

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Associação de álcool e bebidas energéticas: avaliação de danos
histológicos em fígado e rins de ratos Wistar**

Bruna Ducatti Tonietto

Porto Alegre, julho de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Associação de álcool e bebidas energéticas: avaliação de danos
histológicos em fígado e rins de ratos Wistar**

**Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia apresentado a Faculdade
de Farmácia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, sob a
orientação da Profa. Dra. Mirna
Bainy Leal e co-orientação da Msc.
Marina Tuerlinckx Costa Valle para
obtenção do título de Farmacêutica.**

Porto Alegre, julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Beatriz e Airton, e meus avós maternos, Leonides e Armando (*in memoriam*) que apoiaram o sonho de me tornar farmacêutica e compreenderam minha ausência em momentos importantes.

Ao Marcos, pessoa que amo partilhar a minha vida, tu foi a força e a calma necessárias para me acompanhar nesta jornada.

A Prof. Dra. Mirna Bainy Leal pela confiança depositada em mim para execução deste projeto, paciência e orientação, a Prof. Dra. Eliane Dallegrave por compartilhar seus conhecimentos e auxílio na execução do projeto, a Marina pela dedicação e parceria em todos os momentos e pelos “vai dar tudo certo” e toda equipe que auxiliou na execução dos experimentos. Sem vocês a conclusão desta etapa não seria possível. Tenho eterna gratidão a todos.

Aos amigos que compartilharam essa trajetória comigo.

A todos os professores, farmacêuticos e pacientes que compartilhei essa jornada, levarei todos estes conhecimentos para minha atuação profissional em um futuro próximo.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi elaborado na forma de artigo a fim de ser submetido à Revista **“FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY”**

Associação de álcool e bebidas energéticas: avaliação de danos histológicos em fígado e rins de ratos Wistar

Association of alcohol and energy drinks: evaluation of histological damages in liver and kidneys of Wistar rats

Bruna Ducatti Tonietto^{1,3,*}, Marina Tuerlinckx Costa Valle², Eliane Dallegrave², Mirna Bainy Leal³

1. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS

2. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Rua Sarmiento Leite 245, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS

3. Departamento de Farmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite 500, sala 202, CEP 90050170, Porto Alegre, RS

*Correspondência autor: (51) 997570107, brunnatonietto@gmail.com

RESUMO

O aumento do consumo de álcool associado a bebidas energéticas cresce cada vez mais, e atinge um mercado composto principalmente por adolescentes e adultos jovens. Porém, a avaliação do impacto na saúde dos seus consumidores ainda não foi totalmente determinada. Por tais motivos, o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade aguda das bebidas energéticas e seus principais constituintes (cafeína e taurina), isolados e em associação ao álcool, em ratos Wistar, através de medidas bioquímicas e histopatológicas. Os animais (n=5/grupo) foram tratados em dose única para avaliação da toxicidade aguda (OECD 420). Os ratos foram tratados por via oral com soluções contendo: água, bebida energética (10mL/kg), álcool 20% (2 g/kg), álcool 20% (2 g/kg) associado à bebida energética (10mL/kg), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg), associação de cafeína (3,2 mg/kg) e taurina (40 mg/kg), e associação de álcool 20% (2 g/kg), cafeína (3,2 mg/kg) e taurina (40 mg/kg). Neste protocolo os animais foram anestesiados, eutanasiados e necropsiados 24h após os tratamentos. A massa relativa dos animais e dos órgãos foi determinada, sendo que não houve diferença significativa na massa corporal relativa à inicial ($p>0,05$; ANOVA de uma via), bem como na massa relativa do fígado ($p=0,309$), rim direito ($p=0,711$) e rim esquerdo ($p=0,085$). Também não houve diferença significativa ($p>0,05$; ANOVA de uma via) na dosagem dos parâmetros bioquímicos, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), gamaglutamiltranspeptidase (GGT), creatinina, fosfatase alcalina (FAL), e lactato desidrogenase (LDH). Entretanto, após a avaliação dos parâmetros histológicos no fígado observou-se diferença significativa ($p<0,05$; Qui-quadrado) na degeneração hidrópica ($p=0,007$), degeneração hialina ($p=0,0001$); congestão ($p=0,0001$) e hemorragia ($p=0,0001$), no rim houve diferença significativa ($p>0,05$; Qui-quadrado) na degeneração hialina ($p=0,001$) e hemorragia ($p=0,007$). Através deste estudo foi possível demonstrar que o perfil bioquímico relacionado a dano hepático ou renal não sofreu alteração após tratamento agudo, porém as análises histológicas sinalizam que a associação de álcool e bebidas energéticas causa pequenas alterações dos tecidos hepáticos e renais, que se repetidas a longo prazo podem acarretar danos aos indivíduos que fazem uso da associação álcool-bebida energética.

UNITERMOS: Bebidas Energéticas, Álcool, Toxicidade Aguda, Histopatologia,
Ratos Wistar

ABSTRACT

The consumption of alcohol associated with energy drinks is increasing, reaching a market composed mainly by adolescents and young adults. However, the assessment of the impact on the health of its consumers has not yet been determined. For these reasons, the objective of this study was to evaluate the acute toxicity of energy drinks and their main constituents (caffeine and taurine), isolated and in association with alcohol, in Wistar rats, through biochemical and histopathological measures. The animals (n=5/group) were treated in a single dose for acute toxicity evaluation (OECD 420). The rats were treated orally with solutions containing: water, energy (10mL/kg), alcohol 20% (2 g/kg), alcohol 20% (2 g/kg) associated with energy drink (10mL/kg), caffeine (3,2 mg/kg), taurine (40 mg/kg), association of caffeine (3,2 mg/kg) and taurine (40 mg/kg), and association of alcohol 20% (2 g/kg), caffeine (3,2 mg/kg) and taurine (40 mg/kg). In this protocol the animals were anesthetized, euthanized and necropsied 24 h after the treatments. The relative mass of the animals and organs was determined, and there was no significant difference in body mass relative to the initial mass ($p > 0,05$, one-way ANOVA), as well as in the relative liver mass ($p=0,309$), right kidney ($p=0,711$) and left kidney ($p=0,085$). There was also no significant difference ($p > 0,05$; one-way ANOVA) in the biochemical parameters, glutamic-oxalacetic transaminase (TGO), glutamic-pyruvic transaminase (TGP), gammaglutamyltranspeptidase (GGT), creatinine, alkaline phosphatase, and lactate dehydrogenase (LDH). However, a significant difference ($p < 0,05$; Chi-square) in the hydropic degeneration ($p=0,007$), hyaline degeneration ($p=0,0001$) was observed after evaluation of the histological parameters in the liver: there was a significant difference ($p > 0.05$; Chi-square) in congestion ($p=0,0001$) and hemorrhage ($p=0,0001$) and in the kidney there was a difference in hyaline degeneration ($p=0,001$) and hemorrhage ($p=0,007$). Through this study it was possible to demonstrate that the biochemical profile related to hepatic or renal damage did not change after acute treatment, but histological analyzes indicate that the association of alcohol and energy drinks causes small alterations of liver and kidney tissues, which if repeated over a long period of time could harm individuals who make use of the alcohol-energy drink association.

KEYWORDS: Energy Drinks, Alcohol, Acute Toxicity, Histopatology, Wistar Rats

HIGHLIGHTS

- Este é o primeiro estudo que avalia o efeito histopatológico e bioquímico da associação álcool-energético de administração aguda em ratos Wistar
- Bebidas energéticas em conjunto com álcool causam alterações nos tecidos hepático e renal de ratos Wistar
- Bebidas energéticas associadas com álcool em tratamento agudo não alteram parâmetros bioquímicos renais e hepáticos.

1. Introdução

Bebidas energéticas lançadas na Ásia e na Europa nos anos 60 (Pennay e Lubman, 2012) ganharam grande popularidade quando a marca Red Bull® foi introduzida na Áustria em 1987, e tornou-se conhecida mundialmente quando foi lançada nos EUA em 1997 (Reissig et al., 2009).

Dados epidemiológicos apontam a existência de mais de 500 marcas de bebidas energéticas ao redor do mundo (Bigard, 2009). O mercado de venda de bebidas energéticas aponta o crescimento de 16% nos EUA em 2011 totalizando aproximadamente 9 bilhões de dólares (Sepkowitz, 2013), e em 2012 ultrapassou 12 bilhões (Sorkin et al., 2014).

Os principais constituintes das bebidas energéticas são: cafeína, taurina, guaraná, glicose, adoçante, sódio e vitaminas do complexo B. Também se observa na composição de algumas marcas de bebidas energéticas a presença de: L-carnitina, ginseng, glucuronolactona, *Ginkobiloba*, entre outros (Higgins e Ortiz, 2014; Reissig et al., 2009).

O principal objetivo do uso das bebidas energéticas é aumentar a energia e o estado de alerta, sendo o principal foco de mercado consumidor os adolescentes (Miller, 2008; O'Brien et al., 2008) e jovens do sexo masculino, pelo seu efeito estimulante e possível aumento de performance (Reissig, 2009).

Na literatura há relatos que em torno de 46% do uso recreacional de bebidas energéticas tem sido em associação com bebidas alcoólicas (Gunja e Brown, 2012). A associação de álcool e bebidas energéticas acarreta no aumento do consumo alcoólico, com maior probabilidade dos usuários sofrerem mais prejuízos do que consumidores somente de bebidas alcoólicas (McKetina et al., 2015). Os riscos associados ao consumo concomitante de álcool e bebidas energéticas englobam violência, suicídio, acidentes de carro e quedas (Roemer e Stockwell, 2016). Acredita-se que este fenômeno está relacionado com o maior consumo de álcool, pois a bebida energética mascara o efeito sedativo e intoxicante do mesmo (Ferreira et al., 2006; Howland et al., 2011; Marczinski et al., 2016).

O principal componente psicoativo das bebidas energéticas é a cafeína, um alcaloide (1,3,7-trimetilxantina) encontrado em diversas plantas que atua como um estimulante do sistema nervoso central e do sistema cardiovascular. Em baixas doses atua como antagonista competitivo de receptores de adenosina e em doses elevadas como inibidor de fosfodiesterases (Dalvi, 1986). Porém, quando é consumida em altas concentrações pode gerar intoxicação (Wolk et al., 2012; Seifert et al., 2011).

A bebida energética Red Bull® contém cerca de 32 mg de cafeína a cada 100 mL, estando presente no mercado a apresentação de 250 mL (80mg) e 355 mL (1136 mg), em contraste com refrigerantes do tipo “Cola” que contém aproximadamente 40mg por lata (Gunja e Brown, 2012). O café presente em uma xícara pode conter entre 50 e 300 mg de cafeína, dependendo do tipo de torra e modo de preparo (Ludwig et al., 2014).

Outro componente encontrado na constituição das bebidas energéticas é a taurina, um “ β -amino ácido sulfônico” presente em grande parte das bebidas energéticas, e também abundância no nosso organismo (Jacobsen e Smith, 1968) podendo ser obtido pela dieta ou sintetizado a partir da cisteína no fígado (Lambert et al., 2015; Vitvitsky et al., 2011). Diversas funções da taurina no organismo já foram descritas, dentre as quais, neuroproteção (Chen et al., 2001), neuromodulação (Kuiyama, 1980), neurotransmissão (Okamoto, 1983), osmorregulação (Schaffer et al., 2000; Solís et al., 1988), regulação de cálcio (El Idrissi, 2008) e antioxidante (Messina e Dawson, 2000). Atua como um neurotransmissor inibitório nos receptores GABA e de glicina, tendo efeito ansiolítico em ratos (Chen et al., 2004; Kong et al., 2006; Murakami et al., 2010).

O efeito estimulatório da cafeína é atenuado quando associado com taurina, aumentando o efeito de fadiga (Childs et al., 2014), porém há indícios que a taurina aumente o estado eufórico causado pelo álcool (Ginsburg et al., 2008).

A toxicidade do álcool está relacionada com o aumento da produção de radicais livres e desenvolvimento de um estado de stress oxidativo, devido a oxidação do álcool (Reinke et al., 1997). A peroxidação lipídica no plasma, fígado, rim, coração e a pressão sanguínea foram aumentados pelo consumo de

álcool, porém, quando o consumo era associado com taurina os níveis de peroxidação lipídica diminuíram, o que está relacionado com a normalização do sistema antioxidante (Pushpakiran et al., 2004).

Há relatos na literatura de dano hepático com achado histológico e bioquímico em tratamento crônico com bebidas energéticas (Khayyat et al., 2012). Bebidas energéticas e a sua associação com álcool causam alteração na função renal e hepática em tratamento crônico (Ugwuja et al., 2014).

Estudo não publicado de Costa Valle (2016) avaliou a neurotoxicidade subcrônica oral de bebida energética em ratos, bem como seus respectivos constituintes: cafeína e taurina, isoladas e em associação. Os resultados demonstraram que os grupos tratados com cafeína (3,2mg/kg) e taurina (40mg/kg) (doses equivalentes ao consumo de 3 latas), tiveram melhor desempenho nos testes de memória. Entretanto, os biomarcadores de estresse oxidativo (atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a produção de espécies reativas através da medida de diclorofluoresceína (DCFH) e conteúdo total de tióis) avaliados no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dos ratos tratados com a associação de cafeína e taurina, demonstraram diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Neste estudo, em todos os testes foi evidente que a associação de cafeína e taurina, em concentrações semelhantes a maior dose de bebidas energéticas, diferiu dos efeitos da administração apenas da bebida energética

Tendo em vista o elevado consumo de bebidas energéticas associada com álcool por jovens e que os danos causados por essa associação ainda são pouco conhecidos, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos hepáticos e renais da associação de álcool com bebidas energéticas contendo cafeína e taurina em ratos Wistar.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos, adultos (60 dias), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório da UFRGS (CREAL-UFRGS) e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – UFRGS. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) (4 ratos por caixa) com livre acesso a água e alimento em ciclos de claro/escuro de 12h (7 – 19h), em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade monitorada, sendo adaptados previamente ao estudo por 10 dias. O protocolo, aprovado pelo CEUA/UFRGS 26689/2014, foi baseado no teste de toxicidade aguda (OECD 420), utilizando 5 machos por grupo.

2.2 Drogas e Bebida Energética

A bebida energética (Red Bull® Fuschl, Áustria), etanol P.A. (Dinâmica, Brasil) e os padrões cafeína (Sigma Aldrich, Brasil) e taurina (Sigma Aldrich, Brasil) foram solubilizados em água destilada. Em todos os experimentos a água destilada foi usada como controle.

A dose de bebida energética e dos padrões cafeína (3,2 mg/kg) e taurina (40 mg/kg) foi definida através de cálculo relativo às doses ingeridas usualmente por consumidores (FERREIRA et al., 2004). Estabelecendo uma similaridade com as bebidas energéticas, o padrão cafeína e taurina contida em uma lata de 250 mL de bebida energética consumida por um indivíduo adulto pesando 70 kg, é de taurina (1000 mg/250 mL) e cafeína (80 mg/250 mL), sendo administradas volume equivalente a 3 latas (10 mL/kg) (FERREIRA et al., 2013).

O Etanol P.A. foi diluído em água destilada. A solução de álcool administrada por gavagem em dose equivalente a 2 g/kg de álcool 20% (controle álcool) e esta associada a: 10 mL/kg de bebidas energéticas, cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg, cafeína 3,2 mg/kg mais taurina 40 mg/kg associadas (Ferreira et al., 2004).

2.3 Tratamentos

Os ratos foram divididos em 8 grupos e os seguintes tratamentos administrados por gavagem oral: água destilada (10 mL/kg), bebida energética (10 mL/kg), álcool 20% (2g /kg), bebida energética (10 mL/kg) associado com álcool 20% (2g /kg), cafeína (3,2mg/kg), taurina (40mg/kg), cafeína (3,2mg /kg) associada com taurina (40mg /kg), e grupo associação de cafeína (3,2mg /kg), taurina (40mg /kg) e álcool 20% (2g /kg).

2.4 Coleta de Material

Vinte e quatro horas após a administração dos tratamentos, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com a associação de tiopental (100 mg/kg) e lidocaína (10 mg/kg), eutanasiados e necropsiados. O sangue foi coletado através da veia cava caudal, transferido para tubos sem anticoagulante e processados para análise bioquímica. Fígado e rins foram removidos, limpos de tecidos adjacentes, pesados e comparados a massa corporal, sendo determinada a massa relativa dos órgãos. Posteriormente, estes foram fixados em formol tamponado 10% para a análise histopatológica.

2.5 Análise Bioquímica

Foram adicionados 10 mL de sangue em um tubo de coleta com gel separador e centrifugado por 20 minutos em 3000 rpm para obtenção do soro. Foi realizada a análise de transaminases hepáticas (TGO e TGP), gamaglutamiltranspeptidase (GGT), uréia, creatinina, fosfatase alcalina (FAL) e lactato desidrogenase (LDH) utilizando kits comerciais da Bioclin conforme indicações da bula no equipamento Mindray BS-120

2.6 Análise Histopatológica

Os órgãos, previamente acondicionados em recipientes contendo 2/3 do volume dos órgãos de uma solução de formaldeído tamponado 10% por 7 dias para fixação. Os órgãos foram cortados e incluídos em blocos de parafina, que então foram seccionados em um micrótomo com cortes de 4 micras de espessura para o fígado e 3 micras para o rim. Os cortes foram distendidos em banho Maria de água destilada a 51°C e então montados sobre lâminas. Foi

utilizada a coloração hematoxilina/eosina e a leitura foi realizada em microscópio óptico a 400x para avaliação histológica.

2.7 Análise Estatística

Os dados paramétricos foram apresentados em média e erro padrão da média e os não paramétricos em forma de percentual. Variáveis paramétricas que apresentaram distribuição normal, como o ganho de massa corporal, a massa relativa dos órgãos e os parâmetros bioquímicos, foram analisados por ANOVA de uma via e os dados não paramétricos relativos as lesões histopatológicas foram analisados pelo teste Qui-quadrado, utilizando o SPSS versão 23.

3. Resultados

Vinte e quatro horas após a administração de bebida energética (10 mL/kg) e álcool (2 g/kg), isolados e em associação com cafeína (3,2 mg/kg) e taurina (40 mg/kg) não houve diferença significativa na massa corporal relativa à inicial ($p > 0,05$; ANOVA de uma via), bem como na massa relativa do fígado ($p = 0,309$), rim direito ($p = 0,711$) e rim esquerdo ($p = 0,085$) (Tabela 1). Também não houve diferença significativa ($p > 0,05$; ANOVA de uma via) na dosagem dos parâmetros bioquímicos, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), gamaglutamiltranspeptidase (GGT), uréia, creatinina, fosfatase alcalina (FAL), e lactato desidrogenase (LDH) (tabela 2). Entretanto, após a avaliação dos parâmetros histológicos no fígado observou-se diferença significativa ($p < 0,05$; Qui-quadrado) na degeneração hidrópica ($p = 0,007$), degeneração hialina ($p = 0,0001$); congestão ($p = 0,0001$) e hemorragia ($p = 0,0001$). Não foi observado desestruturação, vacuolização, infiltrado e necrose (Tabela 3 e Quadro 1) e no rim houve diferença significativa ($p > 0,05$; Qui-quadrado) na degeneração hialina ($p = 0,001$) e hemorragia ($p = 0,007$). Não houve diferença estatística na degeneração hidrópica ($p = 0,09$), congestão ($p = 0,355$) e vacuolização ($p = 0,101$). Não foi observado desestruturação, infiltrado e necrose (Tabela 4 e Quadro 2). Dentre as diferenças apresentadas pode-se dizer que tanto a degeneração hidrópica, quanto a degeneração hialina e a congestão foram mais evidentes nos grupos referentes aos constituintes isolados, bem como no álcool e na associação álcool e bebida energética, sendo que áreas hemorrágicas foram evidenciadas somente nos grupos dos constituintes isolados e associados, mas estas não foram manifestadas na bebida energética isolada, nem nos grupos tratados com álcool.

TABELA 1: Efeito do tratamento agudo de bebida energética e álcool, isolados e em associação sobre a massa relativa hepática e renal. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão.

Grupos	Órgãos avaliados			
	Peso	Fígado	Rim D	Rim E
Controle (10mL/kg)	102,93 \pm 2,35	4,38 \pm 0,16	0,44 \pm 0,06	0,41 \pm 0,03
Álcool (2g/kg)	103,63 \pm 1,42	4,59 \pm 0,71	0,44 \pm 0,05	0,43 \pm 0,02
Bebida energética (10mL/kg)	103,22 \pm 2,50	4,37 \pm 0,44	0,42 \pm 0,06	0,41 \pm 0,03
Álcool + Bebida energética (2g/kg + 10mL/kg)	103,77 \pm 3,19	4,11 \pm 0,19	0,41 \pm 0,05	0,39 \pm 0,02
Cafeína (3,2 mg/kg),	104,80 \pm 2,60	4,31 \pm 0,29	0,45 \pm 0,06	0,43 \pm 0,03
Taurina (40 mg/kg)	105,51 \pm 3,06	4,13 \pm 0,28	0,44 \pm 0,05	0,42 \pm 0,03
Cafeína + Taurina (3,2 mg/kg + 40 mg/kg)	105,28 \pm 1,73	4,26 \pm 0,30	0,46 \pm 0,04	0,41 \pm 0,01
Álcool + Cafeína +Taurina (2g/kg + 3,2 mg/kg + 40 mg/kg)	108,10 \pm 12,53	4,02 \pm 0,24	0,41 \pm 0,05	0,38 \pm 0,03

p<0,05 (ANOVA de uma via)

TABELA 2: Efeito do tratamento agudo de bebida energética e álcool, isolados e em associação sobre parâmetros de função hepática e renal. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão.

Grupos	Parâmetros bioquímicos avaliados						
	TGO (U/L)	TGP (U/L)	GGT (U/L)	FAL (U/L)	LDH (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle (10mL/kg)	91,6 \pm 6,3	45,6 \pm 2,7	6,6 \pm 1,3	207,0 \pm 19,2	189,0 \pm 48,6	49,0 \pm 3,4	0,36 \pm 0,02
Álcool (2g/kg)	98,7 \pm 2,5	56,8 \pm 5,0	6,2 \pm 1,8	245,8 \pm 30,2	127,0 \pm 21,1	50,6 \pm 6,7	0,46 \pm 0,06
Bebida energética (10mL/kg)	86,6 \pm 3,5	47,8 \pm 5,1	5,0 \pm 1,8	195,6 \pm 14,1	165,8 \pm 60,2	51,0 \pm 5,6	0,40 \pm 0,03
Álcool + Bebida energética (2g/kg + 10mL/kg)	84,8 \pm 3,6	47,2 \pm 2,6	6,8 \pm 1,5	191,2 \pm 17,6	110,6 \pm 16,5	44,2 \pm 3,3	0,38 \pm 0,02
Cafeína (3,2 mg/kg),	89,2 \pm 4,9	40,2 \pm 3,4	15,7 \pm 5,9	172,6 \pm 13,6	260,5 \pm 61,2	48,4 \pm 3,1	0,40 \pm 0,03
Taurina (40 mg/kg)	83,0 \pm 2,3	47,4 \pm 2,8	7,0 \pm 0,7	203,0 \pm 20,6	162,8 \pm 21,9	46,0 \pm 0,4	0,32 \pm 0,03
Cafeína + Taurina (3,2 mg/kg + 40 mg/kg)	102,4 \pm 9,6	54,0 \pm 5,1	8,8 \pm 3,6	209,2 \pm 10,4	222,6 \pm 49,6	45,0 \pm 3,2	0,38 \pm 0,07
Álcool + Cafeína +Taurina (2g/kg + 3,2 mg/kg + 40 mg/kg)	82,2 \pm 2,6	46,0 \pm 3,8	11,2 \pm 3,3	186,4 \pm 9,6	148,8 \pm 34,5	47,0 \pm 3,4	0,36 \pm 0,02

p < 0,05 (ANOVA de uma via)

TABELA 3: Efeito do tratamento agudo de bebida energética e álcool, isolados e em associação sobre parâmetros histológicos hepáticos. Os dados estão representados em percentual de ratos que apresentam a alteração.

Grupos	Percentual de ratos que apresentam alterações (%)				
	Degeneração hidrópica *	Degeneração hialina **	Congestão **	Hemorragia **	Vacuolização, Infiltrado e Necrose
Controle (10mL/kg)	20 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0
Álcool (2g/kg)	40 ^a	100 ^b	100 ^b	0 ^a	0
Bebida energética (10mL/kg)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0
Álcool + Bebida energética (2g/kg + 10mL/kg)	100 ^b	60 ^b	100 ^b	0 ^a	0
Cafeína (3,2 mg/kg),	80 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b	0
Taurina (40 mg/kg)	80 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b	0
Cafeína + Taurina (3,2 mg/kg + 40 mg/kg)	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b	0
Álcool + Cafeína +Taurina (2g/kg + 3,2 mg/kg + 40 mg/kg)	80 ^b	80 ^b	100 ^b	100 ^b	0

*p<0,05 e **p<0,001 (Qui-quadrado)

TABELA 4: Efeito do tratamento agudo de bebida energética e álcool isolados e em associação sobre parâmetros histológicos renais. Os dados estão representados em percentual de ratos que apresentam a alteração.

Grupos	Percentual de ratos que apresentam alterações (%)					
	Degeneração hidrópica	Degeneração hialina *	Congestão	Hemorragia **	Vacuolização	Infiltrado e Necrose
Controle (10mL/kg)	60	0 ^a	60	40 ^a	60	0
Álcool (2g/kg)	100	40 ^a	60	100 ^b	100	0
Bebida Energética (10mL/kg)	100	100 ^b	100	100 ^b	100	0
Álcool + Bebida Energética (2g/kg + 10mL/kg)	100	100 ^b	100	100 ^b	100	0
Cafeína (3,2 mg/kg),	60	0 ^a	60	80 ^b	100	0
Taurina (40 mg/kg)	100	40 ^a	60	20 ^a	100	0
Cafeína + Taurina (3,2 mg/kg + 40 mg/kg)	100	80 ^b	60	80 ^b	100	0
Álcool + Cafeína +Taurina (2g/kg + 3,2 mg/kg + 40 mg/kg)	100	100 ^b	100	100 ^b	100	0

**p<0,05 *p<0,001 (Qui-quadrado)

4. Discussão

A exposição aguda a bebida energética e seus constituintes, isolados e em associação ao álcool, não interferiu de forma significativa na avaliação macroscópica dos órgãos à necropsia, na massa relativa dos órgãos (fígado e rins) e nos parâmetros bioquímicos de função renal e hepática avaliados (TGO, TGP, GGT, Uréia, Creatinina, FAL e LDH). Entretanto, foram observadas alterações microscópicas (degeneração hidrópica, degeneração hialina, congestão, hemorragia) no fígado e rins.

Em contraste aos dados de nosso estudo Akande e Banjoko (2011) observou níveis elevados de TGO, TGP E FAL em ratas fêmeas após tratamento com bebidas energéticas (10 mL/kg e 20 mL/kg) por 21 dias, porém não foi relatado aumento no nível de creatinina, tais dados corroboram o estudo de Khayyat, L. et al (2012), no qual a administração de bebida energética (15 mL/kg) por um período de 14 a 28 dias eleva os níveis de TGO, TGP e FAL. Ugwuja e colaboradores (2013 e 2014) avaliou parâmetros bioquímicos em ratos albinos em dois estudos diferentes, o primeiro em ratos diabéticos e o segundo em ratos saudáveis, no primeiro o tratamento com bebida energética (3,75 mL/kg) e no segundo bebida energética (3,75 mL/kg e 7,5 mL/kg), ambos utilizando tratamento com álcool (1 g/kg) por 30 dias. No qual os resultados encontrados foram o aumento nos parâmetros de TGO e TGP em ambos estudos, porém no estudo conduzido em ratos diabéticos a TGO ficou elevada e a creatinina não teve alteração, já no grupo de ratos saudáveis a creatinina também ficou elevada. Igualmente aos dados citados acima, Crişan (2013) também relatou aumento significativo de TGO, TGP e LDH em soro de ratos que ingeriram bebida energética *ad libitum* por 15 dias.

Uma das análises histológicas utilizadas para constatar se há ou não dano tecidual é a degeneração hidrópica que resulta de um desbalanço eletrolítico e acúmulo de água no citoplasma (Abdelhalim e Jarra, 2011). No fígado, esta alteração, foi observada em quase todos os animais dos grupos cafeína, taurina e álcool + cafeína + taurina, e em todos os animais dos grupos associação de álcool + bebida energética e cafeína + taurina. Outra análise utilizada é degeneração hialina que detecta o acúmulo de material proteico extracelular, em

contraste ao grupo controle e bebida energética, todos os outros grupos sofreram degeneração hialina significativa, sendo que o grupo cafeína, taurina e cafeína + taurina em sua totalidade (Abbas et al., 2010). Dentre outras análises feitas, tais como; na congestão, observou-se que todos os grupos apresentaram, em exceção aos grupos controle e bebida energética. Já a hemorragia esteve presente nos grupos cafeína, taurina, cafeína + taurina, e álcool + cafeína + taurina. Porém um estudo conduzido por Khayyat e colaboradores (2012), observou que os ratos que receberam bebidas energéticas (1,5 mL/kg) por 14 e 28 dias apresentaram alterações histopatológicas relevantes como infiltração, vacuolização e necrose, o que não foi observado nos animais de nosso estudo.

A toxicidade hepática do álcool está relacionada com o seu metabolismo centrado no fígado, no qual o hepatócito sofre ação de metabólitos e espécies reativas de oxigênio (ROS), causando peroxidação lipídica e consequente dano (Louvet e Mathurin, 2015). Neste estudo o álcool apresentou dano histológico (degeneração hialina e congestão) como o esperado, porém o dano foi mais pronunciado quando o álcool foi administrado em conjunto com a bebida energética. Corroborando o nosso estudo Reis e colaboradores (2017) administraram bebidas energéticas em ratos Wistar por um período de 14 dias, nas doses de 3,5g/kg e 7g/kg, isoladas e em conjunto com álcool (1g/kg) demonstrando que bebidas energéticas isoladas causam dano hepático e em conjunto com álcool causam dano ainda maior.

Em se tratando de uma substância presente nas Bebidas Energéticas e de interesse no estudo, a taurina, segundo Kerai e colaboradores (1998) tem propriedades hepatoprotetoras quando administrada em conjunto com o álcool (0,05 g/mL), porém os achados histológicos deste estudo foram contrários. Os grupos em que o tratamento incluía taurina e álcool (álcool + bebida energética e álcool + cafeína + taurina) e inclusive o grupo que utilizou taurina de forma isolada, sem álcool, apresentou degeneração hidrópica, degeneração hialina, congestão e hemorragia.

Segundo Lv e colaboradores (2010) fígado de ratos que receberam tratamento de álcool junto com cafeína sofreram menos peroxidação lipídica, stress oxidativo (SOD, GSH, DCF, TBARS) e aumento de citocinas pró

inflamatórias (IL -6, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β), diferente de ratos tratados apenas com álcool, sendo assim, a cafeína é hepatoprotetora contra a inflamação e stress oxidativo, porém os achados histológicos neste estudo foram contrários. Os grupos em que a cafeína estava presente de forma isolada e em conjunto com taurina e taurina + Álcool apresentaram danos (Degeneração Hidrópica, Degeneração Hialina, Congestão e Hemorragia).

Os resultados acima citados são diferentes dos evidenciados no presente estudo, pois sendo um protocolo de toxicidade aguda, utilizando apenas uma administração de tratamentos em um intervalo de 24h, é esperado que danos histopatológicos estejam pouco pronunciados. Sugere-se que se o protocolo fosse de doses repetidas (subagudo ou subcrônico) as alterações poderiam ser mais evidentes. Além disto, acredita-se que a toxicidade hepática e dano oxidativo esteja relacionado com vários ingredientes das bebidas energéticas e não a ingredientes isolados (Reis, 2017), o que pode justificar os nossos resultados encontrados, uma vez que a associação dos componentes pode acarretar em danos ainda maiores dependendo do período de tempo, sendo que por períodos mais extensos acredita-se que o dano histológico fosse maior.

Dentre as alterações analisadas no rim, somente a degeneração hialina e a hemorragia apresentaram resultados significantes. A degeneração hialina esteve presente de maneira significativa nos grupos bebida energética e álcool + bebida energética, e não com o álcool de forma isolada. A cafeína e a taurina apresentaram degeneração hialina de forma significativa apenas quando utilizadas em conjunto e não de formas isoladas, e como era esperado, o grupo álcool + cafeína + taurina apresentou degeneração hialina significativa. A hemorragia foi presente nos grupos que foram tratados com bebida energética e álcool de forma isolada e também em conjunto. A taurina apresentou hemorragia somente em conjunto com a cafeína e com álcool + cafeína. Infiltrado e necrose estiveram ausentes em todos os grupos analisados e degeneração hidrópica, congestão e vacuolização não apresentaram resultados significantes

Segundo dados não publicados de nosso grupo de pesquisa, marcadores de dano renal precoce NAG (N-acetilglicosaminidase), analisado na urina e TBARS (ácido tiobarbitúrico), marcador de lipoperoxidação tecidual, foram

analisados em rim de ratos que receberam bebida energética (10 mL/kg) e associação de cafeína (3,2mg /kg) e taurina (40mg /kg). Também foi observado aumento nos tióis totais. Porém, segundo Akande e Banjoko (2011) a análise histológica de rim de ratas após administração de bebidas energéticas em diferentes doses (10 mL/kg e 20 mL/kg) por 21 dias não causa danos relacionados ao tratamento. Não há artigos, de nosso conhecimento, avaliando a histopatologia renal de ratos após administração aguda de álcool e bebidas energéticas. Os dados presentes na literatura sobre dano renal estão relacionados com patologias, impossibilitando o uso para discussão neste artigo.

5. Conclusão

Considerando o aumento progressivo do consumo de bebidas energéticas associadas ao álcool, o pouco conhecimento acerca do impacto toxicológico deste consumo excessivo e a escassez de dados científicos sobre os efeitos desta associação no perfil bioquímico e histopatológico, este estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda das bebidas energéticas e seus principais constituintes (cafeína e taurina), isolados e em associação com o álcool, em ratos Wistar. Através deste estudo foi possível demonstrar que o tratamento agudo não alterou o perfil bioquímico, porém as análises histológicas sinalizam que a associação de álcool e bebidas energéticas induz pequenas alterações nos tecidos hepático e renal. Acredita-se que a exposição repetida ao longo do tempo (teste subcrônico e/ou crônico), possa evidenciar possíveis alterações bioquímicas, bem como acentuar as alterações histopatológicas.

CONFLITO DE INTERESSES

O autor declara que não há conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de estudos e à PROPG/UFRGS pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K; FAUSTO, N.; KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; ASTER, J.C.; ROBBINS, S.L.: Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

ABDELHALIM, M.A.K.; JARRAR, B.M. Gold nanoparticles induced cloudy swelling to hydropic degeneration, cytoplasmic hyaline vacuolation, polymorphism, binucleation, karyopyknosis, karyolysis, karyorrhexis and necrosis in the liver. *Lipids in Health and Disease*, v. 10, 2011.

AKANDE, I.S.; BANJOKO, O.A. Assessment of Biochemical Effect of “Power Horse” Energy Drink on Hepatic, Renal and Histological Functions in Sprague Dawley Rats. *Annual Review & Research in Biology*, v. 1, n. 3, p. 45-56, 2011.

BIGARD, A.X. Dangers des boissons énergisantes chez les jeunes. *Arch. Pediatr.*, v. 17, n. 11, p. 1625–1631, 2010.

CHEN, S.W.; KONG, W.X.; ZHANG, Y.J.; LI, Y.L.; MI, X.J.; MU, X.S. Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. *Life Sci.*, v. 75, n. 12, p. 1503-1511, 2004.

CHEN, W.Q.; JIN, H.; NGUYEN, M.; CARR, J.; LEE, Y.J.; HSU, C.C.; FAIMAN, M.D.; SCHLOSS, J.V.; WU, J.Y. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *J Neurosci Res.*, v. 66, n. 4, p. 612-619, 2001

CHILDS, E. Influence of energy drink ingredients on mood and cognitive performance. *Nutrition Reviews*, v.72, p.48-59, 2014.

COSTA VALLE, M.T. Avaliação da neurotoxicidade de bebidas energéticas contendo cafeína e taurina em ratos. Dissertação de Mestrado, PPG-Neurociências, UFRGS, 2015.

CRİŞAN, M.; MUNTEANU, C.; ROŞIORU, C.; LANG, C. Red Bull Induces Biochemical Changes In Wistar Rat Liver. *Annals of RSCB*, v. 18, 2013.

DALVI, R.R. Acute and chronic toxicity of caffeine: a review. *Vet Hum Toxicol*, v. 28, n. 2, p. 144–150, 1986.

FERREIRA, S.; QUADROS, I.M.H.; TRINDADE, A.A.; TAKAHASHI, S.; KOYAMA, R.G.; FORMIGONI, M.L.O.S. Can energy drinks reduce the depressor effect of ethanol? Na experimental study in mice. *Physiology & Behavior*, p.841-847, 2004.

FERREIRA, S.E.; ABRAHAO, K.P.; FORMIGONI, M.L.O. S. Expression of behavioral sensitization to ethanol is increased by energy drink administration. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, p.1-4, 2013.

FERREIRA, S.E.; DE MELLO, M.T.; POMPÉIA, S.; DE SOUZA-FORMIGONI, M.L. Effects of energy drink ingestion on alcohol intoxication. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 30, p. 598–605, 2006.

GINSBURG, B.C.; LAMB, R.J. Taurine and ethanol interactions: Behavioral effects in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 578, p. 228-237, 2008.

GUNJA, N.; BROWN, J.A. Energy drinks: health risks and toxicity. *MJA*, v.196, p. 46–49, 2012

HIGGINS, J.P.; ORTIZ, B.L. Energy Drink Ingredients and their Effect on Endothelial Function: A Review. *Int J Clin Cardiol*, v.1, 2014

HOWLAND, J.; ROHSENOW, D.J.; CALISE, T.V.; MACKILLOP, J.; METRIK, J. Caffeinated alcoholic beverages: An emerging public health problem. *American Journal of Preventive Medicine*, v.40, n. 2, p.268–271, 2011.

IDRISSI, A.E. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. *Amino acids*, v. 34, p. 321–328, 2008.

JACOBSEN, J.G.; SMITH L.H. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.*, v. 48, p. 424– 451, 1968.

KERAI, M.D.; WATERFIELD, C.J.; KENYON, S.H.; ASKER, D.S.; TIMBRELL, J.A. Taurine: protective properties against ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation during chronic ethanol consumption in rats. *Amino Acids*, v. 15, p. 53-76, 1998.

KHAYYAT, L.; SOROUR, J.; RAWI, M.A.; ESSAWY, A. Histological, Ultrastructural and Physiological Studies on the Effect of Different Kinds of Energy Drinks on the Liver of Wistar albino Rat. *Journal of American Science*, v. 8, n. 8, p. 688-697, 2012.

KONG, W.X.; CHEN, S.W.; LI, Y.L.; ZHANG, Y.J.; WANG, R.; MIN, L.; MI, X. Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 83, n. 2, p. 271-276, 2006.

KUIYAMA, K. Taurine as a neuromodulator. *Fed. Proc.*, v. 39, n. 9, p. 2680-2684, 1980.

LAMBERT, I.H.; KRISTENSEN, D.M.; HOLM, J.B.; MORTENSEN, O.H. Physiological role of taurine - from organism to organelle. *Acta Phys.*, v. 213, n. 1, p. 191–212, 2015.

LOUVET, A.; MATHURIN, P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, v. 12, n. 4, p. 231-242, 2015.

LUDWIG, I.A.; MENA, P.; CALANI, L.; CID, C.; DEL RIO, D.; LEAN, M.E.; CROZIER, A. Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: What are we drinking? *Food Funct*, v. 5, p. 1718–1726, 2014.

LV, X.; CHEN, Z.; LI, J.; ZHANG, L.; LIU, H.; HUANG, C.; ZHU, P. Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. *Inflamm Res.*, v. 59, n. 8, p. 635-645, 2010.

MARCZINSKI, C.A.; FILLMORE, M.T. Stamates, A.L.; Maloney, S.F. Desire to Drink Alcohol is Enhanced with High Caffeine Energy Drink Mixers. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*, v. 40, n. 9, 2016.

MCKETIN, R.; COEN, A.; KAYE, S. A comprehensive review of the effects of mixing caffeinated energy drinks with alcohol. *Drug and Alcohol Dependence*, v.151, p. 15-10, 2015.

MESSINA, S.A.; DAWSON, R. Attenuation of oxidative damage to DNA by taurine and taurine analogs. *Adv Exp Med Biol.*, v. 483, p. 355–367, 2000.

MILLER, K.E. Energy drinks, race, and problem behaviors among college students. *J Adolesc Health*, v. 43, n. 5, p. 490-497, 2008.

MURAKAMI, T.; FURUSE, M. The impact of taurine- and beta-alanine supplemented diets on behavioral and neurochemical parameters in mice: antidepressant versus anxiolytic-like effects. *Amino Acids*, v. 39, n. 2, p. 427-434, 2010.

O'BRIEN, M.C.; MCCOY, T.P.; RHODES, S.D.; WAGONER, A.; WOLFSON, M. Caffeinated Cocktails: Energy Drink Consumption, High-risk Drinking, and Alcohol related Consequences among College Students. *Acad Emerg Med*, v. 15 n. 5, p. 453-460, 2008.

OKAMOTO, K.; KIMURA, H.; SAKAI, Y. Taurine-induced increase of the Cl⁻ conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. *Brain Res.*, v. 259, p. 319– 323, 1983

PENNAY, A.; LUBMAN, D. Alcohol and energy drinks: a pilot study exploring patterns of consumption, social contexts, benefits and harms. *Biomed Central Research Notes*, v. 5, n. 369, p. 1-10, 2012.

PUSHPAKIRAN, G.; MAHALAKSHMI, K.; ANURADHA, C.V. Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat tissues. *Amino Acids*, v. 27, n. 1, p. 91-96, 2004.

REINKE, L.A.; MOORE, D.R.; MCCAY, P.B. Free radical formation in livers of rats treated acutely and chronically with alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 21, n. 4, p. 642-646, 1997

REIS, R.; CHAREHSAZ, M.; SIPAHI, H.; EKICI, A.I.D.; MACIT, Ç.; AKKAYA, H.; AYDIN, A. Energy Drink Induced Lipid Peroxidation and Oxidative Damage in Rat Liver and Brain When Used Alone or Combined with Alcohol. *Journal of Food Science*, v. 00, n. 0, 2017.

REISSIG, C.J.; STRAIN, E.C.; GRIFFITHS, R.R. Caffeinated Energy Drinks – A Growing Problem. *Drug Alcohol Depend.*, p.1-16, 2009.

ROEMER, A.; STOCKWELL, T. Alcohol Mixed With Energy Drinks and Risk of Injury: A Systematic Review. *J. Stud. Alcohol Drugs*, v. 78, p. 175–183, 2017.

SCHAFFER, S.; TAKAHASHI, K.; AZUMA, J. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids*, v. 19, p. 527-546, 2000.

SEIFERT, S.M.; SCHAECHTER, J.L.; HERSHORIN, E.R.; LIPSHULTZ, S.E. Health Effects of Energy Drinks on Children, Adolescents, and Young Adults. *Pediatrics*, v. 127, n. 3, 2011.

SEPKOWITZ, K.A. Energy drinks and caffeine-related adverse effects. *American Medical Association*, v.309, n.3, p.243-244, 2013.

SOLÍS, J.M.; HERRANZ, A.S.; HERRERAS, O.; LERMA, J.; DEL RÍO R.M. Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain? *Neurosci Lett.*, v. 91, n. 1, p. 53-58, 1988.

SORKIN, B.C.; CAMP, K.M.; HAGGANS, C.J.; DEUSTER, P.A.; HAVERKOS, L.; MARUVADA, P.; WITT, E.; COATES, P.M. Executive summary of NIH workshop on the Use and Biology of Energy Drinks: Current Knowledge and Critical Gaps. *Nutr Rev*, v. 72, p. 1–8, 2014.

UGWUJA, E.I. Biochemical Effects of Energy Drinks Alone or in Combination with Alcohol in Normal Albino Rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 4, n. 1, p. 69-74, 2014.

UGWUJA, E.I.; UGWU, N.C.; NWACHI, U.E. Hematological and biochemical parameters of diabetic rats administered either energy drink alone or energy drink mixed with alcohol. *J Pharm Biomed Sci*, v. 35 n. 35, p. 1808-1813, 2013.

VITVITSKY, V.; GARG, S.K.; BANERJEE, R. Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 286, n. 37, p. 32002–32010, 2011.

WOLK, B.J.; GANETSKY, M.; BABU, K.M. Toxicity of energy drinks. *Current Opinion Pediatrics*, v. 24, n. 2, p.243-251, 2012.