

CONSUMO DE AFLATOXINA B1 E ÁCIDOS CLOROGÊNICOS: UM ESTUDO SOBRE O PESO DE ÓRGÃOS E O GANHO DE PESO EM RATOS WISTAR¹.

Patrícia de Fátima Pereira Goulart²; Juliano Silva Rocha³; Carlos José Pimenta⁴;
Roseane Maria Evangelista de Oliveira⁵; Sara Maria Chalfoun⁶; Ademir Felício Alves⁷

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

³Mestrando UFLA- rocha_js@hotmail.com

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

⁵Doutoranda UFLA- roseane-ufla@hotmail.com

⁶ Pesquisadora EPAMIG/Lavras -chlafoun@epamig.br

⁷Biólogo-Técnico Biotério

RESUMO –A 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. Durante todo o ciclo produtivo do café, quando as condições de umidade, temperatura, pH e umidade relativa do ar são favoráveis, diversos fungos podem surgir e conseqüentemente afetar a qualidade do produto, produzindo micotoxinas, entre elas as aflatoxinas. A ingestão de alimentos contaminados com doses significativas de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 é classificada como carcinogênica para humanos. Diante das evidências observadas na literatura, o presente estudo buscou confrontar através de testes “*in vivo*” a ação bioprotetora dos ácidos clorogênicos e o efeito tóxico da aflatoxina B1 (AFB1) 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 ácidos clorogênicos 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. O consumo médio de ácidos clorogênicos promoveu um aumento no peso dos animais; os diferentes níveis de consumo foram também efetivos no aumento do peso de fígado e coração; isso devido aos seus benefícios ao metabolismo glicídico e aumento no acúmulo de glicogênio.

Palavras Chave: bioproteção; composição do café; aflatoxina B1; ratos Wistar.

AFLATOXIN B1 AND CLHOROGENIC ACID CONSUNPTION: A STUDY OVER ORGANS WEIGHT AND WEIGHT GAIN IN WISTAR RATS

ABSTRACT – Every day increases the concern of people with the quality of life. The production and use of healthy foods has an important role for the welfare of people and animals. Throughout the production coffee cycle, while the humidity, temperature, pH and relative humidity are favorable, many fungi can occur and affect the quality of the product, generating mycotoxins, including aflatoxins. Ingestion of foods contaminated with significant amounts of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 is classified as carcinogenic to humans. Confronted with evidence found in literature, this study sought to confront, by *in vivo* testing, the bioprotective action of chlorogenic acids and the toxicity effect of aflatoxin B1 (AFB1). 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. The middle consumption of chlorogenic acid promoted an increase in weight of animals, the different levels of consumption were also effective in increasing the weight of liver and heart, that due to its benefits to glucose metabolism and increased accumulation of glycogen.

Key words: bioprotection; coffee composition; aflatoxin B1; Wistar rats.

INTRODUÇÃO

A 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. Por outro lado, a presença de substâncias nocivas em alimentos, mesmo que em pequenas concentrações, quando consumidas por períodos prolongados pode promover efeito inverso aos dos famosos alimentos funcionais e proporcionar prejuízos à saúde (Baptista, 2005).

Durante todo o ciclo produtivo do café, quando as condições de umidade, temperatura, pH e umidade relativa do ar são favoráveis, diversos fungos podem surgir e conseqüentemente afetar a qualidade do produto. Estes fungos, muitas vezes produzem metabólitos tóxicos (micotoxinas), que podem gerar uma série de prejuízos a saúde dos consumidores, como intoxicações de evolução rápida com comprometimento de vários órgãos provocando distúrbios e/ou até morte. A ingestão de produtos contaminados com doses mais baixas e freqüentes induz o aparecimento de câncer, principalmente no fígado, e a diminuição da resistência às doenças (Pitt, 2000). A produção desses metabólitos pode ocorrer em qualquer momento da fase de consumo seja ela no campo, no armazenamento, durante o transporte, ou na fase de industrialização. Sua atividade tóxica persiste por um longo tempo nos alimentos, mesmo após o desaparecimento dos bolores que as originaram (Soliman, 2002).

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 et al., 2000). 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 liga-se à albumina e pequenos volumes são distribuídos para diversos tecidos. O metabolismo hepático é a principal rota de detoxificação (Galtier, 1998). A ingestão de alimentos contaminados com doses significativas de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 é classificada como carcinogênica para humanos (IARC, 2002). Apesar de não ser facilmente encontrada em grãos de café, a aflatoxina B1 (AFB1) tem seu modo de ação no organismo animal semelhante ao das ocratoxinas, cujos fungos produtores são mais freqüentemente encontrados nestes grãos.

Em contrapartida, existem, na composição da bebida do café, inúmeros compostos que tem sido estudados por suas ações no metabolismo humano, dentre estas substâncias, os ácidos clorogênicos, que 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).

Várias pesquisas recentes têm sido realizadas com o café na área da saúde apontando-o como um alimento nutricional e farmacêutico, capaz de incrementar a qualidade da vida humana, notadamente agindo sob a atenção, concentração, memória, aprendizado e na prevenção da depressão e suas conseqüências.

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 AFB1, analisando ganho de peso corpóreo e peso de 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 Wistar, machos, jovens, com peso inicial 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 AFB1 foi diluída em solução de benzeno/acetoneitrila 2%. As doses para cada animal (24 µg/kg peso corpóreo/dia) foram misturadas em 3g de leite em e moldada na forma esférica (dose diária); os animais dos grupos negativos para o consumo de AFB1 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- AFB1 + ração;
 Tratamento 6- AFB1 + ácidos clorogênicos 1% + ração;
 Tratamento 7- AFB1 + ácidos clorogênicos 2% + ração;
 Tratamento 8- AFB1 + ácidos clorogênicos 3% + ração.

Os animais tiveram seu peso acompanhado 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 e coração; que foram pesados e descartados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 3).

TABELA 1 Ganho de peso médio dos animais submetidos à ácidos clorogênicos + AFB1

Níveis de ¹ Ácidos clorogênicos	Aflatoxina B1 ²					
	Ausência		Presença			
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.

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. 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 (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. 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.

TABELA 2 Peso médio do fígado dos animais submetidos à ácidos clorogênicos + AFB1

Níveis de ¹ Ácidos clorogênicos	Aflatoxina B1 ²					
	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

Os animais que não consumiram ácidos clorogênicos apresentaram corações de menor peso quando comparados aos animais que consumiram. Tratando-se o coração de 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, ao final dos ensaios, os resultados encontrados em relação a esse órgão.

TABELA 3 Peso médio do coração dos animais submetidos à ácidos clorogênicos + AFB1

Níveis de ¹ Ácidos clorogênicos	Aflatoxina B1 ²					
	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

Não foi observada ação tanto da AFB1 quanto dos ácidos clorogênicos que causasse diferença no peso dos rins dos animais.

TABELA 4 Peso médio dos rins dos animais submetidos ao Ensaio I: ácidos clorogênicos + AFB1

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

CONCLUSÕES

O consumo médio de ácidos clorogênicos promoveu um aumento no peso dos animais; os diferentes níveis de consumo foram também efetivos no aumento do peso de fígado e coração; isso devido aos seus benefícios ao metabolismo glicídico e aumento no acúmulo de glicogênio.

Foi possível observar ação bioprotetora dos ácidos clorogênicos frente à AFB1, aparentando atuar intensamente no metabolismo glicêmico, aumentando a produção de glicogênio no organismo animal.

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.

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

- CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C. & ANGÉLICO, C. L. Efeito da cafeína (1, 3, 7 – trimethylxanthina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, n. 3, p. 50-53, 2000.
- 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.
- GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue Méd. Vét.**, v.149, p.549-554, 1998.
- IARC – International Agency of Research on Cancer - **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon: OMS, v. 82, 2002
- 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.
- LV, L.; WU, S. Y.; WANG, G. F.; ZHANG, J. J. PANG, J. X.; LIU, Z. Q.; XU, W.; WU, S. G.; RAO, J. J. Effect of astragaloside IV on hepatic glucose-regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin. **Phytother Res**. 2010 Feb;24(2):219-24.
- MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B.; **Quim. Nova** 2000, 23, 195.
- PARI, L.; KARTHIKESAN, K.; MENON, V. P. Comparative and combined effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in chemical induced experimental diabetes. **Mol Cell Biochem**. v. 341, p. 109–117, 2010.
- PITT, J.I. Toxicogenic fungi, **Medical Mycology**, v. 1, n. 38, p. 17-22, 2000.
- SAKAMOTO, W., et al. Effect of Coffee Consumption on Bone Metabolism. **Bone**, v. 28, p. 332-336, 2001.
- SOLIMAN, K. M. Incidence, level, and behavior of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7477-7481, 2002.
- 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.