos anos, setores ligados à cafeicultura (firmas importadoras, instituições de pesquisa) têm manifestado mais interesse quanto à qualidade micotoxicológica do café beneficiados para estimar o risco aos consumidores pela ingestão de OTA. desagradáveis e em alguns casos podem produzir metabólitos tóxicos (micotocicoses) (Batista et al., 2003).

Estudos referentes ao café como possível fonte de micotoxina (ocratoxina A) na dieta, visam determinar com a máxima precisão seu nível de participação, na dieta quando comparado a outros produtos alimentícios.

Um grande número de componentes do café têm sido identificados como sendo potencialmente responsáveis pela sua quimioproteção. Estas ações protetoras do café conferem-lhe a qualificação de alimento funcional. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo através de testes "in vivo", utilizando ratos wistar determinar a atuação das diferentes concentrações dos ácidos clorogênicos, suposto bioprotetor do café, agindo sobre os danos causados por ocratoxina A, em ratos wistar, através de análises de ganho de peso dos órgãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes biológicos foram desenvolvidos no Biotério do Laboratório Multidisciplinar de Experimentação Animal do Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS). Foram utilizados 32 ratos machos da linhagem Wistar recém desmamados, com peso de aproximadamente 125g, separados em grupos de quatro animais totalizando oito tratamentos. O protocolo experimental deste estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado no Comitê de ética em experimentação animal do Centro Universitário de Lavras. Os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas, durante 15 dias antes do experimento, no período de adaptação. Neste período os animais tiveram acesso a dieta padrão e água potável ad libitum. O experimento teve a duração de 45 dias. Nos primeiros 15 dias os animais receberam ração modificada adicionada de ácidos clorogênicos, lembrando que o grupo controle recebeu somente ração modificada sem a presença de bioprotetor (ácidos clorogênicos).

A dieta dos animais consistiu de ração comercial modificada contendo o composto bioprotetor (ácidos clorogênicos) na concentração proporcional ao que seria o consumo de xícaras de café/dia/ por humano adulto de 60Kg, adicionado em diferentes doses a saber: 1% concentração de ácidos clorogênicos referente a duas xícaras de café/dia (baixo consumo); 2% a quatro xícaras de café/dia (médio consumo), 3% seis xícaras de café/dia (alto consumo). A Ocratoxina A foi diluída em solução de benzeno/acetoneitrila 2%. As doses para cada animal (24 µg/kg peso corpóreo/dia), foram misturadas em 5g de leite em e moldada na forma esférica (dose diária); os animais dos grupos negativos para o consumo de Ocratoxina A também receberam o leite em pó que passou pelo mesmo tratamento, mas sem a adição de toxina. Portanto, ao final, os tratamentos foram os seguintes:

Tratamento 1- Controle – ração padrão

Tratamento 2- ácidos clorogênicos 1% + ração;

Tratamento 3- ácidos clorogênicos 2% + ração;

Tratamento 4- ácidos clorogênicos 3% + ração;

Tratamento 5- Ocratoxina A + ração;

Tratamento 6- Ocratoxina A + ácidos clorogênicos 1% + ração;

Tratamento 7- Ocratoxina A + ácidos clorogênicos 2% + ração;

Tratamento 8- Ocratoxina A + ácidos clorogênicos 3% + ração.

Os animais tiveram seu peso acompanhado durante três vezes a cada semana. Os sinais de toxicidade foram registrados a medida que foram feitas as observações que compreenderam o momento de seu aparecimento, sua diminuição e sua duração. As observações abrangeram alterações da pele, pêlos, mucosas, olhos, sistemas circulatório e respiratório, sistemas nervoso central e periférico, atividades somatomotriz e manifestações comportamentais em geral.

As eutanásias foram realizadas utilizando hidrato de cloral (dose 1g/kg; volume 0,5 mL/100g animal) pela via intraperitoneal e após a certificação da anestesia ocorreu incisão cutânea, divulsão, incisão muscular, rompimento da artéria aorta para proporcionar a realização da coleta de sangue sendo em seguida sacrificados para subsequente necropsia de seus órgãos, (fígado, rins, pulmões e coração,) foram pesados e descartados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo ensaio não houve uma diferença comportamental no ganho de peso dos animais que consumiram ou não OTA (Figuras 1 e 2), não apresentando diferença estatística. 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.

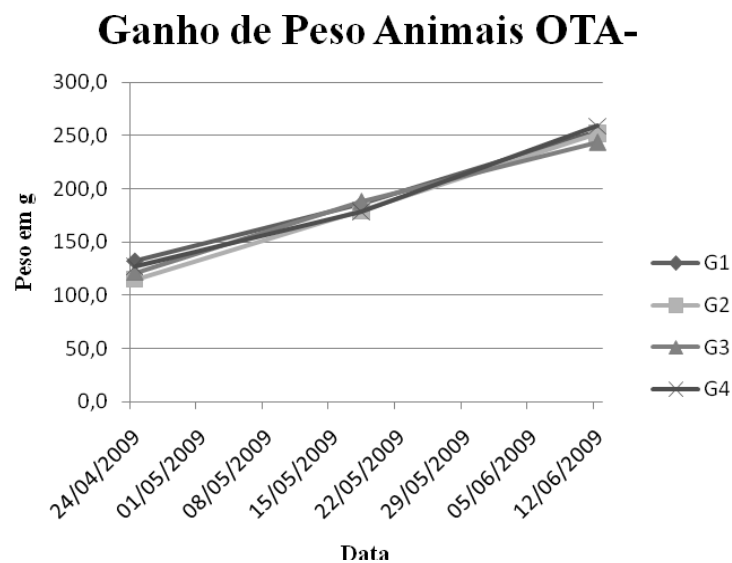


Figura1: Ganho de peso ao longo do experimento dos animais que não consumiram OTA.

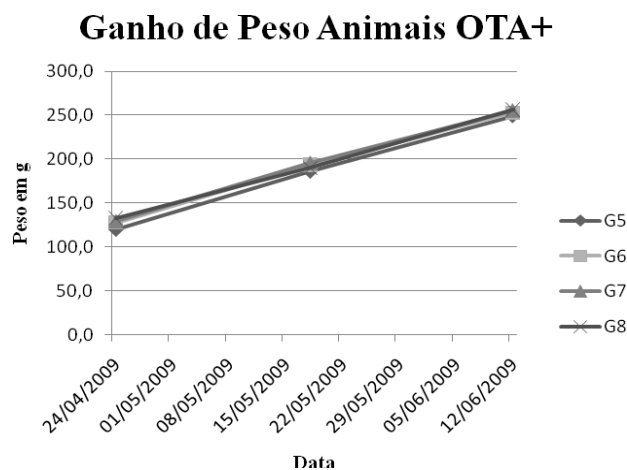


Figura 2: Ganho de peso ao longo do experimento dos animais que consumiram OTA.

Álvarez et al. (2004), demonstraram que a administração oral de OTA em ratos Wistar pode prejudicar o desenvolvimento dos animais, observando que animais que consumiram OTA de quatro a oito semanas apresentaram menor peso em relação aos animais que não consumiram. Os animais que consumiram OTA apresentaram rins com menor peso frente aos que não consumiram (Figura 3), demonstrando ação da toxina nos principais órgãos responsáveis

por sua metabolização, inibindo seu desenvolvimento. Arbillaga et al. (2008) afirmam que o estresse oxidativo gerado pelo consumo de OTA pode interferir negativamente na síntese protéica renal em ratos. Não foi observado efeito bioprotetor dos ácidos clorogênicos em relação aos rins dos animais que consumiram OTA em nenhuma das concentrações.

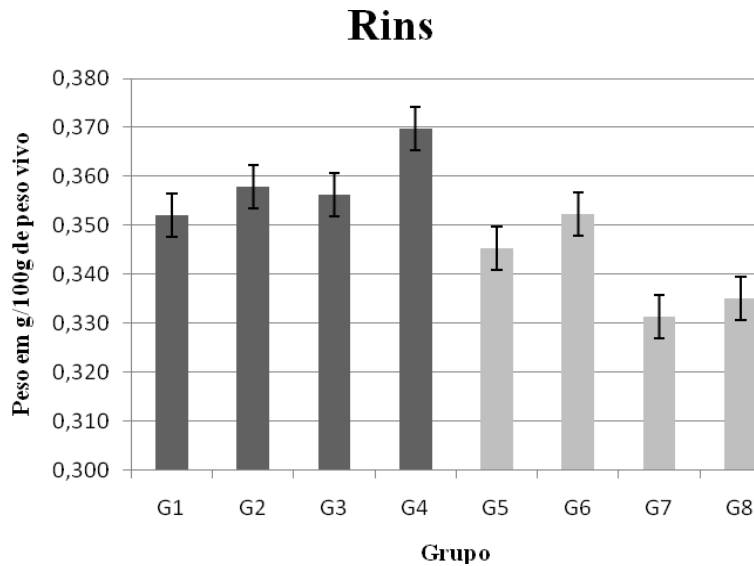


Figura 3: Peso dos rins dos animais de diferentes tratamentos, expresso em gramas/ 100g de peso vivo ($p < 0,05$).

Os animais que não consumiram ácidos clorogênicos tiveram seus fígados com menor peso em relação aos que consumiram (Figura 4). Diversos estudos demonstraram que o consumo do café e/ou alguns de seus componentes atuam de maneira positiva no controle glicêmico e no metabolismo lipídico em ratos (Van Dijk et al., 2009; Pari, Karthikesan & Menon, 2010). 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.

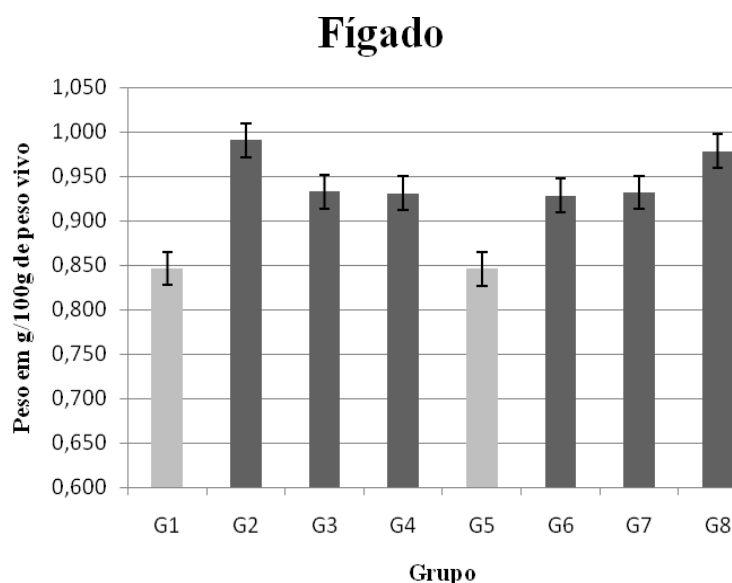


Figura 4: Peso do fígado dos animais de diferentes tratamentos, expresso em gramas/ 100g de peso vivo ($p < 0,05$).

Lin et al. (2010) afirmam que um melhor metabolismo glicêmico pode resultar em menores níveis séricos de glicose e uma 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 produção de glicogênio hepático. Também é possível ver que o consumo de OTA não afetou o fígado dos animais, já que não há diferença entre os grupos 1 e 5.

Os animais que não consumiram ácidos clorogênicos apresentaram corações de menor peso quando comparados aos animais que consumiram (Figura 5).

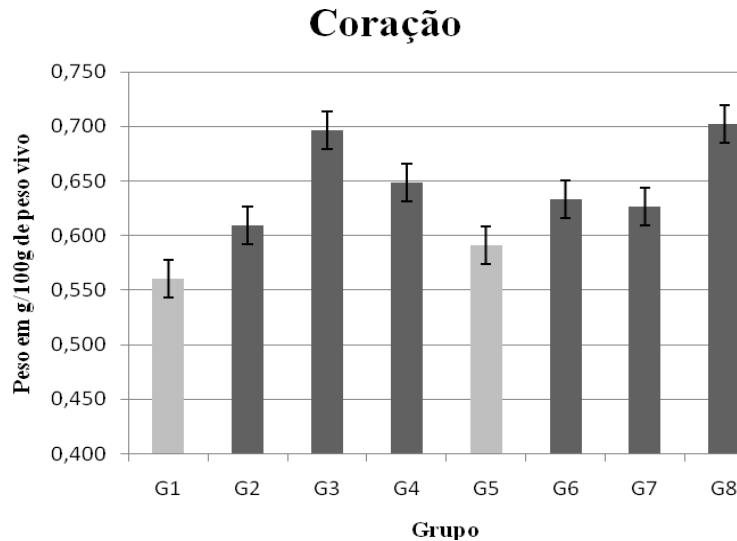


Figura 5: Peso do coração dos animais de diferentes tratamentos, expresso em gramas/ 100g de peso vivo ($p < 0,05$).

Tratando-se o coração de um músculo estriado que armazena glicogênio entre suas miofibrilas, os benefícios do consumo de ácidos clorogênicos relatados por Cho et al. (2010) justificam os resultados encontrados ao final deste ensaio em relação a esse órgão. Os animais que consumiram OTA e ácidos clorogênicos simultaneamente apresentaram pulmões com menor peso em relação ao demais (Figura 6).

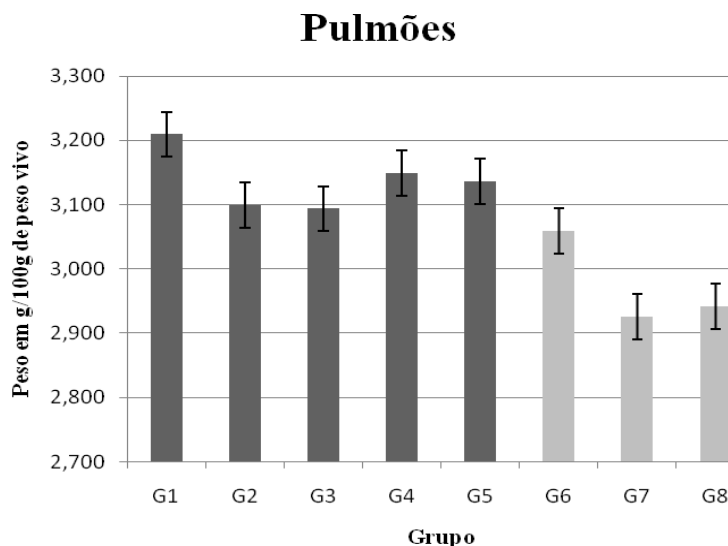


Figura 6: Peso dos pulmões dos animais de diferentes tratamentos, expresso em gramas/ 100g de peso vivo ($p < 0,05$).

Os animais que consumiram OTA e ácidos clorogênicos simultaneamente apresentaram pulmões com menor peso em relação ao demais (Figura 6).

CONCLUSÕES

Os animais que consumiram OTA apresentaram rins com menor peso frente aos que não consumiram.

Os animais que não consumiram ácidos clorogênicos apresentaram corações e fígados de menor peso quando comparados aos animais que consumiram.

Os animais que consumiram OTA e ácidos clorogênicos simultaneamente apresentaram pulmões com menor peso em relação ao demais.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo apoio financeiro para participação no VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ, L.; GIL, A. G.; EZPELETA, J. A.; GARCÍA-JALÓN, J. A.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Immunotoxic effects of Ochratoxin A in wistar rats after oral administration. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 825-834, 2004.

ARBILLAGA, L.; VETORAZZI, A.; GIL, A. G.; VAN DELFT, J. H. M.; GARCIA-JALÓN, J.; CERIAN, A. L. Gene expression changes induced by ochratoxin A in renal and hepatic tissues of male F344 rat after oral repeated administration. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 230, n. 2, p. 197-207, July 2008.

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.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. 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.

CHO, A. S.; JEON, S. M.; KIM, M. J.; YEO, J.; SEO, K. I.; CHOI, M. S.; LEE, M. K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 937-943, 2010.

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

KRAEGEN, E. W.; COONEY, G. J.; YE, J. M.; THOMPSON, A. L. 2001 Triglycerides, fatty acids and insulin resistant-hyperinsulinemia. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 109:S516-S526, 31.2001.

LIN, L. V.; SHAO-YU, WHO.; GUANG-FA, WUANG; JIN-JUN, HAO. Effect of astragaloside IV on hepatic glucose-regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin. **Phytotherapy Research**. 2010 Feb; 24(2):219-24.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B.; **Quim. Nova** 2000, 23, 195.

SAKAMOTO, W., et al. Effect of Coffee Consumption on Bone Metabolism. **Bone**, v. 28, p. 332-336, 2001

VAN DIJK, A. E.; OLTHOF, M. R.; MEEUSE, J. C.; SEEBUS, E.; HEINE, R. J.; VAN DAM, R. M. Acute Effects of Decaffeinated Coffee and the Major Coffee Components Chlorogenic Acid and Trigonelline on Glucose Tolerance. **Diabetes Care**, v. 32, n. 6, p. 1023-1025, 2009.