

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Avaliação da neurotoxicidade de bebidas energéticas contendo cafeína e  
taurina em ratos**

Marina Tuerlinckx Costa Valle

PORTO ALEGRE

2015

Marina Tuerlinckx Costa Valle

**Avaliação da neurotoxicidade de bebidas energéticas contendo cafeína e taurina em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Bainy Leal

PORTO ALEGRE

2015

Às pessoas mais importantes da minha vida:

Meus pais e minha irmã.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus e aos meus pais, Lilian e Luiz Antonio, pelo incentivo incondicional em todas as horas de minha vida, me apoiando, criticando e por sua imensa dedicação ao meu estudo e na minha felicidade.

A minha querida irmã Manuela, por querer estar sempre presente, transmitindo carinho, atenção, apoiando e criticando.

Agradeço a minha professora e orientadora Mirna Bainy Leal, em primeiro lugar por me abrir as portas da UFRGS, permitindo que eu começasse a trabalhar junto com seu grupo de pesquisa. Foi sempre atenciosa e prestativa, me apoiou, ajudou em todas as etapas do mestrado, sempre esteve presente e auxiliou em toda a realização do projeto.

A professora Eliane Dallegrave por também ter me acolhido, ter sido fundamental nos experimentos, me ensinando a fazer estatística, gráficos e tabelas.

A professora Renata Limberger que deu origem a realização deste tema como projeto, e por ter financiado parte deste.

A professora Carla Dalmaz e todas as meninas do seu laboratório, Natividade, Danusa, Karine e Ana por terem auxiliado na parte experimental e na realização dos experimentos na bioquímica.

As colegas do meu laboratório Rebeca e Ana Cláudia que sem o apoio e auxílio delas não teria conseguido realizar todos os experimentos.

A todos os professores da pós-graduação por transmitirem seus conhecimentos, ajudarem na formação do profissional. Bem como aos meus colegas de pós-graduação pelo apoio, amizade e companheirismo.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à PROPESQ/UFRGS pelo apoio financeiro.

E, por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| Resumo   | 9  |
| Abstract   | 11 |
| Lista de Abreviaturas                              | 13 |
| Lista de Figuras                                   | 14 |
| Lista de Tabelas                                   | 15 |
| 1. Introdução                                      | 16 |
| 1.1 Efeitos Adversos das bebidas energéticas       | 17 |
| 1.2 Cafeína  | 18 |
| 1.3 Taurina  | 20 |
| 1.4 Energéticos em associação a bebidas alcoólicas | 22 |
| 1.5 Estudos em animais                             | 24 |
| 1.6 Desequilíbrio oxidativo celular e energéticos  | 27 |
| 2. Objetivos                                       | 31 |
| 3. Materiais e Métodos                             | 32 |
| 3.1 Animais  | 32 |
| 3.2 Drogas e bebidas energéticas                   | 32 |
| 3.3 Doses e tratamentos                            | 32 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4 Testes de Toxicidade Aguda  | 33 |
| 3.4.1 Experimento 01 – Toxicidade Aguda dos energéticos e padrões                                 | 34 |
| 3.4.2 Experimento 02 – Toxicidade Aguda de ED 10 e padrões associados ao álcool                   | 34 |
| 3.4.3 Análise estatística – Toxicidade Aguda  | 35 |
| 3.5 Avaliações da toxicidade subcrônica   | 35 |
| 3.5.1 Avaliação da neurotoxicidade por desempenho no teste Rota Rod                               | 35 |
| 3.5.2 Teste de Atividade Locomotora   | 36 |
| 3.5.3 Teste de OX MAZE  | 36 |
| 3.5.4 Teste de Reconhecimento de objetos de memória de curta e longa duração                      | 37 |
| 3.5.6 Atividade das enzimas antioxidantes, produção de espécies reativas e conteúdo total de Tiol | 38 |
| 3.5.6.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)   | 38 |
| 3.5.6.2 Atividade da Catalase (CAT)   | 39 |
| 3.5.6.3 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)   | 39 |
| 3.5.6.4 Produção de espécies reativas (diclorofluoresceína)                                       | 40 |
| 3.5.6.5 Determinação do conteúdo total de Tiol  | 40 |
| 3.5.6.6 Análise Estatística   | 40 |

|   |    |
|---|----|
| 4. Resultados                             | 41 |
| 4.1 Toxicidade Aguda dos energéticos      | 41 |
| 4.2 Toxicidade Subcrônica dos energéticos | 48 |
| 5. Discussão                              | 61 |
| 6. Conclusão                              | 71 |
| 7. Referências Bibliográficas             | 74 |
| Anexo 1 – Carta Aprovação - CEUA          | 89 |



## Resumo

O consumo de bebidas energéticas cresce a cada ano e atinge um grupo cada vez maior de adolescentes e adultos jovens, porém, o impacto destas bebidas no desenvolvimento e na saúde ainda não tem resultados concretos. Diante do aumento no consumo de bebidas energéticas, principalmente associadas ao álcool, e considerando que o impacto toxicológico deste consumo excessivo é desconhecido, este trabalho teve por objetivo fazer uma avaliação da neurotoxicidade induzida por bebida energética, e seus principais componentes, cafeína e taurina em ratos Wistar machos. Os animais (n= 5/grupo) foram tratados em dose única para avaliação da toxicidade aguda (OECD 420) em dois experimentos. Experimento 1: os animais foram tratados por via oral com soluções contendo: água, bebida energética nas doses de 5 mL/kg (ED 5), 7,5 mL/kg (ED 7,5) e 10 mL/kg (ED 10), cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg e associação de cafeína 3,2 mg/kg e taurina 40 mg/kg. Foram observados comportamentos indicativos de atividade depressora ou estimulante do SNC e manifestações autonômicas. Durante 14 dias a variação de massa corporal e letalidade foram observadas. Ao fim deste período todos os animais foram anestesiados, eutanasiados e necropsiados, sendo determinada a massa relativa dos órgãos. Os resultados revelaram sinais de toxicidade pelo aumento da ambulação, taquipnéia e alguns comportamentos associados à ansiedade, principalmente nas doses intermediárias do energético (ED 7,5). Experimento 2: Os ratos foram tratados por via oral com soluções contendo: água, energético (ED 10), álcool 20% (2 g/kg e álcool 20% (2 g/kg) associado à energético (ED 10), cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg e associação de cafeína 3,2 mg/kg mais taurina 40 mg/kg. A avaliação da toxicidade aguda foi realizada conforme descrito anteriormente. Entretanto, neste protocolo os animais foram anestesiados, eutanasiados, necropsiados 24h após os tratamentos. A massa relativa dos órgãos foi determinada. Os resultados mostraram que quando o álcool foi associado ao energético ou a taurina e cafeína, os sinais de toxicidade observados foram mais intensos. Dando continuidade à avaliação da neurotoxicidade, procedeu-se a avaliação da toxicidade subcrônica dos energéticos e dos padrões (cafeína e taurina) (OECD 407). Os animais (n= 10/grupo) foram tratados por via oral

durante 28 dias com ED 5, ED 7,5, ED 10, cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg e a associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg. Demonstrou-se que nos testes de memória (OX Maze e reconhecimentos de objetos) os grupos tratados com cafeína e taurina isoladamente ou em associação tiveram um melhor desempenho nos parâmetros avaliados. Estes resultados são independentes de alterações na atividade locomotora, avaliada através do teste de Rota Rod e atividade locomotora espontânea. No 29<sup>o</sup> dia após o início dos tratamentos os animais foram eutanasiados e medidos os biomarcadores do 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 de tióis) nas estruturas córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. Os resultados obtidos com a associação de cafeína e taurina foram os mais relevantes demonstrando que houve diminuição da atividade de enzimas antioxidantes com consequências. Em todos os testes foi evidente que a associação de cafeína e taurina, mesmo nas concentrações presentes na maior dose de energético, diferiu dos efeitos da administração apenas do energético. Considerando que os efeitos dos energéticos são normalmente associados à presença de cafeína e taurina, sugere-se que os resultados podem estar relacionados com a presença de outros componentes nos energéticos, que interferem na modulação dos efeitos causados apenas pela associação de cafeína e taurina.

## Abstract

Consumption of energy drinks is growing every year and reaches a growing number of teenagers and young adults, however, the impact of these drinks in the development and health does not have concrete results. Due to the increase in the consumption of energy drinks, mainly associated with alcohol, and considering that the toxicological impact of this excessive consumption is unknown, the aim of this study was to evaluate the neurotoxicity induced by energy drink, and its main components, caffeine and taurine in male Wistar rats. The animals (n= 5/group) were treated in a single dose for evaluation of acute toxicity (OECD 420) in two experiments. Experiment 1: The animals were treated by oral route with water (control), energy drink in doses of 5 mL/kg (ED 5), 7.5 mL/kg (ED 7,5) and 10 mL/kg (ED 10), caffeine 3.2 mg/kg, taurine 40 mg/kg and the combination of 3.2 mg/kg caffeine and 40 mg/kg taurine. It was observed indicative behaviors of depressant or stimulant activity of the CNS and autonomic manifestations. During 14 days the body weight change and mortality were observed. At the end of this period all animals were anesthetized, euthanized and necropsied, and determined the relative organ weights. The results showed signs of toxicity by increased ambulation, tachypnea, and some behaviors associated with anxiety, especially in intermediate energy dose (ED 7.5). Experiment 2: The rats were orally treated with water (control), energy (ED 10), 20% alcohol (2 g/kg) and ethanol 20% (2 g/kg) associated with the energy drink (ED 10), caffeine 3.2 mg/kg, taurine 40 mg/kg and the combination of 3.2 mg/kg caffeine and 40 mg/kg taurine. The assessment of acute toxicity was performed as described above. However, in this protocol, the animals were anesthetized, euthanized, necropsied 24 after the treatments. The relative organ weights were determined. The results showed that when ethanol was associated to the energy drink or taurine and caffeine, the signs of toxicity were more intense. Continuing evaluation of neurotoxicity was carried out to evaluate subchronic toxicity of energy drink and components (caffeine and taurine) (OECD 407). The animals (n= 10/group) were treated orally for 28 days with ED 5, ED 7,5, ED 10, caffeine 3,2 mg/kg, taurine 40 mg/kg, and the combination of caffeine 3,2 mg/kg + taurine 40 mg/kg. It has been shown that in the memory tests (OX Maze and recognition of objects), the groups treated with caffeine and

taurine alone or in combination had a best performance in the evaluated parameters. These results are independent of changes in locomotor activity as measured by Rota Rod test and spontaneous locomotor activity. In 29th day after the start of treatment, the animals were euthanized and oxidative stress biomarkers such as the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), the total thiol content and the production of reactive species were measured in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum. The results obtained with the combination of caffeine and taurine were the most relevant, demonstrating that there was decreased activity of antioxidant enzymes. In all tests it was evident that caffeine and taurine mixture, even at the same concentration present in the largest amount of energy drink, differed from the effects of the administration of energy drink only. Whereas the effects of energy are usually associated with the presence of caffeine and taurine, it is suggested that these results may be related to the presence of other components in energy drink, which interfere with the modulation of the effects caused by the combination of caffeine and taurine only.

## **Lista de Abreviaturas**

**ANOVA** – Analysis of variance

**CAT** – Catalase

**DCFH** – Diclorofluoresceína

**DCFH-DA** – Diacetato de 2-7-diclorofluoresceína

**FDA** – Food and drug administration

**GABA** – Ácido gama aminobutírico

**GAD** – Ácido glutâmico descarboxilase

**GPx** – Glutathione peroxidase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**INT** – 2-(4-iodofenil)-3(4-nitrofenil)-5-cloro feniltretazólio

**NADPH** – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

**NMDA** – n-metil-D-aspartato

**OECD** – Organization for economic cooperation & development

**OHDA** – 6-hidroxy-dopamina

**SHR** – Ratos espontaneamente hipertensos

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SOD** – Superóxido dismutase

**WKY** – Ratos Wistar Kyoto

## Lista de Figuras

|                |   |    |
|----------------|---|----|
| Figura 1A      | Teste de Toxicidade Aguda dos energéticos e padrões após 30 min de administração em ratos Wistar machos                       | 42 |
| Figura 1B      | Teste de Toxicidade Aguda dos energéticos e padrões após 60 min de administração em ratos Wistar machos                       | 42 |
| Figura 1C      | Teste de Toxicidade Aguda dos energéticos e padrões após 120 min de administração em ratos Wistar machos                      | 43 |
| Figura 2       | Massa Corporal Relativa no Tratamento Agudo   | 44 |
| Figura 3A      | Teste de Toxicidade Aguda dos energéticos e padrões associados ao álcool após 30 min de administração em ratos Wistar machos  | 46 |
| Figura 3B      | Teste de Toxicidade Aguda dos energéticos e padrões associados ao álcool após 60 min de administração em ratos Wistar machos  | 47 |
| Figura 3C      | Teste de Toxicidade Aguda dos energéticos e padrões associados ao álcool após 120 min de administração em ratos Wistar machos | 47 |
| Figura 4       | Teste de Rota Rod   | 49 |
| Figura 5       | Teste de Atividade Locomotora   | 50 |
| Figura 6A      | Teste de OX MAZE para encontrar a primeira recompensa   | 51 |
| Figura 6B      | Teste de OX MAZE para encontrar a primeira recompensa   | 52 |
| Figura 7A e 7B | Teste de OX MAZE para encontrar a última recompensa   | 53 |
| Figura 8A      | Teste de OX MAZE no símbolo correto   | 54 |
| Figura 8B      | Teste de OX MAZE no símbolo correto   | 55 |
| Figura 9A e 9B | Teste de Reconhecimento de objetos de curta e longa duração   | 56 |
| Figura 10      | Massa Corporal Relativa no tratamento subcrônico  | 59 |

## Lista de Tabelas

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Varição do peso dos órgãos no Experimento 01 da Toxicidade Aguda | 45 |
| Tabela 2 | Varição do peso dos órgãos no Experimento 02 da Toxicidade Aguda | 48 |
| Tabela 3 | Biomarcadores do estresse oxidativo no Córtex Pré-Frontal        | 57 |
| Tabela 4 | Biomarcadores do estresse oxidativo no Hipocampo                 | 58 |
| Tabela 5 | Biomarcadores do estresse oxidativo no Estriado                  | 59 |
| Tabela 6 | Massa relativa dos órgãos após tratamento subcrônico             | 60 |

## 1. Introdução

As bebidas conhecidas como energéticos foram lançadas nos anos 60 na Europa e na Ásia, porém tiveram o reconhecimento mundial ao atingir o mercado americano em 1997 com a marca Red Bull®. Tais bebidas são desenvolvidas a base de cafeína e tem como intuito proporcionar um impulso de energia e aumentar o estado de alerta. No ano de 2006 mais de 500 marcas de energéticos eram comercializadas mundialmente (PENNAY et al, 2012). A indústria dos energéticos cresceu ao redor de 400% entre os anos 2003 e 2007 (HOWARD et al, 2010), com uma venda de 6,7 bilhões de dólares no ano de 2010. O consumo dessas bebidas é maior entre adolescentes e adultos jovens (MCLELLAN et al, 2012; RATH et al, 2012), representando cerca de 50% do mercado (MCLELLAN et al, 2012). Desde que a popularização dos energéticos aumentou, os residentes dos EUA (Estados Unidos da América) consumiram o estimado de 2,3 bilhões de energéticos em 2005 e 6 bilhões em 2010. Aproximadamente 6% dos homens jovens nos EUA relatam o consumo diário de energéticos. Em uma pesquisa, as tropas americanas no exterior 45% reportam uso diário. As vendas dos energéticos nos Estados Unidos aumentaram 16% em um único ano para quase 9 bilhões de dólares em 2011 (SEPKOWITZ, 2013).

A indústria multibilionária do mercado dos energéticos usa estratégias agressivas e inovadoras de marketing para atingir adolescentes e jovens (HOWLAND et al, 2013). Para tal os produtores dos energéticos os promovem em eventos de esportes e festivais de música, locais frequentados pelos principais consumidores (WOLK et al, 2012). Estudos demonstraram que 31%



de adolescentes entre 12 e 17 anos e 34% dos jovens entre 18 a 24 anos relataram o consumo de energéticos regularmente (SEIFERT et al, 2011).

Em 2011, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) encomendou um estudo para recolher dados sobre o consumo de bebidas energéticas em 16 países da União Europeia. Eles observaram que 68% dos adolescentes (com idades entre 10 e 18 anos de idade), 30% dos adultos, e 18% das crianças (< 10 anos) consumiram bebidas energéticas (BREDA et al, 2014). Os energéticos têm sido implicados como potencial perigo a população de crianças e adolescentes. Em função do menor peso destes indivíduos, estes estão mais suscetíveis a uma grande exposição dos ingredientes ativos numa base por quilograma (SHEARER et al, 2014).

Os principais constituintes dos energéticos são: cafeína, taurina, guaraná, açúcar, sódio e vitamina B6 (ISHAK et al, 2012). Também se observa na composição de algumas marcas de energéticos a presença de glucuronolactona, ginseng, Ginkobiloba entre outros (HIGGINS et al, 2010).

### **1.1 Efeitos Adversos das bebidas energéticas**

Alguns sintomas são implicados com o uso excessivo de bebidas energéticas como manifestações cardíacas; arritmias ventriculares e arteriais (GOLDFARB et al, 2014). Evidências sobre os potenciais riscos do alto consumo de energéticos emergem demonstrando que a cafeína presente nos energéticos é eficaz agudamente aumentando, a pressão sanguínea sistólica e diastólica, frequência cardíaca e débito cardíaco (GOMAR et al, 2015).

## 1.2 Cafeína

A cafeína é o componente psicoativo principal dos energéticos normalmente está presente em altas concentrações, resultando muitas vezes em ingestão excessiva, podendo causar toxicidade (WOLK et al, 2012; SEIFERT et al, 2011). Apesar de a cafeína estar associada à melhora de capacidades cognitivas como concentração e memória, ainda não se conhece o efeito de todos os componentes das formulações de forma isolada ou em combinação, além de poucos estudos com doses elevadas destes compostos, que são cada vez mais comumente ingeridos em altas doses (ISHAK et al, 2012).

A cafeína, contida em bebidas como os energéticos e drogas, é a substância mais utilizadas com o propósito de aumentar efeitos cognitivos, sendo que 53,2% afirmam ter usado o café em busca de aumento nos efeitos cognitivos ao menos uma vez em sua vida, 8,5% durante o último ano e 6,3% durante o último mês. As taxas de prevalência dos energéticos ao longo da vida são de 39%, 10,7% no último ano e 6,3% no último mês (FRANKE et al, 2014).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é o componente psicoativo primário encontrado nos energéticos. É absorvida rapidamente e completamente pela via oral, tendo meia vida de aproximadamente 4,5 h (WOLK et al, 2012;GLADE et al, 2010). Exerce efeitos psicoestimulantes em humanos e em ratos (BOECK et al, 2009). Pode-se destacar aumento no estado de alerta e redução de cansaço. Também pode estar relacionada ao aumento de ansiedade, pois indivíduos que consomem cafeína em grandes quantidades podem tornar-se

ansiosos. (SMITH, 2002). Uma sobre dose de cafeína pode causar palpitações, hipertensão, estimulação do sistema nervoso central, náusea, vômito, hipocalcemia, acidose metabólica, convulsões e, em casos raros até a morte. Em adultos, também a sobre dose de cafeína aumento do risco de hipertensão arterial e diabetes do tipo 2, uma vez que o consumo elevado de cafeína reduz a sensibilidade a insulina. O consumo de altas doses de cafeína em gestantes aumenta o risco de abortos tardios, baixo peso para idade gestacional e ainda nascimentos prematuros (BREDA et al, 2014). Os sintomas de intoxicação pela cafeína podem se parecer com os de ansiedade e transtornos de humor. Indivíduos que consomem energéticos podem aumentar o risco de intoxicação e sobre dosagem de cafeína (REISSIG et al, 2009).

Estudos farmacológicos indicam que os efeitos da cafeína no sistema nervoso central são mediados particularmente pela ação antagonista dos subtipos de receptores A1 e A2 de adenosina (LORIST et al, 2003). Tem também sido demonstrado que a cafeína induz a liberação de dopamina no estriado e no córtex pré-frontal. A função da dopamina no estriado é importante tanto para estimular quanto ativar o mecanismo de recompensa de várias drogas, incluindo os efeitos hedônicos do álcool. A cafeína, induzindo a liberação de dopamina nesta região tem sido relacionada com o aumento do desejo por outras drogas psicoativas. O mesmo mecanismo pode mediar o aumento do desejo de beber álcool que é visto com o consumo junto aos energéticos (McKETTIN, et al 2015).

A cafeína bloqueando os receptores de adenosina causa um aumento da liberação de dopamina, noradrenalina, glutamato. A cafeína também reduz o fluxo sanguíneo cerebral e reduz o fluxo sanguíneo do miocárdio. Os

receptores A1 podem ser encontrados em quase todas as áreas cerebrais, sendo que a maior concentração está no córtex cerebral e cerebelar, no hipocampo, e no núcleo talâmico. Pequena concentração está no estriado, no caudado e no putâmen. O bloqueio dos receptores A2 no gânglio basal, no estriado e no globo pálido parece ser fundamental para os efeitos estimulatórios da cafeína. Esses efeitos são dependentes de uma transmissão dopaminérgica intacta (CAPPELLETTI et al, 2015).

Existem evidências de que há uma relação entre receptores de adenosina e receptores de dopamina: uma neurotransmissão intacta dopaminérgica é necessária para os efeitos estimulatórios da cafeína. A interação entre cafeína e a transmissão dopaminérgica é baseada principalmente no aumento da transmissão pós-sináptica por meio de receptores de dopamina do tipo D2 (LORIST et al, 2003, BOECK et al, 2009). Quando a cafeína é ingerida em grandes quantidades ocorrem alguns sintomas de intoxicação como: ansiedade, inquietação, insônia, desconfortos gastrointestinais, tremores, taquicardia, agitação psicomotora e, em casos mais raros, podendo chegar à morte (REISSIG et al, 2009).

Os efeitos da cafeína contida nos energéticos no desempenho mental e cognitiva são indiscutíveis. Muitos estudos demonstraram que os energéticos aumentam a vigilância subjetiva e o desempenho em tarefas de atenção e memória, bem como em funções executivas (CHILDS et al, 2014).

### **1.3 Taurina**

O outro componente amplamente encontrado nos energéticos é a taurina, que tem numerosas funções biológicas e fisiológicas (HIGGINS et al,

2010). Atua também no sistema nervoso central (SNC), porém o impacto do uso de altas concentrações de taurina ainda não é bem conhecido (RATH et al, 2012, SEIFERT et al, 2011).

Taurina (2-aminoetil ácido sulfônico) é um  $\beta$ -amino ácido sulfonado derivado da dieta ou sintetizado da cisteína, principalmente no fígado. É o mais abundante aminoácido encontrado, primariamente na retina e tecidos dos músculos cardíacos e esqueléticos, sendo também encontrada no coração e no fígado, assim como no sistema nervoso central derivado do metabolismo da metionina e cisteína. A taurina é associada com uma variedade de funções fisiológicas incluindo neuromodulação, neuroproteção, osmoregulação, estabilidade da membrana celular, e modulação dos níveis intracelulares de cálcio in vitro e in vivo (DALL'AGNOL et al, 2009; HECKMAN et al, 2010; GILES et al, 2012).

A taurina é um componente comum encontrado em diversos energéticos. Melhora o humor em voluntários saudáveis, porém também induz mania em indivíduos suscetíveis. No contexto de doenças neuropsiquiátricas, níveis alterados de taurina têm sido demonstrados em várias condições, incluindo esquizofrenia (FEKKERS et al, 1994), epilepsia (GOODMAN et al, 1989), e depressão (LIMA et al, 2003), porém os estudos neste contexto ainda são limitados (WHIRLEY et al, 2008).

Alguns dos efeitos da taurina são atribuídos a um papel na função de memória através da modulação de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). Porém nenhum estudo em humanos estabeleceu uma relação concreta entre taurina e melhora da memória. Estudos em ratos demonstraram que a taurina

melhora a função de memória (BICHLER et al, 2006). Também vem sendo estudado o efeito da taurina na excitabilidade neural através da alteração do sistema inibitório GABAérgico, incluindo elevação na expressão do ácido glutâmico descarboxilase (GAD), aumento dos níveis de GABA, e baixa regulação do receptor GABA A (CALABRÓ et al, 2012).

A suplementação com taurina está provando ter alguns benefícios terapêuticos em casos clínicos específicos, incluindo pacientes com disfunção hepática, diabetes e doenças cardiovasculares (XU et al, 2008). A taurina atenua os efeitos estimulatórios da cafeína, e a combinação da cafeína com a taurina aumenta o estado de fadiga (CHILDS et al, 2014). Um possível mecanismo de neuroproteção pela taurina situa-se nos efeitos modulatórios do cálcio. A taurina modula tanto homeostase do cálcio citoplasmática quanto intramitocondrial. Além do mais a taurina serve como um agonista dos receptores GABA A. A deterioração na função gabaérgica causada pela idade e seu resultado no declínio cognitivo no aprendizado e memória, melhora com a suplementação de taurina exógena (EL IDRISSEI et al, 2013).

#### **1.4 Energéticos em associação a bebidas alcoólicas**

O consumo de energéticos associados com bebidas alcoólicas, como vodka surgiu a partir do ano de 2000 (PENNAY et al, 2012). O consumo recorrente de álcool e energéticos podem causar efeitos indesejáveis. Acredita-se que o efeito estimulante da cafeína pode antagonizar os efeitos sedativos do álcool, possivelmente levando a um aumento do consumo de álcool e conseqüentemente aumentando os efeitos tóxicos do álcool (HANN et al, 2012,

HOWLAND et al, 2010, FERREIRA et al, 2004) incluindo o aumento do risco de acidentes e violência (BERGER et al, 2013).

Em 2010 a FDA (Food and Drug Administration) determinou que a associação de cafeína e álcool não é segura (MARCZINSKI, et al 2015). Os indivíduos que ingerem energéticos acreditam que são mais capazes de executar comportamentos que exijam controle motor fino apesar de estarem debilitados pelo álcool, mascarando os sintomas subjetivos da intoxicação alcoólica (CURRY et al, 2009; SNIPES et al, 2013). Pesquisas revelam ainda que a percepção de cefaleia, xerostomia e prejuízo da coordenação motora diminui quando os energéticos são consumidos em associação com o álcool em comparação quando o álcool é consumido isoladamente (VERSTER et al, 2012).

Estudantes que consomem energéticos tendem a consumir maior quantidade de álcool e com maior frequência, quando comparados com aqueles indivíduos que não consomem. Também há evidências que o consumo de energéticos aumenta quando associado ao álcool (BRACHE et al, 2011, PEACOCK et al, 2013). Apesar dos relatos dos benefícios causados pelo consumo de energéticos (aumento da vigília e da energia), algumas desvantagens também são mencionadas (distúrbio do sono, piora dos sintomas de ressaca e aumento da frequência cardíaca) (PENNAY et al, 2012).

Usuários de energéticos associados ao álcool estão mais propensos ao uso de cocaína, ecstasy, maconha e medicamentos sem prescrição (BRACHE et al, 2011; SNIPES et al, 2013). Alguns transtornos psiquiátricos também têm sido associados (ansiedade, psicoses e hiperatividade) (WOLK et al, 2012). A

associação de álcool com energéticos (ou álcool e cafeína) resulta no aumento da estimulação (em humanos e animais), decréscimo da percepção de intoxicação (em humanos) e no aumento do desejo de maior intoxicação alcoólica (em humanos e animais) quando comparado ao álcool sozinho (MARCZINSKI, et al 2014).

A sedação observada após a ingestão alcoólica ocorre em razão do aumento da atividade extracelular do neurotransmissor adenosina. A cafeína por sua vez bloqueia os receptores de adenosina, ou seja, quando há ingestão da associação os sintomas de sedação alcoólica são inibidos através da ação da cafeína. E também através da inibição dos receptores de adenosina pela cafeína, aumenta a atividade do neurotransmissor dopamina (MARCZINSKI, et al 2015).

### **1.5 Estudos em animais**

Em um estudo realizado com camundongos observou-se que a cafeína diminui os efeitos sedativos do álcool particularmente a locomoção e a ataxia. A pré-exposição da associação álcool e cafeína atenua os efeitos agudos tóxicos em alta dose do álcool, porém a cafeína não influencia os efeitos condicionados do álcool. Agudamente a cafeína tende a antagonizar os efeitos locomotores depressores, com uma exposição repetida da associação leva a um aumento em atividade motora comparada a cada droga administrada separadamente (MAY et al, 2015). Assim como em outro estudo realizado em camundongos, observou-se que o consumo de álcool e cafeína não produziu nenhuma evidência de sedação causada pelo álcool em igual dosagem ao



álcool separadamente, e produziu um estado altamente estimulado, portanto a cafeína antagonizou a ataxia induzida pelo álcool (FRITZ et al, 2014).

Sendo a cafeína e a taurina, componentes amplamente utilizados em energéticos, pesquisas relatam o efeito de ambas no desempenho físico. Foi observado que a administração conjunta de ambos componentes aumentou a distância percorrida em testes animais de resistência física (IMAGAWA et al, 2009). Baseados ainda no conhecimento de ação da cafeína e taurina no sistema nervoso pode-se assumir que estas substâncias alteram os efeitos do álcool, principalmente através dos efeitos estimulantes da cafeína e ou talvez a influência da taurina na neurotransmissão mediada por GABA. Para aferir tais condições através em modelo de estudo animal observou que a administração de energéticos aumentou a atividade locomotora, porém quando administrada juntamente com o álcool não houve mudanças de alterações nos efeitos do álcool, mas reduziu o efeito depressor do mesmo (FERREIRA A et al, 2004).

No estudo da memória em modelos animais, uma pesquisa relatou que a cafeína tem efeitos diferentes dependendo do estágio de processamento da memória. Os efeitos da cafeína na consolidação da memória em ratos controles concordam com maioria dos estudos anteriores, que reportaram a melhora da retenção da memória em ratos após administração de cafeína (PREDIGER B et al, 2005). Outros estudos, demonstraram que os agonistas de receptores de adenosina (A1) prejudicam o aprendizado e a memória em ratos, enquanto o bloqueio não seletivo dos receptores de adenosina A1 e A2 pela cafeína facilita o aprendizado e a memória dos ratos (PREDIGER A et al, 2005).

Pesquisas mostram que o tratamento crônico com cafeína apresenta diferentes efeitos dependendo da linhagem dos animais. Por exemplo, cafeína administrada cronicamente não apresentou efeitos de memória na linhagem WKY (Wistar Kioto Rats), mas melhorou os déficits de memória e atenção apresentados por ratos da linhagem SHR (ratos hipertensos, modelo de déficit de atenção e hiperatividade). Além disso, nesses últimos animais, foi observado aumento da densidade de transportadores de dopamina e da captação de dopamina in vitro no córtex frontal de ratos (PANDOLFO et al., 2013).

Estudando o efeito da cafeína como possível tratamento para o aumento da atenção e da memória, ratos neonatos lesionados com 6-hidroxy-dopamina (6-OHDA) foram utilizados para estudar o déficit de atenção e de hiperatividade. Foi feita avaliação de comportamento e da locomoção no labirinto Olton, resultando que, embora não houvesse incremento da locomoção dos animais, após o tratamento contínuo com a cafeína, houve a melhora da atenção dos ratos lesionados (CABALLERO et al, 2011).

A administração de altas doses de álcool em ratos causa prejuízo em testes de memória, como o reconhecimento de objetos. Em estudo conduzido utilizou-se a cafeína com o intuito de prevenir a perda de memória quando administrada com o álcool, e os resultados mostraram-se satisfatórios (SPINETTA et al, 2008). Os efeitos concomitantes da administração de álcool e taurina são especulativos quanto à possibilidade de a taurina reforçar efeitos de euforia do álcool. Em um estudo buscou-se aferir esta possibilidade em testes de locomoção, ataxia e perda de reflexo de endireitamento em camundongos.

Observou-se que não houve interação da taurina e do álcool nas condições estudadas (GINSBURG et al, 2008).

Na tentativa de estudar os efeitos sobre ansiedade e aprendizado, estudaram-se em camundongos os efeitos da cafeína e do álcool no labirinto em cruz com a tarefa de esquiva. Os resultados encontrados revelaram que as dificuldades de aprendizado associadas com o álcool não foram revertidas pela associação com a cafeína, mas o álcool bloqueou os efeitos ansiogênicos da cafeína. Ainda, a cafeína reverteu os efeitos sedativos do álcool e déficits de atenção (GULICK et al, 2009). Em outro estudo também foi relacionado o efeito do álcool e da cafeína, em diferentes concentrações, em camundongos os testes avaliaram a preferência por diferentes ambientes e a locomoção, no teste no aparato claro-escuro. A partir dos testes pode-se concluir que a administração conjunta de álcool e cafeína aumentou a locomoção (HILBERT et al, 2013).

## **1.6 Desequilíbrio oxidativo celular e energéticos**

O estresse oxidativo decorre de desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante do organismo (HALLIWELL, 1996). Os radicais livres e as espécies reativas do oxigênio (EROS) são constantemente produzidas em baixos níveis no organismo como parte de processos biológicos normais e essenciais (HALLIWELL & CROOS, 1994). Um importante processo metabólico envolvido com essa produção envolve a cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria, a principal fonte geradora dessas espécies. Uma vez produzidas em excesso, por serem altamente reativas, elas podem causar danos à célula,

como por exemplo, danos a moléculas de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (VALKO et al., 2007), podendo até causar morte celular.

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes oxidantes e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do  $O_2$  e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de  $O_2$ . O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. Esse sistema antioxidante, usualmente, é dividido em enzimático (Superóxido dismutase, Catalase e Glutaciona peroxidase) e não-enzimático (HALLIWELL & CROSS, 1994). Este último é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética (BARBOSA et al, 2010). Esse sistema de defesa pode atuar de duas maneiras. Uma delas consiste em atuar como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutaciona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutaciona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, glutaciona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px (FERREIRA et al, 1997). Como visto nos exemplos, alguns antioxidantes podem tanto atuar diretamente sobre as espécies reativas quanto reparando moléculas, como é o caso da glutaciona peroxidase.

A enzima antioxidante superóxido-dismutase é uma enzima com uma presença generalizada no organismo, que catalisa a dismutação do radical superóxido. A enzima SOD tem três variantes: a SOD cobre – zinco que é

predominante, e é constituída por enzimas encontradas no citoplasma, enquanto a SOD manganês está localizado nas mitocôndrias. Um terceiro tipo está presente no meio extracelular (JEEVA, et al 2015). Um subproduto desta reação catalisada pela reação é o peróxido de hidrogênio, que causa prejuízo pela formação de radicais livres.

As enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase agem como antioxidantes. A glutathione peroxidase atua sobre peróxidos, e necessita de um tripeptídeo, a glutathione (GSH), como doador de elétrons durante a reação. Esse peptídeo passa a sua forma oxidada (GSSG), que é novamente reduzida pela glutathione reductase, completando o ciclo. A repetida oxidação e redução da glutathione a torna um captador de radicais. A catalase é uma enzima antioxidante que atua como um catalisador para a conversão de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio.

O cérebro é especialmente vulnerável aos danos causados pelos radicais livres e EROS, por possuir um alto consumo de oxigênio, abundante conteúdo de lipídeos e insuficiência relativa de enzimas antioxidantes comparada com outros tecidos (OLANOW, 1992; HALLIWELL and GUTTERIDGE, 2007).

Poucos estudos foram encontrados na literatura avaliando impacto de energéticos no sistema antioxidante. ZEIDÁN-CHULIÁ e colaboradores (2013) avaliaram cafeína, taurina e guaraná sobre o sistema antioxidante em células humanas neuronais SH-SY5Y e demonstraram que houve redução dos níveis basais de geração de radicais livres. A combinação de cafeína ou taurina com guaraná induziu uma diminuição na atividade da superóxido dismutase (SOD)

in vitro, assim como a associação de cafeína ou taurina ao guaraná diminui a atividade da catalase (CAT) nas células, porém não houve mudanças na atividade da glutathione peroxidase (GPx) .

Devido à carência de dados na literatura, que relacionam os energéticos e seus compostos (cafeína e taurina) em modelos in vivo de comportamento, e avaliação de enzimas antioxidantes contra a produção de radicais livres, diante do aumento progressivo do consumo de bebidas energéticas, principalmente associadas ao álcool, e considerando que o impacto toxicológico deste consumo excessivo é desconhecido. Este trabalho teve por objetivo fazer uma avaliação da neurotoxicidade aguda dos energéticos em diferentes doses e seus constituintes (cafeína e taurina) associados, separados e juntamente ao álcool. Bem como avaliar a neurotoxicidade subcrônica dos energéticos nas diferentes doses e seus constituintes, porém sem associação ao álcool, através de testes comportamentais e bioquímicos em ratos.

## **2. Objetivos**

-Avaliar a toxicidade aguda de bebidas energéticas e dos padrões cafeína e taurina, separados e em associação em ratos.

-Avaliar a toxicidade aguda de bebidas energéticas e dos padrões cafeína e taurina, separados e em associação ao etanol em ratos.

-Avaliar a neurotoxicidade subcrônica de bebidas energéticas e dos padrões cafeína e taurina, separados e em associação em ratos.

-Avaliar a neurotoxicidade subcrônica comportamental em ratos por desempenho no teste do Rota-rod, teste de atividade locomotora, teste de OX MAZE e memória de reconhecimento de objetos.

-Avaliar os biomarcadores do estresse oxidativo nas estruturas córtex pré-frontal, hipocampo e estriado: atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e a produção de espécies reativas através da medida de diclorofluoresceína (DCFH) e conteúdo de tióis após o tratamento subcrônico.

### **3. Materiais e Métodos**

**3.1 Animais:** Aprovação CEUA/UFRGS 26689/2014 (ANEXO 1). Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (60 dias), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório da UFRGS (CREAL-UFRGS). Antes de iniciar os experimentos os animais foram adaptados por 15 dias no biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – UFRGS, 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. O número de animais por grupo seguiu o padrão de literatura para teste de toxicidade aguda e ensaios comportamentais, sendo este, fixado em 5 animais por grupo para o ensaio agudo (OECD 420) e 10 animais por grupo para o ensaio subcrônico, sendo utilizados ao total 135 animais (PANDOLFO et al, 2013; CABALLERO et al, 2011; WOOD et al, 2011, GINSBRUG et al, 2008; BOECK et al, 2009; HILBERT et al, 2013).

**3.2 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 e administrada por gavagem assim como os demais tratamentos.

**3.3 Doses e tratamentos:** As doses de energéticos e dos padrões cafeína (3,2 mg/Kg) e taurina (40 mg/Kg) foram definidas através de cálculo relativo às doses ingeridas usualmente por consumidores. Estabelecendo uma similaridade com os energéticos, o padrão cafeína e taurina contida em uma



lata de 250 mL de energético consumida por um indivíduo adulto pesando 70 kg, é de taurina (1000 mg/250 mL) e cafeína (80 mg/250 mL), sendo administradas volumes equivalentes a 1 lata (5 mL/kg) (ED 5), 2 latas (7,5 mL/kg) (ED 7,5) e 3 latas (10 mL/kg)(ED 10) (FERREIRA et al, 2013). O volume 10 mL/kg de energético tinha 40 mg/kg de taurina e 3,2 mg/kg de cafeína (FERREIRA et al, 2004 A) e foram as doses selecionadas para serem administradas isoladamente ou em associação em todos os experimentos. Todos os animais foram tratados por gavagem com doses no volume máximo de 10 ml/Kg.

O Etanol P.A. utilizado no teste de toxicidade aguda foi diluído em água destilada. As soluções de etanol administradas por gavagem em doses equivalentes a 2 g/kg de etanol 20% (controle etanol) e esta associada a: 10 mL/kg de energético (ED 10), cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg, cafeína 3,2 mg/kg mais taurina 40 mg/kg associadas (FERREIRA et al, 2004 A).

### **3.4 Teste de Toxicidade Aguda**

O teste foi baseado no método de toxicidade aguda de dose fixa – Organization for Economic Cooperation & Development (OECD 420), onde grupos de 5 animais foram tratados por via oral e logo após a administração, cada animal foi observado durante 1 minuto nos períodos de 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 min. Foram observados comportamentos indicativos de atividade depressora ou estimulante do SNC e manifestações autonômicas. Os sinais indicativos de toxicidade observados foram: alteração da locomoção, reação a estímulos, piloereção, diarreia, sialorréia, tremor, ptose, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões e contorções abdominais. Os resultados foram

expressos como porcentagem de animais que apresentaram o comportamento, sendo 100% = 5 animais.

Letalidade foi observada durante as primeiras 24h após a administração dos tratamentos e diariamente durante 14 dias.

#### **3.4.1 EXPERIMENTO 01 – Toxicidade aguda de energéticos e padrões:**

Os ratos foram tratados por via oral com soluções contendo: água, energético (ED 5, ED 7,5 e ED 10), cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg, e cafeína (3,2 mg/Kg) associada a taurina (40 mg/Kg) a avaliação da toxicidade aguda foi realizada conforme descrito anteriormente (**item 3.4**). A variação de massa corporal também foi observada durante os 14 dias após a administração dos tratamentos. Ao fim deste período todos os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com a associação de tiopental (100 mg/kg) e lidocaína (10 mL/Kg) e eutanasiados e necropsiados. Sob anestesia os animais foram exsanguinados por punção cardíaca e posteriormente, os órgãos foram removidos e pesados, sendo determinada a massa relativa dos órgãos.

#### **3.4.2 EXPERIMENTO 02– Toxicidade aguda de ED10 e padrões associados ao álcool:**

O teste de toxicidade aguda também foi realizado com a associação de bebida energética e álcool, os ratos foram tratados por via oral com soluções contendo: água, energético (ED 10), álcool 20% (2 g/kg) (controle etanol) e álcool 20% (2 g/kg) associado ao energético (ED 10), a cafeína 3,2 mg/kg, a taurina 40 mg/kg, e associação de cafeína 3,2 mg/kg mais taurina 40 mg/kg. A avaliação da toxicidade aguda foi realizada conforme descrito anteriormente (**item 3.4**). Entretanto, neste protocolo 24h após a administração dos

tratamentos os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com a associação de tiopental (100 mg/kg) e lidocaína (10 mL/Kg) e eutanasiados e necropsiados, os órgãos foram removidos e pesados, sendo determinada a massa relativa.

### **3.4.3 Análise estatística – Toxicidade Aguda**

Os resultados da avaliação dos sinais de toxicidade comportamental foram expressos como porcentagem de animais que apresentaram o comportamento, sendo 100% = 5 animais, e analisados através do teste qui-quadrado.

Os resultados referentes à massa relativa dos órgãos foram analisados através de ANOVA de uma via/Bonferroni e os resultados referentes à variação de massa corporal foram avaliados através de ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni.

### **3.5 Avaliação da toxicidade subcrônica:**

O teste foi baseado no método de toxicidade subcrônica Organization for Economic Cooperation & Development (OECD 407), onde grupos de 10 animais foram tratados por via oral durante 28 dias com ED 5, ED 7,5, ED 10, cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg e cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg associadas. A seguir serão descritos os métodos que foram avaliados durante o tratamento subcrônico.

#### **3.5.1 Avaliação de neurotoxicidade por desempenho no teste do Rota-Rod:**

O teste foi realizado no 14<sup>o</sup> dia antes da administração diária dos tratamentos, segundo método descrito por MACIEL (2012). Primeiramente foi realizado um treino, e seguido 1h foi realizado o teste, onde foi determinada a latência de permanência no aparelho Rota Rod (Insight Equipamentos Ltda Ribeirão Preto, Brasil) foi realizada uma tentativa de no máximo 90s a 18 rpm. Os resultados foram analisados através de ANOVA de uma via/Bonferroni.

### **3.5.2. Teste de Atividade locomotora:**

A avaliação da atividade locomotora espontânea foi realizada no 15<sup>o</sup> dia, antes da administração diária dos tratamentos. Os animais foram colocados na caixa de atividade locomotora (Insight Equipamentos Ltda Ribeirão Preto, Brasil), a qual consiste em uma caixa de 50 x 48 x 50 cm, dotada de seis barras, cada uma com 16 sensores de luz infravermelha que detectam a posição relativa do animal na caixa. A distância percorrida foi monitorada durante 15 minutos, sendo os 5 min iniciais considerados atividade exploratória e os 10min finais a atividade locomotora. Os resultados foram analisados através de ANOVA de uma via/Bonferroni.

### **3.5.3 Teste de OX MAXE**

Segundo o método descrito por WOOD et al (2011) e ROJAS, et al (2015), o teste foi utilizado avaliar a discriminação visual, aprendizado e memória. O aparato consiste de uma caixa de acrílico medindo 60 cm x 60 cm x 30 cm de altura. O labirinto era composto por quatro blocos brancos Perspex (10 cm x 10 cm x 5 cm de altura). Os blocos tinham um orifício circular (2 cm de diâmetro x 2 cm de profundidade) em cada lado, com cada orifício a ser localizado no meio de um dos quatro símbolos ( O, X , = ,| | ), desenhados com

um marcador preto permanente. A orientação dos símbolos em relação uns aos outros foi idêntica em cada bloco. Os blocos foram posicionados simetricamente na caixa. O teste foi realizado entre o 16º e 26º dia, sempre antes da administração diária dos tratamentos. Para realizar o teste um pellet comestível (Kellog's® Froot Loops® Brasil) foi colocado em um dos quatro orifícios dos blocos condizentes com cada um dos símbolos, sendo que a recompensa foi sempre colocada no mesmo lugar (bloco de símbolo O). Os ratos foram colocados no labirinto e durante 10 minutos foi contada a latência para encontrar a primeira recompensa, o número de vezes que o animal cheirava corretamente os orifícios de cada bloco e o tempo para concluir o teste. O labirinto e os blocos foram higienizados com álcool 30% de forma branda para impedir a interferência nos testes. Cada rato poderia receber até quatro recompensas por dia. Durante os 10 dias de experimento a disposição do labirinto foi alternada a cada dia. Os resultados foram analisados através de ANOVA de medidas repetidas e ANOVA/Bonferroni.

#### **3.5.4 Teste de Reconhecimento de objetos de memória de curta e longa duração:**

No 27º e 28º dias antes da administração dos tratamentos diários foi realizado um treinamento e 1 hora e 30 minutos (curta duração) e 24h (longa duração) após foi realizado o teste de reconhecimento de objetos, os animais eram administrados sempre após os testes para que não ocorresse efeito agudo do tratamento, mas sim residual (MACIEL et al, 2014).

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado em uma “arena” de acrílico cuja base mede 60 cm x 60 cm cuja altura é de 30 cm (a mesma usada

no OX Maze), em razão dos animais terem realizado os testes por 10 dias na arena do OX MAZE não há necessidade de habituar os animais ao aparato para realizar o teste de reconhecimento de objetos. Na habituação, 2 objetos idênticos (A1 e A2) foram colocados em lados opostos nos cantos da arena, no qual os ratos podiam explorar por 5 minutos. Após um período de 1h e 30 minutos a cópia idêntica do objeto familiar (A3) e um novo objeto (B) foram colocados no mesmo local onde estavam A1 e A2 anteriormente, permitindo que o rato explorasse estes novos objetos por mais 5 minutos. Após 24 horas eram colocados os objetos familiar (A1) e um objeto novo (C) permitindo também a exploração por 5 minutos. A localização dos objetos era contrabalanceada em cada sessão. A exploração do objeto era definida como a aproximação do rato por aproximadamente 2 cm ou menos do objeto, bem como quando o animal tocava o objeto com suas vibrissas. As análises foram feitas através dos parâmetros: tempo total explorando o objeto novo (TN) divididos pelo tempo total explorando os dois objetos o novo (TN) e o familiar (TF) na fase discriminatória  $TN/(TF+TN)$  (MACIEL et al, 2014). Os resultados foram analisados através do teste Kruskal Wallis Test.

### **3.5.6 Atividade das enzimas antioxidantes, produção de espécies reativas e conteúdo total de Tiol**

No 29<sup>o</sup> dia após os tratamentos, os animais foram decapitados sem anestesia como forma de proceder à eutanásia. Foi realizada a dissecação de estruturas encefálicas (córtex, hipocampo e estriado) para testes neuroquímicos das enzimas antioxidantes.

#### **3.5.6.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da Superóxido Dismutase foi determinada utilizando o Kit comercial RANSOD (RandoxLABs.,USA) baseado no procedimento descrito por DELMAS-BEAUVIEUX et al. 1995. Este método emprega xantina e xantina oxidase para a geração de radicais superóxido que reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto feniltretrazólio (INT) para formar coloração de formazan que é medida espectrofotometricamente a 492nm a 37,8°C. A inibição da produção do cromógeno é proporcional à atividade da SOD presente na amostra. Uma unidade de SOD causa a inibição de 50% da taxa de redução de INT sob as condições do ensaio.

#### **3.5.6.2 Atividade da catalase (CAT)**

A catalase é uma enzima capaz de degradar peróxidos, incluindo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e sua atividade é baseada no estabelecimento da taxa de degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> espectrofotometricamente a 240nm a 25°C (AEBI, 1984). A atividade da CAT foi calculada em termos de micromoles consumida por minuto por miligrama de proteína, sendo o coeficiente de extinção molar de 43,6 M/cm.

#### **3.5.6.3 Atividade da glutaciona peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi determinada de acordo com WENDEL 1981 com modificações. A reação foi realizada a 37° C em uma solução contendo 20 mM tampão fosfato de potássio (pH 7,7), 1,1 mM EDTA, 0,44 mM de azida de sódio, 0,5 mM NADPH, 2 mM de glutaciona e 0,4U glutaciona redutase. A atividade da GPx foi medida tomando terc-Butilhidroperóxido como substrato a 340 nm. A oxidação espontânea do NADPH foi subtraída da taxa de reação global. A

atividade da GPx foi calculada em pmol de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína e expressa como porcentagem do controle.

#### **3.5.6.4 Produção de espécies reativas (diclorofluoresceína)**

Homogêinizados das estruturas foram incubadas com diacetato de 2-7-diclorofluoresceína (DCFH-DA 100µM) a 37 C por 30 minutos. O DCFH-DA foi clivado por esterases celulares e o DCFH formado é por fim oxidado por espécies reativas de oxigênio/nitrogênio. A formação do derivado diclorofluoresceína (DCF) foi monitorado por fluorescência (SpectraMax M5) usando os comprimentos de onda de 488 (excitação) e 525 (emissão) nm. A quantidade de espécies reativas foi quantificada usando uma curva padrão para DCF e os resultados expressos com nmoles de DCF formados por mg de proteína na amostra (SRIRAM et al, 1997).

#### **3.5.6.5 Determinação do conteúdo total de TioI**

Este ensaio baseia-se na redução de 5, 50 - ditiobis -2-nitrobenzóico (DTNB) por grupo tioI, que se torna oxidado (dissulfeto), obtendo-se um composto amarelo (TNB) cuja absorção é medida por espectrofotometria análise a 412 nm.

#### **3.5.6.6 Análise estatística**

Os resultados foram analisados através de ANOVA de uma via/Bonferroni. A relação das enzimas SOD, CAT e GPx foi determinada através da divisão dos resultados de SOD pela soma de CAT + GPx (SOD/CAT+GPx) e analisada também através de ANOVA/Bonferroni, através do programa SPSS Statistics versão 18.



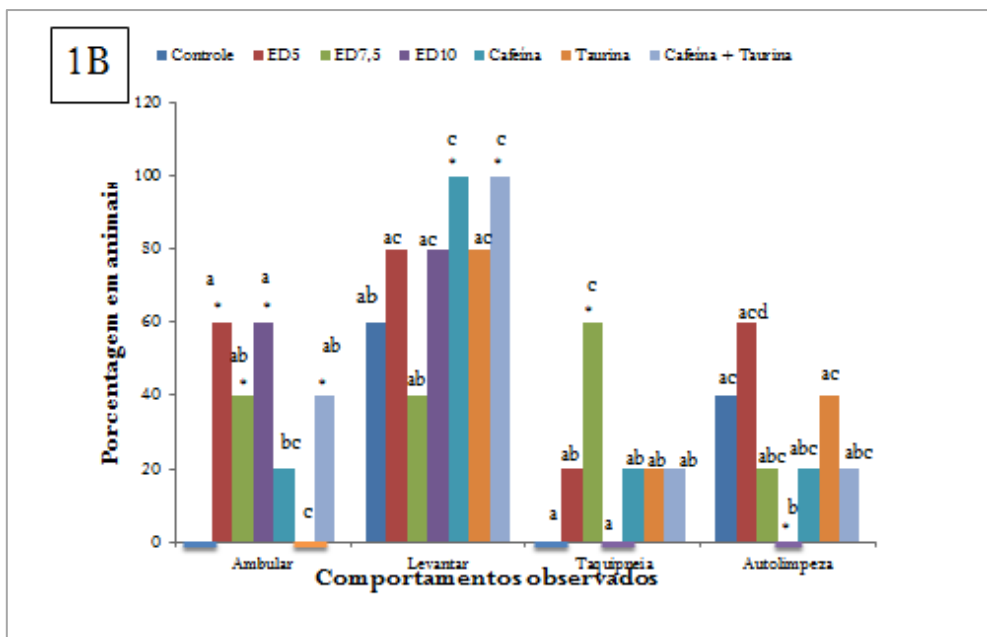
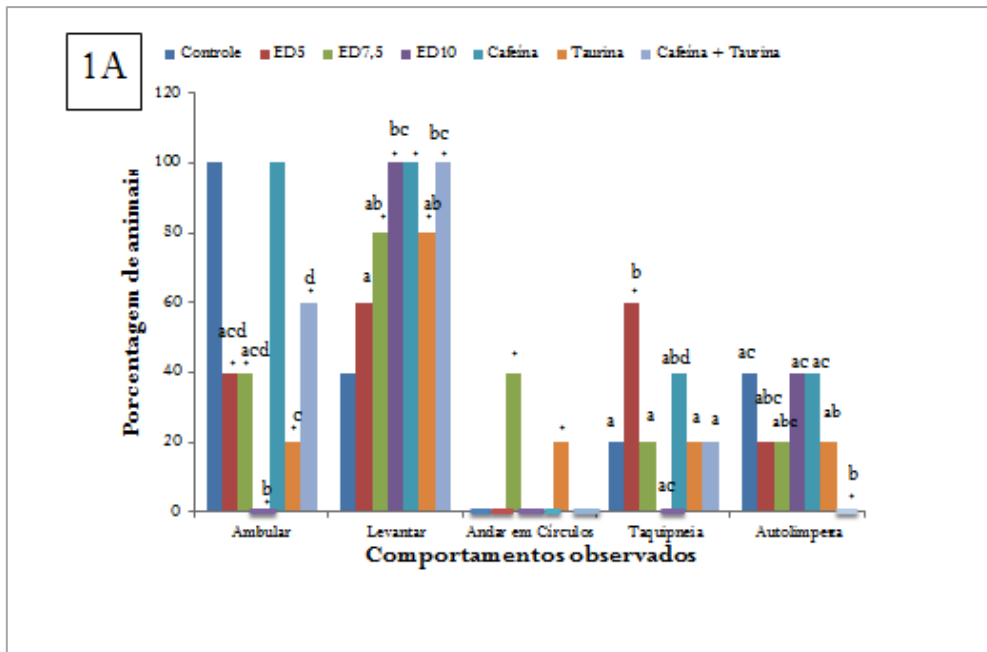
## 4. Resultados

### 4.1 Toxicidade Aguda dos Energéticos

No teste de toxicidade aguda os sinais significativos observados 30min após o tratamento com energéticos e padrões associados foram diminuição da porcentagem de ambulação e aumento do *rearing* (levantar). O comportamento de andar em círculos também foi observado com o energético (ED 7,5) e taurina 40 mg/kg. O grupo tratado com energético (ED 7,5) apresentou um aumento percentual na taquipneia e diminuiu a autolimpeza (Figura 1A) ( $P < 0,01$ ) Qui-quadrado.

Sessenta minutos após o tratamento agudo com energéticos e padrões associados foram observados aumento do percentual da ambulação nos grupos tratados com energéticos e associação de cafeína e taurina, aumentou o percentual da taquipneia nos grupo energético (ED 7,5) e diminui a autolimpeza no grupo energético (ED 10) (Figura 1B) ( $P < 0,01$ ) Qui-quadrado.

Nos 120 min após o tratamento a ambulação permaneceu aumentada no grupo ED 7,5 e grupo cafeína e taurina, aumentou também percentualmente o *rearing* (levantar) no grupo ED 7,5. O percentual da taquipneia aumentou nos grupos tratados com ED 5 e cafeína. Hipnose foi observada nos grupos tratados com cafeína ou taurina isoladamente (Figura 1C) ( $P < 0,01$ ) Qui-quadrado.



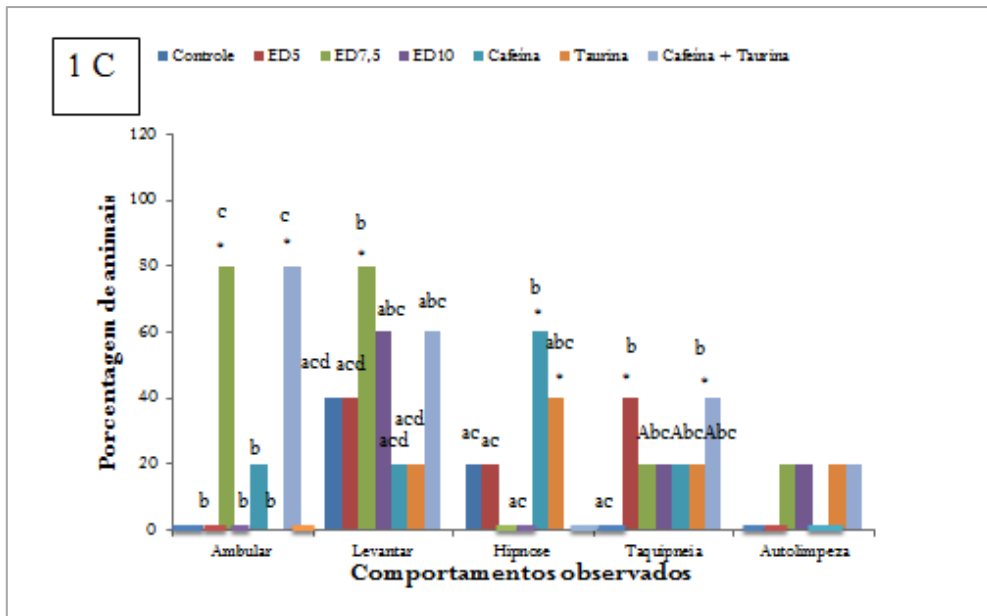


FIGURA 1: Efeito de bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg no teste de toxicidade aguda. Controle = água. Os dados são expressos como porcentagem de animais que apresentaram o comportamento. A) comportamentos observados após 30 min. B) comportamentos observados após 60 min. C) comportamentos observados após 120 min (n=5) (\* P< 0,01 diferença significativa do controle; <sup>a,b,c,d</sup> P< 0,01 diferença significativa entre os grupos, Qui-quadrado).

A variação de peso corporal ao longo dos 14 dias está demonstrada na figura 2. Pode se observar que houve ganho de massa corporal relativa no 14º dia (P< 0,05) ANOVA de duas vias/Bonferroni no grupo tratado com ED 10.

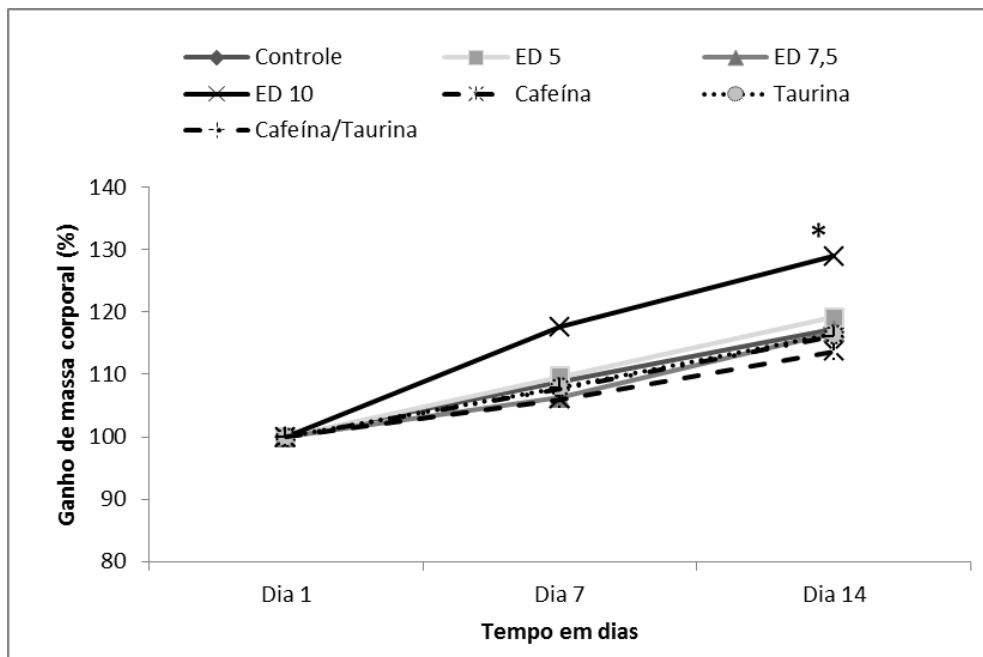


FIGURA 2: Efeito do tratamento agudo com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg no ganho de massa corporal em ratos 14 dias após a administração única (n=5) (\* P<0,05 em relação ao controle) ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni.

No final do teste de toxicidade aguda os rins, adrenais e fígado foram observados quanto a alterações macroscópicas e não houve diferença significativa (Tabela 1).

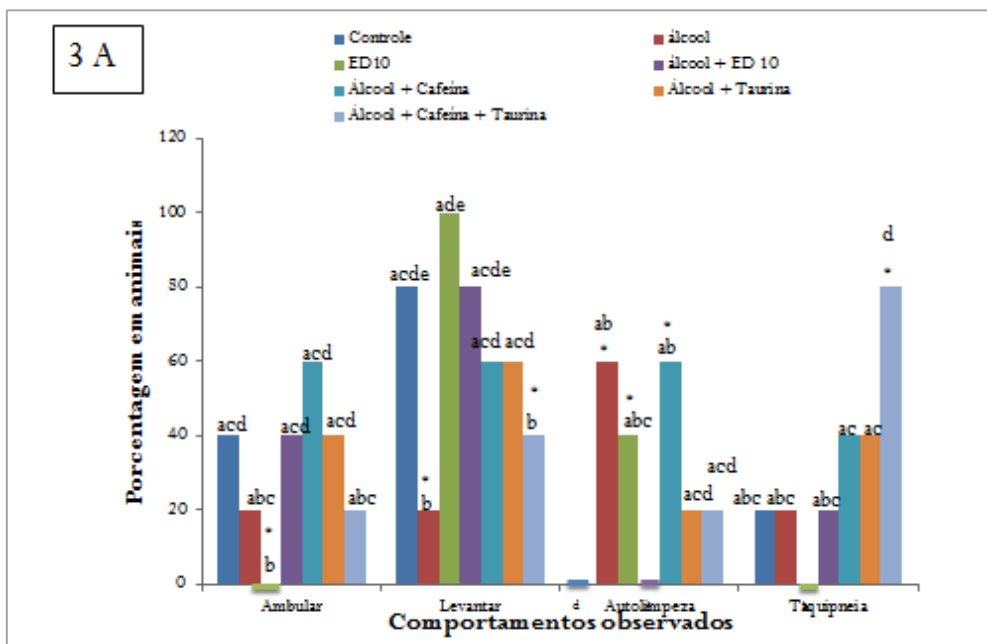
Tabela 1: Efeito do tratamento agudo com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg e associação de cafeína 3,2 mg/kg (Caf) + taurina 40 mg/kg (Tau) na variação do peso dos órgãos 14 dias após a administração única (n=5). Os dados representam a média ± EP da massa relativa do órgão ANOVA de uma via.

|          | Fígado (g)  | Rins (g)    | Adrenais (g)    |
|----------|-------------|-------------|-----------------|
| Controle | 3,47 ± 1,55 | 0,79 ± 0,35 | 0,0171 ± 0,0077 |
| ED 5     | 3,73 ± 1,67 | 0,80 ± 0,36 | 0,0192 ± 0,0086 |
| ED 7,5   | 3,72 ± 1,66 | 0,79 ± 0,35 | 0,0170 ± 0,0076 |
| ED 10    | 3,58 ± 1,60 | 0,82 ± 0,37 | 0,0165 ± 0,0074 |
| Cafeína  | 3,70 ± 1,66 | 0,81 ± 0,36 | 0,0170 ± 0,0076 |
| Taurina  | 3,72 ± 1,66 | 0,80 ± 0,36 | 0,0163 ± 0,0073 |
| Caf/Tau  | 3,61 ± 1,61 | 0,80 ± 0,36 | 0,0174 ± 0,0078 |

O teste de toxicidade aguda realizado com a associação de álcool e energéticos, no 2º experimento demonstrou que após os 30 min iniciais do teste podem-se observar os seguintes comportamentos em percentual: diminuição da ambulação no grupo tratado com energético 10 mL/Kg, diminuição do *rearing* (levantar) nos grupos tratados com álcool e álcool associado a cafeína e taurina, aumento da taquipnéia no grupo álcool associado a cafeína e taurina, bem como aumento da autolimpeza nos grupos tratados com álcool, energético 10 mg/Kg, e álcool com cafeína (Figura 3 A) ( $P < 0,01$ ; Qui-quadrado).

Seguidos os 60 min após o início do teste, os comportamentos observados em percentual foram: aumento da ambulação nos grupos tratados com ED 10 e álcool mais ED 10, aumento do *rearing* (levantar) nos grupos tratados com álcool, energético ED 10, e álcool associado ao ED 10, aumento da taquipnéia no grupo álcool e cafeína, e álcool associado à cafeína e taurina, diminuição da autolimpeza nos grupos ED 10, álcool e cafeína, e álcool e taurina, aumento da hipnose nos grupos tratados com álcool, álcool e taurina e álcool associado à cafeína e taurina (Figura 3 B) ( $P < 0,01$ ) Qui-quadrado.

Após 120 min de teste, foi observado em valores de percentual, aumento da ambulação nos grupos tratados com álcool + ED 10 e álcool + cafeína, e diminuição da ambulação nos grupos tratados com álcool e álcool + taurina, já a associação de álcool + cafeína + taurina não alterou a ambulação. O *rearing* (levantar) aumentou nos grupos tratados com ED 10 e álcool associado ao ED 10 e houve diminuição do *rearing* nos grupos tratados com álcool associado à cafeína ou taurina e associado à cafeína + taurina. A taquipnéia aumentou nos grupos álcool e álcool associado à taurina, aumentou também a hipnose no grupo tratado com álcool associado à cafeína + taurina e diminuiu no grupo tratado com ED 10 (Figura 3 C) ( $P < 0,01$ ; Qui-quadrado).



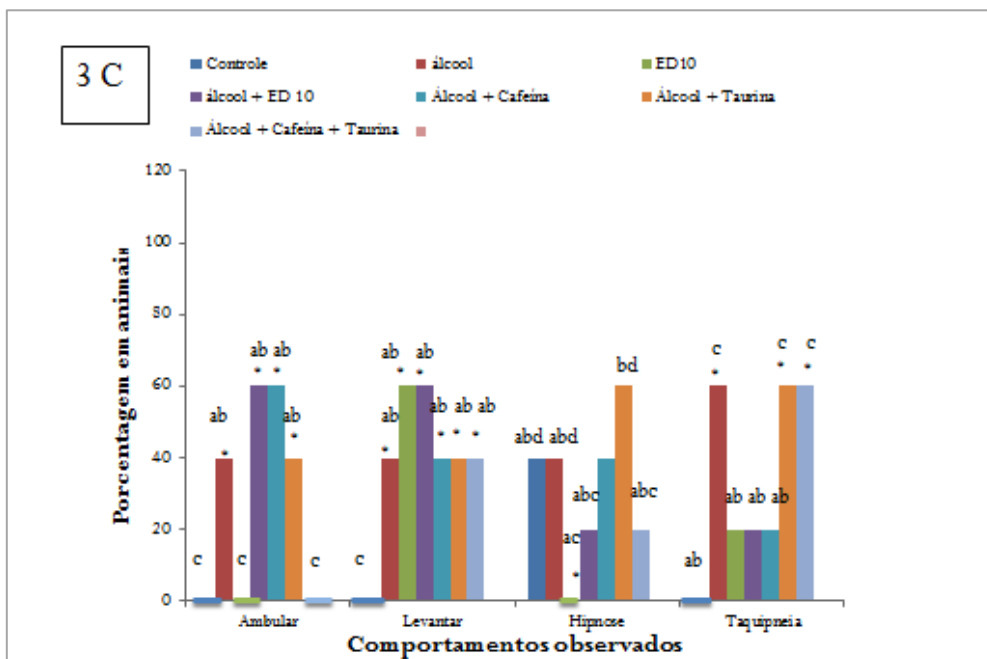
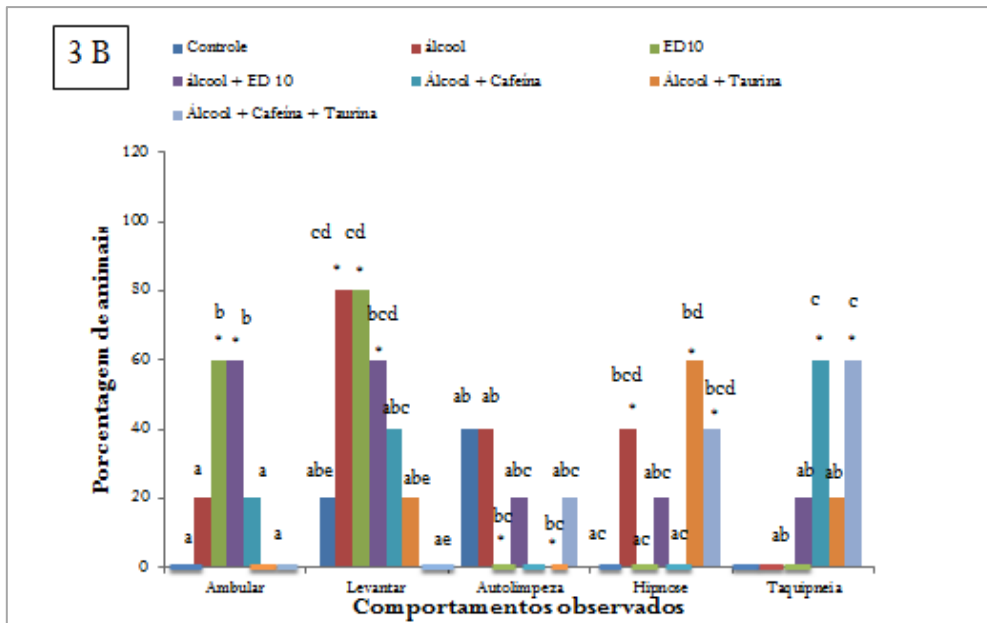


FIGURA 3: Efeito de álcool 2 g/kg (álcool) e bebida energética 10 mL/Kg (ED 10) isolados ou em associação e álcool + ED 10, álcool + cafeína (3,2 mg/kg), álcool + taurina (40 mg/kg) e álcool + cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg no teste de toxicidade aguda. Controle = água. Os dados são expressos como porcentagem de animais que apresentaram o comportamento. A) comportamentos observados após 30 min. B) comportamentos observados

após 60 min. C) comportamentos observados após 120 min (n=5) (\* P< 0,01 diferença significativa do controle; <sup>a,b,c,d,e</sup> P< 0,01 diferença significativa entre os grupos, Qui-quadrado).

Com relação à análise macroscópica dos órgãos após um dia da administração aguda, observou-se uma redução significativa na massa relativa do fígado dos grupos tratados com álcool e ED 10 e álcool e cafeína (P< 0,05; ANOVA de uma via/Bonferroni).

Tabela 2: Efeito de álcool 2 g/kg (álcool) e bebida energética 10 mL/Kg (ED 10) isolados ou em associação e álcool + ED 10, álcool + cafeína 3,2 mg/kg, álcool + taurina 40 mg/kg e álcool + cafeína 3,2 mg/kg (Caf) + taurina 40 mg/kg (Tau) na massa relativa dos órgãos. Controle = água. (n=5 grupo). Os dados representam a média ± EP da massa relativa do órgão (P<0,05) ANOVA/Bonferroni.

|                  | Fígado (g)   | Rins (g)    | Adrenais (g)    |
|------------------|--------------|-------------|-----------------|
| Controle         | 4,00 ± 1,79  | 0,71 ± 0,32 | 0,0192 ± 0,0086 |
| Álcool           | 3,75 ± 1,68  | 0,74 ± 0,33 | 0,0185 ± 0,0083 |
| Álcool + ED 10   | 3,71 ± 1,66* | 0,71 ± 0,32 | 0,0169 ± 0,0076 |
| Álcool + Cafeína | 3,96 ± 1,77* | 0,75 ± 0,33 | 0,0174 ± 0,0078 |
| Álcool + Taurina | 4,26 ± 1,90  | 0,74 ± 0,33 | 0,0179 ± 0,0080 |
| Álcool+ Caf/Tau  | 4,20 ± 1,88  | 0,76 ± 0,34 | 0,0168 ± 0,0075 |

## 4.2 Toxicidade subcrônica de energéticos

Ao final dos 28 dias de tratamento não foram observados sinais significativos de toxicidade ou letalidade.

O teste de Rota Rod (Figura 4) foi realizado no 14º dia após o início dos tratamentos. Não houve diferença significativa (P= 0,342, ANOVA de uma



via/Bonferroni) entre os tratamentos, demonstrando que não houve comprometimento do controle motor.

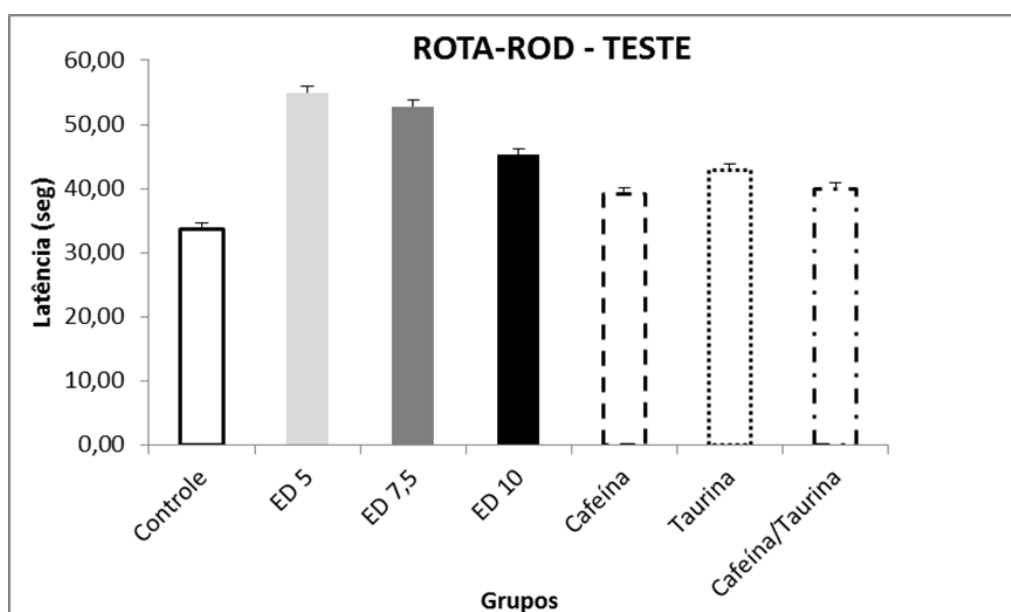


FIGURA 4: Efeito do tratamento subcrônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg sobre a latência para a queda no teste de Rota rod em ratos. Teste realizado no 14<sup>o</sup> dia após o início dos tratamentos. Cada coluna representa a média  $\pm$  EP (n=10 grupo) (P= 0,342) ANOVA de uma via/Bonferroni.

Não houve diferença significativa na atividade locomotora espontânea avaliada durante 15 minutos, sendo medida a atividade exploratória nos primeiros 5 minutos (P= 0,14, ANOVA) (dados não mostrados) e nos 10 min seguintes foi medida a atividade locomotora (P= 0,25, ANOVA) (Figura 5).

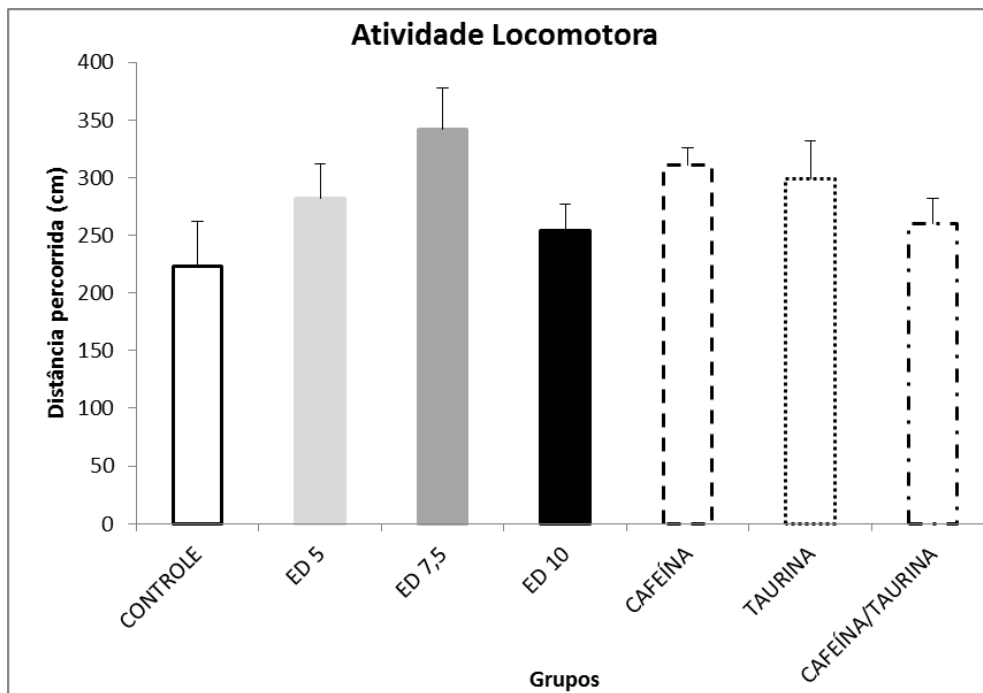
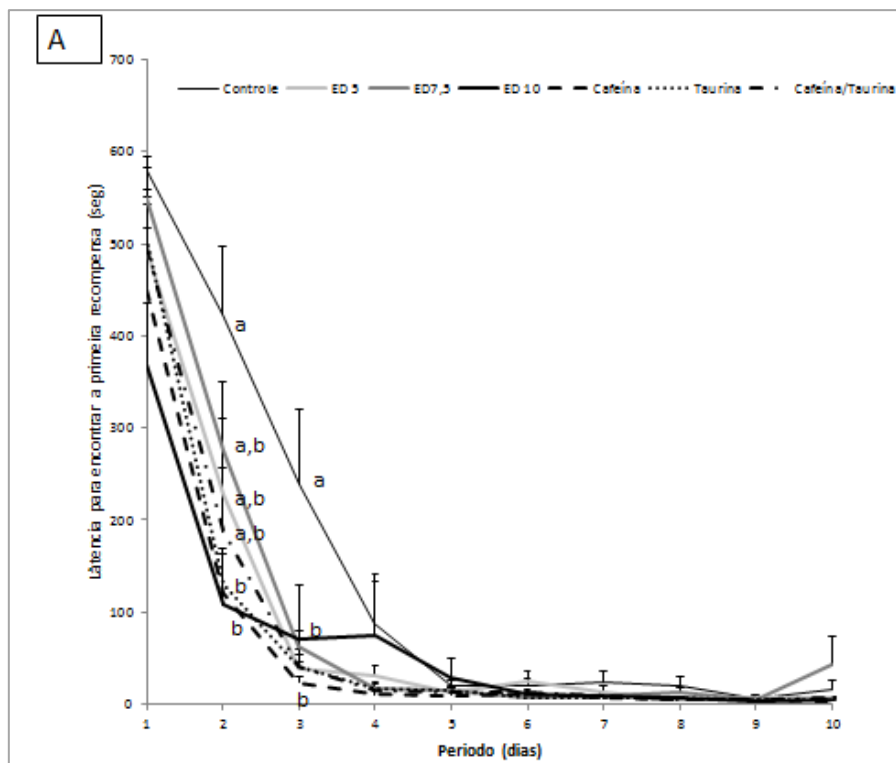


FIGURA 5: Efeito do tratamento subcrônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg no teste de Atividade Locomotora em ratos. Teste realizado no 15º após o início dos tratamentos. Resultados expressos pela distância percorrida durante 10 min. Cada coluna representa a média  $\pm$  EP. (n=10 grupo) (P= 0,25) ANOVA/Bonferroni

No teste de memória OX MAZE, observou-se diminuição no tempo de latência para encontrar a primeira recompensa nos grupos tratados com energético 10 mL/kg, cafeína, taurina e associação cafeína e taurina em relação ao grupo controle (P=0,003; ANOVA/Bonferroni). A diferença dos grupos ao longo dos dias revelou que o grupo controle também foi diferente dos grupos energético ED 10, cafeína, taurina, e associação cafeína e taurina (P=0,03) ANOVA/Bonferroni no segundo e terceiro dia (Figura 6 A e 6 B).

Também se observou que os grupos tratados com cafeína, taurina e associação cafeína e taurina dispenderam um tempo menor para concluir a tarefa do teste ( $P= 0,0001$ ; ANOVA/Bonferroni). A diferença dos grupos entre os dias revelou que o grupo controle foi diferente dos grupos cafeína, taurina e associação cafeína e taurina ( $P=0,001$ ) ANOVA/Bonferroni do segundo ao oitavo dia (Figura 7 A e 7 B).

Quando se registrou o tempo em que o animal permaneceu junto ao bloco correto da recompensa, mesmo após ter encontrado e consumido a recompensa, provavelmente à espera de mais recompensa, observou-se que os grupos tratados com cafeína e taurina ficaram menos tempo junto ao bloco após encontrar a recompensa ( $P= 0,01$ ; ANOVA/Bonferroni). A diferença dos grupos entre os dias revelou que os grupos foram diferentes ao longo dos dias ( $P= 0,01$ ) ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni (Figuras 8 A e 8 B).



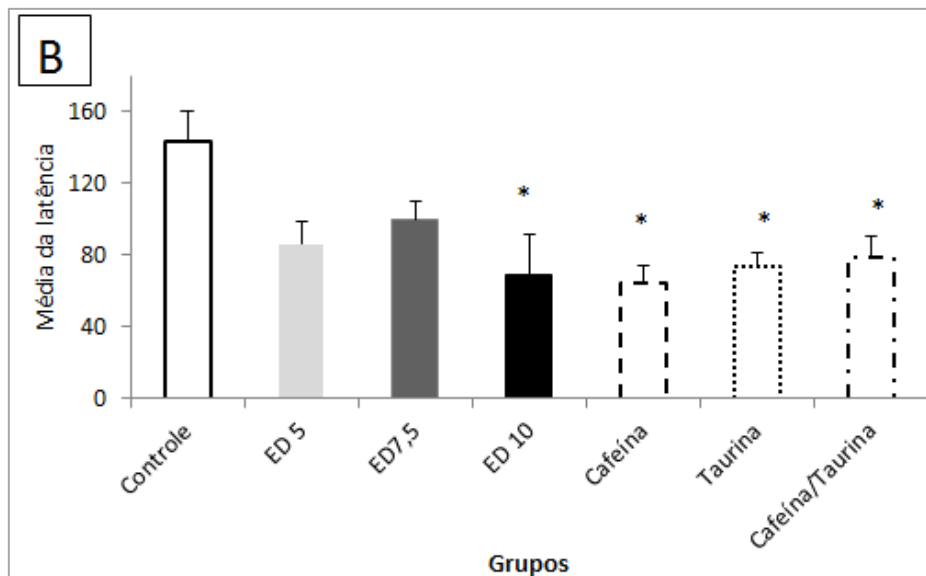


FIGURA 6: Efeito do tratamento subcrônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg no tempo de latência para encontrar a primeira recompensa no teste de OX MAZE em ratos. Teste realizado do 18<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia após o início dos tratamentos. A) Dados representam a latência média  $\pm$  EP diária durante os 10 dias de teste (a,b =  $P < 0,03$  ANOVA de medidas repetidas) B) Dados representam a média  $\pm$  EP, considerando a média do período total do teste (n=10 grupo) (\* $P < 0,003$ ) ANOVA/Bonferroni

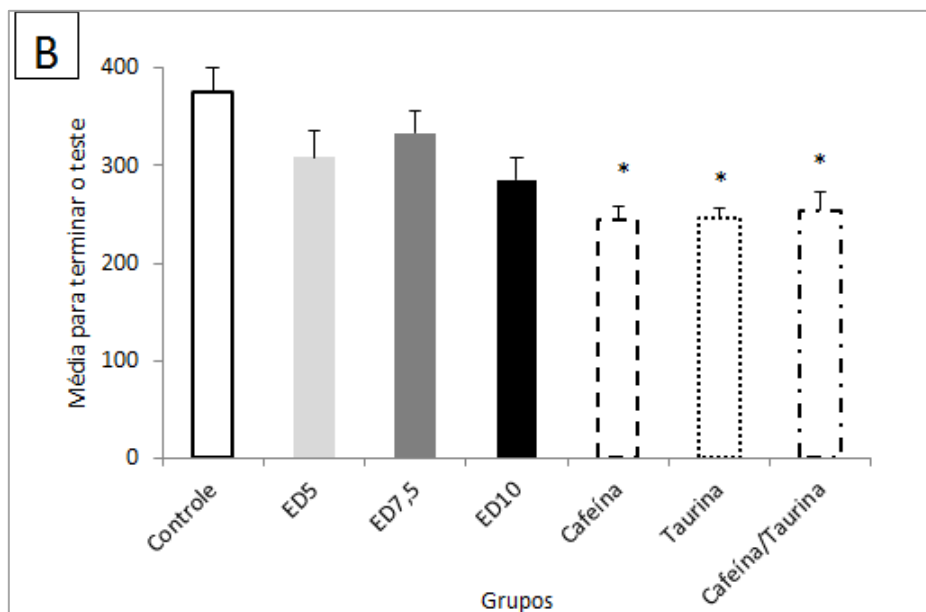
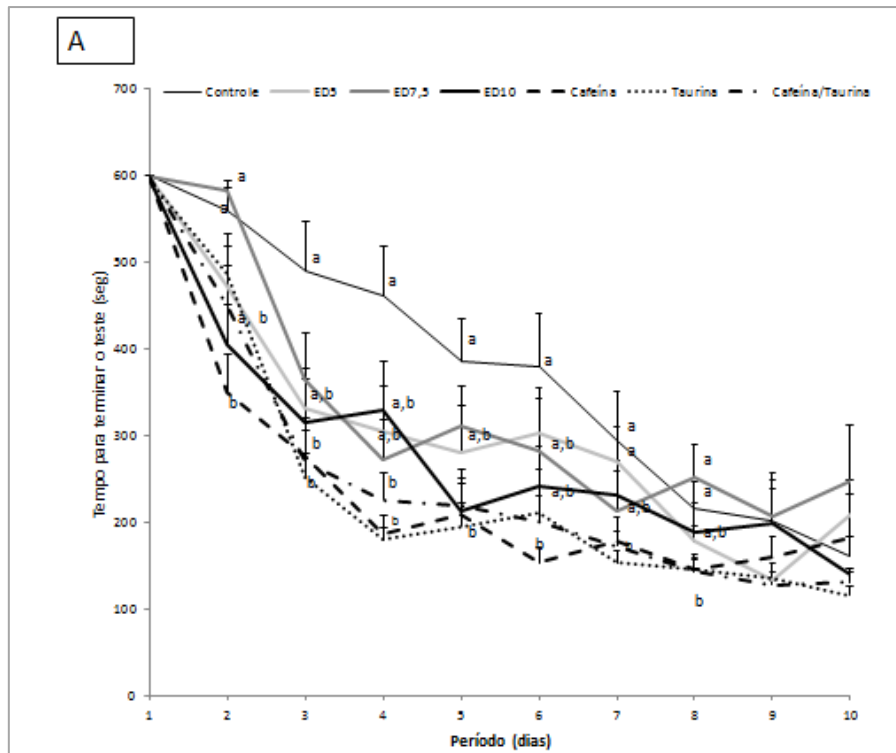
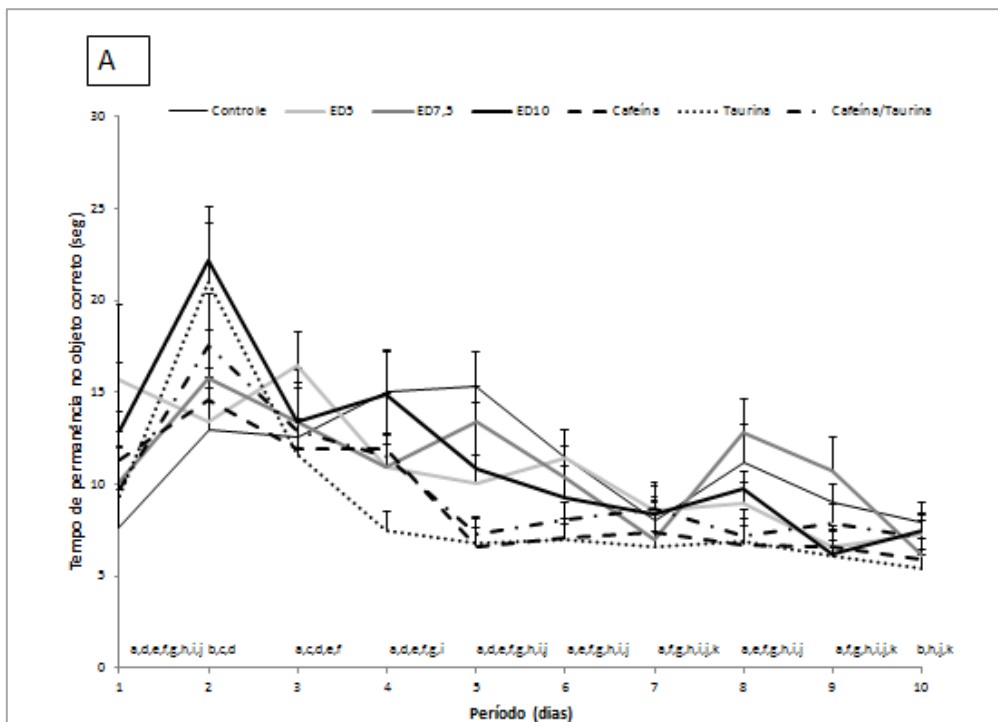


FIGURA 7: Efeito do tratamento subcrônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg no

tempo para completar o teste de OX MAZE em ratos. Teste realizado do 18<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia após o início dos tratamentos. A) Dados representam a média  $\pm$  EP diária durante os 10 dias de teste para completar o teste (a,b =  $P < 0,001$  ANOVA de medidas repetidas) B) Dados representam a média  $\pm$  EP considerando a média do período total do teste (n=10 grupo) (\* $P < 0,0001$ ) ANOVA/Bonferroni.



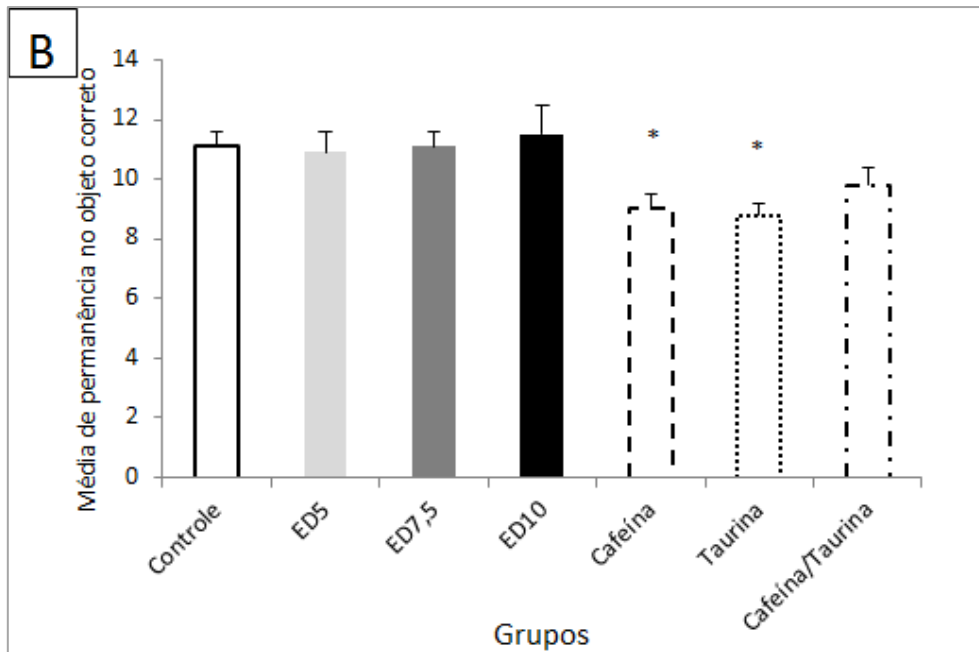


FIGURA 8: Efeito do tratamento subcrônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg no tempo de permanência em cada objeto no teste de OX MAZE em ratos. Teste realizado do 16º ao 26º dia após o início dos tratamentos. A) Dados representam a média  $\pm$  EP diária durante os 10 dias de teste de permanência no objeto certo, (a,b =  $P < 0,01$  ANOVA de medidas repetidas) B) Dados representam a média  $\pm$  EP considerando a média do período total do teste. (n=10 grupo) (\* $P < 0,01$ ) ANOVA/Bonferroni.

No teste de memória de reconhecimento de objetos observou-se que a associação de cafeína e taurina aumentou a memória de curta duração ( $P < 0,01$ ; Kruskal Wallis) (Figura 9 A). Não houve diferença significativa na memória de longa duração (Figura 9 B).

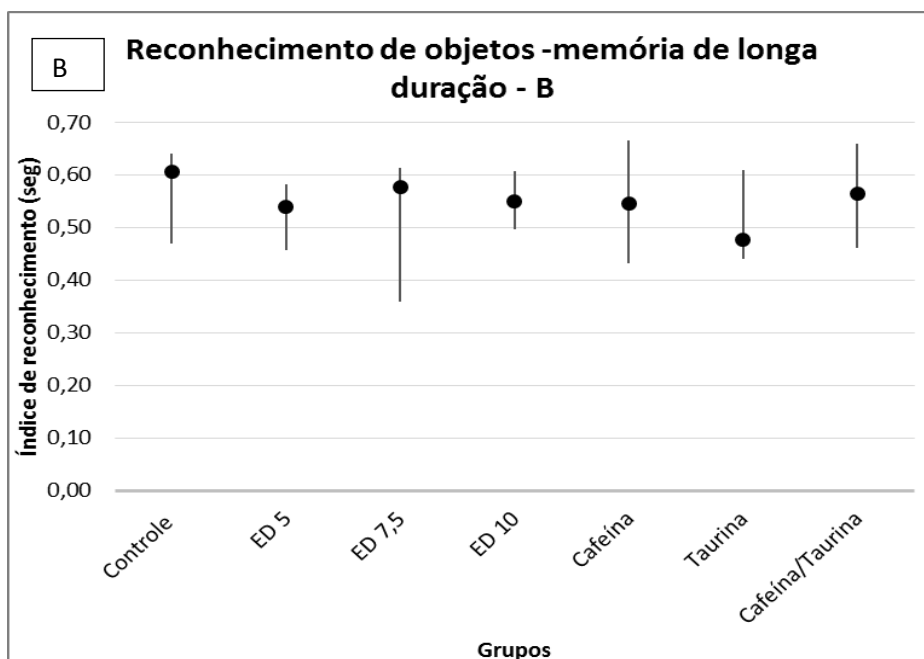
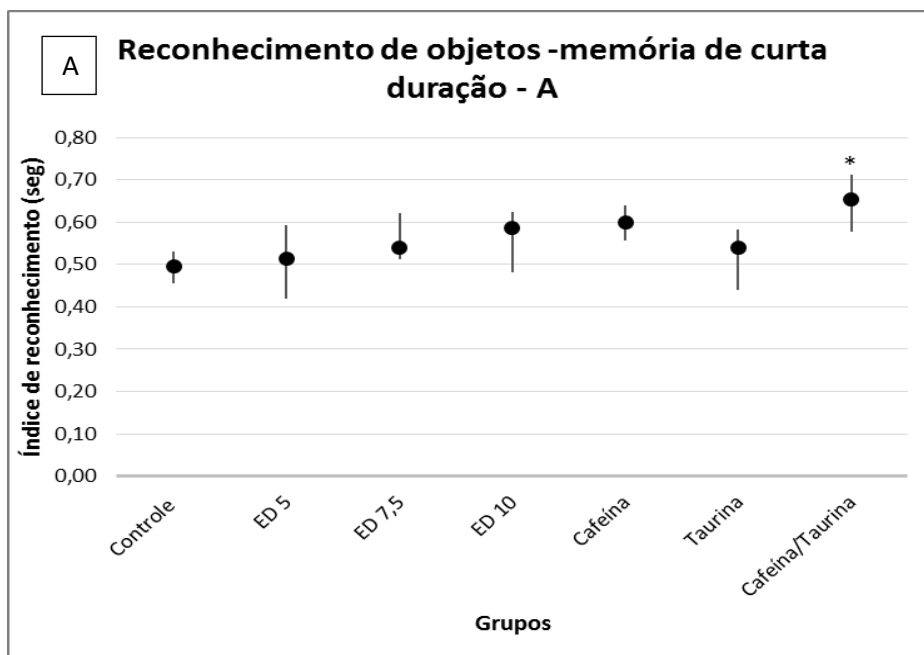


FIGURA 9: Efeito do tratamento subcrônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg no teste de reconhecimento de objetos. Teste realizado do 27º ao 28º dia após o início dos tratamentos. A) Memória de curta duração foi avaliada 1h 30 min após o treino B) Memória de longa duração foi avaliada 24h após o treino. A



proporção do tempo total de exploração do novo objeto foi expressa como o “índice de reconhecimento” expresso como  $TN/TF+TN$ , TF= tempo de exploração do objeto familiar TN= tempo de exploração do objeto novo. Dados são expressos como mediana [intervalo interquartil], (n=10 grupo) \*P<0,01;Kruskall Wallis.

No 29º dia após os tratamentos, os animais foram eutanasiados e foi realizada a dissecação das estruturas encefálicas (córtex, hipocampo e estriado) para os testes neuroquímicos das atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, espécies reativas e conteúdo total de tióis.

No córtex (tabela 3) observou-se que o grupo tratado com a associação de cafeína e taurina aumentou a atividade da enzima SOD e diminuiu a GPx, a relação de SOD/CAT+GPx calculada mostrou que este tratamento aumentou o estresse oxidativo. Também foi observado um aumento na produção de radicais livres para este grupo (P= 0,0001 ANOVA de uma via/Bonferroni).

TABELA 3: Biomarcadores do estresse oxidativo avaliados no córtex encefálico após 28 dias de tratamento sub-crônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg e associação de cafeína 3,2 mg/kg(Caf) + taurina 40 mg/kg (Tau) (n=5-8 grupo)(\*p<0,0001) ANOVA de uma via/ Bonferroni.

|          | SOD (SOD/mg<br>proteína) | CAT<br>(micromol/<br>min/mg<br>proteína) | GPx (pmol<br>NADPH<br>oxidado/min/<br>mg proteína) | SOD/CAT+GPx | DCF (nmoles<br>DCF por mg<br>de proteína) | TIÓIS (nmol<br>TNB/mg<br>proteína) |
|----------|--------------------------|--|--|-------------|---|------------------------------------|
| Controle | 10,7 ± 0,7               | 2,5 ± 0,2                                | 160,6 ± 18,8                                       | 0,8 ± 0,7   | 0,7 ± 0,0                                 | 81,8 ± 2,2                         |
| ED 5     | 10,4 ± 1,6               | 1,9 ± 0,2                                | 154,4 ± 18,1                                       | 0,1 ± 0,0   | 0,8 ± 0,0                                 | 72,7 ± 2,7                         |
| ED 7,5   | 7,0 ± 0,6                | 1,9 ± 0,1                                | 100,2 ± 6,9*                                       | 0,1 ± 0,0   | 0,7 ± 0,0                                 | 74,0 ± 2,0                         |
| ED 10    | 7,4 ± 1,1                | 2,39 ± 0,17                              | 107,1 ± 4,0*                                       | 0,7 ± 0,6   | 0,9 ± 0,0                                 | 75,8 ± 4,1                         |
| Cafeína  | 11,5 ± 1,0               | 1,6 ± 0,2                                | 81,2 ± 4,1*  | 0,1 ± 0,0   | 0,8 ± 0,0                                 | 71,7 ± 3,3                         |
| Taurina  | 6,6 ± 0,5                | 2,1 ± 0,2                                | 101,0 ± 7,4*                                       | 1,4 ± 0,6   | 0,9 ± 0,0                                 | 75,1 ± 2,6                         |
| Caf/Tau  | 14,1 ± 0,9*              | 2,3 ± 0,2                                | 99,5 ± 6,5*  | 4,4 ± 0,6*  | 1,3 ± 0,1*                                | 69,5 ± 3,2                         |

No hipocampo (tabela 4) observou-se que o grupo tratado com a associação de cafeína e taurina também aumentou a atividade da enzima SOD e a relação de SOD/CAT+GPx, entretanto, não alterou a atividade da GPx, mas inibiu a atividade da CAT, demonstrando que este tratamento aumentou também o estresse oxidativo no hipocampo. Corroborando com este resultado, foi observado um aumento de radicais livres através do teste do DCF (P= 0,0001 ANOVA de uma via/Bonferroni).

TABELA 4: Biomarcadores do estresse oxidativo avaliados no hipocampo após 28 dias de tratamento sub-crônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg e associação de cafeína 3,2 mg/kg (Caf)+ taurina 40 mg/kg (Tau) (n=5-8 grupo) (\*p<0,0001) ANOVA de uma via /Bonferroni.

|          | SOD (SOD/mg<br>proteína) | CAT<br>(micromol/<br>min/mg<br>proteína) | GPx (pmol<br>NADPH<br>oxidado/min/mg<br>proteína) | SOD/CAT+GPx | DCF (nmoles<br>DCF por mg<br>de proteína) | TIÓIS (nmol<br>TNB/mg<br>proteína) |
|----------|--------------------------|--|---|-------------|---|------------------------------------|
| Controle | 5,7 ± 0,3                | 2,2 ± 0,2                                | 90,6 ± 4,3  | 0,06 ± 0,0  | 1,3 ± 0,0                                 | 70,1 ± 2,0                         |
| ED 5     | 6,7 ± 0,4                | 2,4 ± 0,2                                | 106,4 ± 11,3                                      | 0,07 ± 0,0  | 1,4 ± 0,0                                 | 70,3 ± 4,3                         |
| ED 7,5   | 7,0 ± 0,7                | 1,8 ± 0,2                                | 81,4 ± 5,7  | 0,07 ± 0,0  | 1,3 ± 0,0                                 | 67,1 ± 2,8                         |
| ED 10    | 7,7 ± 0,3                | 1,7 ± 0,0*                               | 84,5 ± 6,5  | 0,59 ± 0,5  | 1,4 ± 0,0                                 | 77,0 ± 2,4                         |
| Cafeína  | 8,5 ± 0,7*               | 1,6 ± 0,2*                               | 60,3 ± 5,3*                                       | 0,12 ± 0,0  | 1,3 ± 0,0                                 | 70,1 ± 2,2                         |
| Taurina  | 10,3 ± 0,4*              | 2,2 ± 0,1                                | 62,8 ± 8,9*                                       | 1,34 ± 0,8  | 1,4 ± 0,0                                 | 68,8 ± 2,0                         |
| Caf/Tau  | 8,3 ± 0,5*               | 1,6 ± 0,0*                               | 96,2 ± 5,3  | 5,30 ± 0,4* | 1,7 ± 0,0*                                | 71,5 ± 1,1                         |

As análises realizadas no estriado demonstraram diminuição da atividade da GPx com todos os tratamentos. Entretanto, somente a associação de cafeína e taurina aumentou significativamente na relação SOD/CAT+GPx ( $P < 0,0001$ ) (tabela 5).

O conteúdo de tióis não foi modificado nas três estruturas encefálicas analisadas.

TABELA 5: Biomarcadores do estresse oxidativo avaliados no estriado após 28 dias de tratamento sub-crônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg (n=5-8 grupo) (\* $p < 0,0001$ ) ANOVA Bonferroni.

|          | SOD (SOD/mg proteína) | CAT (micromol/min/mg proteína) | GPx (pmol NADPH oxidado/min/mg proteína) | SOD/CAT+GPx | DCF (nmoles DCF por mg de proteína) | TIÓIS (nmol TNB/mg proteína) |
|----------|-----------------------|--------------------------------|--|-------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Controle | 14,2 ± 0,7            | 2,0 ± 0,2                      | 181,6 ± 9,3                              | 0,1 ± 0,0   | 1,4 ± 0,0                           | 76,9 ± 2,9                   |
| ED 5     | 12,3 ± 0,6            | 2,0 ± 0,1                      | 118,5 ± 21,7*                            | 0,6 ± 0,5   | 1,5 ± 0,1                           | 76,9 ± 3,4                   |
| ED 7,5   | 13,5 ± 0,8            | 2,1 ± 0,3                      | 125,5 ± 7,5*                             | 0,8 ± 0,7   | 1,5 ± 0,1                           | 76,2 ± 2,4                   |
| ED 10    | 9,9 ± 1,2*            | 2,0 ± 0,2                      | 134,2 ± 6,0*                             | 0,1 ± 0,0   | 1,5 ± 0,0                           | 73,5 ± 1,9                   |
| Cafeína  | 9,1 ± 0,5*            | 2,4 ± 0,3                      | 122,2 ± 5,3*                             | 0,1 ± 0,0   | 1,6 ± 0,0                           | 81,6 ± 3,3                   |
| Taurina  | 9,0 ± 0,7*            | 2,6 ± 0,2                      | 95,7 ± 8,4*                              | 1,7 ± 0,8   | 1,6 ± 0,0                           | 78,6 ± 1,7                   |
| Caf/Tau  | 15,5 ± 1,2            | 2,7 ± 0,3                      | 81,6 ± 7,8*                              | 5,6 ± 1,8*  | 1,6 ± 0,0                           | 80,2 ± 1,3                   |

A variação de peso corporal ao longo dos 28 dias de tratamento está demonstrada na figura 10. Pode-se observar que não houve alteração da massa corporal relativa.

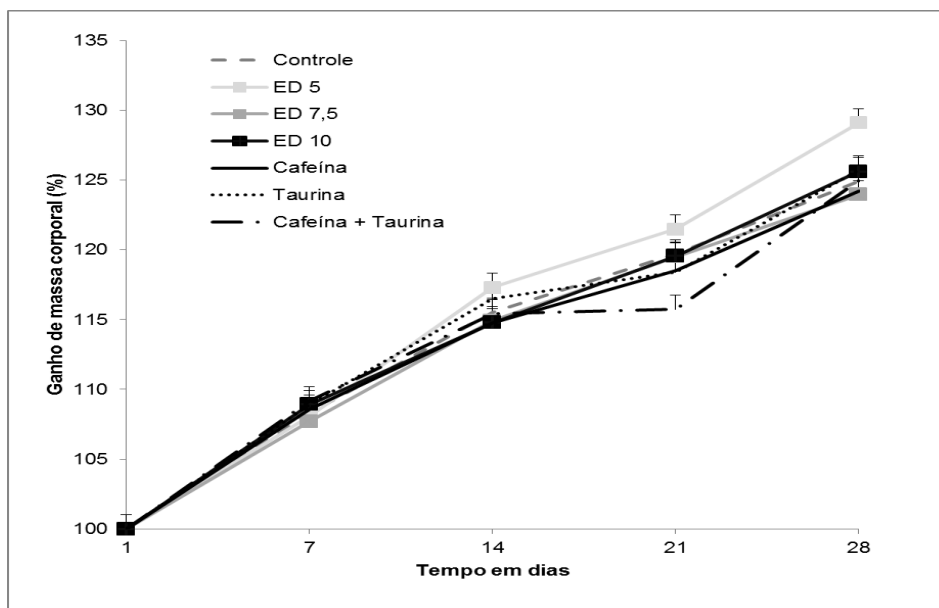


FIGURA 10: Efeito do tratamento subcrônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína 3,2 mg/kg, taurina 40 mg/kg e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg na porcentagem de ganho de massa corporal relativa (n=10 grupos) (P= 0,953) ANOVA de medidas repetidas.

Não houve diferença significativa no peso dos órgãos fígado, rim e adrenais: fígado (P= 0,314), rim direito (P= 0,712), rim esquerdo (P= 0,866), adrenal direita (P= 0,429), adrenal esquerda (P= 0,918) ANOVA de uma via.

TABELA 6: Efeito do tratamento subcrônico com bebidas energéticas 5 mL/Kg (ED 5), 7,5 mL/Kg (ED 7,5) e 10 mL/Kg (ED 10), cafeína (3,2 mg/kg), taurina (40 mg/kg) e associação de cafeína 3,2 mg/kg + taurina 40 mg/kg no peso dos órgãos fígado, rim e adrenal (n=10 grupos). Os dados representam a média ± EP da massa relativa do órgão ANOVA de uma via.

|          | Fígado (g)  | Rim direito (g) | Rim esquerdo (g) | Adrenal direita (g) | Adrenal esquerda (g) |
|----------|-------------|-----------------|------------------|---------------------|----------------------|
| Controle | 3,37 ± 0,06 | 0,33 ± 0,01     | 0,32 ± 0,01      | 0,0070 ± 0,00042    | 0,0078 ± 0,00029     |
| ED 5     | 3,34 ± 0,07 | 0,33 ± 0,01     | 0,32 ± 0,01      | 0,0078 ± 0,00059    | 0,0082 ± 0,00068     |
| ED 7,5   | 3,24 ± 0,12 | 0,34 ± 0,01     | 0,33 ± 0,01      | 0,0070 ± 0,00034    | 0,0077 ± 0,00054     |
| ED 10    | 3,19 ± 0,05 | 0,33 ± 0,01     | 0,32 ± 0,01      | 0,0078 ± 0,00032    | 0,0079 ± 0,00032     |
| Cafeína  | 3,16 ± 0,08 | 0,33 ± 0,01     | 0,32 ± 0,01      | 0,0071 ± 0,00040    | 0,0077 ± 0,00043     |
| Taurina  | 3,31 ± 0,06 | 0,33 ± 0,01     | 0,32 ± 0,01      | 0,0072 ± 0,00040    | 0,0083 ± 0,00045     |
| Caf/Tau  | 3,26 ± 0,05 | 0,33 ± 0,00     | 0,32 ± 0,01      | 0,0065 ± 0,00055    | 0,0076 ± 0,00048     |

## 5. Discussão

Diante do aumento progressivo do consumo de bebidas energéticas (HOWARD et al, 2010, McLELLAN et al, 2012; RATH et al, 2012), e da carência de dados na literatura, que relacionam os energéticos em modelos *in vivo* de comportamento e avaliação de enzimas antioxidantes contra a produção de radicais livres e, ainda, considerando que o impacto toxicológico do consumo excessivo é desconhecido, objetivamos neste trabalho fazer uma avaliação toxicológica, comparando diferentes doses de bebidas energéticas e seus principais constituintes (cafeína e taurina) isolados ou em associação.

Os resultados demonstraram que os comportamentos observados no teste de toxicidade aguda variaram entre os diferentes tratamentos, mas a associação de cafeína e taurina seguiu o mesmo padrão de alterações na ambulação observado com os tratamentos dos energéticos nas maiores doses entre 30 e 120 min. O outro comportamento observado e que pode ser relevante dentro do contexto de toxicidade é a taquipnéia, principalmente com as doses menores de energético (ED 5 e ED 7,5), entretanto aos 120 minutos também observou-se com a associação de cafeína e taurina. A taquipnéia pode estar relacionada a um aumento da atividade cardíaca (KAMIER et al, 2010). Alguns relatos mostram que a intoxicação por cafeína, presente nos energéticos, pode ser clinicamente importante. O diagnóstico é feito através da apresentação de sintomas, como inquietação, nervosismo, excitação, insônia, rubor facial, diurese, perturbação gastrointestinal, espasmos musculares, fluxo desmedido do pensamento e do discurso, arritmia cardíaca, agitação psicomotora, e períodos de inesgotabilidade. As propriedades estimulantes dos

energéticos aumentam a frequência cardíaca e a pressão sanguínea, causando palpitações (KAMIER, et al 2010).

Atualmente, não existe consenso a respeito dos valores de corte para concentrações no plasma de cafeína que pode resultar em diferentes toxicidades. As concentrações plasmáticas de cafeína menores que 10 mg/L são geralmente considerados seguras (LEE et al, 2015). Consumo diário de 240-300 mg de cafeína corresponde a ingestão de 3-7 mg/kg do peso corporal em adultos, e a administração oral de 5 mg/kg de cafeína conduz a uma concentração plasmática de 10 ng/mL (50 uM) (DIAS et al, 2015). É importante ressaltar que o grupo tratado apenas com cafeína não apresentou o respectivo sinal de taquipinéia, entretanto a dose usada isoladamente corresponde àquela encontrada na maior dose de energético (ED 10), que também não apresentou estes sinais. A dose intermediária de energético (ED 7,5) foi mais relacionada ao estímulo do SNC, tais como aumento na ambulação, andar em círculos e aumento do *rearing*.

O consumo de energéticos associados com bebidas alcoólicas (PENNAY et al, 2012) cresceu a partir do ano de 2000 e pode causar consequências indesejáveis (HANN et al, 2012, HOWLAND et al, 2010, FERREIRA et al, 2004 B) incluindo o aumento do risco de acidentes e violência (BERGER et al, 2013). Em 2010, a FDA determinou que a associação de cafeína e álcool não é segura (MARCZINSKI, et al 2015). A partir destes dados foi incluída neste trabalho a avaliação da toxicidade aguda de bebidas energéticas e seus principais compostos associados ao álcool.

Os resultados se mostraram interessantes e ao longo do tempo observou-se um aumento na ambulaco nos grupos tratados com ED 10, lcool + ED 10 e álcool + cafeína e uma diminuico da ambulaco nos grupos tratados com álcool e álcool + taurina. Também se observou que a hipnose foi maior nos grupos tratados com álcool + taurina demonstrando um efeito sinérgico, já que são duas substâncias reconhecidamente depressoras do SNC (CALABRO et al, 2012; COSTARDI et al 2015). Por outro lado, o aumento da taquipnéia variou da seguinte forma: aos 30 min foi maior no grupo tratado com a associao entre álcool + cafeína + taurina, aos 60 min no grupo álcool + cafeína e álcool + cafeína + taurina e aos 120 min no grupo álcool + taurina e álcool + cafeína + taurina. Estes resultados corroboram àqueles encontrados no teste de toxicidade aguda sem a incluso de álcool, e de certa forma permite inferir que na composico dos energéticos, outros componentes além da cafeína e taurina podem ser responsáveis por estas diferenas entre os efeitos do energético e da associao de cafeína e taurina apenas. Alguns trabalhos citam que o efeito estimulante da cafeína pode antagonizar os efeitos sedativos do álcool, possivelmente levando ao aumento do consumo de álcool e conseqüentemente aumentando os efeitos indesejáveis do lcool (HANN et al, 2012, HOWLAND et al, 2010, FERREIRA et al B, 2004). Os indivíduos que ingerem energéticos acreditam que são mais capazes de executar comportamentos que exijam controle motor fino apesar de estarem debilitados pelo álcool, mascarando os sintomas subjetivos da intoxicao alcoólica (CURRY et al, 2009; SNIPES et al, 2013). Nossos resultados no teste de toxicidade aguda corroboram estas observaes, mas merecem ser mais bem investigados.



A partir destes resultados foi avaliada a neurotoxicidade subcrônica através de avaliações comportamentais e neuroquímicas.

No teste de toxicidade subcrônica os animais foram tratados durante 28 dias com a maior dose de energético usada no teste de toxicidade aguda (ED 10) e com os padrões cafeína e taurina isoladamente ou em associação. Nos testes relacionados à avaliação de alteração motora (teste de Rota Rod e atividade locomotora espontânea) não foi observada diferença significativa entre os tratamentos em relação ao controle. Estes resultados foram importantes, pois os testes de memória usados neste estudo poderiam sofrer interferência se os animais tivessem comprometimento motor.

No teste de Ox Maze considerado um teste de memória e atenção (ROJAS et al, 2015) os grupos tratados com cafeína e taurina isoladamente ou em associação tiveram um melhor desempenho nos principais parâmetros avaliados. No teste de memória de reconhecimento de objetos, o grupo tratado com a associação de cafeína e taurina apresentou um aumento da memória de curta duração. Estes resultados estão de acordo com relatos da literatura onde foi demonstrado que a atividade da taurina (BICHLER et al, 2006), e principalmente da cafeína, é importante em tarefas que exijam atenção, memória e desempenhos mais rápidos em curto período de tempo (CHILDS et al, 2014).

Doses moderadas de cafeína aumentam a vigilância, aprendizado, memória e estados de humor (SMITH et al, 2013). O efeito da cafeína em tarefas de atenção é devido ao seu papel antagonista de receptores de adenosina A1 e A2 em áreas de grande concentração de inervação

dopaminérgica. O aumento da regulação da dopamina nas regiões do córtex pré-frontal, córtex do cíngulo anterior e no tálamo parece resultar no aumento de vigília, atividade motora, e aumento no desempenho em tarefas que exigem respostas rápidas. Doses elevadas de cafeína aumentam a execução de tarefas que dependem da atenção visual (BRUNYÉ et al, 2010). A cafeína aumenta a habilidade de usar efetivamente pistas de alerta e inibe a influência de ações incompatíveis de informação. A cafeína aumenta o desempenho em tarefas que requerem atenção e vigilância sustentada, também tem efeitos benéficos no controle executivo em geral (BRUNYÉ et al, 2009).

Nossos resultados demonstram mais uma vez que os efeitos observados com a ingestão de bebidas energéticas não estão relacionados somente à presença dos componentes cafeína e taurina, mas outros compostos presentes nesta formulação energética usada neste estudo tais como: açúcares e vitaminas do grupo B.

Após 28 dias de tratamento procederam-se a avaliação dos biomarcadores do estresse oxidativo nas estruturas córtex pré-frontal, hipocampo e estriado: 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 de tióis.

Os resultados demonstram que houve diminuição da atividade de enzimas antioxidantes com consequente aumento da produção de radicais livres. Os resultados mais relevantes estão relacionados com a associação de cafeína e taurina.

Os resultados presentes no trabalho demonstram o papel da cafeína, taurina e dos energéticos na modulação da proteção do sistema nervoso central contra o aumento da produção de radicais livres. De modo geral, foi verificada uma diminuição da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. Sendo esta enzima muito importante para a conversão de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio e, que atua em conjunto com a enzima catalase para manter o equilíbrio oxidativo celular prevenindo danos a proteínas e ao DNA por acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, a enzima superóxido dismutase (SOD) mostrou estar aumentada no córtex pré-frontal e no hipocampo, e diminuída no estriado. A enzima catalase (CAT) apresentou uma diminuição da atividade apenas no hipocampo. O desbalanço das atividades enzimáticas foi acompanhado pelo aumento da produção de radicais livres no córtex pré-frontal e hipocampo. Dessa forma, é evidenciado que o tratamento com taurina e cafeína associadas promove um aumento do estresse oxidativo, aumentando a produção de espécies reativas, que leva a um aumento da atividade da SOD, produzindo mais  $H_2O_2$ . Este, ainda fica em excesso, pois a CAT e GPx, por estarem inibidas, parecem não serem suficientes para neutraliza-lo deixando um excedente, capaz de promover dano celular.

A ingestão crônica de café e de cafeína, além de aumentar a capacidade de aprendizado e memória, modula o sistema antioxidante cerebral de ratos. Foi observado que o café e a cafeína diminuem a peroxidação lipídica, aumentam a concentração de glutathione, um potente antioxidante endógeno, bem como aumentam a atividade das enzimas antioxidantes glutathione reductase e superóxido dismutase (ABREU et al, 2011).

De encontro a estes resultados, receptores de adenosina estão envolvidos na regulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), afetando a gênese e o impacto de radicais livres em neurônios e em outros sistemas biológicos (ABREU et al, 2011). A cafeína atua como um captador de radicais livres hidroxila, prevenindo a peroxidação lipídica e inibindo o estresse oxidativo. Dessa forma, o consumo a longo prazo de café e de cafeína tem um efeito protetor, melhorando funções cerebrais como a memória, através da inibição do estresse oxidativo, tanto no encéfalo de ratos adultos quanto de ratos mais velhos. A administração crônica de cafeína a ratos adultos previne o déficit de memória, estresse oxidativo, neuroinflamação e neurodegeneração induzida por D-galactose. Assim, o consumo regular de cafeína poderia ser benéfico para a saúde humana por prevenir as doenças neurológicas relacionadas à idade (ULLAH et al, 2015). O que ficou evidenciado em nossos experimentos de memória e atenção, no qual os animais tratados com cafeína obtiveram melhores desempenhos, eram mais atentos, e terminavam as tarefas mais rapidamente, e associavam as pistas visuais à recompensa alimentar.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas em dano tecidual através de uma variedade de insultos. Estas substâncias podem diretamente danificar proteínas, DNA, lipídeos e, portanto afetar todas as funções celulares. Para isto as funções das enzimas antioxidantes devem estar em equilíbrio celular, o que não foi verificado em nossos resultados uma vez que houve aumento de algumas enzimas e diminuição de outras com consequente geração de espécies reativas, o que pode tornar o encéfalo mais vulnerável a danos (NOSCHANG et al A, 2009). Em ratos verificou-se que o consumo de cafeína, associado ao estresse crônico, aumenta o dano de DNA

no hipocampo. Indo de encontro a este dado, foi observado *in vitro* que tanto a cafeína como os seus produtos catabólicos teobromina e xantina, conduzem à geração de radicais de oxigênio (SHAMSI & HADI 1995; AZAM et al, 2003; NOSCHANG et al, 2009 B).

ZEIDÁN-CHULIA et al (2013) demonstraram que a análise de diferentes parâmetros relacionados ao estresse oxidativo mostrou efeito antioxidante induzido em células SH-SY5Y (células humanas de neuroblastoma) quando tratadas com componentes de energéticos, especialmente com guaraná e suas combinações com cafeína e ou taurina, que é consistente com o alto potencial antioxidante *in vitro* exercido pelo guaraná. A diminuição dos níveis basais de geração de radicais livres após estes tratamentos pode ser resultado da sub-regulação da defesa antioxidante enzimática celular (por exemplo, pela atividade da SOD e da CAT).

De fato, os efeitos da cafeína parecem estar relacionados com a dose administrada, possuindo um efeito antioxidante em baixas doses, enquanto que em altas doses o efeito torna-se pró-oxidante. Isto foi observado *in vitro* em células epiteliais alveolares expostos à hiperoxia, com a concentração mais baixa de cafeína (0,05 Mm) os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuíram enquanto que a concentração mais elevada (0,1Mm) aumentou os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TIWARI et al, 2014). Este efeito pró-oxidante parece estar relacionado com a liberação de dopamina nas terminações nervosas, conduzindo a uma subsequente geração de ROS (espécies reativas de oxigênio). Em um modelo *in vitro*, utilizando células SK-N-SH incubadas com concentrações não citotóxicas de cafeína e metanfetamina, foi verificado um aumento da neurotoxicidade mediados via estresse oxidativo e ativação de vias apoptóticas. *In vivo*, também foi

observado que a cafeína potencializa os efeitos tóxicos da metanfetamina. A coadministração aumentou significativamente a taxas de letalidade em ratos (SINCHAI et al, 2011).

A taurina é conhecida por estar envolvida em vários processos celulares, incluindo a homeostase do cálcio, proteção contra a excitotoxicidade do glutamato e apoptose, inflamação, estresse oxidativo e epilepsia. Além disso, a taurina possui alguns efeitos na neurogênese, como foi observado em um estudo que o uso crônico da taurina aumentou a proliferação de células no giro denteado, aumentou a sobrevivência de novos neurônios, diminuiu o número da micróglia em ratos idosos (GEBARA et al, 2015).

Como antioxidante, a taurina pode ser neuroprotetora contra o dano oxidativo em várias condições patológicas, incluindo hipóxia, hipoglicemia, isquemia, excitotoxicidade e neurotoxicidade induzida por  $\beta$ -amiloide. Na mitocôndria, a taurina pode reduzir o estresse oxidativo, estimulando as enzimas mitocondriais antioxidantes, regular a homeostase do cálcio mitocondrial e preservar a função mitocondrial. Sendo um antioxidante eficaz, a taurina detecta a produção de espécies reativas de oxigênio e estimula enzimas antioxidantes direta ou indiretamente (XU et al, 2015).

A taurina também está relacionada com a recuperação do déficit de memória induzidos por álcool, pentobarbital, nitrato de sódio e cicloheximida em ratos, sem quaisquer efeitos observáveis em outros comportamentos incluindo a coordenação motora e atividades exploratória e locomotora (KIM et al, 2014). A administração intracerebroventricular de taurina protege contra o prejuízo de aprendizagem induzido por hipóxia em ratos (YU et al, 2007). Além

disso, a taurina administrada por via intravenosa melhora significativamente o prejuízo de função pós-lesão por traumatismo crânio-encefálico (KIM et al, 2014). A suplementação com taurina também pode melhorar a perda de discriminação visual dependente do envelhecimento em camundongos (BROZOSKI et al, 2010).

Em experimentos utilizando a proteína  $\beta$ -amilóide como agente neurotóxico, foi observado que a taurina inibe fracamente a agregação da proteína e tem efeito neuroprotetor, relacionado com a suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes. Além disso, pela ativação de receptores GABA e glicina, a taurina inibe a excitotoxicidade causada por  $\beta$ -amilóide, que induz a ativação da transmissão glutamatérgica. A taurina também parece atenuar a morte de células neuronais associada à abertura do poro de permeabilidade mitocondrial transitório, disfunção mitocondrial e geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (KIM et al, 2014, MENZIE et al, 2013).

Neste trabalho demonstrou-se que em relação aos tratamentos, foi evidente que a associação cafeína + taurina, mesmo nas concentrações presentes na maior dose de energético, apresentou um efeito maior. Isto pode estar relacionado com a presença de outros componentes nos energéticos, que interferem na modulação dos efeitos causados apenas pela associação de cafeína e taurina.

## 6. Conclusão

A avaliação da neurotoxicidade dos energéticos revelou que:

Os comportamentos observados no teste de toxicidade aguda variaram entre os diferentes tratamentos, mas a associação de cafeína e taurina seguiu o mesmo padrão de alterações encontradas no grupo tratado com energéticos, embora a dose intermediária (7,5 mL/Kg) foi a que apresentou maior número de sintomas relacionados à toxicidade.

Quando associou-se álcool aos energéticos ou taurina e cafeína demonstrou-se que a associação com cafeína e taurina levou a observação de sinais de toxicidade mais intensos, acentuando tanto os efeitos estimulantes da cafeína quanto os depressores da taurina, diferindo daqueles observados com a associação de álcool e energético (ED 10).

No teste de toxicidade subcrônica demonstrou-se que em testes que exigem memória e atenção, os grupos tratados com cafeína e taurina isoladamente ou em associação tiveram um melhor desempenho nos parâmetros avaliados no teste de Ox Maze e no teste de memória de reconhecimento de objetos, o grupo tratado com a associação de cafeína e taurina apresentou um aumento da memória de curta duração. Estes resultados são independentes de alterações na atividade locomotora, avaliada através do teste de rota Rod e atividade locomotora espontânea.

Nos testes bioquímicos verificou-se que os resultados obtidos com a associação de cafeína e taurina foram os mais relevantes, pois levou a uma diminuição da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. Por outro lado, a enzima superóxido dismutase



(SOD) mostrou estar aumentada no córtex pré-frontal e no hipocampo, e diminuída no estriado. A enzima catalase (CAT) apresentou uma diminuição da atividade apenas no hipocampo. O desbalanço das atividades enzimáticas foi acompanhado pelo aumento da produção de radicais livres no córtex pré-frontal e hipocampo. Portanto, estes resultados demonstram que houve diminuição da atividade de enzimas antioxidantes com consequente aumento da produção de radicais livres.

Em todos os testes foi evidente que a associação cafeína + taurina, mesmo nas concentrações presentes na maior dose de energético, diferiu dos efeitos da administração apenas do energético. Isto pode estar relacionado com a presença de outros componentes nos energéticos, que interferem na modulação dos efeitos causados apenas pela associação de cafeína e taurina.

Considerando os resultados obtidos, as bebidas energéticas exercem alguns sintomas neurotóxicos por aumentarem a taquipnéia, ambulação e exploração, principalmente devido à presença da cafeína, e quando em associação a bebidas alcoólicas diminuem alguns sintomas depressores do álcool. Pode-se também relacionar melhor desempenho em tarefas que exijam maior atenção e memória. Entretanto há um desequilíbrio de enzimas protetoras contra a produção de radicais livres e aumento de espécies reativas, o que pode ocasionar maior suscetibilidade a danos ao DNA, e proteínas gerando estresse oxidativo. Estando estes fatores relacionados principalmente aos compostos presentes em maior concentração nos energéticos, tais como cafeína e taurina.

O uso excessivo de bebidas energéticas isoladamente ou em associação a bebidas alcoólicas pode tornar o indivíduo mais propenso a injúrias causadas pelo estresse oxidativo, e desequilíbrio oxidativo, como também a fatores neurotóxicos.

Mais estudos devem ser realizados para esclarecer o potencial dano da ingesta somente de energéticos ou associados ao álcool, principalmente em jovens, que são os maiores consumidores.

## 7. Referências Bibliográficas:

AEBI H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121–126, 1984.

ABREU, R.V.; OLIVEIRA, E.M.S.; MORAES, M.F.D.; PEREIRA, G.S.; SANTOS, T.M. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.99, p.659-664, 2011.

AZAM S.; HADI, N.; KHAN, N.U. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit*, v.9, p. 325-330, 2003

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BERGER, L.; FENDRICH, M.; FUHRMANN, D. Alcohol mixed with energy drinks: Are there associated negative consequences beyond hazardous drinking in college students? *Addictive Behaviors*, p.2428-2432, 2013.

BICHLER, A.; SWENSON, A.; HARRIS, M.A. A Combination of caffeine and taurine has no effect on short term memory but induces changes in heart rate and mean arterial blood pressure. *Amino Acids*, p.471-476, 2006.

BOECK,C.R.; MARQUES, V.B.; VALVASSORI, S.S.; CONSTANTINO, L.C.; ROSA, D.V.F.; LIMA, F.F.; ROMANO-SILVA,M.A.; QUEVEDO, J. Early long-term exposure with caffeine induces cross-sensitization to methyphenidate with involvement of DARPP-32 in adulthood of rats. *Neurochemistry International*, v. 55, p.318-322, 2009.

BRACHE, K.; STOCKWELL, T. Drinking patterns and risk behaviors associated with combined alcohol and energy drink consumption in college drinkers. *Addictive Behaviors*, p.1133-1140, 2011.

BREDA, J.J.; WHITING, S.H.; ENCARNAÇÃO, R.; NORBERG, S.; JONES, R.; REINAP, M.; JEWELL, J. Energy drink consumption in europe: a review of the risks, adverse health effects, and policy options to respond. *Frontiers in public health*, v.2, p.1-5, 2014.

BROZOSKI T.J; CASPARY, D.M.; BAUER, C.A.; RICHARDSON, B.D. The Effect of Supplemental Dietary Taurine on Tinnitus and Auditory Discrimination in an Animal Model. *Hear Res.*, v. 270, p. 71-80, 2010.

BRUNYÉ, T.T.; MAHONEY, C.R.; LIEBERMAN, H.R.; TAYLOR, H.A. Caffeine modulates attention network function. *Brain and Cognition*, v. 72, p. 181-188, 2010.

BRUNYÉ, T.T.; MAHONEY, C.R.; LIEBERMAN, H.R.; GILES, G.E.; TAYLOR, H.A. Acute caffeine consumption enhances the executive control of visual attention in habitual consumers. *Brain and Cognition*, v. 74, p. 186-192, 2010.

CABALLERO, M.; NUNEZ, F.; AHERN, S.; CUFFI, M.L.; CARBONELL, L.; SANCHEZ, S.; DUENÑAS, V.F.; CIRUELA, F. Caffeine improves attention deficit in neonatal 6-OHDA lesioned rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuroscience Letters*, v. 494, p. 44-48, 2011.

CALABRÓ, R.S.; ITALIANO, D.; GERVASI, G.; BRAMANTI, P. Single tonic-clonic seizure after energy drink abuse. *Epilepsy & Behavior*, v.23, p. 384-385, 2012.

CAPELLETTI, S.; DARIA, P.; SANI, G.; AROMATARIO, M. Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Current Neuropharmacology*, v. 13, p. 71-88, 2015.

CHILDS, E. Influence of energy drink ingredients on mood and cognitive performance. *Nutrition Reviews*, v.72 (S1), p.48-59, 2014.

CURRY, K.; STASIO, M.J. The effects of energy drinks alone and with alcohol on neuropsychological functioning. *Human Psychopharmacology*, p. 473-481, 2009.

COSTARDI, J.V.; NAMPO, R.A.; SILVA, G.L.; RIBEIRO, M.A.; STELLA, H.J.; STELLA, M.B.; MALHEIROS, S.V. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. *Revista Associação Médica Brasileira*, v.61, n.4; p.381-7, 2015.

DALL'AGNOL, T.; DE SOUZA, P.F.A. Efeitos fisiológicos agudos da taurina contida em uma bebida energética em indivíduos fisicamente ativos. *Revista Brasileira de Medicina Esportiva*, v.15, n.2, p.123-126, 2009.

DELMAS-BEAUVIEUX MC, PEUCHANT E, DUMON MF, RECEVEUR A, LE BRAS M, CLERC M (1995), Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clinical Biochemistry* 28: 63–169.

DIAS, T.R.; ALVES, M.G.; BERNARDINO, R.L.; MARTINS, A.D.; MOREIRA, A.C; SILVA, J.; BARROS, A.; SOUSA, M.; SILVA, B.M.; OLIVEIRA, P.F. Dose-dependent effects of caffeine in human Sertoli cells metabolism and oxidative profile: relevance for male fertility. *Toxicology*, v.328, p.12-20, 2015.

EL IDRISSE, A.E.; SHEN, C.H.; L' AMOUREAUX, W.J. Neuroprotective role of taurine during aging. *Amino Acids*, v.45, p.735-750, 2013.

FEKKERS, D.; PEPPLINKHUIZEN, L.; VERHEIJ, R.; BRUINVELS, J. Abnormal plasma levels of serine, methionine, and taurine in the transient acute polymorphic psychosis. *Psychiatry*, v.51, p.11-18, 1994.

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.; 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, A.

FERREIRA, S.D; DE MELLO, M.T.; SOUZA-FORMIGONI, M.L. O efeito das bebidas alcoólicas pode ser afetado pela combinação com bebidas energéticas? Um estudo com usuários. *Revista Associação Médica Brasileira*, v.50. n.1, p.48-51, 2004, B.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livre: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, n.1, p. 61-68, 1997.

FRANKE, A.G.; BAGUSAT, C.; RUST, S.; ENGEL, A.; LIEB, K. Substances used and prevalence rates of pharmacological cognitive enhancement among healthy subjects. *Eur Arch Psychiatry Clin Neuroscience*, v.264 (S1), p. 83-90, 2014.

FRITZ, B.M.; COMPANION, M.; BOEHM, S.L. Wired yet intoxicated: modeling binge caffeine and alcohol co-consumption in the mouse. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v.38, n.8, p.2269-2278, 2014.

GEBARA, E.; UDRY, F.; SULTAN, S.; TONI, N. Taurine increases hippocampal neurogenesis in aging mice. *Stem Cell Research*, v.14, p.369-379, 2015.

GILES, G.E.; MAHONEY, C.R.; BRUNYÉ, T.T; GARDONY, A.L.; TAYLOR, H.A.; KANAREK, R.B. Differential cognitive effects of energy drink ingredients: Caffeine, taurine, and glucose. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, p. 569-577, 2012.

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

GLADE, M.J.; F.A.C.N. Caffeine – not just a stimulant. *Nutrition*, v.26, p.932-938, 2010.

GOLDFARB, M.; TELLIER, C.; THANASOULIS, G. Review of published cases of adverse cardiovascular events after ingestion of energy drinks. *Am. J. cardiol*, v.113, p.168-172, 2014.

GOODMAN, H.O.; SHIHABI, Z.; OLES, K.S. Antiepileptic drugs and plasma and platelet taurine in epilepsy. *Epilepsy*, v.30, p.201-207, 1989.

GOMAR, F.S.; GALEANO, H.P.; CERVELLIN, G.; LIPPI, G.; EARNEST, C.P. Energy drink overconsumption in adolescents: implications for arrhythmias and other cardiovascular events. *Canadian Journal of Cardiology*, v. 31, p.572-575, 2015.

GULICK, D.; GOULD, T.J. Effects of ethanol and caffeine on behavior in C57BL/6 mice in the plus-maze discriminative avoidance task. *Behav Neurosci*, v. 123, n. 6, p. 1271-1278, 2009.

HALLIWELL, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans*, v.24, n.4, p.1023-1027, 1996.

HALLIWELL, B.; CROSS CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, v.10, p.5-12, 1994.

HALLIWELL ,B.; GUTTERIDGE. JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4<sup>o</sup> Oxford. Clarendon, 2007.

HAAN, L.; HAAN, H.A.; PALEN, J.V.D.; OLIVIER, B.; VERSTER, J.C. Effects of consuming alcohol mixed with energy drinks versus consuming alcohol only on overall alcohol consumption and negative alcohol-related consequences. *International Journal of General Medicine*, p.953-960, 2012.

HECKMAN, M.A.; SHERRY, K.; MEJIA, E.G. Energy drinks: an assessment of their Market size, consumer, demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.9, p.303-317, 2010.

HIGGINS, J.P.; TUTTLE, T.D.; HIGGINS, C.L. Energy Drinks: Content and Safety. *Mayo Foundation for Medical Education and Research*, v. 85, n. 11, p. 1033-1041, 2010.

HILBERT, M.L.T.; MAY, C.E.; GRIFFIN, W.C. Conditioned reinforcement and locomotor activating effects of caffeine and ethanol combinations in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 110, p. 168-173, 2013.



HOWLAND, J.; ROHSENOW, D.J. Risks of energy drinks mixed with alcohol. American Medical Association, v. 309, n. 3, p.245-246, 2013.

HOWLAND, J.; ROHSENOW, D.J.; ARNETT, J.T.; BLISS, C.A.; HUNT, S.K.; CALISE, T.V.; HEEREN, T.; WINTER, M.; LITTLEFIELD, C.; GOTTLIEB, D.J. The acute effects of caffeinated versus non-caffeinated alcoholic beverage on driving performance and attention/reaction time. Addiction Research Report, p. 335-341, 2010.

HOWARD, M.A.; MARCZINSKI, C.A. Acute Effects of a Glucose Energy Drink on Behavioral Control. Experimental and Clinical Psychopharmacology, v. 18, n. 6, p. 553-561, 2010.

IMAGAWA, T.F.; HIRANO, I.; UTSUKI, K.; HORIE, M.; NAKA, A.; MATSUMOTO, K.; IMAGAWA, S. Caffeine and Taurine Enhance Endurance Performance. Physiology & Biochemistry, v. 30, p. 485-488, 2009.

ISHAK, W.W.; UGOCHUKWU, C.; BAGOT, K.; KHALILI, D.; ZAKY, C. Energy Drinks: Psychological Effects and Impact on Well-being and Quality of live. Innovations in Clinical Neuroscience, v. 9, n. 1, p.25-34, 2012.

JEEVA, J.S.; SUNITHA, J.; ANANTHALAKSHMIR, R.; RAJKUMARI, S.; RAMESH, M.; KRISHNAN, R. Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences, v.7, p.331-333, 2015.

KAMIER, Y. Problematic use of energy drinks by adolescents. Child Adolesc Psychiatric, v. 19, p. 643-650, 2010.

KIM, H.Y.; KIM, H.V.; YOON, J.H.; KANG, B.R.; CHO, S.M.; LEE, S.; KIM, J.Y.; KIM, J.W.; CHO, Y.; WOO, J.; KIM, Y.S. Taurine in drinking water recovers

learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, v.4:7467, 2014.

LEE, J.W.; KIM, Y.; PERERA, V.; McLachlan, A.J.; BAE, K.S. Prediction of plasma caffeine concentrations in Young adolescents following ingestion of caffeinated energy drinks: a Monte Carlo simulation. *Eur J Pediatric*, 2015.

LIMA, L. OBREGON, F.; URBINA, M.; CARREIRA, I.; BACCICHET, E.; PENA, S. Taurine concentration in human blood peripheral lymphocytes: Major depression and treatment with the antidepressant mirtazapine. *Adv Exp Med Biol*, v.526, p.297-304, 2003.

LORIST, M.M.; TOPS, M. Caffeine, fatigue and cognition. *Brain and Cognition*, v. 53, p. 82-94, 2013.

MACIEL, E.S. Avaliação dos efeitos neurotóxicos induzidos por benzo[a]pireno sobre parâmetros comportamentais e Bioquímicos. Dissertação de Mestrado, PPG-Neurociências, UFRGS, junho 2012.

MACIEL, E.S.; BIASIBETTI, R.; COSTA, A.P.; LUNARDI, P.; SCHUNCK, R.V.A.; BECKER, G.C.; ARBO, M.D.; DALLEGRAVE, E.; GONÇALVES, C.A.; SALDIVA, P.H.N.; GARCIA, S.C. LEAL, R.B.; LEAL, M.B. Subchronic oral administration of benzopyrene impairs motor and cognitive behavior and modulates S100B levels and MAPKs in rats. *Neurochemical Res*, 2014.

MARCZINSKI, C.A.; FILLMORE, M.T. Energy drinks mixed with alcohol: what are the risks? *Nutrition Reviews*, v.72 (S1), p.98-107, 2014.

MARCZINSKI, C.A. Can energy drinks increase the desire for more alcohol? *Advances in Nutrition an International Review Journal*, v.6, p.96-101, 2015.

MAY, C.E.; HAUN, H.L.; GRIFFIN, W.C. Sensitization and tolerance following repeated exposure to caffeine and alcohol in mice. *Alcoholism: clinical and experimental research*, v.39, n.8, p.1443-1452, 2015.

McLELLAN, T.M.; LIEBERMAN, H.R. Do energy drinks contain active components other than caffeine? *Nutrition Reviews*, v. 70, p. 730-744, 2012.

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.

MENZIE, J.; PRENTICE, H.; WU, J.Y. Neuroprotective mechanisms of taurine against ischemic stroke. *Brain Sciences*, v.3, p.877-907, 2013.

NOSCHANG, C.G.; PETTENUZZO, L.F.; TOIGO, E.V.P.; ANDREAZZA, A.C.; KROLOW, R.; FACHIN, A.; ÁVILA, M.C.; ARCEGO, D.; CREMA, L.M.; DIEHL, L.A.; GONÇALVES, C.A.; VENDITE, D.; DALMAZ, C. Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.94, p.63-69, 2009, B.

NOSCHANG, C.G.; KROLOW,R.; PETTENUZZO, L.F.; ÁVILA, M.C. FACHIN, A.; ARCEGO, D.; TOIGO, E.V.P.; CREMA, L.M.; DIEHL, L.A.; VENDITE, D.; DALMAZ, C. Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidante system. *Neurochemistry Research*, v.34, p.1568-1574, 2009, A.

OLANOW, C.W. An introduction to the free radical in Parkinson´s disease. *Ann Neural*, v. 32, p.2-9, 1992.

PANDOLFO, P.; MACHADO, N.J.; KOFALVI, A.; TAKAHASHI, R.N.; CUNHA, R.A. Caffeine regulates front cortical striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *European Neuro psychopharmacology*, v. 23, p. 317-328, 2013.

PEACOCK, A.; BRUNO, R.; MARTIN, F.H.; CARR, A. The impact of alcohol and energy drink consumption on intoxication and risk-taking behavior. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 37, n.7, p. 1234-1242, 2013.

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.

PREDIGER, R.D.S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R.N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behavioral Brain Research*, v. 159, p.197-205, 2005, A.

PREDIGER, R.D.S.; PAMPLONA, F.A.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R.N. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) – the spontaneously hypertensive rat (SHR). *International Journal of Neuropsychomacology*, v.8, p.583-594, 2005, B.

RATH, M. Energy drinks: What is all the hype? The dangers of energy drinks consumption. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, p.70-76, 2012.

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

ROJAS, J.J; DENIZ, B.F.; SCHUCH, C.P.; CARLETTI, J.V.; DECKMANN, I.; DIAZ, R.; MATTÉ, C.; DOS SANTOS, T.M.; WYSE, A.T., NETTO, C.A.; PEREIRA, L.O. Environmental stimulation improves performance in the ox-maze task and recovers Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus of hypoxic-ischemic rats. *Neuroscience*, v. 16, n.291.p.118-27, 2015.

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, p.511-528, 2011.

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

SCHUNCK, R.V.A ; TORRES, I.L.S. ; LASTE,G. ; DE SOUZA, A. ; MACEDO, I.C. ; VALLE, M.T.C. ; SALOMÓN, J.L.O. ; MOREIRA, S. ; KUO, J. ; ARBO, M.D. ; DALLEGRAVE, E.; LEAL, M.B.. Protracted alcohol abstinence induces analgesia in rats: Possible relationships with BDNF and interleukin-10. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 135, p. 64-69, 2015.

SHAMSI, F.A.; HADI, S.M. Photo induction of strand scission in DNA by uric acid Cu (II). *Free Radical Biol Med*, v.19, p.189-96, 1995.

SHEARER, J. Methodological and metabolic considerations in the study of caffeine-containing energy drinks. *Nutrition Reviews*, v.72 (S1), p.137-145, 2014.

SINCHAI, T.; PLASEN, S.; SANVARINDA, Y.; JAISIN, Y.; GOVITRAPONG, P.; MORALES, N.P.; RATANACHAMNONG, P.; PLASEN, D. Caffeine potentiates methamphetamine-induced toxicity both *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience Letters*, v.502, p. 65-69, 2011.

SMITH, A. Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1243-1255, 2002.

SMITH, A.P.; CHRISTOPHER, G.; SUTHERLAND, D. Acute effects of caffeine on attention: a comparison of non-consumers and withdrawn consumers. *Psychopharmacology*, v. 27(1), p.77-83, 2013.

SNIPES, D.J.; BENOTSCH, E.G. High-risk cocktails and high-risk sex: Examining the relation between alcohol mixed with energy drink consumption, sexual behavior, and drug use in college students. *Addictive Behaviors*, p.1418-1423, 2013.

SPINETTA, M.; WOODLEE, M.T.; FEINBERG, L.M.; STROUD, C.; SCHALLERT, K.; CORMACK, L.K.; SCHALLERT, T. Alcohol-induced retrograde memory impairment in rats: prevention by caffeine. *Psychopharmacology*, 201, 361-371, 2008.

SRIRAM, K.; PAI, K.S. BOYD, M.R. RAVINDRANATH, V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP : *in vitro* and *in vivo* studies in mice. *Brain Research*, 21: 44-52, 1997.

TIWARI, K.K.; CHU, C.; COUROUCLI, X.; MOORTHY, B.; LINGAPPAN, K. Differential concentration-specific effects of caffeine on cell viability oxidative

stress, and cell cycle in pulmonary oxygen toxicity *in vitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 450, p. 1345-1350, 2014.

ULLAH, F.; ALI, T.; ULLAH, N.; KIM, M.O. Caffeine prevents D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. Neurochemistry International, p.1-11, 2015.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MANOEL, J.; CRANIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J. Biochem Cell Biol, v. 39, n. 1, p.44-84, 2007.

VERSTER, J.C.; AUFRICHT, C.; ALFORD, C. Energy drinks mixed with alcohol: misconceptions, myths, and facts. International Journal of General Medicine, p. 187-198, 2012.

XU, Y.J.; ARNEJA, A.S.; TAPPIA, P.S.; DHALLA, N.S. The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. Ex.Clin Cardiol, v.13, n.2, p.57-65, 2008.

XU, S.; HE, M.; ZHONG, M.; LU, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; YU, Z.; ZHOU, Z. The neuroprotective effects of taurine against nickel by reducing oxidative stress and maintaining mitochondrial function in cortical neurons. Neuroscience Letters, v.590, p. 52-57, 2015.

ZEIDÁN-CHULIÁ, F. GELAIN, D.P.; KOLLING, E.A.; FILHO, J.L.R.; AMBROSI, P.; TERRA, S.R.; PIRES, A.S.; DA ROCHA, J.B.T.; BEHR, G.A.; MOREIRA, J.C.F. Major components of energy drinks (caffeine, taurine and guaraná) exert

cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing reactive oxygen species production. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.

YU, S.S.; WANG, M.; LI, X.M.; CHEN, W.H.; CHEN, J.T.; WANG, H.L.; RUAN, D.Y. Influences of different developmental periods of taurine supplements on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area of rats following prenatal and perinatal lead exposure. *Biomedical Central*, v.7, n.51, 2007.

WENDEL A (1981), Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 77: 325–333.

WHIRLEY, B.K.; EINAT, H. Taurine Trials in Animal Models Offer no Support for Anxiolytic, Antidepressant or Stimulant Effects. *Isr. J. Psychiatry Relate. Sci.*, v. 45, n. 1, p. 11-18, 2008.

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

WOOD, N.I.; GLYNN, D.; MORTON, A.J. Brain training improves cognitive performance and survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, v. 42, p.427-437, 2011.





## **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 26689

**Título:** Avaliação da neurotoxicidade de bebidas energéticas contendo cafeína e taurina em ratos

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

MIRNA BAINY LEAL - coordenador desde 07/04/2014  
CARLA DALMAZ - pesquisador desde 07/04/2014  
RENATA PEREIRA LIMBERGER - pesquisador desde 07/04/2014  
Marina Tuerlinckx Costa Valle - Aluno de Mestrado desde 07/04/2014

**Equipe Externa:**

Eliane Dallegrove - pesquisador desde 07/04/2014

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 09/06/2014 - Sala Multiuso da Biblioteca Central - Prédio da Reitoria - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 130 ratos Wistar, machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Sexta-Feira, 27 de Junho de 2014

---

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética