



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES BIOLÓGICAMENTE RELEVANTES DE OCRATOXINA A SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM *CAENORHABDITIS ELEGANS*.

M. K. M. E. Costa¹, L. Schmidt¹, W.G. Ávila¹, J.E. Welke¹, P. R. Augusti¹

1- Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-6674 – e-mail: (meuryketteryncosta@gmail.com)

RESUMO – A Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina tóxica contaminante de alimentos e produzida por fungos do gênero *Aspergillus*. Entre os mecanismos de toxicidade associados a OTA, encontram-se a produção de espécies reativas (ER) e danos oxidativos decorrentes. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de concentrações biologicamente relevantes de OTA sobre danos oxidativos no modelo experimental *Caenorhabditis elegans*. Os nematóides foram expostos a concentrações de OTA normalmente encontradas na urina de humanos (5, 10 e 22 mg L⁻¹) por 30 minutos a 20°C. Os vermes foram então submetidos às análises de taxa de sobrevivência e geração de ER. As concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ causaram maior geração de ER, enquanto a concentração de 22 mg L⁻¹ causou redução na taxa de sobrevivência quando comparadas ao controle (p<0,05). O estudo demonstrou que a OTA, mesmo em baixas concentrações, pode induzir a produção de ER *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: Espécies reativas, taxa de sobrevivência; micotoxinas.

1. INTRODUÇÃO

As Ocratoxinas são micotoxinas produzidas por diferentes espécies de *Aspergillus* e, de acordo com suas estruturas químicas, podem ser divididas em três classes principais: ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB) e ocratoxina C (OTC) (SAMUEL *et al.*, 2021). Dentre essas, a OTA se destaca por ser a mais tóxica e amplamente encontrada no ambiente. Além de sua toxicidade, a OTA é mais estável e resistente ao calor e sua estrutura dificilmente é modificada pelos processos de conservação de alimentos (OU *et al.*, 2023). Devido a essa estabilidade, a OTA pode ser encontrada em diversas matérias-primas como café, uva, milho, cevada, malte, cacau e trigo, além de produtos processados como cerveja, vinho, chocolate e pães (WU, *et al.*, 2011; FREIRE *et al.*, 2019; ISMAIEL *et al.*, 2023).

A OTA está associada há efeitos deletérios a saúde de várias espécies de animais, como efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos, imunotóxicos e nefrotóxicos (LIU, *et al.*, 2022). Devido a sua toxicidade, a OTA foi classificada como grupo 2B (possivelmente cancerígena para humanos) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) (IARC,



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

2023). Um dos mecanismos pelos quais a OTA desempenha seus efeitos tóxicos é via estresse oxidativo e tais efeitos têm sido relacionados a produção de espécies reativas (ER), aumento da peroxidação lipídica e danos oxidativos ao DNA (NOGAIN *et al.*, 2020). A partir disso, muitos países têm estabelecido com sucesso limites para a concentração de OTA em alimentos e rações.

Apesar do desenvolvimento de tecnologias para prevenir a contaminação fúngica em alimentos, em muitas situações não é sempre possível impedir o crescimento fúngico e subsequente produção de micotoxinas (ALDRED e MAGAN, 2004). Em animais e humanos a biodegradação da OTA é pobre, com absorção relativamente rápida, eliminação lenta e ainda possui efeito cumulativo, o que demonstra um importante papel em sua toxicidade, carcinogenicidade e especificidade por determinados órgãos (RINGOT *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2020). Sendo assim, mesmo uma exposição a pequenas concentrações já pode apresentar riscos à saúde. Diante do exposto o objetivo desse estudo é avaliar o efeito de concentrações biologicamente relevantes (baixas concentrações) de OTA sobre marcadores de estresse oxidativo utilizando o modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura, crescimento e sincronização do *C. elegans*

Cepas selvagens do *C. elegans* (tipo N2) foram obtidas no Centro Genético *Caenorhabditis* (Minnesota, USA). Os nematóides foram mantidos a 20 °C em placas contendo *E. Coli* OP50 em meio NGM (meio de cultura para nematoide), seguindo metodologia descrita por Brenner (1974). O processo de sincronização foi realizado a partir do isolamento da população L1 (primeiro estágio larval), utilizando solução de branqueamento (NaCl 1 %; NaOH 0,25 M) e solução de sacarose (30 %) para a separação dos ovos por flotação. Os ovos foram lavados com soluções tampão (KH₂PO₄ 0,02 M; Na₂HPO₄ 0,04 M; NaCl 0,08 M e MgSO₄ 0,001 M). A incubação dos ovos foi realizada durante a noite (12h) em placas estéreis contendo meio NGM, de acordo com metodologia descrita por Avila *et al.* (2012).

2.2 Tratamento dos nematoides

Cepas selvagens (N2) em estágio larval L1 foram expostas a 3 concentrações de OTA (5, 10 e 22 mg L⁻¹) por 30 minutos a 20°C. As concentrações escolhidas são menores que o consumo tolerável para humanos (0,1µg kg⁻¹ semana⁻¹) descritos pela JECFA (2008). Ao final da exposição,



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

os nematoides sofreram lavagens para remover as amostras e foram submetidos a determinação da taxa de sobrevivência e geração de ER.

Para a análise de taxa de sobrevivência, um total 2500 vermes foram expostos a cada concentração em triplicata e colocados em placas contendo meio NGM semeadas com OP50 (60 mm x 10 mm). Após o período de incubação de 24 horas a 20°C, o número de vermes sobreviventes foi verificado com auxílio de lupa, seguindo metodologia descrita por Avila *et al.* (2012).

A fim de determinar a geração de ER, 1500 vermes foram utilizados para a quantificação de no ensaio da DCFH. Ao final da exposição aos tratamentos, os vermes foram lavados e suspensos em 100 µL de solução NaCl (0,9 %), adicionando em seguida o DCFH-DA (2'-7'- diacetato diclorofluoresceína). O composto fluorescente formado a partir da oxidação do DCFH-DA pela ação das ER (DCF) foi quantificado em leitor de microplacas a 485 nm de excitação e 530 nm de emissão (CHARÃO *et al.*, 2015).

2.3. Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA) e teste de Tukey quando necessário. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da OTA sobre a geração de ER

Os resultados da geração de ER pelo metabolismo dos nematoides expostos às três concentrações de OTA são apresentados na figura 1. A exposição dos vermes a OTA nas concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ aumentou significativamente a quantidade de ER nos nematoides quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Esses resultados corroboram com vários estudos que mostram que a OTA influencia a produção de ER (Crupi *et al.*, 2020; Schmidt *et al.*, 2020; García-Pérez *et al.*, 2021). Entretanto, esses estudos utilizam, em sua maioria, concentrações de OTA encontradas nos alimentos, o que pode superestimar as quantidades ingeridas pelas pessoas e animais. No presente estudo, as concentrações avaliadas são semelhantes às encontradas na urina de indivíduos expostos a OTA através da dieta. Além dessa limitação, os mecanismos pelos quais a toxina pode aumentar os níveis de ER ainda não estão bem elucidados, podendo estar relacionados a distúrbios na homeostase do cálcio, a redução de complexos OTA-Fe³⁺ pelo citocromo P450 e a perda de potencial de membrana (Schmidt *et al.*, 2020; García-Pérez *et al.*, 2021).

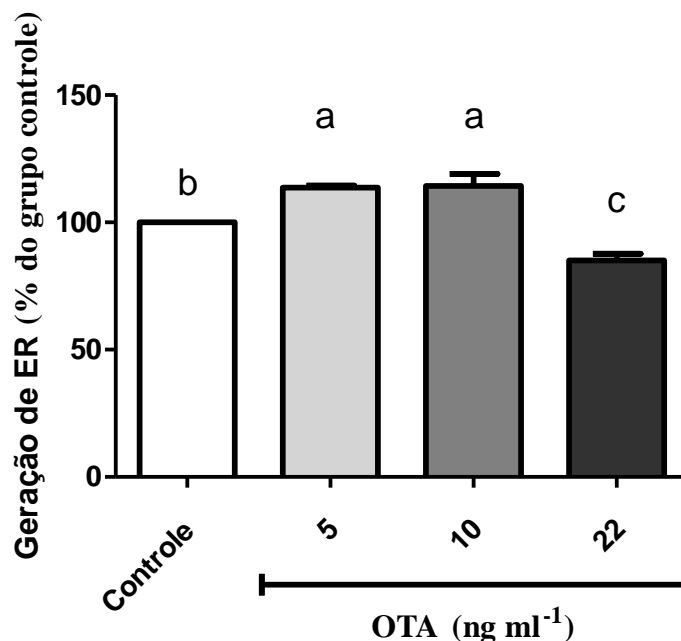


Figura 1: Efeito de baixas concentrações de OTA sobre a geração de ER em *C. elegans*. Dados são apresentados como média \pm erro padrão (n=3-5). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.2 Taxa de sobrevivência de *C. elegans* expostos a OTA

A concentração de 22 mg L⁻¹ foi a única que causou uma redução significativa na taxa de sobrevivência dos vermes (figura 2, $p < 0,05$). Curiosamente, essa concentração não induziu aumento de ER ($p > 0,05$, figura 1). Isso sugere que as defesas antioxidantes podem ter agido para reduzir a geração de ER, mas foram insuficientes para evitar a morte dos nematoides. Isso está de acordo com um estudo anterior onde concentrações de 1 e 10 μ M de OTA demonstraram uma toxicidade em células HepG2 não relacionada a produção de ER, mas sim à regulação da expressão de enzimas antioxidantes e sua atividade, em células (García-Pérez *et al.*, 2020). Assim, estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar os efeitos de baixas concentrações de OTA sobre os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos dos nematoides.

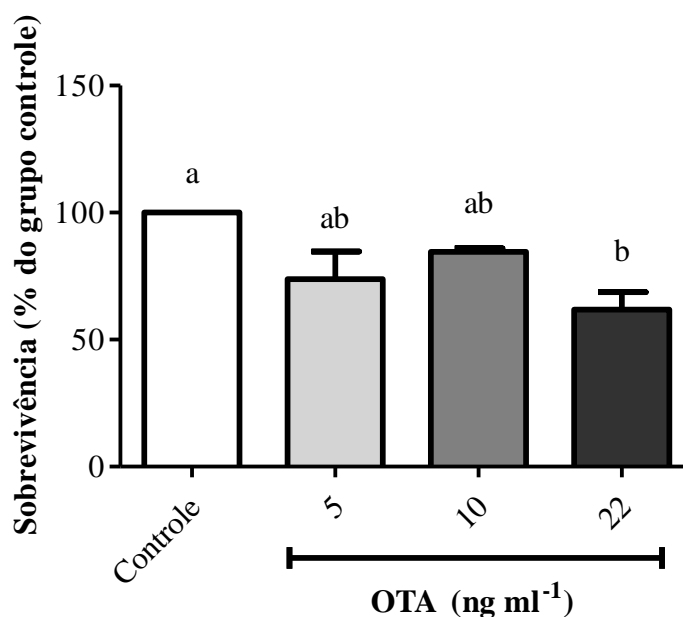


Figura 2: Efeito de baixas concentrações de OTA sobre a taxa de sobrevivência de *C. elegans*. Dados são apresentados como média \pm erro padrão (n=3-5). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05).

4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a OTA, mesmo em baixas quantidades, pode induzir a produção de ER e reduzir a sobrevivência de *C. elegans*. Desta maneira, mais estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar quais as concentrações de OTA são realmente seguras *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALDRED, David; MAGAN, Naresh. Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology letters*, v. 153, n. 1, p. 165-171, 2004.

AVILA, Daiana Silva et al. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 52, n. 9, p. 1903-1910, 2012.

CHARAO, Mariele Feiffer et al. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 5093, 2015.



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

CRUPI, Rosalia et al. Protective effect of Hydroxytyrosol against oxidative stress induced by the Ochratoxin in kidney cells: In Vitro and In Vivo study. *Frontiers in veterinary science*, v. 7, p. 136, 2020.

FREIRE, Luísa et al. The presence of ochratoxin A does not influence *Saccharomyces cerevisiae* growth kinetics but leads to the formation of modified ochratoxins. *Food and Chemical Toxicology*, v. 133, p. 110756, 2019.

GARCÍA-PÉREZ, Enrique et al. Ochratoxin A induces oxidative stress in HepG2 Cells by impairing the gene expression of antioxidant enzymes. *Toxins*, v. 13, n. 4, p. 271, 2021.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Acesso em: 10 de março de 2023.

ISMAIEL, Ahmed A.; MOHAMED, Hala H.; EL-SAYED, Manal T. Biodegradation of ochratoxin A by endophytic *Trichoderma koningii* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 2, p. 53, 2023.

LIU, Wen-Chao et al. Ochratoxin A as alarming health in livestock and human: A review on molecular interactions, mechanism of toxicity, detection, detoxification, and dietary prophylaxis. *Toxicon*, 2022.

NOGAIM, Qais A. et al. Protective effect of Yemeni green coffee powder against the oxidative stress induced by Ochratoxin A. *Toxicology reports*, v. 7, p. 142-148, 2020.

RINGOT, Diana et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*, v. 159, n. 1, p. 18-46, 2006.

SAMUEL, Melvin S. et al. Detection, contamination, toxicity, and prevention methods of ochratoxins: An update review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 69, n. 46, p. 13974-13989, 2021.

SCHMIDT, Luana et al. Ochratoxin A presence in Cabernet Sauvignon wine changes antioxidant activity in vitro and oxidative stress markers in vivo. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 37, n. 10, p. 1755-1764, 2020.

WU, Qinghua et al. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current drug metabolism*, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2011.