

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS

Naiéli Schiefelbein Souto

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA AFLATOXINA B1 COM ASPARTAME
EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM
RATOS**

Santa Maria, RS
2020

Naiéli Schiefelbein Souto

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA AFLATOXINA B1 COM ASPARTAME EM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Furian

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Souto, Naiéli Schiefelbein

Efeitos da associação da aflatoxina B1 com aspartame em parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos / Naiéli Schiefelbein Souto.- 2020.
136 p.; 30 cm

Orientadora: Ana Flávia Furian

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2020

1. Adoçante Artificial 2. Micotoxina 3. Estresse Oxidativo 4. Comportamento I. Furian, Ana Flávia II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

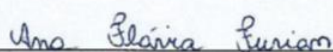
Declaro, NAIÉLI SCHIEFELBEIN SOUTO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Naiéli Schiefelbein Souto

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA AFLATOXINA B1 COM ASPARTAME
EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM
RATOS.**

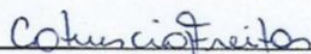
Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Aprovado em 11 de Março de 2020.




Ana Flávia Furian, Dra. (UFSM)

(Presidente/Orientadora)



Catiúscia Mólz de Freitas, Dra. (URI)


Frederico Diniz Lima, Dr. (UFSM)


Gustavo Pétri Guerra, Dr. (UNIPAMPA)


Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS.

2020

Aos meus pais, Ilton e Jovânia, meus exemplos, pelo incentivo, amor e apoio incondicional durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos, me dando força para superar todas as dificuldades.

À minha orientadora, Prof^a. Dra Ana Flávia Furian, pela oportunidade, confiança, disponibilidade e atenção desde o início desta caminhada que se iniciou em 2012, com toda certeza me tornou uma pessoa muito mais preparada, levarei sempre comigo seu exemplo de pessoa, competência profissional, caráter, humildade, amizade. Meus sinceros agradecimentos por ter me ensinado a pesquisar.

Ao Prof. Dr. Mauro Oliveira por toda ajuda prestada no decorrer de meu trabalho, com sugestões, aprimoramentos, explicações que levo por toda a vida. Minha admiração e gratidão

Aos meus pais, Ilton e Jovânia que são as pessoas mais importantes na minha vida, meus exemplos, por me incentivar sempre em seguir em frente e lutar por cada um dos meus sonhos, abrindo mão de muitas coisas para que eu pudesse chegar até aqui e ir mais além inclusive, obrigada pelo amor, carinho, segurança, palavras de incentivo, por tentar sempre aliviar minhas incertezas e medos. Amo muito vocês!

Ao meu amor Leonardo Berton por sempre estar presente. Agradeço o incentivo e a paciência sabendo me ouvir nos momentos de incertezas. Obrigada pelo teu carinho, teu amor e tua alegria. Te amo!

A Micheli, minha companheira de comportamento, análises e de vida. Fez meus dias muito mais leves, te agradeço pela amizade, pelo companheirismo, dedicação, incentivo, bom humor, muito bom trabalhar com você e pode contar comigo sempre. Te admiro muito.

A Ana pela parceria, amizade, nossas inúmeras diluições e divisão de conhecimento. Você fez toda diferença nessa caminha, obrigada!

Ao LAFARMT, Érica e Alice agradeço pelo companheirismo que possamos partilhar ainda mais conhecimentos e histórias. Obrigada por tudo!

Aos meus colegas de laboratório LABNEURO, Mayara, Fernanda, Michele, Bruna, Luiz, pela convivência, ensinamentos e auxílio. Muito obrigada!

Aos meus amigos que fizeram essa jornada mais leve e feliz, Ângela, Augusto, Camila, Fê, Fran, Jamila, Ká, Mari, Marcelo e Thai, muito obrigado a cada um de vocês.#TP

A Aline, Juh e Renata por estar sempre ao meu lado, companheirismo que vem da graduação e vai seguir por toda vida!

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, pela oportunidade e oferta de ensino de qualidade.

A CAPES, CNPq e a FAPERGS, que garantiram o sustento financeiro necessário à realização deste trabalho de doutorado.

A todos que de alguma maneira me ajudaram e me acompanharam na realização deste trabalho, quero agradecer e compartilhar esta vitória. **MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA AFLATOXINA B1 COM ASPARTAME EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS

AUTORA: Naiéli Schiefelbein Souto

ORIENTADORA: Ana Flávia Furian

Micotoxinas são substâncias produzidas por fungos, contaminantes naturais de diversos alimentos. As aflatoxinas são micotoxinas produzidas principalmente pelos fungos do gênero *Aspergillus*, sendo a aflatoxina B1 (AFB1) a mais frequente e a mais tóxica. A AFB1 apresenta efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, é convertida no fígado em 8,9-epóxido, um metabólito que reage com macromoléculas celulares, incluindo proteínas, RNA e DNA. Desta forma, a AFB1 altera parâmetros hematológicos e promove um desequilíbrio no sistema oxidativo, especialmente nas enzimas antioxidantes. Os adoçantes são substâncias utilizadas como substitutos da sacarose, dentre eles destaca-se o aspartame (ASP), o qual é amplamente utilizado em formulações alimentares e na indústria farmacêutica. O mecanismo de toxicidade do ASP baseia-se principalmente na indução de estresse oxidativo e pode atuar em diferentes tecidos. Considerando a presença tanto de AFB1 como de ASP numa refeição, bem como seus mecanismos de toxicidade, eles podem promover o desenvolvimento de quadros de estresse oxidativo, desequilíbrio nas defesas enzimáticas e facilitar o desenvolvimento de alterações comportamentais. Neste estudo, investigamos a exposição a AFB1 (250 µg/kg, i.g.) e/ou ASP (75mg/kg, i.g.) no comportamento dos animais através dos testes de Campo Aberto, Bolinhas enterradas, Construção de Ninho e Borrifagem de Sacarose, bem como em parâmetros bioquímicos após 7 e 14 dias. Os resultados mostraram alterações nos parâmetros comportamentais, evidenciados pelo aumento no tempo gasto no centro no teste de campo aberto, aumento no número de bolinhas enterradas e diminuição no tempo de limpeza da face no teste de borrifagem de sacarose nos animais tratados com AFB1+ASP após 7 e 14 dias. Houve alteração nos marcadores de estresse oxidativo, representados pela diminuição da atividade da enzima catalase (CAT) no fígado e rim após 7 dias de exposição e aumento na atividade após 14 dias em todos os grupos. A glutationa-S-transferase (GST) aumentou no fígado e rim após 7 e 14 dias, o conteúdo de ácido ascórbico diminuiu no fígado, córtex e hipocampo somente no tratamento mais longo. Da mesma forma, os tióis não-proteicos (NPSH) e poder antioxidante usando ferro reduzido (FRAP) diminuíram no fígado, rim, córtex e hipocampo somente após 14 dias de exposição. A peroxidação lipídica determinada através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) aumentou no tratamento de 7 dias somente no hipocampo, e após 14 dias de exposição à AFB1+ASP ocorreu aumento deste marcador no fígado, rim, córtex e hipocampo. Observamos uma redução na imunorreatividade da SOD-2 no hipocampo após o tratamento com AFB1 ou ASP. Pode-se concluir que a administração de AFB1 e ASP alteram parâmetros oxidativos no fígado, rim, córtex cerebral e hipocampo, tanto isolados como associados, além de promover mudanças nos parâmetros relacionados à depressão e ansiedade analisados nos testes de campo aberto, bolinhas e borrifagem de sacarose. Desta forma, salientamos a importância do conhecimento dos efeitos tóxicos e do sinergismo que pode ocorrer entre estes componentes alimentares, os quais podem ser capazes de promover um desequilíbrio e assim acometer e/ou facilitar o desenvolvimento de doenças.

Palavras chave: Adoçante Artificial. Micotoxina. Estresse Oxidativo. Comportamento.

ABSTRACT

EFFECTS OF THE ASSOCIATION OF AFLATOXIN B1 WITH ASPARTAME IN BIOCHEMICAL AND BEHAVIORAL PARAMETERS IN RATS

AUTORA: Naiéli Schiefelbein Souto

ORIENTADORA: Ana Flávia Furian

Mycotoxins are substances produced by fungi, natural contaminants of various foods. Aflatoxins are mycotoxins produced mainly by fungi of the *Aspergillus genus*, with aflatoxin B1 (AFB1) being the most frequent and the most toxic. AFB1 has carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects, is converted in the liver to 8,9-epoxide, a metabolite that reacts with cellular macromolecules, including proteins, RNA and DNA. In this way, AFB1 alters hematological parameters and promotes an imbalance in the oxidative system, especially in antioxidant enzymes. Sweeteners are substances used as substitutes for sucrose, among them aspartame (ASP), which is widely used in food formulations and in the pharmaceutical industry. The toxicity mechanism of ASP is mainly based on the induction of oxidative stress and can act on different tissues. Considering the presence of both AFB1 and ASP in a meal, as well as their mechanisms of toxicity, they can promote the development of oxidative stress, imbalance in enzyme defenses and facilitate the development of behavioral changes. In this study, we investigated the exposure to AFB1 (250 µg / kg, ig) and / or ASP (75mg / kg, ig) in the animals' behavior through the Open Field, Marble Burying test, Nesting test and Splash test, and biochemical parameters after 7 and 14 days. The results showed changes in behavioral parameters, evidenced by the increase in time spent in the center in the open field test, increase in the number of balls buried and decrease in the time of cleaning the face in the sucrose spray test in the animals treated with AFB1 + ASP after 7 and 14 days. There was a change in oxidative stress markers, represented by a decrease in the activity of the enzyme catalase (CAT) in the liver and kidney after 7 days of exposure and an increase in activity after 14 days in all groups. Glutathione-S-transferase (GST) increased in the liver and kidney after 7 and 14 days, the ascorbic acid content decreased in the liver, cortex and hippocampus only in the longest treatment. Likewise, non-protein thiols (NPSH) and antioxidant power using reduced iron (FRAP) decreased in the liver, kidney, cortex and hippocampus only after 14 days of exposure. The lipid peroxidation determined by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) increased in the 7-day treatment only in the hippocampus, and after 14 days of exposure to AFB1 + ASP there was an increase in this marker in the liver, kidney, cortex and hippocampus. We observed a reduction in SOD-2 immunoreactivity in the hippocampus after treatment with AFB1 or ASP. It can be concluded that the administration of AFB1 and ASP alter oxidative parameters in the liver, kidney, cerebral cortex and hippocampus, both isolated and associated, in addition to promoting changes in the parameters related to depression and anxiety analyzed in the open field, Marble Burying test and Splash test. Thus, we emphasize the importance of knowing the toxic effects and the synergism that can occur between these food components, which may be able to promote an imbalance and thus affect and/or facilitate the development of diseases.

Key words: Artificial Sweetener. Mycotoxin. Oxidative Stress. Behaviour.

LISTA DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO

Figura 1 – Estrutura química de edulcorantes artificiais utilizados em alimentos e bebidas aprovados no Brasil	30
Figura 2 – Figura representativa da molécula de aspartame e dos produtos resultantes da sua hidrólise	33
Figura 3 – Principais riscos nas notificações de rejeição de fronteira na União Europeia	38
Figura 4 – Notificações recorrentes e rejeição de fronteira	39
Figura 5 – Porcentagem de contaminação por aflatoxina em diferentes regiões.....	43
Figura 6 – Estruturas químicas das aflatoxinas.....	44

ARTIGO 1

Figure 1. Schematic presentation of the experimental protocol. Rats were weighed and randomly assigned into four groups receiving dimethyl sulfoxide (DMSO) (2%), aflatoxin B ₁ (AFB ₁) (250 µg/kg), aspartame (ASP) (75 mg/kg) or ASP +AFB ₁ by intragastric gavage for 7 days	65
Figure 2. Effect of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on open-field parameters: crossing (A), rearing (B), faeces number (C), grooming behaviour (D), latency to exploration (E), time spent in centre (F). Data are mean + standard error of the mean for n=6 animals in each group. * indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with dimethyl sulfoxide (DMSO) group. + indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB ₁ group. £ indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with ASP group. # indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB ₁ +ASP group.....	68
Figure 3. Effect of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on marble burying test (A) and nesting test (B). Data are mean + standard error of the mean for n=6 animals in each group. * indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with dimethyl sulfoxide (DMSO) group. + indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB ₁ group...	69
Figure 4. Effect of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on splash test parameters: immobility time (A), grooming face (B) and grooming body (C). Data are mean + standard error of the mean for n=6 animals in each group. * indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with dimethyl sulfoxide (DMSO) group	69

MANUSCRITO

Figure 1: Effect of AFB ₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on body weight in all groups along the fourteen days of treatment. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.....	92
Figure 2: Effect of AFB ₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on water (A) and food consumption (B) along the fourteen days of treatment. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.....	92
Figure 3: Effect of AFB ₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on open-field parameters: Crossing (A), Rearing (B), Latency to exploration (C), Time spent	

	in center (D), Grooming behavior (E), Feces number (F). Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.	93
Figure 4:	Effect of AFB1 (250 μ g/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg / kg, i.g.) on marble burying test (A) and nesting test (B). Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.	94
Figure 5:	Effect of AFB1 (250 μ g/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on splash test parameters: immobility time (A), grooming face (B) and grooming body (C). Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.	95
Figure 6:	Effect of AFB1 (250 μ g/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on TBARS content and ascorbic acid content in liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus. Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.	96
Figure 7:	Effect of AFB1 (250 μ g/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on non protein thiols content (NPSH) and antioxidant power of iron reduction (FRAP) content in liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus. Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.	97
Figure 8:	Effect of AFB1 (250 μ g/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g) on glutathione-S-transferase activity (GST) and catalase activity in liver and kidney. Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.	98
Figure 9:	Effect of AFB1 (250 μ g/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g) on immunoreactivity mitochondrial SOD, glutathione S-transferase mu (GSTM) and NOS-2 in hippocampus and cerebral cortex. Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.	99

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO

Tabela 1 – Grau de doçura dos adoçantes artificiais em comparação com a sacarose.....	31
Tabela 2 – Limites de consumo diários, em mg/kg de peso corporal, para os edulcorantes permitidos para consumo no Brasil	32
Tabela 3 – Notificações de micotoxinas na UE durante 2008-2012	38
Tabela 4 – Notificações de micotoxinas por produtos na UE em 2012	39
Tabela 5 – Principais micotoxinas e limites dos EUA e da UE em diferentes produtos alimentícios.....	41
Tabela 6 – Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas no Brasil.....	42
Tabela 7 – Características físicas e químicas das aflatoxinas	45
Tabela 8 – Algumas espécies reativas	48
Tabela 9 – Resultados da exposição a AFB ₁ e ASP após 7 e 14 dias.....	112

ARTIGO 1

Table 1. Effect of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on the organ weight of animals.....	67
Table 2. Effect of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on organ-to-body weight ratio and organ-to-brain weight ratio	67
Table 3. Effect of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on non-protein thiols (NPSH) content, ascorbic acid content, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content and antioxidant power of iron reduction (FRAP) content in cortex cerebral and hippocampus.....	70
Table 4. Effect of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on NPSH content; ascorbic acid content; thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content; antioxidant power of iron reduction (FRAP) content; catalase activity; and glutathione-S-transferase (GST) activity in liver and kidney	70
Table 5. Effect of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on Na ⁺ , K ⁺ , ATPase activity (Δ min/ mg protein) in cerebral cortex	71

MANUSCRITO

Table 1: Effect of AFB ₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on the organ absolute weight of animals. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.....	100
Table 2: Effect of AFB ₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on organ-to-body weight ratio and organ-to-brain weight ratio. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.....	101
Table 3: Effect of AFB ₁ (250µg/kg, i.g.) and/or ASP (75mg/kg, i.g.) on Na ⁺ ,K ⁺ ,ATPase activity (Δ/ min/mg protein) in cerebral cortex. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH	Radical hidroxila
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFM1	Aflatoxina M1
AFP1	Aflatoxina P1
AFQ1	Aflatoxina Q1
ALT	Alanina Aminotransferase
ASP	Aspartame
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CYP	Funções oxidases mistas
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAL	Fosfatase Alcalina
GPx	Glutathiona Peroxidase
GSH	Glutathiona
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
i.g.	Intragástrico
i.p.	Intraperitonal
K⁺	Potássio
MDA	Malonaldeído
Na⁺	Sódio
NE	Norepinefrina
O₂	Oxigênio
O₂•	Radical Superóxido
PKC	Proteína quinase C
RL	Radical livre
RNA	Ácido Ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	ADOÇANTES ARTIFICIAIS	29
2.1.1	Definição e consumo	29
2.1.2	Classificação e avaliação de segurança	30
2.1.3	Aspartame	32
2.2	MICOTOXINAS	36
2.2.1	Aflatoxinas	43
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO	47
2.3.1	Espécies Reativas de oxigênio	48
2.3.2	Indicadores Pró-oxidantes	49
2.3.3	Sistema de defesa antioxidante	50
2.3.3.1	<i>Sistema enzimático</i>	51
2.3.3.2	<i>Sistema não enzimático</i>	53
2.3.3.3	<i>Distúrbios relacionados ao estresse oxidativo</i>	53
3	OBJETIVOS	59
3.1	OBJETIVO GERAL	59
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	63
4.1	ARTIGO 1	63
4.2	MANUSCRITO	76
5	DISCUSSÃO	105
6	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS	117
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	135

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O consumo alimentar é determinado pelas escolhas alimentares dos indivíduos e constitui um processo complexo, que envolve categorias biológicas, econômicas, sociais, oferta, praticidade e disponibilidade dos alimentos (ESTIMA et al., 2009; PERSON et al., 2017).

O aumento da urbanização mundial está distanciando as pessoas da produção primária dos alimentos e isto, têm consequências negativas nos hábitos alimentares e estilo de vida dos indivíduos, colaborando com o aumento do sedentarismo, as dietas desequilibradas em calorias, alterações nos níveis do colesterol, aumento do consumo de sal, tabagismo, exposição a agentes químicos e biológicos, contaminações do solo, água e riscos de intoxicação alimentar. Tais fatores estão contribuindo para o aumento no desenvolvimento de doenças hepáticas, pulmonares, renais, coronárias, neurodegenerativas, câncer dentre outras (WHO, 2003, 2010, 2013).

Grande parte dos produtos mais consumidos atualmente contém uma grande concentração de açúcar ou edulcorante em sua formulação, ambos atuam como aglutinantes e adoçantes, porém os edulcorantes apresentam um diferencial, pois além de fornecerem o sabor doce aos produtos seu potencial calórico por grama de produto final também é inferior a sacarose, não alteram a durabilidade, aparência e textura do produto final (TORLONI et al., 2007).

No Brasil, os edulcorantes (natural, artificial) permitidos são: sacarina, ciclamato, aspartame, esteviosídeo, acessulfame-k, sorbitol, manitol, isomalte, maltitol, lactitol, xilitol, eritriol, neotame, taumatina e sucralose (BRASIL, 2008).

Dentre estes compostos, destacamos o aspartame, o qual é composto por dois aminoácidos (ácido aspártico e a fenilalanina) obtido por síntese enzimática ou química. Possui sabor doce, sendo o mais próximo ao da sacarose e não apresenta sabor residual amargo ou metálico. Possui quatro quilocalorias por grama, porém seu poder de doçura é 200 vezes superior ao da sacarose, o que torna seu valor calórico insignificante. Entretanto, apesar destas vantagens em relação aos demais compostos, uma série de estudos tem buscado analisar se a substituição do açúcar por edulcorantes artificiais á longo prazo é vantajosa ou não para à saúde (FOWLER et al., 2008; MATTES; POPKIN, 2009; STELLMAN; GARFINKEL, 1986).

Muitos produtos integrais entraram na nossa dieta com objetivo de auxiliar a manter uma qualidade de vida e satisfazer as necessidades da população consumidora que busca por

prazer e comodidade. Inicialmente foram criadas em embalagens fracionados, como produtos direcionados aos adeptos de esportes, mas com o tempo conquistaram uma grande gama de consumidores e tomaram diferentes formatos e combinações (BOWER; WHITTEN, 2000; FREITAS; MORETTI, 2006). A grande presença de fibras que faz parte da composição destes produtos integrais acaba refletindo em uma associação positiva com a saúde, sendo que, apresenta uma complexa composição de carboidratos, elevado índice proteico, bem como uma grande quantidade de minerais e vitaminas do grupo B. Os principais cereais que constituem as barras de cereais, cookies, bolachas e pães integrais são: aveia, arroz, milho, centeio, trigo e cevada. Estes cereais atuam de forma positiva no organismo, através da regulação dos níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicerídeos, proporcionando um aumento da saciedade e do volume fecal, e servindo como meio de fermentação para a microbiota intestinal (BRITO et al., 2004; STELATO et al., 2010).

De forma geral, alimentos à base de cereais contém uma grande quantidade de nutrientes, que entre outras coisas podem tornar-se “locais” estratégicos para o crescimento de fungos, pois propiciam uma pressão osmótica elevada, a qual inibe o crescimento bacteriano. Estes produtos podem ser contaminados de forma direta por fungos durante o plantio, transporte e armazenamento (STELATO et al., 2010).

Os fungos podem contaminar os alimentos por diversos meios, como a água, o solo, o ar e manipuladores, causando a deterioração microbiana. Além disso, os fungos filamentosos tais como: *Aspergillus* sp, *Penicilium* sp, *Fusarium* sp, podem causar sérios riscos à saúde do homem pois algumas espécies produzem micotoxinas, as quais tem atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica (BENNETT; KLICH, 2003; BIEHL; BUCK, 1987; BOK; KELLER, 2004).

Dentre as centenas de micotoxinas existentes, as aflatoxinas têm recebido grande atenção em comparação com as demais, pois apresentam maior número de resultados positivos em alimentos. São metabólitos secundários biologicamente ativos, e em sua maioria produzidos por certas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* (BEDARD; MASSEY, 2006).

A aflatoxina B1 (AFB1) é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como Grupo 1 de carcinógenos humanos (IARC, 1993). Os sintomas da aflatoxicose aguda em humanos manifestam-se por vômitos, dor abdominal, edema pulmonar, coma, convulsões, morte com edema cerebral, acúmulo de gordura no fígado, rins e coração (STROSNIDER et al., 2006).

A contaminação de alimentos por aflatoxinas é um importante problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde foi relatado que a

exposição à aflatoxina é associada com aproximadamente 40% das doenças, tais como diferentes tipos de câncer, doenças hepáticas, distúrbios imunológicos e neurológicos (TUNER, 2012; PETERS et al., 2017; WAGNER, 2015; WILLIAMS et al., 2004). Além de problemas de saúde, a presença de aflatoxinas em diferentes fontes alimentícias provoca perdas econômicas consideráveis, visto que lotes contaminados devem ser descartados do mercado, sendo avaliada uma perda mundial de 75% dos grãos produzidos (MARIN et al., 2013, LEE; RYU, 2015; SCHATZMAYR; STREIT, 2013).

Assim, este estudo teve como objetivo investigar o efeito da administração associada do ASP com a AFB1 em ratos Wistar machos, por 7 ou 14 dias, sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais, visto que diversos alimentos que apresentam edulcorantes artificiais em sua composição que podem estar susceptíveis a contaminação por micotoxinas, sendo as aflatoxinas as mais recorrentes e tóxicas do grupo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ADOÇANTES ARTIFICIAIS

2.1.1 Definição e consumo

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define edulcorantes (ED) como sendo substâncias naturais ou artificiais, diferentes dos açúcares, que conferem sabor doce aos alimentos. Atualmente existem 15 edulcorantes aprovados para utilização, dentre os mais conhecidos e mais comercializados estão o aspartame, a sacarina e o ciclamato, comumente utilizados em refrigerantes *light* ou *diet* (ANVISA, 2008).

Os últimos 20 anos têm visto um enorme aumento no número de alimentos contendo adoçantes artificiais não calóricos. Entre os anos de 1999 e 2004, mais de 6000 novos produtos foram lançados somente nos EUA contendo algum destes adoçantes (MAGNUSON et al., 2007).

Uma pesquisa de análise de dados da *National Health and Nutrition Examination* (NHNE), entre 1999 e 2008, demonstrou que a ingestão de adoçantes artificiais em bebidas aumentou de 6,1% para 12,5% entre crianças, e de 18,7% para 24,1% entre adultos. Uma busca no sítio *foodfacts.com* revela mais de 1200 produtos contendo um ou mais adoçantes, entre eles: sucos de frutas, iogurtes, alimentos congelados, barras de cereais e refrigerantes dietéticos (SYLVETSKY et al., 2012).

Há uma grande controvérsia em relação ao uso dos adoçantes artificiais e o seu papel no balanço energético, alguns estudos sugerem que os adoçantes artificiais podem auxiliar no controle do peso corporal (RABEN et al., 2002; ROGERS et al., 1990; TORDOFF; ALLEVA, 1990), outros afirmam que eles não possuem qualquer efeito sobre a saciedade (DREWNOWSKI, 1994; MATTES, 1990; PORIKOS et al., 1982; ROGERS et al., 1990; ROLLS, 1991; VAN WYMELBEKE et al., 2004). Há ainda estudos que mostram um aumento da sensação de fome ou da ingestão alimentar (BLUNDELL; HILL, 1986; BLUNDELL; GREEN, 1996; LAVIN et al., 1997; SWITHERS; DAVIDSON, 2008; SWITHERS et al., 2009; TORDOFF; ALLEVA, 1990; WURTMAN, 1983). Neste mesmo sentido, foi visto em outras pesquisas uma relação entre o consumo de adoçantes artificiais em certos períodos da vida e o desenvolvimento de obesidade (JOHNSON et al., 2009; MALIK et al., 2006; MALIK et al., 2010; TE MORENGA et al., 2012; VAN BAAK; ASTRUP, 2009).

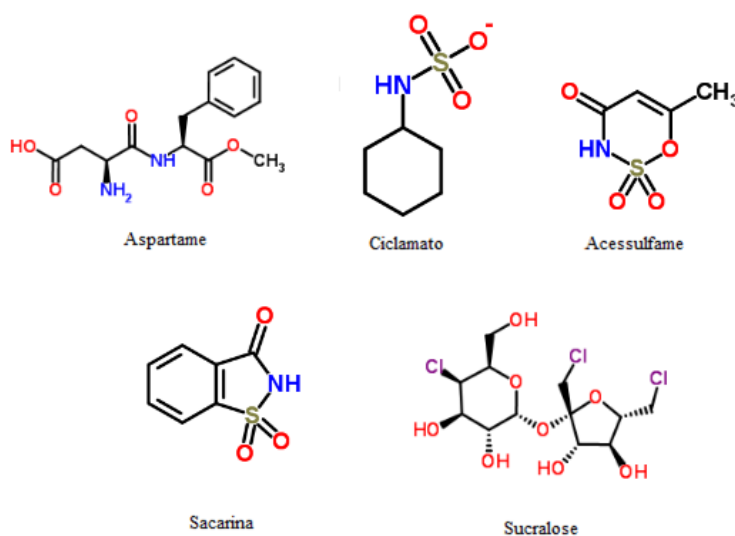
O comportamento alimentar e parâmetros metabólicos dependem não apenas da genética, mas da história prévia do indivíduo, e estudos em protocolos animais demonstraram que intervenções no período gestacional podem influenciar parâmetros relacionados à saúde ou ao comportamento dos filhotes na vida adulta (DAMASCENO et al., 2003; HALLDORSSON et al., 2010; LESAGE et al., 2004).

Dados epidemiológicos têm encontrado uma correlação positiva entre o uso de adoçantes artificiais e ganho de peso, incluindo o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) e o *San Antonio Heart Study* (ASHOK; SHEELADEVI, 2015; ASHOK et al., 2017; DUFFEY; POPKIN, 2006; FOWLER et al., 2008). É interessante observar que vários estudos têm feito observações similares em crianças, encontrando uma associação positiva entre o consumo de refrigerantes *diet* e o aumento do índice de massa corporal (BERKEY et al., 2004; BLUM et al., 2005; FORSHÉE; STOREY, 2003; STRIEGEL-MOORE et al., 2006). Desta forma, mais estudos precisam ser realizados para elucidar a segurança no uso dos adoçantes.

2.1.2 Classificação e avaliação de segurança

Os principais edulcorantes artificiais utilizados em alimentos e bebidas aprovados pela legislação Brasileira e suas estruturas químicas, estão apresentados na figura 1 (GARCÍA-ALMEIDA et al., 2013).

Figura 1 – Estrutura química de edulcorantes artificiais utilizados em alimentos e bebidas aprovados no Brasil



Uma comparação entre o poder adoçante dos adoçantes artificiais frente à sacarose mostra a que a utilização de adoçantes pode ser realizada em menores quantidades e conferem o mesmo grau de doçura, resultando em redução de custo e melhoria das características sensoriais, sem alterar as características desejadas no produto (CAPITAN-VALLVEY et al., 2006; CARDOSO et al., 2004). A Tabela 1 apresenta o grau de doçura dos adoçantes artificiais em comparação com a sacarose.

Tabela 1 – Grau de doçura dos adoçantes artificiais em comparação com a sacarose

Adoçantes Artificiais	Doçura em Relação à Sacarose	Valor calórico (Kcal/g)
Aspartame	180-200	4
Ciclamate	30-50	0
Sacarina	300	0
Acessulfame	200	0
Esteviosídeo	200	0
Sucralose	600	0

Fonte: Adaptado CHATTOPADHYAY et al. (2014).

O uso de adoçantes é avaliado por órgãos governamentais em todo o mundo, incluindo a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e os comitês de especialistas científicos, tais como o *Scientific Committee on Food* (SCF), *European Food Safety Authority* (EFSA) da Comissão Europeia e o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) administrado conjuntamente pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e pela Organização Mundial da Saúde (JECFA/FAO/WHO).

No Brasil, a regulamentação do uso de edulcorantes é de responsabilidade do Ministério da Saúde, por meio da ANVISA, considerando as referências internacionais do *Codex Alimentarius*, do *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA/FAO/WHO) e da FDA, nos Estados Unidos (ANVISA, 2008).

Os edulcorantes não calóricos permitidos para comercialização no Brasil são a sacarina sódica, ciclamate de sódio, aspartame, acessulfame de potássio, sucralose, esteviosídeo, neotame e taumatina (ANVISA, 2008).

Todos os adoçantes artificiais recebem uma recomendação de ingestão diária aceitável (IDA). Esse valor é estabelecido após análise da literatura científica sobre a toxicologia dos edulcorantes, sendo realizada pela JECFA. Para a determinação desse valor, também é

considerada a ingestão estimada dos aditivos pelo consumo de alimentos que contém edulcorante em sua formulação (ANVISA, 2008).

Os limites de consumo diário (mg/kg de peso corporal) para os adoçantes permitidos no Brasil estão descritos na Tabela 2.

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) afirma, em suas diretrizes que os adoçantes dietéticos são seguros quando consumidos até o nível diário aceitável de ingestão, estabelecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) (SBD, 2014).

Tabela 2 – Limites de consumo diários, em mg/kg de peso corporal, para os edulcorantes permitidos para consumo no Brasil

Adoçantes Artificiais	Limites de consumo diário (mg/kg de peso corporal)
Ciclamato	11
Sacarina	2,5
Acessulfame-k	15
Sucralose	15
Aspartame	40
Esteviosídeo	5,5

Fonte: adaptado de ANVISA.

Cabe ressaltar que o adoçante escolhido para a realização do trabalho é o Aspartame, que tem maior limite de consumo diário (40mg/kg por dia) e comparado as demais substâncias que tem um faixa bem menor de segurança para consumo.

2.1.3 Aspartame

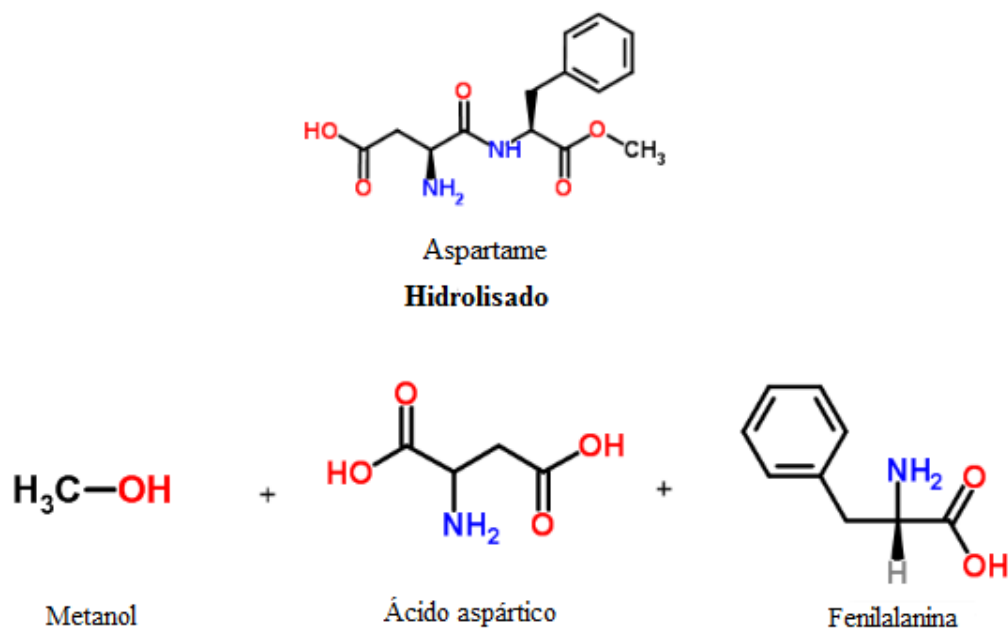
O aspartame (ASP) foi descoberto no ano de 1965 por James Schatter quando ele pesquisava um medicamento para tratamento da úlcera. O composto foi um produto intermediário encontrado na síntese desse medicamento e acidentalmente descoberto seu sabor extremamente doce (CHATTOPADHYAY et al., 2014; MAZUR et al., 1970). A *Food and Drug Administration* (FDA) liberou o consumo do aspartame somente no ano de 1981, após a realização de diversos estudos toxicológicos, sendo que no Brasil o livre comércio de dietéticos foi autorizado em 1988 e na União Europeia seu uso foi liberado em 1994 (STEGINK, 1984; TOLEDO; IOSHI, 1995).

O ASP é termosensível, não pode ser submetido a altas temperaturas, em meio ácido e por armazenamento prolongado. É capaz de acentuar o aroma e prolongar a percepção do sabor das frutas ácidas, como a laranja, limão, maracujá, goiaba e morango, tendo ótimos resultados quando utilizado na formulação de sucos e doces de frutas. É utilizado em adoçantes de mesa, gomas de mascar, balas, sobremesas, bebidas, congelados, refrigerantes, coberturas, xaropes e produtos lácteos (CHATTOPADHYAY et al., 2014; FREITAS, 2006; PHILIPPI, 2014).

A produção do ASP na Europa no ano de 2008 esteve em torno de 19.000 toneladas por ano. Nos Estados Unidos estima-se que este adoçante esteja presente em cerca de 77% dos refrigerantes produzidos, pode estar presente em mais de 6 mil produtos dentre eles iogurtes, cereais e produtos farmacêuticos, e é consumido em diferentes regiões do mundo, alcançando mais de 200 milhões de consumidores (ABDEL-SALAM et al., 2012; GREMBECKA; SZEFER, 2012; YAGASAKI et al., 2008).

Classificado como adoçante artificial e não calórico, o ASP (éster metílico da L- α -aspartil-L-fenilalanina) apresenta um poder de doçura de 180-200 vezes maior que a sacarose. É hidrolisado completamente em três subprodutos: fenilalanina (50%), ácido aspártico (40%) e metanol (10%), representado na Figura 2 (HUMPHRIES et al., 2008; ROWE; SHESKEY, 2009).

Figura 2 – Figura representativa da molécula de aspartame e dos produtos resultantes da sua hidrólise



Metabolizado rapidamente no organismo humano, o aspartame diferencia-se dos demais adoçantes pois é hidrolisado por esterases e peptidases. A absorção de seus metabólitos ocorre no lúmen do trato gastrointestinal, seguida da entrada na circulação sistêmica (MAGNUSON et al., 2007; MOURAD; NOOR, 2011; YANG, 2010).

A quantidade diária de fenilalanina e ácido aspártico aumenta em 1 e 2%, respectivamente para consumidores de ASP, sendo que o ácido aspártico já foi associado à distúrbios neurológicos como enxaqueca e epilepsia (EFSA, 2013; HUMPHRIES et al., 2008; KROGER et al., 2006).

Após 36 anos da sua aprovação para consumo, o ASP continua sendo alvo de estudos relacionados à sua segurança frente aos seus efeitos no metabolismo para humanos e animais. Além disso, pouco se sabe em relação à associação que pode ocorrer do ASP com diferentes compostos presentes nos alimentos.

Em 2003 *U.S. Department of Health and Human Services* mostraram em um estudo usando animais de laboratório que a dose letal (DL₅₀) do ASP é de mais de 10 g/kg de massa corpórea por dia. Ainda assim, os produtos da metabolização desse adoçante podem causar riscos aos indivíduos com fenilcetonúria, que possuem ausência de atividade da enzima fenilalanina hidroxilase, de forma que a presença deste composto deve ser descrita no rótulo do alimento para garantir a segurança dos consumidores (WILLIAMS et al., 2008).

Estudos à curto e longo prazos realizados com ratos e camundongos tratados com ASP em doses que variaram de 5.6 mg a 1.000mg/kg de massa corpórea, verificaram aumento significativo da peroxidação lipídica, aumento do conteúdo óxido nítrico (NO), e das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), evidenciando a instalação de um quadro de estresse oxidativo no cérebro dos animais (ABDEL-SALAM et al., 2012; ABU-TAWEEL et al., 2014; ADARAMOYE; AKANNI, 2016; ASHOK; SHEELADEVI, 2015).

Em 2011, Mourad avaliou os efeitos da ingestão diária de ASP durante 2, 4 e 6 semanas de tratamento (40mg/kg) em ratos machos, e observou um aumento na formação de malondialdeído e diminuição da glutathiona reduzida no sistema antioxidante no fígado e rins. Estes efeitos foram associados ao metanol que é liberado no metabolismo do ASP.

Sugere-se que o consumo de ASP por longos prazos pode gerar problemas em decorrência do metanol que é produzido durante seu metabolismo, promovendo lesões hepáticas e alterações no equilíbrio redox principalmente no fígado (ABHILASH et al., 2011). Casos de acidose metabólica e lesões oculares também foram relacionados ao consumo de ASP (RYCERZ; JAWORSKA-ADAMU, 2013).

Finamor e colaboradores (2014) mostraram que o tratamento com N-acetilcisteína pode exercer um efeito protetor contra o dano oxidativo no cérebro, causado pelo consumo a longo prazo do ASP mesmo na dose diária aceitável, em um protocolo de seis semanas de administração de ASP na dose de 40mg/kg de massa corpórea e a partir da quinta semana a administração de N-acetilcisteína na dose de 150 mg/kg, i.p., em ratos Wistar machos, sendo observado que a N-acetilcisteína promoveu uma redução das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, hidroperóxidos lipídicos e níveis de proteína carbonil, que foram aumentadas devido à administração de ASP. A N-acetilcisteína também resultou em um aumento da superóxido dismutase, da glutatona peroxidase, da atividade da glutatona redutase, bem como dos níveis de potencial de antioxidantes, que diminuíram após a exposição ao ASP. A catalase e a glutatona-s-transferase, cujas atividades foram reduzidas devido ao tratamento com ASP, continuaram diminuídas mesmo após a exposição à N-acetilcisteína.

Lebda e colaboradores (2017) verificaram que o tratamento com ASP (240 mg/kg por via oral) em ratos Wistar machos por dois meses, promoveu interrupção da produção de energia, eletrólitos e desequilíbrio hormonal, além do aumento do estresse oxidativo e ativação da via molecular da apoptose neuronal.

Choudhary (2017) constatou em seu estudo que, o ASP pode atuar como estressor químico ao aumentar os níveis de cortisol, pode induzir o estresse oxidativo sistêmico, aumentando a geração de radicais livres, pode alterar a atividade microbiana intestinal e interferir com o receptor N-metil D-aspartato (NMDA), resultando em deficiência ou resistência à insulina.

Ashok e colaboradores (2017) verificaram em seu estudo que animais tratados com ASP na dose de 40mg/kg de massa corpórea por 90 dias, apresentaram um aumento significativo da glutatona-S-transferase (GST), com uma diminuição significativa na glutatona reduzida (GSH), atividade da superóxido dismutase (SOD), da glutatona peroxidase (GPx) e da catalase (CAT) quando analisado o esperma epidídimo, entre outros achados descritos em seu trabalho, de modo a ressaltar a participação dos metabólitos do ASP como um fator que contribui para o desenvolvimento do estresse oxidativo.

O efeito da ingestão em dose única de 40mg/kg de ASP em 10 voluntários (homens e mulheres), foi estudado por Spanel e colaboradores (2015) onde observaram um aumento de 6 vezes no metanol plasmático dos voluntários. Em outro trabalho, foi avaliada a concentração de álcool no ar expirado por 16 voluntários. Um grupo recebeu bebida alcoólica suplementada com ASP e o outro recebeu bebida alcoólica adicionada de açúcar, e foi observado aumento na concentração de álcool no ar expirado no grupo que consumiu bebida contendo ASP.

Como muitos estudos evidenciaram a participação do metanol no efeito tóxico do ASP, cabe ressaltar que o metanol, após ser lançado no intestino delgado, é oxidado em formaldeído e em ácido fórmico. Este último possui meia-vida longa e é considerado como o primeiro composto tóxico do envenenamento por metanol. Acredita-se que 1 litro de bebidas adoçadas com ASP contenha 56 mg de metanol, lembrando que o limite diário de ingestão de metanol é de 7.8 a 8.0 mg, segundo a Agência Americana de Proteção Ambiental (DOROKHOV, 2015).

Jacob e Stechschulte (2008) verificaram a sensibilidade ao formaldeído, em seis pacientes com idade entre 16 e 75 anos que consumiram mais de 2 litros de refrigerante *diet* do tipo cola contendo ASP por dia. Os pacientes apresentaram dermatite de contato, apresentando resultados positivo ao teste, associando a presença de formaldeído a processos inflamatórios na pele.

Como o ASP está presente em uma grande variedade de alimentos, e seu consumo ser capaz de promover diversas manifestações tóxicas em diferentes tecidos e órgãos, salientamos a necessidade de verificar a interação destes compostos com as micotoxinas, as quais são contaminantes alimentares naturais que podem desenvolver-se em diferentes etapas da produção e armazenamento dos alimentos.

2.2 MICOTOXINAS

Fungos são microrganismos eucarióticos, muitas vezes denominados mofos ou bolores, multicelulares e filamentosos. Sabe-se que a presença de fungos nos alimentos pode promover alterações desejáveis como na fabricação de queijos, porém também podem acarretar sabor desagradável e perda da qualidade dos produtos, principalmente se houver a presença de micotoxinas, gerando além das perdas econômicas, problemas de saúde pública (DINIZ, 2002).

São conhecidas aproximadamente 400 micotoxinas as quais apresentam uma grande diversidade estrutural. Para a produção das micotoxinas nos alimentos, além da presença do fungo toxigênico algumas condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial redox são necessárias (HUSSEIN; BRASEL, 2001; LEE; RYU, 2015).

Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, e uma única espécie é capaz de produzir mais de um tipo de micotoxina. Da mesma forma a presença do fungo nem sempre está associada com a produção da micotoxina, assim como a

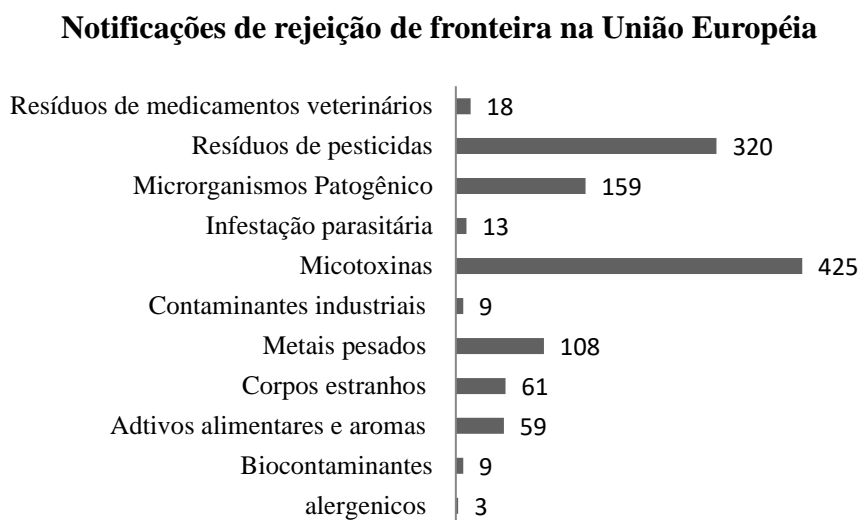
toxina pode estar presente no alimento mesmo que o fungo já tenha sido eliminado (DINIZ, 2002; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Dentre todas as micotoxinas, as que ocorrem com maior frequência e em concentrações significativas em alimentos, são as aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, tricotecenos (particularmente deoxinivalenol) e zearalenona são consideradas mais importantes na segurança alimentar e na saúde pública devido à sua ocorrência e toxicidade (LEE; RYU, 2015).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) estimou que cerca de 25% dos cereais produzidos no mundo estão contaminados por micotoxinas (MARIN et al., 2013). Outros alimentos, como nozes, especiarias, frutas e seus subprodutos também podem ser contaminados por esses metabólitos. A produção de micotoxinas em culturas agrícolas pode ocorrer em vários pontos da cadeia alimentar: pré-colheita, colheita, secagem e armazenamento. Pequenas práticas agrícolas e de colheita, tais como secagem inadequada, manipulação, embalagem, armazenamento e condições de transporte podem promover o crescimento de fungos, aumentando o risco de produção de micotoxinas. Após o processamento do alimento, dificilmente continua a produção de micotoxinas, a não ser que o produto seja novamente contaminado por fungos produtores e encontre condições favoráveis para a sua produção (MARIN et al., 2013).

De acordo com o relatório anual do Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF), em 2012 as micotoxinas foram os principais riscos nas notificações de rejeição de fronteira na União Européia (Figura 3).

Figura 3 – Principais riscos nas notificações de rejeição de fronteira na União Europeia



Fonte: Adaptado de Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), Relatório anual 2012.

Dentre as micotoxinas encontradas, destacam-se as aflatoxinas como as que apresentaram resultados positivos expressivos durante todo o período analisado bem como nos produtos (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 3 – Notificações de micotoxinas na UE durante 2008-2012

Micotoxinas	2008	2009	2010	2011	2012
Aflatoxinas	902	638	649	585	484
Deoxinivalenol	4	3	2	11	4
Fumonisinias	2	1	3	4	4
Ocratoxinas	20	27	34	35	32
Patulina	3				
Zearalenona	2				4

Fonte: Adaptado de Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), Relatório anual 2012.

Tabela 4 – Notificações de micotoxinas por produtos na UE em 2012

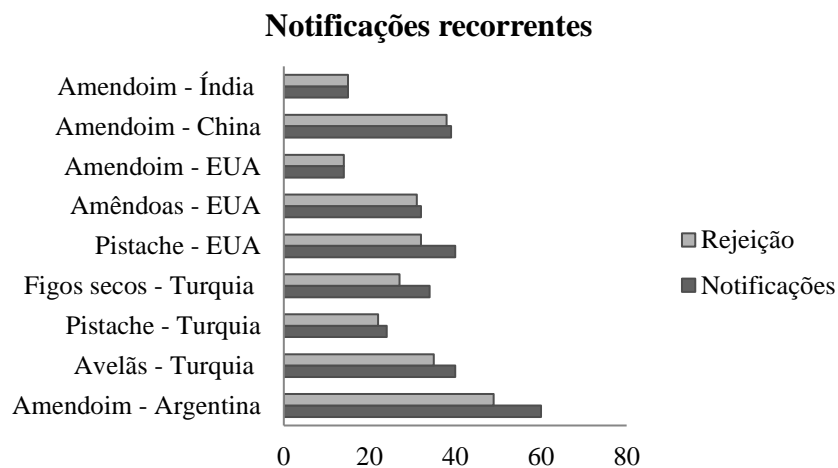
Produtos	Aflatoxina	Deoxinivalenol	Fumonisinás	Ocratoxina A	Zearalenona
Cereais e produtos de padaria	17	4	4	6	3
Frutas e vegetais	137			19	
Ervas e especiarias	33			4	1
Nozes e subprodutos	204				
Outros	14			3	

Fonte: Adaptado de Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), Relatório anual 2012.

Em 2015, houve 475 notificações sobre micotoxinas nos alimentos, relacionadas principalmente à presença de aflatoxinas (421 notificações), ocorrendo uma associação das notificações com o nível de desenvolvimento do país de origem, países em desenvolvimento apresentam maior número de notificações sobre a incidência de micotoxinas em alimentos (RASFF, 2015).

Em 2018, houve um aumento de notificações comparado às pesquisas anteriores, foram registradas 569 notificações relacionadas à presença de micotoxinas, o que mostra um aumento no risco para os consumidores que consomem esses produtos com frequência, principalmente para aflatoxinas, para a qual não há segurança real do nível de ingestão. A figura 4 representa os principais produtos notificados e rejeitados de acordo com sua origem.

Figura 4 – Notificações recorrentes e rejeição de fronteira



Fonte: Adaptado de Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), Relatório anual 2018.

As aflatoxinas se destacaram quanto ao número casos de rejeição de fronteira, que no ano de 2018 ultrapassou de 500, superando até mesmo os casos registrados de resíduos de pesticida (154 casos) dentre muitos outros apontados no relatório (RASFF, 2018).

Outro fator importante é a co-contaminação de micotoxinas, visto que, podem apresentar um efeito sinérgico, Rodrigues e Naehrer no ano de 2012 analisaram 7049 amostras originadas na América do Norte e do Sul, na Europa e Ásia de 2009 a 2011, onde encontraram presença de aflatoxinas (33%), ocratoxinas (45%), fumonisinas (59%), desoxivalenol (64%) e zearalenona (28%), sendo 81% das amostras analisadas positivas para no mínimo uma das micotoxinas.

Os efeitos tóxicos induzidos pelas micotoxinas dependem da dose e da frequência com que elas são ingeridas. Podem ocorrer manifestações logo após o contato, normalmente resultantes de ingestão de doses elevadas, ou distúrbios e alterações no metabolismo decorrentes de exposições à doses menores por longos períodos (MURPHY, 2006; SHEPHARD, 2007).

Uma vez ingeridas as micotoxinas são geralmente absorvidas pelo trato gastrointestinal, podendo ser excretadas após o metabolismo em diferentes períodos de tempo, afetando órgãos alvos ou múltiplos órgãos, em humanos e animais, com diferentes níveis de potência citotóxica, mutagênica, teratogênica, cancerígena e/ou imunossupressora (LEE; RYU, 2015).

Muitos países adotaram regulamentos para limitar a exposição das micotoxinas tanto na alimentação humana quanto animal visto que sua presença não está somente relacionada ao efeito que eles podem ter sobre a saúde, mas também o impacto no comércio mundial. Na tabela 5, estão relacionadas às micotoxinas de maior impacto como contaminantes alimentares juntamente como os principais fungos produtores e os limites regulamentados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FDA) e pela União Europeia (ALSHANNAQ; YU, 2017; MORETTI et al., 2017).

Tabela 5 – Principais micotoxinas e limites dos EUA e da UE em diferentes produtos alimentícios

Micotoxina	Espécie de fungo	Produtos alimentícios	EUA (µg/Kg)	UE (µg/Kg)
Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Milho, trigo, arroz, amendoim, sorgo, pistache, amêndoas, nozes, figos, sementes de algodão, especiarias	20 para todas	2–12 para B1; 4–15 para os demais;
Aflatoxina M1	<i>Metabólito de Aflatoxina B1</i>	Leite e Produtos lácteos	0,5	0,05 em leite; 0,025 produtos para crianças
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Cereais, frutas secas, vinho, uvas, café, cacau, queijo		2-10
Fumonisinias B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Milho, produtos de milho, sorgo, aspargos	2000–4000	200–1000
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereais, produtos de cereais, milho, trigo, cevada		20-100
Deoxinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereais, produtos de cereais	1000	200-50
Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	Maçãs, suco de maçã e concentrado	50	10-50

Fonte: Adaptado de Alshannaq e Yu (2017).

No Brasil a Resolução 07/2011 publicada pela ANVISA dispõem os limites máximos para presença de micotoxinas em diferentes categorias de alimentos conforme disposto na Tabela 6.

Tabela 6 – Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas no Brasil

Micotoxina	Alimento	LMT (µg/Kg)
Aflatoxina (M1)	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	1
	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados	5
	Nozes, avelãs, amêndoas, Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Especiarias, Amendoim, Milho (grão inteiro, partido, amassado, moído), Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
Ocratoxina A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
Fumonisinias (B1 + B2)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha;	1500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	1000
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada, Arroz beneficiado e derivados	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz	600
	Produtos e sub-produtos à base de milho	150
	Trigo integral, farinha e farelo de trigo	200
Desoxinivalenol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
	Farinha de trigo, massas, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	750

Fonte: Adaptado da Resolução 07/2011 Anvisa para aplicação janeiro 2016.

Cabe ressaltar que, mesmo com a existência de limites máximos nacionais e internacionais para micotoxinas nas diferentes categorias alimentares, deve-se levar em consideração o somatório destas pequenas exposições permitidas nos produtos que são

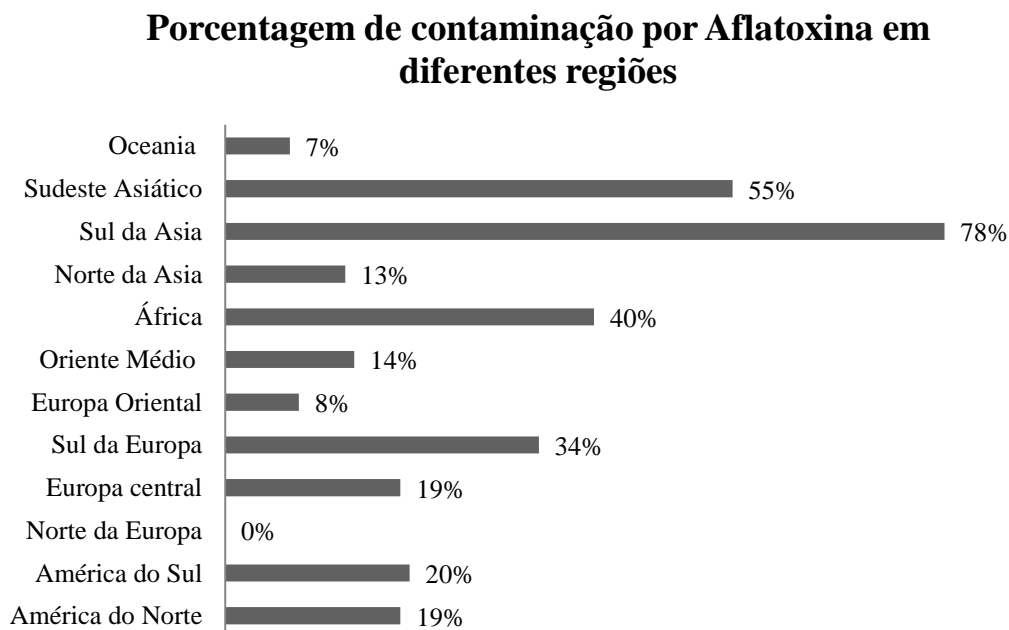
consumidos diariamente pela população e que sozinhas ou associados a outros aditivos alimentares podem provocar danos (ANVISA, 2011).

2.2.1 Aflatoxinas

Desde a descoberta das aflatoxinas como agentes causadores da doença que ocorreu no ano de 1960 provocando a morte de 100 mil jovens perus na Grã-Bretanha, as aflatoxinas passaram a ser objeto de pesquisa, e são consideradas as micotoxinas mais estudadas e que apresentam maior preocupação em relação à saúde pública em todo o mundo (PEREIRA et al., 2014; PITT; MILLER, 2016).

As aflatoxinas são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que colonizam uma variedade de produtos alimentares, incluindo milho, oleaginosas, especiarias, amendoim e nozes em regiões tropicais e subtropicais do mundo. O grau de contaminação varia muito, sendo relacionado com o nível de desenvolvimento dos países, como pode ser observado na Figura 4 (SCHATZMAYR; STREIT, 2013).

Figura 5 – Porcentagem de contaminação por aflatoxina em diferentes regiões

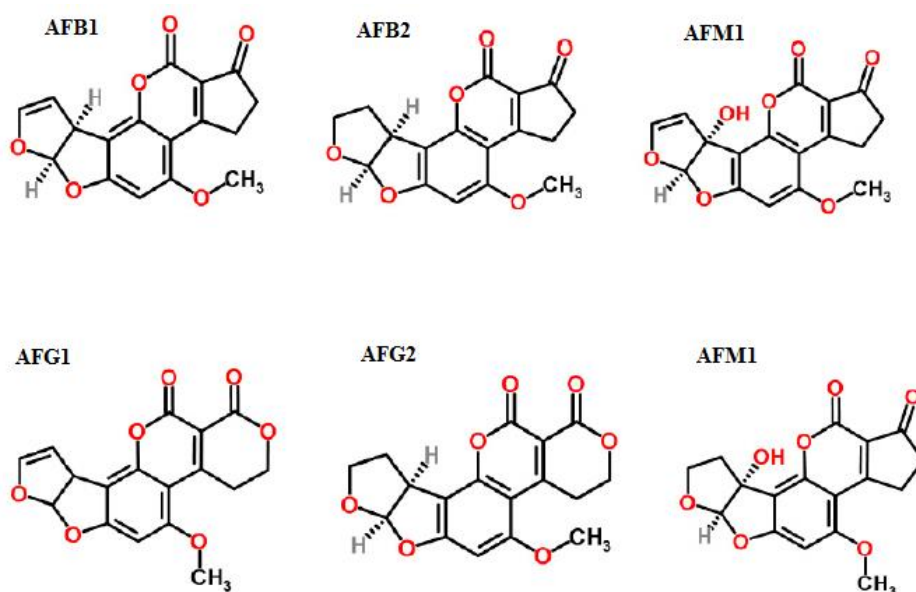


Fonte: Adaptado de Schatzmayr e Streit (2013).

As aflatoxinas são um grupo de aproximadamente 20 metabólitos fúngicos relacionados. As quatro principais aflatoxinas são conhecidas como B1, B2, G1 e G2. As aflatoxinas B2 e G2 são derivados dos compostos originais B1 e G1. As aflatoxinas M1 e M2 são produzidas pelo fígado após a ingestão de alimentos contaminados por aflatoxina B1 (PITT; TOMASKA, 2001), e podem ser detectados no leite 12-24h após o consumo do animal. A AFM1 também pode ser detectada em alguns produtos lácteos como o queijo, pois é estável ao calor, se liga bem à caseína e não é afetada pelo processo de fabricação (BARBIROLI et al., 2007; GOVARIS et al., 2001; PRANDINI et al., 2009).

As estruturas químicas das aflatoxinas são muito semelhantes, todas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide, e são classificadas em dois grandes grupos, aflatoxinas do grupo B que apresentam anel ciclopentona na molécula, e aflatoxinas do grupo G que apresentam anel lactona como representado na figura 5 (CORTÉS et al., 2010).

Figura 6 – Estruturas químicas das aflatoxinas



Fonte: Adaptado de www.chemspider.com.

A nomenclatura das aflatoxinas está associada com a fluorescência que emitem sob luz ultravioleta, onde as aflatoxinas do grupo "B" e "G" referem-se a fluorescência azul (Blue) e verde (Green) que emitem em placas de cromatografia de camada fina, enquanto que os índices numéricos 1 e 2 indicam compostos com maior e menor toxicidade, carcinogenicidade

e mutagenicidade, respectivamente na seguinte ordem B1 > G1 > B2 > G2 (HUSSEIN; BRASEL, 2001; MOLINA et al., 2009).

As principais características físicas e químicas das aflatoxinas estão descritas na tabela 7. São compostos de natureza cristalina, termoestáveis, não promovem alteração de sabor, cor ou aroma dos alimentos. A termoestabilidade permite que as aflatoxinas resistam a determinados tratamentos térmicos, assim elas podem permanecer no alimento mesmo após a eliminação do fungo, sendo destruídas na presença de amônia, hipoclorito ou soluções fortemente alcalinas (BORETTI, 1998; SACRAMENTO, 2016).

Tabela 7 – Características físicas e químicas das aflatoxinas

Aflatoxina	Fórmula Química	Massa Molecular	Temperatura de Fusão (°C)	Emissão de fluorescência (nm) e cor sob luz UV
AFB1	C17H12O6	312	269	425 – azul
AFB2	C17H14O6	314	286-289	425 – azul
AFG1	C17H12O7	328	244-246	450 – verde
AFG2	C17H14O6	330	237-240	450 – verde
AFM1	C17H12O7	328	299	425 – violeta azulada
AFM2	C17H14O7	330	293	425 – violeta azulada

Fonte: Adaptado de Sacramento (2016).

A extensão da toxicidade das aflatoxinas varia em diferentes animais e espécies, sendo mais suscetíveis os ratos e cães e mais resistentes os macacos e camundongos. A relação dose resposta também pode variar de acordo com a raça, sexo, idade e composição da dieta entre indivíduos da mesma espécie. Os machos são mais susceptíveis que as fêmeas, da mesma forma que os jovens são mais sensíveis do que nos adultos (LEESON, 1995; MALMANN; DILKIN, 2007).

Segundo a FDA, o fígado constitui o órgão-alvo primário da toxicidade. A ingestão de baixos teores de aflatoxina, com uma dada frequência e por tempo prolongado, pode resultar em carcinomas hepáticos. A AFB1 é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como pertencente ao Grupo 1 apresentando alto risco de carcinoma hepatocelular. Além disso, o rim, baço e pâncreas podem ser afetados pelas propriedades mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas da micotoxina (MAIA et al., 2011; THOMAS et al., 2005).

Após entrar no organismo, as aflatoxinas são absorvidas por membranas celulares onde atingem a circulação sanguínea, sendo distribuída para diferentes tecidos. No fígado são biotransformadas por ação das enzimas microsossomais do citocromo P450 (CYP450), para a aflatoxina-8,9-epóxido, uma forma reativa que se liga ao DNA e à albumina no soro sanguíneo, este composto altamente eletrofílico, é capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes com sítios nucleofílicos de macromoléculas, ocasionando a formação de aductos que, são responsáveis pelas lesões bioquímicas primárias induzidas pelas aflatoxinas (OLIVEIRA, 1997; WILD; MONTESANO, 2009; WU; KHLANGWISSET, 2010).

O metabólito 8,9-epóxido da aflatoxina B1 também pode sofrer conjugação enzimática com uma molécula de glutathione reduzida, através da glutathione-S-transferase, caracterizando uma importante via de detoxificação deste composto, podendo então ser eliminado do organismo na urina, bile e fezes (ESSIGMANN, 1982).

Devido a formação de radicais livres dentro dos hepatócitos resultantes da exposição a aflatoxina B1, é desencadeada a peroxidação dos fosfolipídios levando ao aumento da permeabilidade das membranas, diminuindo a fluidez e promovendo a inativação das proteínas ocasionando a despolarização da membrana mitocondrial, favorecendo o desenvolvimento de efeitos citotóxicos (BISCHOF, 2007).

Os efeitos tóxicos da aflatoxina B1 mediados pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio decorrente do metabolismo hepático da micotoxina comprometem o balaço entre as defesas antioxidantes do sistema gerando o estresse oxidativo (TOWNER et al., 2003).

Neste sentido El-Nekeety e colaboradores no ano de 2011, mostraram que o consumo de dieta contendo 2,5mg/kg de aflatoxina por 29 dias em ratos Sprague-Dawley promoveu um aumento das transaminases ALT e AST, colesterol, triglicerídeos, creatinina, ácido úrico e óxido nítrico e reduziu os níveis de antioxidante total (TAC), ocasionando ainda um aumento nos níveis de malondialdeído no tecido hepático e renal.

Kanbur e colaboradores em 2011, mostraram efeito pro-oxidante de uma dose de 1250 µg/kg peso corporal de Aflatoxina B1 em um protocolo experimental de 14 dias de tratamento, onde houve um aumento na atividade SOD, seguida de uma diminuição na atividade GSH-Px no cérebro, sem alterar os níveis de MDA e a atividade da CAT.

Ravinayagam e colaboradores no ano de 2012, realizaram um estudo de 45 dias com uma dose de 2mg/kg via intraperitoneal onde puderam observar aumento nos níveis de malondialdeído, na proteína carbonil em fígado e rim, seguido de uma redução da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx, GSH e redução dos tióis não proteicos e vitaminas E e C.

Karabacak et al., 2015, mostraram níveis aumentados de MDA, SOD, CAT e GSH-Px no cérebro de ratas fêmeas Sprague-Dawley, após a exposição a uma dose de 400 µg/kg.bw de aflatoxina B1 durante 28 dias de tratamento.

Mais recentemente Vipin e colaboradores (2017) verificaram em seu trabalho, com doses intercaladas de 24 horas o efeito de 200 µg/kg de aflatoxina B1 durante 28 dias em ratos machos administrados via intraperitoneal, onde foi visto, aumento da ALT, AST, LDH e ALP, diminuição da atividade das enzimas antioxidantes GST, GPx, SOD, CAT, além disso neste mesmo trabalho foi demonstrado a eficiência do extrato de gengibre para inibir a hepatotoxicidade induzida por AFB1.

Um trabalho do nosso grupo de pesquisa verificou parâmetros bioquímicos em córtex cerebral de ratos submetidos a testes comportamentais, 48 horas após uma dose de 250µg/kg via intragástrica de AFB1, onde o tratamento causou efeitos neurotóxicos, evidenciados pela redução significativa nos níveis de defesas antioxidantes não enzimáticas, ácido ascórbico e grupos de tióis não proteico. Além do aumento da ativação da proteína quinase C (PKC), evidenciada pelo aumento da fosforilação de Ser957 da PKCα (SOUTO et al., 2017).

Considerando o potencial tóxico desta micotoxina, a resistência às operações de preparo de alimentos e a presença em diferentes países do mundo a exposição humana torna-se inevitável. Uma ampla gama de produtos ricos em fibras, proteínas, carboidratos podem estar sujeitos à contaminação por aflatoxinas e também por outras micotoxinas, atuando negativamente na saúde, aumentando a susceptibilidade a diversas doenças, tais como: diferentes tipos de câncer, doenças hepáticas, síndromes hemorrágicas, distúrbios imunológicos e neurológicos (PETERS et al., 2017; TURNER, 2012; WAGNER, 2015).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo surge da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. A cronicidade deste processo tem grandes implicações sobre o processo etiológico de inúmeras enfermidades crônicas não transmissíveis, dentre elas: aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e o câncer (AHMAD et al., 2000; MODESTO; MARTINEZ, 2010).

2.3.1 Espécies Reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa, o que o torna instável e altamente reativo, como por exemplo, os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxil (OH^{\bullet}) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 1999). Com base em seu átomo central, são divididos em quatro categorias principais sendo eles: o oxigênio, nitrogênio, enxofre e cloro (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Na natureza, duas das substâncias mais importantes que podem gerar os radicais livres é o oxigênio em seu estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO), que se apresenta como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células e é um importante vasodilatador (DUSTING; MACDONALD, 1995; IGNARRO, 1998; MONCADA et al., 1991).

O termo coletivo “Espécies Reativas de Oxigênio” inclui não somente os radicais livres, mas também outros átomos e moléculas que não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 1992, 2012) (Tabela 8).

Tabela 8 – Algumas espécies reativas

Espécie Reativa de Oxigênio	
OH• Radical hidroxil	H_2O_2 Peróxido de hidrogênio
HOO• Radical hidroperoxil	$O_2^{\bullet-}$ Radical superóxido
RO• Radical alcóxil	O_2 Oxigênio singlete
ROO• Radical peroxil	NO Radical óxido nítrico
ONOO• Peroxinitrito	HOCl Ácido hipocloroso

Fonte: Adaptado de Jordão et al. (1998).

O H_2O_2 é a principal espécie reativa de oxigênio, a qual pode atuar como segundo mensageiro por ser relativamente estável, e em baixas doses ser capaz de reverter à inibição de muitas enzimas, dentre elas as fosfatases. Além disso, as espécies reativas de oxigênio também contribuem para proliferação, migração e sobrevivência celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Para evitar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, os seres vivos dispõem de mecanismos protetores que podem ser enzimáticos e não-enzimáticos, os quais evitam o dano

a lipídios, a proteínas e ácidos nucleicos. As principais enzimas antioxidantes são a catalase, a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx) que evitam o acúmulo de H_2O_2 e de $O_2\bullet$, e a consequente produção de radicais $\bullet OH$, contra o qual não existe nenhum sistema enzimático específico de defesa. As defesas não-enzimáticas incluem os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathione e ascorbato, além da albumina sérica, do ácido úrico e do ácido dehidroascórbico) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os sistemas biológicos por apresentarem lipídios insaturados nas suas membranas tornam-se favoráveis a ocorrência de reações de caráter oxidativo, visto que em seu metabolismo normal já ocorrem uma grande quantidade de reações oxidativas. A suscetibilidade de um tecido ou molécula ao estresse oxidativo é dependente de inúmeros fatores que incluem dentre outros fatores a disponibilidade de antioxidantes, a capacidade de inativação e eliminação dos produtos oxidativos formados (JORDÃO et al., 1998). Fontes externas também podem colaborar para formação de espécies reativas tais como poluentes ambientais, drogas, pesticidas, radiação, entre outros (LOBO et al., 2010).

2.3.2 Indicadores Pró-oxidantes

Um dos principais marcadores do estresse oxidativo, o TBARS mensura as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo utilizado para refletir a intensidade da peroxidação lipídica realizado através da quantificação de malondialdeído (MDA) (LUSHCHAK et al., 2009).

O MDA é um dos mais conhecidos produtos da peroxidação lipídica, é produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poli-insaturados (OROPESA et al., 2009; RODRIGUES, 2007; VASCONCELOS et al., 2007). Altos níveis de MDA aumentam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da peroxidação lipídica (LUSHCHAK et al., 2009).

O 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), um aldeído insaturado, é o produto quantitativamente mais importante da degradação peroxidativa de ácidos graxos ômega, sendo considerado o mais estável (UCHIDA, 2003). Este produto tem a capacidade de difundir-se dentro das membranas ou mesmo em locais distantes de sua formação, podendo reagir com proteínas citosólicas formando vários adutos (resíduos de cisteína, lisina e histidina) que são capazes de induzir respostas específicas de estresse oxidativo, tal como sinalização celular (RAHMAN et al., 2002). O problema adicional é que o HNE pode ser gerado durante as fases de

armazenamento, extração e análise, produzindo resultados erroneamente elevados (CABRERA; JACOB, 2001; STAHL et al., 2001).

Os isoprostanos tem origem não enzimática e são produzidos pela oxidação do ácido araquidônico. Inicialmente, são formados nos fosfolípidios da membrana celular e depois liberados para os fluidos biológicos pela fosfolipase (FRANCO, 2007). A aferição dos isoprostanos é um método de avaliação do estresse oxidativo baseado na oxidação lipídica, os compostos derivados da ação de radicais livres sobre os ácidos graxos poli-insaturados, são produtos secundários da peroxidação lipídica sendo quimicamente estáveis podendo, inclusive, ser dosados na urina (CANI et al., 2008).

2.3.3 Sistema de defesa antioxidante

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicalares. Tal efeito pode ser alcançado por meio de diferentes mecanismos de ação: através do sistema de prevenção (impede a formação dos radicais livres ou espécies não-radicalares), sistema de varredura (impede a ação desses quando já estão formados) ou, ainda sistema de reparo (fornece o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas) (CLARKSON; THOMPSON, 2000; KOURY; DONANGELO, 2003).

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, sejam capazes de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicalares, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (HALLIWELL, 2012).

O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em sistema de defesa enzimático, composto por enzimas como a SOD, GPx, CAT, e sistema de defesa não enzimático, o qual é composto por substâncias produzidas pela própria célula (glutathiona, coenzima Q, ferritina, ácido alfa-lipóico, ácido úrico, entre outros) ou obtidas através da dieta (ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, alguns minerais, diversos compostos fenólicos) (SILVA; JASIULIONES, 2014).

2.3.3.1 Sistema enzimático

Entre as principais enzimas antioxidantes estão a SOD, CAT e GPx. As enzimas SOD são metaloenzimas que protegem os alvos do ataque do ânion superóxido em até 97%. Elas são a primeira e mais importante linha do sistema de defesa enzimático. Estão presentes essencialmente em todas as células do corpo e atualmente existem em três isoformas: a citoplasmática, Cu/ZnSOD (ou SOD1), a mitocondrial, MnSOD (ou SOD2) e a extracelular, Cu/ZnSOD (ou SOD3) (PERRY et al., 2010).

A SOD1 é a principal forma intracelular de SOD, sendo responsável por 80% da proteína total. Estudos mais antigos relataram que a SOD1 é principalmente citosólica (SLOT et al., 1986), mas estudos mais recentes a encontraram em toda a célula, incluindo no espaço inter-membrana mitocondrial e no núcleo (TSANG et al., 2014). Todas as isoformas da SOD agem por um mecanismo comum de dismutação do ânion superóxido, produzindo o peróxido de hidrogênio, que é menos potente.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem ação antimicrobiana e facilita a morte de microorganismos invasores, pois através de oxidação lipídica a membrana plasmática é degradada (Guerra et al., 2007). Mas em excesso, é muito danoso às células. Ele pode interagir com o óxido nítrico ($NO\bullet$) e formar o peroxinitrito ($ONOO^-$). O peroxinitrito é um poderoso pró-oxidante capaz de afetar células vizinhas (BECKMAN et al., 2007). Para tentar evitar esse excesso de H_2O_2 , existem as enzimas que o convertem em água (H_2O) e oxigênio (O_2), uma delas é a catalase (CAT).

A CAT é expressa em todos os órgãos principais do corpo, especialmente no fígado, nos rins, e nos eritrócitos (MASTERS et al., 1986), está localizada principalmente nos peroxissomos, mas também na mitocôndria e no núcleo. Promove a conversão de H_2O_2 à H_2O e O_2 (GLORIEUX et al., 2015). O H_2O_2 pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por exemplo, a membrana do núcleo. Devido ao fato de a célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical $OH\bullet$ em seu interior (BARREIROS et al., 2006).

Baixos níveis da expressão dessa enzima correlacionam-se com uma alta produção de H_2O_2 , o qual está envolvido na ativação de vias de sinalização para induzir a proliferação, migração e invasão em células cancerosas (WU; YOTNDA, 2011; SEN et al., 2012).

A CAT apresenta uma das mais altas taxas de rotatividade para todas as enzimas, sendo que uma molécula de CAT pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de H_2O_2 a cada minuto (VALKO et al., 2006).

Outro sistema que converte o H_2O_2 à H_2O e O_2 é o sistema de defesa da glutathiona. A glutathiona é um tripeptídeo linear (γ -glutamil-cisteinilglicina), sintetizada a partir do glutamato, cisteína e glicina (JOSEPH et al., 1997). Constitui um sistema de defesa endógeno muito importante que tem sido implicado na modulação imune e em respostas inflamatórias (DENEKE; FANBURG, 1989; DROGE et al., 1994). Entre estes eventos incluem a modulação da sinalização redox, da função imune, regulação da proliferação celular, apoptose e respiração mitocondrial (BROWN, 1994; EVANS et al., 1991).

Na célula, cerca de 90% da glutathiona está localizada no citoplasma, 10% na mitocôndria e uma pequena porcentagem no retículo endoplasmático (HWANG et al., 1992). Aproximadamente 85% da glutathiona celular total está livre, enquanto o resto está ligado às proteínas (SIES, 1999).

A glutathiona se apresenta, em mais de 98% do seu total, como glutathiona reduzida (GSH) e o restante na forma de glutathiona oxidada (GSSG). A GSH é convertida a GSSG pela glutathiona peroxidase (GPx), durante períodos de estresse oxidativo e é revertido para a forma reduzida pela glutathiona redutase (GR). A razão GSH/GSSG é utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos sendo crucial na manutenção da homeostase intracelular (MEISTER; ANDERSON, 1983; ROTRUCK et al., 1972).

As GPx são uma família de enzimas que incluem três enzimas dependentes de selênio e uma peroxidase independente desse elemento. Podem ser divididas em dois grupos, celulares e extracelulares. A GPx reduz o H_2O_2 à H_2O , oxidando a glutathiona (KINNULA et al., 1995).

Essa capacidade de reciclar a glutathiona faz com que esse ciclo seja essencial para o mecanismo de defesa antioxidante da célula e evite o esgotamento dos tióis celulares (Heffner & Repine, 1989), sendo que para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão GSH/GSSG deve ser mantida em níveis altos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SIES; MOSS, 1978).

A glutathiona pode através da glutathiona-S-transferase (GST) detoxificar aldeídos reativos (como o MDA), hidroxialdeídos, cetoaldeídos- α , β -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos que são gerados durante a peroxidação lipídica. Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicalares, envolvidas com a iniciação das reações em cadeia que geram danos oxidativos (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

2.3.3.2 Sistema não enzimático

O sistema de defesa não enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos, este sistema atua impedindo reações de auto-oxidação e pode ser vinculado com a redução de radicais livres (PRASAD et al., 2007; SAYEED et al., 2003).

Os tióis não proteicos ligam-se nos radicais livres e os transformam em formas inativas, sendo uma importante função de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (MASSELA et al., 2005; PARVEZ; RAISUDDIN, 2005).

O ácido ascórbico (Vitamina C), é um nutriente hidrossolúvel que mantém diversos processos fisiológicos, interage com espécies reativas de oxigênio antes que estes possam agir oxidando lipídios e proteínas, desempenhando assim um papel de detoxificação e também está envolvido na regeneração da vitamina E (NORDBERG; ARNER, 2001; PARVEZ; RAISUDDIN, 2005; WANG et al., 2003). No organismo, o ácido ascórbico encontra-se na forma de ascorbato, forma que atua como antioxidante neutralizando radicais livres através da doação de elétrons (ação redutora) e permitindo que estes recuperem a estabilidade, reduzindo potencialmente o estresse oxidativo (BARREIROS et al., 2006; PIRES, 2008).

2.3.3.3 Distúrbios relacionados ao estresse oxidativo

Além das enzimas já citadas, um importante marcador a ser considerado são as enzimas presentes nas membranas celulares e bastante sensível a agentes oxidantes é o caso da Na^+K^+ -ATPase, presente em altas concentrações nos tecidos cerebrais, consumindo grande parte da energia gerada por eles, em torno de 40 a 50% do ATP gerado nestes tecidos. Sua inativação é capaz de ocasionar uma despolarização parcial da membrana e entrada de Ca^{2+} nas células neuronais, acarretando excitotoxicidade (FOLMER et al., 2004; SATO et al., 2004; WYSE et al., 2004). Além disso, existe uma correlação entre a inibição desta enzima e déficits cognitivos em diversos modelos de doenças neurodegenerativas como: Alzheimer e Parkinson (BAGH et al., 2008; JOVICIC et al., 2008; KONG et al., 2005).

A resposta do organismo ao estresse leva a alterações neuroquímicas e comportamentais que podem estar associadas à produção excessiva tanto de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis estresse oxidativo, quanto de nitrogênio (ERNs). O estresse é um fator precipitante para os distúrbios relacionados à ansiedade, que estão entre as principais formas de doenças e prejuízos psiquiátricos no mundo moderno (LEZAK et al.,

2017). Testes e ensaios comportamentais baseados em roedores são amplamente utilizados para entender os mecanismos pelos quais o estresse desencadeia comportamentos relacionados à ansiedade, que se caracteriza como um estado emocional desconfortável de antecipação de um perigo iminente, podendo ser traduzido como um medo sem objetivo. Já que o medo pode ser conceituado com um estado gerado pela presença real de um objeto ou situação ameaçadora que, na ansiedade não existiria (LEZAK et al., 2017; PEREGRINO, 1996).

Os ensaios animais de ansiedade procuram reproduzir situações de perigo ou desconforto potencial e desta forma, os padrões comportamentais e as reações fisiológicas ativadas em decorrência destas situações, são utilizadas como medida de ansiedade e geralmente representam grande correspondência com as medidas de ansiedade em humanos (LEZAK et al., 2017; TREIT, 1985).

Dentre os vários tipos de transtornos afetivos existentes, parecem existir diversas características celulares e comportamentais bastantes semelhantes, sendo o estresse oxidativo é um dos aspectos considerados. O dano oxidativo mostrou-se presente com bastante frequência em diferentes transtornos afetivos, como na depressão, ansiedade, transtorno bipolar e transtorno do pânico, o que pode ser relacionado com uma maior vulnerabilidade do sistema nervoso central aos danos oxidativos (BALMUS et al., 2016).

Alguns critérios comportamentais e cognitivos específicos geralmente são apresentados por pacientes depressivos, tais como humor deprimido, anedonia, distúrbios locomotores e de ansiedade, pensamentos de morte e suicídio (BARTOLOMUCCI; LEOPARDI, 2009). Alguns destes sintomas podem ser reproduzidos em ensaios animais de modo a avaliar a indução do comportamento tipo depressivo por substâncias.

Outro distúrbio afetivo com alta prevalência mundial é a depressão, as principais teorias bioquímicas sobre a depressão relacionam-se com disfunções em neurotransmissores cerebrais e seus receptores, embora outras áreas ainda estejam em investigação. Quanto aos neurotransmissores cerebrais, a principal teoria envolve a das monoaminas, onde a deficiência de aminas biogênicas como a serotonina (5HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NE) seria a causa da depressão. Já em relação aos receptores, diversos estudos têm postulado que alterações funcionais em receptores de aminas biogênicas relacionam-se com o desenvolvimento da depressão (BAHLS, 1999).

Uma vez que existe um grande incentivo ao consumo de alimentos ricos em cereais e com baixo teor de açúcar, devemos levar em consideração o risco de contaminação destes cereais por micotoxinas, e os efeitos causados pelo uso de adoçantes artificiais. Alguns

estudos sugerem que a AFB1 e o ASP podem estar relacionados ao desenvolvimento de quadros de estresse oxidativo e alterações em amins biogênicas os quais podem facilitar a ocorrência de distúrbios de ansiedade e depressão. Assim, ressalta-se a importância da realização de estudos que caracterizem os efeitos tóxicos decorrentes da exposição à AFB1 e ao ASP possibilitando o desenvolvimento de estratégias de prevenção ou minimização dos prejuízos causados por esses compostos, trazendo melhorias à saúde humana e animal.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito de exposições à AFB1 e/ou ASP por 7 e 14 dias em testes comportamentais, bem como sobre parâmetros bioquímicos em ratos Wistar machos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar se exposições à AFB1 e/ou ASP alteram o peso corporal e o peso relativo dos órgãos dos animais, além do consumo de água e ração.
- 2- Determinar o efeito da AFB1 e/ou ASP na atividade da enzima catalase (CAT) e da enzima glutationa-S-transferase (GST) no fígado e rim.
- 3- Determinar o efeito da AFB1 e/ou ASP, sobre marcadores de estresse oxidativo, ácido ascórbico, tióis não protéicos (NPSH), peroxidação lipídica (TBARS), poder antioxidante usando ferro reduzido (FRAP) no córtex cerebral, hipocampo, fígado e rim.
- 4- Determinar se exposições à AFB1 e/ou ASP, alteram a atividade da enzima Na^+/K^+ , ATPase no córtex cerebral.
- 5- Determinar se exposições à AFB1 e/ou ASP alteram os parâmetros de locomoção, comportamento tipo ansioso e depressivo nos testes de campo aberto, bolinhas enterradas, construção do ninho e borrifagem de sacarose.
- 6- Determinar se a AFB1 e/ou ASP afeta a imunorreatividade da superóxido dismutase 2 (SOD-2), glutationa-S-transferase mitocondrial (GST-m) e óxido nítrico sintetase (NOS-2) após 14 dias de exposição em córtex cerebral e hipocampo.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1

World Mycotoxin Journal, 2019; 12 (3): 293-305



Behavioural and biochemical effects of one-week exposure to aflatoxin B₁ and aspartame in male Wistar rats

N.S. Souto¹, M. Dassi¹, A.C.M. Braga², E.V.F. Rosa², M.R. Figuera², L.F.F. Royes², M.S. Oliveira² and A.F. Furian^{1,2*}

¹Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 43, Sala 4217, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil; ana.furian@ufsm.br

Received: 18 December 2018 / Accepted: 11 March 2019

© 2019 Wageningen Academic Publishers

RESEARCH ARTICLE

Abstract

Food products are susceptible to contamination by mycotoxins, and aflatoxin B₁ (AFB₁) stands as the most toxic among them. AFB₁ intoxication results in distinct signs, including widespread systemic toxicity. Aspartame (ASP) is an artificial sweetener used as a sugar substitute in many products, and compelling evidence indicates ASP can be toxic. Interestingly, mechanisms underlying ASP and AFB₁ toxicity involve oxidative stress. In this context, concomitant use of ASP and AFB₁ in a meal may predispose to currently unidentified behavioural and biochemical changes. Therefore, we evaluated the effect of AFB₁ (250 µg/kg, intragastrically (i.g.)) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) exposure for 7 days on behavioural and biochemical markers of oxidative stress in male Wistar rats. AFB₁ and/or ASP increased hepatic glutathione S-transferase (GST) activity when compared to controls. In the kidneys, increased GST activity was detected in AFB₁ and AFB₁+ASP groups. In addition, AFB₁ and or ASP elicited behavioural changes in the open field, marble burying and splash tests, however no additive effects were detected. Altogether, present data suggest AFB₁ and ASP predispose to anxiety- and obsessive-compulsive-like symptoms, as well as to enzymatic defence system imbalance in liver and kidney of Wistar rats.

Keywords: mycotoxin, sweetener, food products, oxidative stress, behavioural tests, sugar

1. Introduction

Food products rich in fibre, protein, carbohydrates, minerals and vitamins are part of a healthy diet, but these nutrients can serve as substrates for microorganism proliferation, especially fungi (Orina *et al.*, 2017; Peters *et al.*, 2017; Sadhasivam *et al.*, 2017). Some species of fungi produce toxic substances known as mycotoxins. Importantly, mycotoxins contaminate around 75% of all cereals produced in the world (Lee and Ryu, 2017; Schatzmayr and Streit, 2013). Among mycotoxins, aflatoxins are the prominent group, of which aflatoxin B₁ (AFB₁) is considered the most toxic and abundant (Singh and Chuturgoon, 2017; Stoev, 2015). In fact, food and beverages contaminated with aflatoxins cause global health problems (Mitchell *et al.*, 2016). These toxins are the leading cause of some types of liver cancer and severe gastrointestinal problems, negatively affecting up to five billion people (Liu and Wu,

2010; Williams *et al.*, 2004). In light of the deleterious effects of mycotoxins, there is a need for regulation of their levels in food. Nevertheless, the maximum acceptable levels vary by country (Alshannaq and Yu, 2017; Schatzmayr and Streit, 2013). For instance, in Brazil and USA 20 µg/kg (ANVISA, Legislation 07/2011) is the maximum level, whereas the European Union (EC, 2006) has set limits to 4-15 µg/kg of total aflatoxins. Moreover, in Japan total aflatoxin limit is 10 µg/kg and in Germany it is 4 µg/kg, illustrating the differences in limits for mycotoxins as food contaminants.

These mycotoxins are mutagenic, carcinogenic, hepatotoxic and immunosuppressive; exert inhibitory effects on biological processes, including changes at DNA and RNA level, protein synthesis and development of oxidative stress. Accordingly, AFB₁ is a group 1 carcinogenic by International Agency Cancer Research (IARC) (Karabacak *et al.*, 2015; Vipin *et al.*, 2017). Of note, AFB₁ is stable and

can resist thermal processes such as roasting and cooking, being present in roasted nuts and cooked products, as well as other foods such as spices, fruits, cereals and their derivatives (Marin *et al.*, 2013).

Use of sweeteners allow a marked reduction in sugar consumption and thus a significant decrease in caloric intake, while maintaining the desirable palatability of foods and beverages (Abhilash *et al.*, 2014). Aspartame (ASP) (L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester) is one of the most used artificial sweeteners in the world. It is a high intensity sweetener added to a wide variety of foods, low calorie beverages, desserts, pharmaceuticals and as a table top sweetener (Marinovich *et al.*, 2013). The acceptable daily intake levels of ASP established by the US Food and Drug Administration and European Food Safety Authority is 40 mg/kg/day (JECFA, 1980). Approximately 50% of the ASP molecule is phenylalanine, 40% is aspartic acid and 10% is methanol. Since its approval in 1965, studies have been demonstrating several toxic manifestations in different tissues and organs including liver, kidney and brain (Abhilash *et al.*, 2011; Ashok and Sheeladevi, 2015; Ashok *et al.*, 2017; Simintzi *et al.*, 2007). In this context, methanol is the most toxic ASP metabolite and causes widespread systemic toxicity (Humphries *et al.*, 2008).

Interestingly, mycotoxin-contaminated foods and feedstocks may be consumed in the same meal with products containing ASP, such as in a breakfast cereals (AFB₁) with yoghurt (ASP); cereal bars (AFB₁) and artificial juice (ASP); peanut cookies (AFB₁) and flavoured water (ASP); bread (AFB₁) with fruit jelly (ASP) and coffee with ASP, bakery products (AFB₁) and soft drinks (ASP) (Lee and Ryu, 2017; Magnuson *et al.*, 2007; Marinovich *et al.*, 2013; Rushing and Selim, 2019). Therefore, in the present study we tested the hypothesis that concomitant administration of ASP and AFB₁ may predispose to toxic effects. In this context, we investigated the effect of ASP and AFB₁, alone or in combination, on biochemical and behavioural parameters in male Wistar rats.

2. Materials and methods

Animals and reagents

We used male Wistar rats weighting 40-50 g. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light-dark cycle, 24±1 °C, 55% relative humidity) with controlled access of water (100 ml) and food (40 g) daily. Experimental protocols were performed with the objective of keeping the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS

Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (Process no. 3403220317). AFB₁ (Cas No. 1162-65-8, ≥95% purity) and ASP (Cas No. 22839-47-0; ≥95% purity) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). A stock solution of AFB₁ was prepared dissolving it in 2% dimethyl sulfoxide (DMSO). ASP was prepared daily, dissolving it in NaCl 0.9%.

Experimental design

Figure 1 shows the treatment schedule, DMSO (2%; intragastrically (i.g.)) or AFB₁ (250 µg/kg; i.g.) and ASP (75 mg/kg i.g.) or NaCl (0.9%, i.g.) by intragastric gavage for 7 days. Dose and schedule for AFB₁ (250 µg/kg) administration followed previous studies of Souto *et al.* (2018) and Quian *et al.* (2013), whereas ASP dose (75 mg/kg) was based on Ashok *et al.* (2014, 2015) and Iyyaswamy *et al.* (2012). The time interval between intra gastric AFB₁ and ASP administrations were 45 min, in such a way that the peak plasma concentration of the two compounds occurred as close as possible to each other (Burns *et al.*, 1990; Jubert *et al.*, 2009).

During the treatment, water, feed intake and weight were monitored once daily. In the last two days of treatment, the animals were submitted to behavioural tests. On the seventh day of treatment the animals were sacrificed by decapitation and the liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus were removed, weighed and homogenised in 30 mM Tris-HCl, pH 7.4 for biochemical assays. The experimental protocol was repeated three times to ensure the reproducibility of the results.

Organ weights and relative organ weight ratios

The organs adrenal gland, spleen, brain, heart, liver, lung, kidney and testicles were dissected, removed and weighed. According to wet weight (absolute weight) and body weight at necropsy, organ weight and organ body weight (relative weight) were calculated.

Behavioural tests

Open-field test

The open field task is a simple assessment used to determine general levels of activity, gross locomotor activity and rodent exploration habits. On the sixth day after AFB₁ and/or ASP treatments the rats were placed in the central area of a round open field (56 cm in diameter), which had its floor divided into 10 equal areas. Five areas of the apparatus had their borders limited by the walls of the arena and considered as peripheral areas. The remaining five areas that had no contact with the walls of the apparatus were central areas. The time spent in central areas was

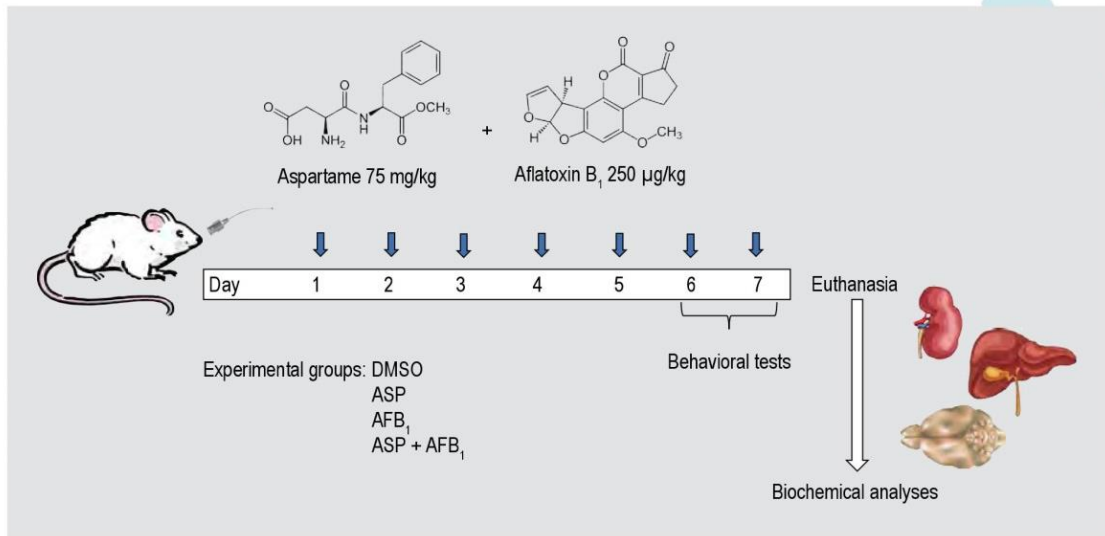


Figure 1. Schematic presentation of the experimental protocol. Rats were weighed and randomly assigned into four groups receiving dimethyl sulfoxide (DMSO) (2%), aflatoxin B₁ (AFB₁) (250 µg/kg), aspartame (ASP) (75 mg/kg) or ASP + AFB₁ by intragastric gavage for 7 days.

measured as an index of anxiety-like behaviour. The number of crossed areas (crossing) as well as the number of rearing responses (animal stands on its hind legs) was recorded for 10 min (Kerr *et al.*, 2005).

Marble burying test

The buried marbles test is used to evaluate anxiety-like and obsessive-compulsive-like behaviour. The test protocol was based on Deacon (2006) with some modifications. Using an opaque plastic box (26×16 cm) with a 5 cm high sawdust layer, 12 glass balls of approximately 15 mm diameter, 4 cm apart, forming 6 rows and 2 columns were arranged. The animals were placed individually in the boxes and after 30 min, the animal was removed from the test site. The number of glass beads with more than 75% of the object body covered with sawdust were counted. In response to a new or aversive stimulus, the animals will seek to leave this environment, burying the offending object (e.g. glass beads) as a defence mechanism. Increased burial of the beads was interpreted as neophobic, a marker of fear/anxiety in rodents (Burke *et al.*, 2016).

Nesting test

The nest building test consists of evaluating the loss or reduction of the animals' ability to perform normal daily tasks related to changes in cognitive behaviour. Both male and female rats have the natural tendency of nesting, for thermo-regulation, breeding and protection. In addition, it can be used as a parameter to evaluate anxiety levels, since the anxious animal would seek the construction of

the nest as a form of protection (Tsai-Teng *et al.*, 2016). The nest quality was assessed on a 1-5 rating scale, with 1 – nest let was not noticeable touched; 2 – nest let was partially shredded and scattered on the floor; 3 – nest let was mostly shredded but only flat nest was build; 4 – nest was identifiable but flat; and 5 – nest was built in a burrow (Deacon, 2012).

Splash test

The splash test is a valid behavioural marker of anhedonia in models of depression (Steckert *et al.*, 2017). This test consists of squirting a 10% sucrose solution in the dorsal coat of rats. The sucrose solution dirties the skin of the rats and they initiate the grooming behaviour (which are cleaning movements for the animals – licking or washing the face and body). Hygiene time was measured for 10 min, such as latency for grooming (immobility time), face grooming time, body grooming time, since animals submitted to behavioural models of depression present a shorter self-grooming time when compared to control animals (Ducottet *et al.*, 2003; Moretti *et al.*, 2012).

Biochemical determinations

Non-protein thiols determination

Non-protein thiols (NPSH) levels of the cerebral cortex, hippocampus, liver and kidney were measured according to Ellman (1959) with some modifications. Samples were precipitated with tricarboxylic acid (TCA) (10%) followed by centrifugation at 3,000×g for 10 min at 4 °C. After the

N.S. Souto et al.

supernatant fraction (60 µl) was added to a reaction medium containing potassium phosphate buffer (1 M, pH 7.4) and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (10 mM), it was read at 412 nm in a spectrophotometer. Results were expressed as nmol NPSH/mg protein, expressed as percent of control, using L-cysteine as thiol standard.

Ascorbic acid determination

Determination of ascorbic acid content (vitamin C) was according Jacques-Silva *et al.* (2001). Samples (cerebral cortex, hippocampus, liver and kidney) were precipitated with 5% TCA and centrifuged at 3,000×g for 10 min at 4 °C. The supernatant (300 µl) was incubated for 3 h at 37 °C with 13.3% TCA (75 µl) and colour development solution (100 mM dinitrophenylhydrazine, 30 mM thiourea and 17 mM Cu₂SO₄ in 5 M H₂SO₄) (75 µl). We measured the reaction product at 520 nm in a spectrophotometer. A standard curve of ascorbic acid was prepared, and the results are expressed as nmol of ascorbic acid/mg of protein, as percent of control.

Thiobarbituric acid reactive substances determination

Lipid peroxidation was estimated by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content, according to the method of Ohkawa *et al.* (1979) with some modifications. Samples (cerebral cortex, hippocampus, liver and kidney) (80 µl) were incubated for 2 h at 95 °C in a medium containing 0.8% thiobarbituric acid (200 µl), 2.5 M acetic acid (100 µl; pH 3.4), 8.1% sodium dodecyl sulphate (25 µl) and distilled water (135 µl). After cooling to room temperature, absorbance was measured at 532 nm in a spectrophotometer. A MDA standard curve was prepared and results were expressed as nmol MDA/mg protein as percent of control.

Antioxidant power of iron reduction determination

The antioxidant power of iron reduction (FRAP) assay followed the method described by Benzie and Strain (1996), performed on cerebral cortex, hippocampus, liver and kidney. Samples (25 µl) were incubated for 60 min at 37 °C in 275 µl of FRAP working solution (25 volumes of 300 mM acetate buffer – pH 3.6, 2.5 volumes of 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine and 2.5 volumes of 20 mM FeCl₃·3H₂O). We measured the reaction product on a spectrophotometer having a length of 630 nm and the results presented in nmol Fe²⁺/mg protein and expressed as a percentage of the control.

Na⁺, K⁺-ATPase activity measurements

The cerebral cortex and the hippocampus were homogenised in ice-cold 30 mM imidazole buffer (pH 7.4) and determination of Na⁺, K⁺-ATPase activity was performed as described by Funck *et al.* (2014) with some additions. Substrate concentrations were saturated, and the reaction was linear with respect to protein amount and time. Appropriate controls were included in the assays to control the non-enzymatic hydrolysis of ATP. Specific Na⁺, K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and normalised to control values.

Catalase activity

Catalase (CAT) activity was determined following the decomposition of 30 mM hydrogen peroxide in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) maintained at a temperature of 37 °C, the reading was performed at a wavelength of 240 nm for 75 s, according to the method proposed by Aebi (1984), in the liver and kidneys. CAT specific activity was expressed as first-order rate constant k, per mg of protein. Appropriate controls for non-enzymatic decomposition of hydrogen peroxide were included in the assays.

Glutathione S-transferase activity

Glutathione S-transferase (GST) activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method of Habig *et al.* (1974). The reaction mixture contained an aliquot of supernatant of liver, kidney, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM glutathione (GSH) and 100 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), which was used as substrate. We expressed enzymatic activity as nmol CDNB/min/mg of protein.

Protein determination

Total protein measurement was performed according to Bradford (1976).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by two-way ANOVA and post hoc analyses were carried out by the Newman-Keuls, using a Graphpad prism 6.0 software (La Jolla, CA, USA). A probability of *P*<0.05 was considered significant, and all data are reported as mean and standard error of the mean.

3. Results

Body weight, food and water consumption and relative organs weight

Body weight gain [F (21, 120) = 0.7188; *P*=0.8068], water [F (15, 72) = 0.2375; *P*=0.9984] and food [F (15, 72) = 0.5567; *P*=0.8978] consumption were identical in all groups along the seven days of treatment, data not shown. In addition, no effects of AFB₁ and/or ASP were detected regarding absolute (Table 1) or relative (Table 2) weight of adrenal gland, spleen, brain, heart, liver, lung, kidney or testes.

Behavioural tests

To investigate whether AFB₁ and/or ASP alter motor and exploratory behaviour of rats, animals were evaluated in the open field paradigm. Statistical analysis showed all

treated groups differ from the control group, and that ASP decreased the crossings compared to AFB₁ and ASP/AFB₁ group (Figure 2A) [F (1, 20) = 15.70; *P*=0.0008]. ASP decreased the number of rearings when compared to control, AFB₁ and AFB₁ plus ASP (Figure 2B) [F (1, 20) = 9.582; *P*=0.005]. On the other hand, no differences were detected in number of faeces [F (1, 20) = 3.351; *P*=0.0821] (Figure 2C) or in grooming behaviour [F (1, 20) = 0.3478; *P*=0.5620] (Figure 2D). The latency to start exploration was longer in AFB₁-treated group, compared to other groups (Figure 2E) [F (1, 20) = 7.305; *P*=0.0137]. Moreover, AFB₁ and AFB₁ plus ASP increased the time spent in the centre of the open field (Figure 2F) [F (1, 20) = 21.12; *P*=0.0002] compared to the DMSO and ASP group.

In addition to open field test, marble burying, nesting test and splash test were evaluated in animals. ASP or AFB₁ plus ASP increased the number of buried balls when compared

Table 1. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on the organ weight of animals.¹

Organs	Treatment			
	DMSO	AFB ₁	ASP	AFB ₁ +ASP
Adrenal gland	0.034±0.001	0.035±0.002	0.036±0.002	0.036±0.001
Spleen	0.345±0.010	0.355±0.015	0.368±0.014	0.392±0.020
Brain	1.132±0.017	1.157±0.011	1.142±0.021	1.175±0.018
Heart	0.488±0.015	0.481±0.017	0.467±0.009	0.487±0.003
Liver	4.712±0.081	4.585±0.133	4.615±0.043	4.795±0.157
Lung	0.725±0.024	0.755±0.026	0.765±0.032	0.795±0.030
Kidney	1.063±0.025	1.046±0.016	1.061±0.027	1.090±0.023
Testicles	0.723±0.053	0.608±0.047	0.734±0.013	0.742±0.032

¹ DMSO = dimethyl sulfoxide. Data are mean ± standard error of the mean for n=6 animals in each group.

Table 2. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on organ-to-body weight ratio and organ-to-brain weight ratio.¹

Organs	Organ-to-body weight ratio				Organ-to-brain weight ratio			
	DMSO	AFB ₁	ASP	AFB ₁ +ASP	DMSO	AFB ₁	ASP	AFB ₁ +ASP
Adrenal gland	0.033±0.002	0.035±0.002	0.037±0.002	0.038±0.002	2.988±0.198	3.038±0.222	3.147±0.197	3.088±0.128
Brain	1.127±0.031	1.187±0.023	1.197±0.029	1.158±0.010	–	–	–	–
Spleen	0.342±0.006	0.358±0.015	0.395±0.017	0.387±0.017	30.617±1.287	30.400±1.233	32.233±0.953	33.500±1.275
Heart	0.492±0.016	0.488±0.022	0.495±0.012	0.486±0.011	42.954±1.116	41.201±1.392	41.465±1.289	41.131±0.532
Liver	4.710±0.037	4.698±0.091	4.862±0.102	4.795±0.059	420.03±9.33	391.54±10.80	400.77±6.99	408.23±12.47
Lung	0.747±0.026	0.763±0.026	0.817±0.063	0.788±0.016	65.750±3.824	64.900±2.613	67.400±2.921	67.700±2.463
Kidney	1.073±0.020	1.077±0.026	1.123±0.059	1.093±0.022	93.663±2.494	90.743±1.002	91.940±2.828	92.473±2.424
Testicles	0.722±0.048	0.687±0.016	0.788±0.015	0.776±0.033	63.899±5.598	52.631±4.057	64.411±1.462	62.925±3.068

¹ DMSO = dimethyl sulfoxide. Data are mean ± standard error of the mean for n=6 animals in each group.

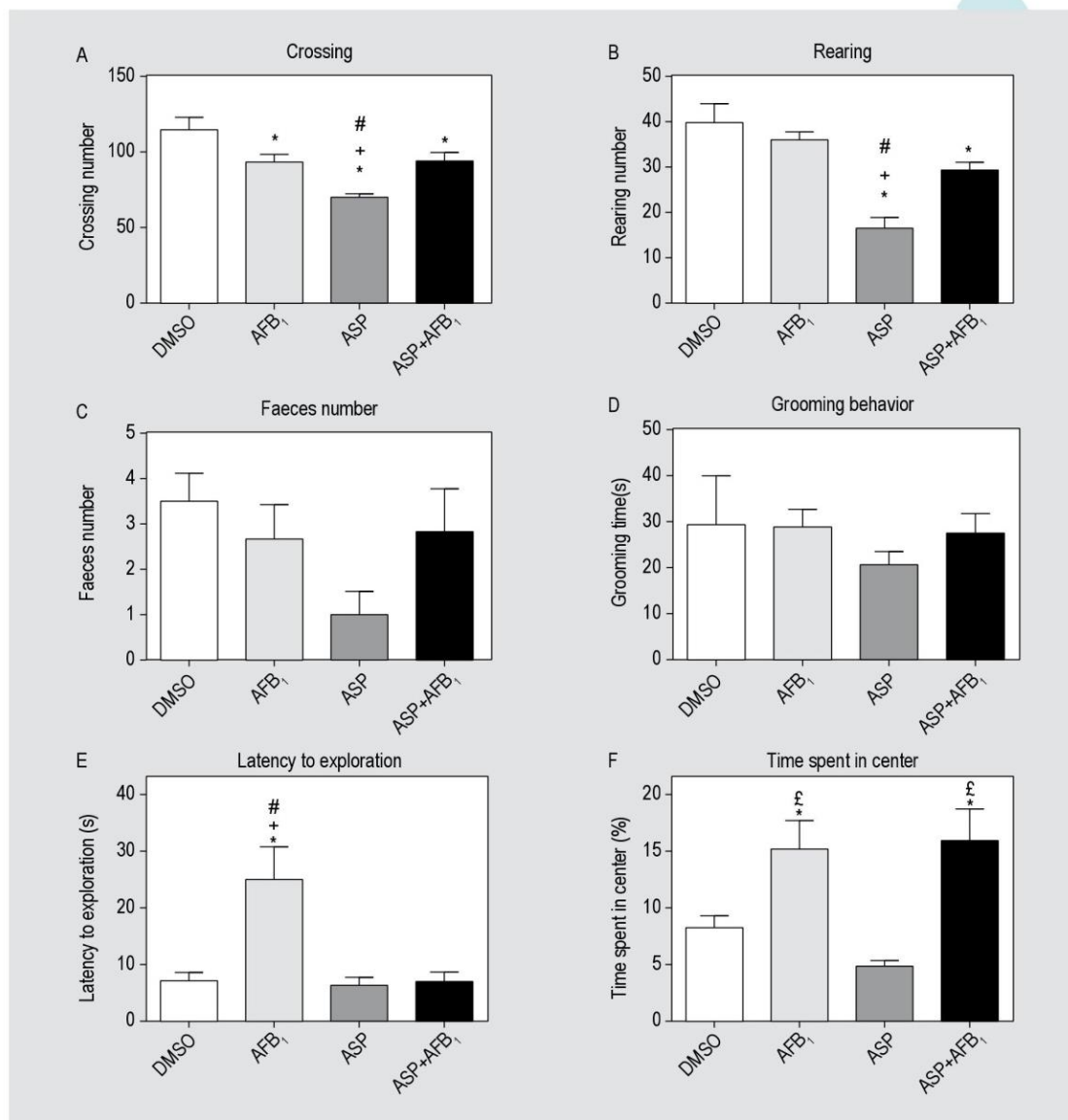


Figure 2. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on open-field parameters: crossing (A), rearing (B), faeces number (C), grooming behaviour (D), latency to exploration (E), time spent in centre (F). Data are mean + standard error of the mean for n=6 animals in each group. * indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with dimethyl sulfoxide (DMSO) group. + indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB₁ group. £ indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with ASP group. # indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB₁+ASP group.

to the control group and AFB₁ group (Figure 3A) [$F(1, 20) = 22.02; P=0.0001$]. On the other hand, in the nesting test no score differences were detected (Figure 3B) [$F(1, 20) = 0.05618; P=0.8151$]. Regarding the splash test, we detected decreased immobility time (latency to clean) [$F(1, 20) = 5.428; P=0.0304$] (Figure 4A) and time to grooming face [$F(1, 20) = 6.094; P=0.0227$] (Figure 4B) in all groups when compared to the control group. No differences between

groups were detected regarding the time spent in grooming behaviour (Figure 4C) [$F(1, 20) = 0.1271; P=0.7252$].

Biochemical analyses

Oxidative stress parameters were measured in liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus. Regarding non-enzymatic defences, no significant differences were observed in NPSH

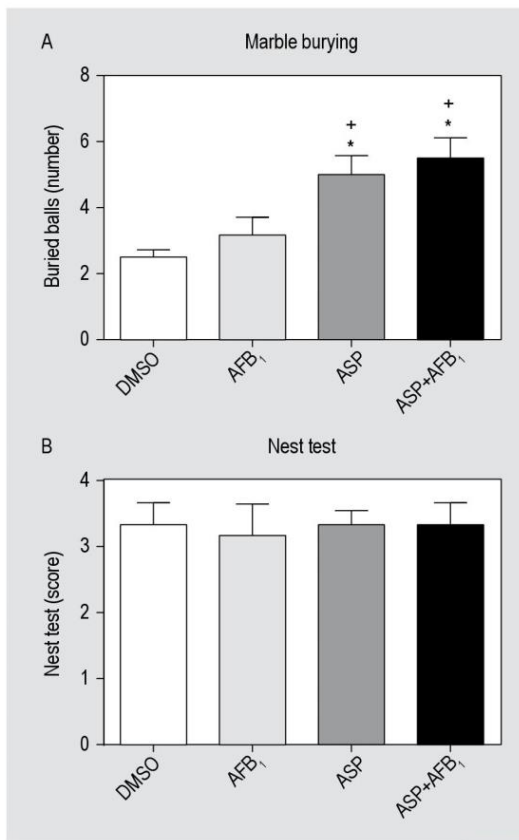


Figure 3. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on marble burying test (A) and nesting test (B). Data are mean ± standard error of the mean for n=6 animals in each group. * indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with dimethyl sulfoxide (DMSO) group. + indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB₁ group.

or ascorbic acid levels in cerebral cortex or hippocampus (Table 3) [$F(1, 20) = 3.238; P=0.0870$], [$F(1, 20) = 1.632; P=0.2161$], [$F(1, 20) = 5.772; P=0.0261$] and [$F(1, 20) = 0.7161; P=0.4074$], respectively. In addition, AFB₁ and ASP, alone or in combination, did not change NPSH, ascorbic acid, TBARS or FRAP content in liver and kidneys of the animals (Table 4).

TBARS content increased in the hippocampus after AFB₁ plus ASP when compared to AFB₁ (Table 3) [$F(1, 20) = 4.832; P=0.0399$]. Moreover, AFB₁ decreased FRAP content when compared to all other groups (Table 3) [$F(1, 20) = 5.852; P=0.0252$]. TBARS and FRAP content of the cerebral cortex were not different between the groups (Table 3) [$F(1, 20) = 3.724; P=0.0679$] and [$F(1, 20) = 1.044; P=0.3191$]. In addition, we investigated whether AFB₁ and/or ASP alter Na⁺, K⁺-ATPase activity in the cerebral cortex. However,

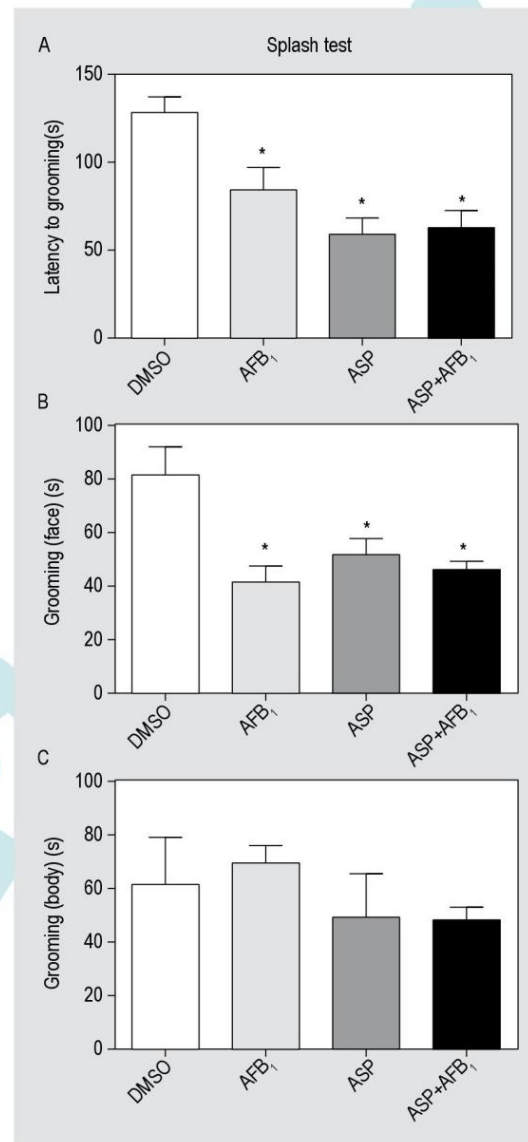


Figure 4. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on splash test parameters: immobility time (A), grooming face (B) and grooming body (C). Data are mean ± standard error of the mean for n=6 animals in each group. * indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with dimethyl sulfoxide (DMSO) group.

statistical analyses revealed that total Na⁺, K⁺-ATPase, α1 or α2/α3 activities were not altered by ASP and/or AFB₁ (Table 5 [$F(1, 20) = 0.6705; P=0.4225$], [$F(1, 20) = 1.821; P=0.1923$] and [$F(1, 20) = 2.186; P=0.1548$]).

Interestingly, AFB₁ and/or ASP altered enzymatic defences. In fact, AFB₁ and AFB₁ plus ASP decreased CAT activity

Table 3. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on non-protein thiols (NPSH) content, ascorbic acid content, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content and antioxidant power of iron reduction (FRAP) content in cortex cerebral and hippocampus.¹

	DMSO	AFB ₁	ASP	AFB ₁ +ASP
NPSH (nmol NPSH/mg protein) (% of vehicle)				
Cerebral cortex	100.00±2.58	87.31±10.06	79.94±6.79	91.362±5.06
Hippocampus	100.00±3.42	93.30±2.75	86.72±6.66	90.638±2.35
Ascorbic acid content (nmol ascorbic acid/mg protein) (% of vehicle)				
Cerebral cortex	100.00±3.24	95.56±4.01	83.72±3.39	100.82±6.50
Hippocampus	100.00±8.16	77.689±4.48	91.76±10.39	82.04±5.15
TBARS (nmol MDA/mg protein) (% of vehicle)				
Cerebral cortex	100.00±3.56	130.36±12.93	144.88±36.61	97.44±10.27
Hippocampus	100.00±6.69	78.08±7.71	98.84±10.90	127.83±17.69+
FRAP (nmol Fe ²⁺ /mg protein) (% of vehicle)				
Cerebral cortex	100.00±2.71	100.83±6.06	98.12±8.37	111.82±6.64
Hippocampus	100.00±2.74	80.20±3.43#£	101.90±4.54	100.33±4.09

¹ Data are mean ± standard error of the mean for n=6 animals in each group. + indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB₁ group. # indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB₁+ASP group. £ indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with dimethyl sulfoxide (DMSO)/ASP group.

Table 4. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on NPSH content; ascorbic acid content; thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content; antioxidant power of iron reduction (FRAP) content; catalase activity; and glutathione-S-transferase (GST) activity in liver and kidney.¹

	DMSO	AFB ₁	ASP	AFB ₁ +ASP
NPSH (nmol NPSH/mg protein) (% of vehicle)				
Liver	100.00±1.14	103.84±8.04	96.17±6.73	95.22±7.66
Kidney	100.00±5.38	102.35±4.64	94.42±5.57	98.59±4.23
Ascorbic acid content (nmol ascorbic acid/mg protein) (% of vehicle)				
Liver	100.00±4.02	91.93±8.64	95.17±1.34	88.34±2.72
Kidney	100.00±3.91	96.57±0.77	90.51±3.17	92.82±4.38
TBARS (nmol malondialdehyde/mg protein (% of vehicle)				
Liver	100.00±3.87	96.83±3.89	92.89±4.66	93.38±3.19
Kidney	100.00±3.93	92.54±4.54	92.68±6.75	87.64±3.25
FRAP (nmol Fe ²⁺ /mg protein (% of vehicle)				
Liver	100.00±0.81	98.32±3.31	97.19±2.15	98.77±4.23
Kidney	100.00±1.86	99.82±4.03	90.78±4.47	97.54±1.35
Catalase (K/mg of protein)				
Liver	2.27±0.08	1.36±0.08*£	2.20±0.07	1.49±0.05*£
Kidney	0.74±0.02	0.98±0.03*	0.70±0.02+#	0.95±0.01*
GST (η mol CDNB/mg protein/ min)				
Liver	21.41±0.74	41.69±0.39*£	32.69±0.56*	29.98±0.56*+£
Kidney	10.84±0.28	15.63±0.17*£	11.27±0.19	12.88±0.53*+£

¹ Data are mean ± standard error of the mean for n=6 animals in each group. * Indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with dimethyl sulfoxide (DMSO) group. + Indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB₁ group. £ Indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with ASP group. # Indicates a significant difference ($P<0.05$) compared with AFB₁+ASP group.

Table 5. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) (250 µg/kg, i.g.) and/or aspartame (ASP) (75 mg/kg, i.g.) on Na⁺, K⁺, ATPase activity (Δ min/mg protein) in cerebral cortex.¹

	DMSO ¹	AFB ₁	ASP	AFB ₁ +ASP
Na ⁺ , K ⁺ , ATPase activity (Δ min/mg protein) (% of vehicle)				
NaK total	100.00±3.93	104.17±12.55	104.43±5.26	94.51±9.78
NaK α-1subunit	100.00±4.32	97.53±7.52	107.77±3.76	91.32±4.23
NaK α-2.3subunit	100.00±6.56	117.10±22.36	119.73±12.71	93.43±12.52

¹ Data are mean ± standard error of the mean for n=6 animals in each group. DMSO = dimethyl sulfoxide.

in the liver [F (1, 20) = 115.3; $P < 0.0001$] (Table 4) when compared to the control group and ASP group. Conversely, AFB₁ and AFB₁ plus ASP increased CAT activity in the kidney [F (1, 20) = 86.42; $P < 0.0001$] (Table 4), whereas ASP decreased CAT activity when compared to AFB₁ and AFB₁ plus ASP. In addition, hepatic GST activity increased in all groups when compared to the control group [F (1, 20) = 391.3; $P < 0.0001$]. GST activity in the kidney increased after AFB₁ or ASP plus AFB₁ when compared to the control and ASP group [F (1, 20) = 23.25; $P = 0.0001$] (Table 4).

4. Discussion

In the present study we investigated the effects of one-week treatment with AFB₁ and/or ASP on behaviour and on oxidative stress parameters in cerebral cortex, hippocampus, liver and kidney of male Wistar rats. ASP is a food additive used in more than 6,000 consumer products and nearly 500 pharmaceuticals, including medicines for children (Magnuson *et al.*, 2007). The chronic use of ASP causes several harmful effects on human health, including neurological disorders (Van den Eeden *et al.*, 1994). AFB₁ is a food contaminant present in different raw materials. It is a heat-resistant compound and its presence does not change the final product characteristics (Casquete *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2016). Toxic effects of ASP and AFB₁ include overproduction of reactive oxygen species, such as superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide, disturbing antioxidant defences and eventually promoting oxidative stress (Towner *et al.*, 2003). Considering that ASP and AFB₁ may be simultaneously present in meals, the present study aimed to investigate the effects ASP and AFB₁ on behavioural and biochemical parameters in rats.

Weight gain, water and food intake were not altered by AFB₁ and/or ASP. Accordingly, a study using ASP (40 mg/kg, i.g.) in male adult Wistar rats (120-150 g) for 6 weeks did not find changes in body weight gain (Finamor *et al.*, 2014). Trebak *et al.* (2015) showed that repeated exposure to AFB₁ in adult male rats twice weekly for 5 weeks (1.5 or 3 mg/kg) dose-dependently decreases body weight gain. These data are in agreement with a previous study reporting

that AFB₁ at 2 mg/kg, but not at 32.8 µg/kg or 327.9 µg/kg, decreases body weight gain (Coulombe and Sharma, 1985). To some extent, these findings agree with present data, since we used low AFB₁ dose. In addition, Raisuddin *et al.* (1990) showed that high doses (700 mg/kg for 14 days) of AFB₁ are necessary to reduce body weight gain in weaned Wistar rats. Regarding this point, the WHO accepts a tolerable daily intake of 20 µg/kg for total aflatoxins. Translating the dose used in the present study (250 µg/kg) according to the formula proposed by Reagan-Shaw *et al.* (2008), we found a human estimated dose of 0.040 mg/kg (40 µg/kg). Indeed, this dose would represent occasional intoxication by high amounts of aflatoxins. In this context, high levels of AFB₁ can be present in some foods, from 6.7 mg/kg in peanut products to 36.9 mg/kg in Brazil nuts (Andrade *et al.*, 2013). Moreover, peanut and derived products present a high incidence of aflatoxin contamination (34.7% of samples), with samples containing up to 1.7 mg/kg of total aflatoxins (Caldas *et al.*, 2002).

Studies performed with AFB₁ and ASP reported oxidative stress as a major mechanism underlying their toxicity. In the study by Alm-Eldeen *et al.* (2015), AFB₁ (750 µg/kg i.g.) decreased antioxidant enzymes activities (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)), increased lipid peroxidation and hydrogen peroxide in male rats. El-Nekeety *et al.* (2011) found increased lipid peroxidation in the liver and kidneys and severe histological changes in liver after 2 weeks of treatment with AFB₁ (2.5 mg/kg i.g.). Naaz *et al.* (2014) showed an increase in lipoperoxidation (LPO) level and a decrease in GSH levels and in the activity of GPx, GST, glutathione reductase (GR), SOD, CAT after 90 days of treatment with AFB₁ (66.60 µg/kg i.g.). Additionally, Abhilash *et al.* (2011) showed that ASP (1000 mg/kg i.g.) for 180 days increased aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), γ-glutamyl transpeptidase (GGT) and decreased GSH levels, GPx and GR activities in liver of rats. Ashok and Sheeladevi (2015) found that ASP (40 mg/kg i.g.) increased the activity of SOD, CAT, GPx, LPO content and decrease GSH and NPSH in the liver of rats. Thus, present results are in agreement with the

mentioned studies, since one-week treatment with ASP and/or AFB₁ altered activity of antioxidant enzymes and predisposing to oxidative stress. Interestingly, it has been reported that AFB₁ elicits neurotoxic effects. Karabacak *et al.* (2015), reported that AFB₁ (400 µg/kg bw/day for 28 days) increased levels of MDA, SOD and CAT in the brain of Sprague-Dawley female rats. Such effects were neutralised by *Tarantula cubensis* D6, a homeopathic medicine. Kanbur *et al.* (2011) showed a pro-oxidant effect of AFB₁ (1,250 µg/kg) after 14 days of treatment, since SOD activity increased, whereas GSH-Px activity decreased in the brain. Souto *et al.* (2018) showed AFB₁ (250 µg/kg) decreased NPSH and ascorbic acid levels and increased expression of the p-PKCα subunit ratio Ser957/PKCα in the cerebral cortex, without concomitant changes in the MDA content, SOD and GST activities. Additionally, some studies with ASP revealed dose-dependent central nervous system (CNS) toxicity. For instance, increased LPO, nitric oxide (NO) content, SOD and CAT activities enzymes were observed after high doses of ASP, evidencing occurrence of oxidative stress in animals' brains (Abdel-Salam *et al.*, 2012; Adaramoye and Akanni, 2016; Ashok and Sheeladevi, 2015). On the other hand, we did not observe differences in NPSH and ascorbic acid content in cerebral cortex and hippocampus (Table 3), as well as in Na⁺, K⁺-ATPase activity in the cerebral cortex (Table 5). Regarding this point, it is suggested that the differences in experimental variables (time, specie, dose, etc.) may have accounted for the lack of effect of ASP or AFB₁ on some biochemical parameters. Duration of exposure to ASP and AFB₁ seems to be critical, since a study with acute oral administration of ASP (4.5 mg/kg) in adult diabetic rats had no influence on glycemia or insulin levels (Shigeta *et al.*, 1985). Abnormal glucose homeostasis, decreased release of serotonin, noradrenaline and dopamine, and oxidative stress were linked to memory loss in mice after chronic treatment with ASP for 30 days at doses of 0.625, 1.875 or 5.625 mg/kg (Abdel-Salam *et al.*, 2012). This is particularly important considering that the dose of 75 mg/kg bw/day used here translates to a human estimated dose of 12.15 mg/kg (Reagan-Shaw *et al.*, 2008), which represents around one third of maximum permitted levels (40 mg/kg) (JECFA, 1980).

Few studies have evaluated the effects of ASP or AFB₁ on behavioural tests. Considering some evidences that ASP and AFB₁ modulate neurotransmitter synthesis/action (Abdel-Salam *et al.*, 2012; Coulombe and Sharma, 1985), we investigated the effect of these compounds alone or in association on behavioural tests. Our results support the view that these compounds affect the CNS, since they modified different behavioural parameters. In the open field, we observed a prominent effect of the ASP in locomotor and exploratory activity, decreasing crossing, rearing when compared to control, AFB₁ and AFB₁ plus ASP groups. AFB₁ group increased the latency to explore when compared to the control, ASP and AFB₁ plus ASP

groups (Figure 2). Therefore, these results suggest that ASP increases anxiety of animals, and that association with AFB₁ blunts these effects. In addition, in the marble burying test, ASP or AFB₁ plus ASP increased the number of marbles buried when compared to the control and AFB₁ groups (Figure 3A). These results suggest increased anxiety- or obsessive-compulsive-like behaviour, since they buried more balls than controls and AFB₁. In fact, increased burial of the balls is a marker of fear/anxiety or obsessive-compulsive disorder in rodents (Deacon, 2006). Moreover, it has been shown that compounds active on serotonin systems decrease marble burying behaviour. Therefore, based on this pharmacological evidence, we suggest that ASP induce anxiety-like or obsessive-compulsive-like behaviour. Moreover, in the splash test ASP and/or AFB₁ decreased latency to grooming (immobility time) and decreased grooming behaviour compared to control (Figure 4A and 4B). Accordingly, some models of anhedonia and depression present a shorter self-grooming time when compared to control animals, indicating that AFB₁, ASP and their association may predispose to anhedonia- or depressive-like behaviour.

In this context, Ashok and colleagues (2014) reported that long-term (90 day) oral administration of ASP (75 mg/kg) disturbed locomotor activity and emotional behaviour of Wistar rats in open field trials and elevated plus maze. Moreover, prenatal exposition to AFB₁ alters cliff avoidance, negative geotaxis, surface righting activity, ascending wire mesh, open-field behaviour, and exploratory and locomotor activities (Kihara *et al.*, 2000; Supriya and Reddy, 2015). On the other hand, our previous studies suggest single acute oral administration of AFB₁ (250 µg/kg/i.g.) does not alter open field test, forced swim, elevated plus maze, taste preference test and novel object recognition performance 48 h after exposure (Souto *et al.*, 2018). Altogether, these studies suggest that the administration of AFB₁ and ASP may be associated with behavioural changes, and that these are dependent on the protocol used, including route of administration, dose, specie, age and the duration of treatment. Moreover, no clear cause-effect relationship between oxidative stress and behavioural alterations could be definitely established from the present study. Regarding this point, we decided to study the effects of AFB₁ and ASP on liver and kidney since there are many reports indicating that these organs are target to toxicity by these compounds, and that oxidative stress plays a pivotal role in pathophysiology of mycotoxin and ASP intoxication. In addition, systemic organ toxicity elicits brain oxidative stress, as seen for instance in uremic (Kovalcikova *et al.*, 2018) or hepatic encephalopathy (Norenberg *et al.*, 2004), and oxidative stress in the hippocampus and cerebral cortex has been reported after AFB₁ or ASP treatment. These observations, along with the fact that behavioural impairment is often related with structural and functional changes in these cerebral areas (Deacon, 2006), may warrant

further studies to investigate the potential role of oxidative stress on behavioural impairment elicited by AFB₁ and/or ASP.

In conclusion, exposure to AFB₁ and/or ASP altered behavioural parameters and biochemical parameters of oxidative stress in different rat organs. More studies involving other exposure protocols, behavioural tests as well as markers of cellular damage may clarify the mechanisms underlying these changes, aiming to improve food safety, particularly in products containing food additives, such as ASP and that are subject to contamination by AFB₁.

Acknowledgements

Research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS grant #16/2551-0000365-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grant #471653/2013-6). M.D., L.F.F.R., M.R.F., M.S.O., and A.F.F. (grant #304824/2016-0) are the recipients of CNPq fellowships; A.C.M.B. and N.S.S. are the recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

References

- Abdel-Salam, O.M., Salem, N.A., El-Shamarka, M.E., Hussein, J.S., Ahmed, N.A. and El-Nagar, M.E., 2012. Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 16: 2092-2101.
- Abhilash, M., Alex, M., Mathews, V.V. and Nair, R.H., 2014. Chronic effect of aspartame on ionic homeostasis and monoamine neurotransmitters in the rat brain. *International Journal of Toxicology* 33: 332-341. DOI: <https://doi.org/10.1177/1091581814537087>
- Abhilash, M., Paul, M.V., Varghese, M.V. and Nair, R.H., 2011. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1203-1207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.02.019>
- Adaramoye, O.A. and Akanni, O.O., 2016. Effects of long-term administration of aspartame on biochemical indices, lipid profile and redox status of cellular system of male rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 27: 29-37. DOI: <https://doi.org/10.1515/jbcp-2014-0130>
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Alm-Eldeen, A.A., Mona, M.H., Shati, A.A. and El-Mekkawy, H.I., 2015. Synergistic effect of black tea and curcumin in improving the hepatotoxicity induced by aflatoxin B₁ in rats. *Toxicology and Industrial Health* 31: 1269-1280. DOI: <https://doi.org/10.1177/0748233713491807>
- Alshannaq, A. and Yu, J.H., 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14: E632. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Andrade, P.D., De Mello, M.H., Franca, J.A. and Caldas, E.D., 2013. Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminary dietary risk assessment. *Food Additives and Contaminants Part A* 30: 127-136. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.720037>
- Ashok, I. and Sheeladevi, R., 2015. Oxidant stress evoked damage in rat hepatocyte leading to triggered nitric oxide synthase (NOS) levels on long term consumption of aspartame. *Journal of Food and Drug Analysis* 23: 679-691. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.07.011>
- Ashok, I., Poornima, P.S., Wankhar, D., Ravindran, R. and Sheeladevi, R., 2017. Oxidative stress evoked damages on rat sperm and attenuated antioxidant status on consumption of aspartame. *International Journal of Impotence Research* 29: 164-170. DOI: <https://doi.org/10.1038/ijir.2017.17>
- Ashok, I., Sheeladevi, R. and Wankhar, D., 2014. Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behavior in Wistar Albino rats. *Biomedicine and Preventive Nutrition* 4: 3943.
- Ashok, I., Sheeladevi, R. and Wankhar, D., 2015. Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in Wistar albino rat brain. *Journal of Biomedical Research* 29: 390-396. DOI: <https://doi.org/10.7555/JBR.28.20120118>
- Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Burke, N.N., Coppinger, J., Deaver, D.R., Roche, M., Finn, D.P. and Kelly, J., 2016. Sex differences and similarities in depressive- and anxiety-like behaviour in the Wistar-Kyoto rat. *Physiology and Behavior* 167: 28-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.08.031>
- Burns, T.S., Stargel, W.W. and Hurwitz, A., 1990. Bioavailability of phenylalanine and aspartate from aspartame (20 mg/kg) in capsules and solution. *Metabolism* 39: 1200-1203.
- Caldas, E.D., Silva, S.C. and Oliveira, J.N., 2002. Aflatoxins and ochratoxin A in food and risks to human health. *Revista de Saude Publica* 36: 319-323.
- Casquete, R., Rodriguez, A., Hernandez, A., Martin, A., Bartolome, T., Cordoba, J.J. and Cordoba, M.G., 2017. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins during smoked paprika production. *Journal of Food Protection* 80: 2068-2077. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-164>
- Coulombe Jr, R.A. and Sharma, R.P., 1985. Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B₁ in the rat. *Food and Chemical Toxicology* 23: 827-830.
- Deacon, R., 2012. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *Journal of Visualized Experiments*: e2607. DOI: <https://doi.org/10.3791/26072607>

N.S. Souto et al.

- Deacon, R.M., 2006. Digging and marble burying in mice: simple methods for *in vivo* identification of biological impacts. *Nature Protocols* 1: 122-124. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.20>
- Ducotet, C., Griebel, G. and Belzung, C., 2003. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27: 625-631. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00051-4)
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77.
- El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E. and Abdel-Wahhab, M.A., 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicol* 57: 984-991. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2011.03.021>
- European Commission (EC), 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L 364: 5-24.
- Finamor, I.A., Ourique, G.M., Pes, T.S., Saccol, E.M., Bressan, C.A., Scheid, T., Baldisserotto, B., Llesuy, S.F., Partata, W.A. and Pavanato, M.A., 2014. The protective effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in the brain caused by the long-term intake of aspartame by rats. *Neurochemical Research* 39: 1681-1690. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1360-9>
- Func, V.R., Ribeiro, L.R., Pereira, L.M., De Oliveira, C.V., Grigoletto, J., Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F. and Oliveira, M.S., 2014. Long-term decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. *Epilepsy Research* 108: 1705-1710. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.09.025>
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
- Humphries, P., Pretorius, E. and Naude, H., 2008. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European Journal of Clinical Nutrition* 62: 451-462. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602866>
- Iyyaswamy, A. and Rathinasamy, S., 2012. Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in the brain of albino rats. *Journal of Bioscience* 37: 679-688. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9236-0>
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M. and Rocha, J.B., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacology and Toxicology* 88: 119-125.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 1980. Aspartame; evaluation of certain food additives. Technical Report Series No. 653. FAO/WHO, Rome/Geneva, Italy/Switzerland.
- Ji, C., Fan, Y. and Zhao, L., 2016. Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition* 2: 127-133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.07.003>
- Jubert, C., Mata, J., Bench, G., Dashwood, R., Pereira, C., Tracewell, W., Turteltaub, K., Williams, D. and Bailey, G., 2009. Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B₁ pharmacokinetics in human volunteers. *Cancer Prevention Research* 2: 1015-1022. DOI: <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0099>
- Kanbur, M., Eraslan, G., Sarica, Z.S. and Aslan, O., 2011. The effects of evening primrose oil on lipid peroxidation induced by subacute aflatoxin exposure in mice. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1960-1964. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.006>
- Karabacak, M., Eraslan, G., Kanbur, M. and Sarica, Z.S., 2015. Effects of *Tarantula cubensis* D6 on aflatoxin-induced injury in biochemical parameters in rats. *Homeopathy* 104: 205-210. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.homp.2015.02.005>
- Kerr, D.S., Bevilacqua, L.R., Bonini, J.S., Rossato, J.I., Kohler, C.A., Medina, J.H., Izquierdo, I. and Cammarota, M., 2005. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT₂ receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology* 179: 529-535. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2074-5>
- Kihara, T., Matsuo, T., Sakamoto, M., Yasuda, Y., Yamamoto, Y. and Tanimura, T., 2000. Effects of prenatal aflatoxin B₁ exposure on behaviors of rat offspring. *Toxicology Science* 53: 392-399.
- Kovalcikova, A., Gyuraszova, M., Vavrinova-Yaghi, D., Vavrinc, P., Tothova, L., Boor, P., Sebekova, K. and Celec, P., 2018. Oxidative stress in the brain caused by acute kidney injury. *Metabolic Brain Disease* 33: 961-967. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0204-8>
- Lee, H.J. and Ryu, D., 2017. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: public health perspectives of their co-occurrence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65: 7034-7051. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04847>
- Liu, Y. and Wu, F., 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 118: 818-824. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.0901388>
- Magnuson, B.A., Burdock, G.A., Doull, J., Kroes, R.M., Marsh, G.M., Pariza, M.W., Spencer, P.S., Waddell, W.J., Walker, R. and Williams, G.M., 2007. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Critical Reviews in Toxicology* 37: 629-727. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408440701516184>
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. and Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 60: 218-237. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Marinovich, M., Galli, C.L., Bosetti, C., Gallus, S. and La Vecchia, C., 2013. Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: regulatory safety and epidemiological issues. *Food and Chemical Toxicology* 60: 109-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.040>
- Mitchell, N.J., Bowers, E., Hurburgh, C. and Wu, F., 2016. Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives and Contaminants Part A* 33: 540-550. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1138545>

Effects of one-week exposure to aflatoxin B₁ and aspartame

- Moretti, M., Colla, A., De Oliveira Balen, G., Dos Santos, D.B., Budni, J., De Freitas, A.E., Farina, M. and Severo Rodrigues, A.L., 2012. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of Psychiatric Research* 46: 331-340. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.11.009>
- Naaz, F., Abdin, M.Z. and Javed, S., 2014. Protective effect of esculin against prooxidant aflatoxin B₁-induced nephrotoxicity in mice. *Mycotoxin Research* 30: 25-32. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12550-013-0185-8>
- Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R. and Rama Rao, K.V., 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* 19: 313-329.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.
- Orina, I., Manley, M. and Williams, P.J., 2017. Non-destructive techniques for the detection of fungal infection in cereal grains. *Food Research International* 100: 74-86. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.069>
- Peters, J., Van Dam, R., Van Doorn, R., Katerere, D., Berthiller, F., Haasnoot, W. and Nielen, M.W.F., 2017. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *PLoS ONE* 12: e0185887. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185887>
- Qian, G., Wang, F., Tang, L., Massey, M.E., Mitchell, N.J., Su, J., Williams, J.H., Phillips, T.D. and Wang, J.S., 2013. Integrative toxicopathological evaluation of aflatoxin B₁ exposure in F344 rats. *Toxicologic Pathology* 41: 1093-1105. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623313477256>
- Raisuddin, Singh, K.P., Zaidi, S.I., Saxena, A.K. and Ray, P.K., 1990. Effects of aflatoxin on lymphoid cells of weanling rat. *Journal of Applied Toxicology* 10: 245-250.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M. and Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal* 22: 659-661. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>
- Rushing, B.R. and Selim, M.I., 2019. Aflatoxin B₁: a review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology* 124: 81-100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Sadhasivam, S., Britzi, M., Zakin, V., Kostyukovsky, M., Trostanetsky, A., Quinn, E. and Sionov, E., 2017. Rapid detection and identification of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in stored wheat grain. *Toxins* 9: E302. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins9100302>
- Schatzmayr, G. and Streit, E., 2013. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin Journal* 6: 213-222. DOI: <https://doi.org/10.3920/WMJ2013.1572>
- Shigeta, H., Yoshida, T., Nakai, M., Mori, H., Kano, Y., Nishioka, H., Kajiyama, S., Kitagawa, Y., Kanatsuna, T., Kondo, M. and Otsuki, K., 1985. Effects of aspartame on diabetic rats and diabetic patients. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 31: 533-540.
- Simintzi, I., Schulpis, K.H., Angelogianni, P., Liapi, C. and Tsakiris, S., 2007. The effect of aspartame metabolites on the suckling rat frontal cortex acetylcholinesterase. An *in vitro* study. *Food and Chemical Toxicology* 45: 2397-2401. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.016>
- Singh, S.D. and Chuturgoon, A.A., 2017. A comparative analysis of mycotoxin contamination of supermarket and premium brand pelleted dog food in Durban, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 88: e1-e6. DOI: <https://doi.org/10.4102/jsava.v88i0.1488>
- Souto, N.S., Claudia Monteiro Braga, A., Lutchemeyer de Freitas, M., Rechia Figuera, M., Royes, L.F.F., Schneider Oliveira, M. and Furian, A.F., 2018. Aflatoxin B₁ reduces non-enzymatic antioxidant defenses and increases protein kinase C activation in the cerebral cortex of young rats. *Nutritional Neuroscience* 21: 268-275. DOI: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1278837>
- Steckert, A.V., Dominguni, D., Michels, M., Abelaira, H.M., Tomaz, D.B., Sonai, B., De Moura, A.B., Matos, D., Da Silva, J.B.L., Reus, G.Z., Barichello, T., Quevedo, J. and Dal-Pizzol, F., 2017. The impact of chronic mild stress on long-term depressive behavior in rats which have survived sepsis. *Journal of Psychiatric Research* 94: 47-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.06.006>
- Stoev, S.D., 2015. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39: 794-809. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.01.022>
- Supriya, C. and Reddy, P.S., 2015. Prenatal exposure to aflatoxin B₁: developmental, behavioral, and reproductive alterations in male rats. *Naturwissenschaften* 102: 26. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00114-015-1274-7>
- Towner, R.A., Qian, S.Y., Kadiiska, M.B. and Mason, R.P., 2003. *In vivo* identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radical Biology and Medicine* 35: 1330-1340.
- Trebak, F., Alaoui, A., Alexandre, D., El Ouezanni, S., Anouar, Y., Chartrel, N. and Magoul, R., 2015. Impact of aflatoxin B₁ on hypothalamic neuropeptides regulating feeding behavior. *Neurotoxicology* 49: 165-173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.06.008>
- Tsai-Teng, T., Chin-Chu, C., Li-Ya, L., Wan-Ping, C., Chung-Kuang, L., Chien-Chang, S., Chi-Ying, H.F., Chien-Chih, C. and Shiao, Y.J., 2016. Erinacine A-enriched *Hericium erinaceus* mycelium ameliorates Alzheimer's disease-related pathologies in APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice. *Journal of Biomedical Science* 23: 49. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0266-z>
- Van den Eeden, S.K., Koepsell, T.D., Longstreth Jr, W.T., Van Belle, G., Daling, J.R. and McKnight, B., 1994. Aspartame ingestion and headaches: a randomized crossover trial. *Neurology* 44: 1787-1793.
- Vipin, A.V., Raksha Rao, K., Kurrey, N.K., Anu Apaiah, K.A. and Venkateswaran, G., 2017. Protective effects of phenolics rich extract of ginger against aflatoxin B₁-induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 91: 415-424. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.107>
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M. and Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 1106-1122. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>

4.2 MANUSCRITO

Aflatoxin B1 and aspartame exposure promote pro-oxidant and behavioral effects after 14 days in rats

SOUTO, N.S.^a; DASSI, M.^a; BRAGA, A.C.M.^b; ROSA, E.V.F.^b; MELLO, K.F.^b; FIGHERA, M.R.^b; ROYES, L.F.F.^b; OLIVEIRA, M.S.^b; FURIAN, A.F.^{a,b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

*Corresponding author: Profa. Dra. Ana Flávia Furian

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos,
Universidade Federal de Santa Maria
Prédio 43, Sala 4217
97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.
PHONE: +55 55 3220 8254
E-mail: ana.furian@ufsm.com

Manuscript will be submitted to World Mycotoxin Journal

Abstract

Aspartame (ASP) is one of the most popular artificial sweeteners in the world but its use may cause some adverse health effects, including obesity, metabolic syndrome and modification in the intestinal microbiota. In addition, food products are susceptible to mycotoxin contamination, aflatoxin B1 (AFB1) is the most recurrent and toxic. Exposition to AFB1 results in distinct symptoms, including generalized systemic toxicity and behavioral changes. Interestingly, mechanisms underlying ASP and AFB1 toxicity involve oxidative stress, that may influence behavioral changes. Therefore, we evaluated the effect of exposure to AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) for 14 days in rats. Animals were subjected to behavioral analysis, and after testing, biochemical parameters were measured in the cerebral cortex, hippocampus, liver and kidneys. In the open field test, AFB1 and/or ASP affects the motor, exploratory and grooming behavior. AFB1 and AFB1+ASP groups increased the number of buried balls. In splash test, reduced time to grooming face and body in all treated groups compared to the control were observed. In the liver, AFB1 and/or ASP increased TBARS levels, GST and CAT activities, and decreased ascorbic acid, NPSH and FRAP levels when compared to control. In the kidneys, AFB1+ASP increased GST and CAT activities, accompanied by increased TBARS and decreased NPSH content. In hippocampus and cerebral cortex there was an increase in TBARS content, accompanied by a decreased ascorbic acid, NPSH and FRAP in all groups compared to control. Mitochondrial SOD-2 immunoreactivity decreased after AFB1 or ASP exposition in hippocampus. These findings provide new insights into the interactions between ASP and AFB1 as promoters of renal, hepatic, as well as neurochemical parameters accompanied by behavioral changes.

Key-words: mycotoxin; sweetener; oxidative stress; liver; kidneys; neurochemical.

1 Introduction

Aspartame (ASP) is one of the most used artificial sweeteners in the world, have a high sweetness potential, which is 200 to 300 times greater than that of sucrose, with no metallic residue or bitter taste. It is cheaper than sugar and is an attractive alternative for manufacturers (Figlewicz *et al.*, 2009; Marinovich *et al.*, 2013).

ASP is incorporated into more than six thousand products, including soft drinks, frozen dessert, yogurt, chewable multivitamins, and breakfast cereals. It is also used in about 600 pharmaceutical products and is, therefore, consumed by millions of people worldwide (Butchko and Stargel, 2001; Lee and Ryu, 2017; Magnuson *et al.*, 2007; Marinovich *et al.*, 2013; Rencuzogullari *et al.*, 2004; Rushing and Selim, 2019). The acceptable daily intake levels of ASP established by U.S. Food and Drug Administration and European Food Safety Authority is 40 mg/kg/day (JECFA, 1980). Approximately 50% of the aspartame molecule is metabolized in phenylalanine, 40% is aspartic acid and 10% is methanol. Since its approval in 1965, studies have been demonstrating several toxic manifestations in different tissues and organs including liver, kidney and brain (Abhilash *et al.*, 2011; Ashok *et al.*, 2017; Ashok and Sheeladevi, 2015; Simintzi *et al.*, 2007). In this context, methanol is the most toxic aspartame metabolite and causes widespread systemic toxicity (Humphries *et al.*, 2008). Use of sweeteners allow a marked reduction in sugar consumption and thus a significant decrease in caloric intake, while maintaining the desirable palatability of foods and beverages (Abhilash *et al.*, 2014). Many people today are pursuing a healthier lifestyle, including low sugar and whole foods.

Whole foods are rich in fiber, protein, carbohydrates, minerals and vitamins these nutrients can serve as substrates for microorganism proliferation, especially fungi (Orina *et al.*, 2017; Peters *et al.*, 2017; Sadhasivam *et al.*, 2017). Some species of fungi produce toxic substances known as mycotoxins. Importantly, mycotoxins contaminate around 75% of all cereals produced in the world (Lee and Ryu, 2017; Schatzmayr and Streit, 2013). In fact, food and beverages contaminated with aflatoxins cause global health problems (Mitchell *et al.*, 2016). AFB1 is the most toxic and prevalent, and AFB1 classified as a group 1 of carcinogenicity by International Agency Cancer Research (IARC) (Ostry *et al.*, 2017; Singh and Chaturgoon, 2017; Stoev, 2015).

AFB1 has been shown to affect several organs and tissues; however, the liver is its target organ, since it has been shown to cause hepatocellular carcinoma (HCC) after chronic exposure, negatively affecting up to five billion people (Liu and Wu, 2010; Rushing and Selim, 2019; Williams *et al.*, 2004; Wogan *et al.*, 2012). It is also mutagenic, teratogenic, immunotoxic (Bondy and Pestka, 2000; Rushing and Selim, 2019), impairs growth in children (Hoffmann *et al.*, 2018; Khlangwiset *et al.*, 2011) and affects reproductive health (Eze *et al.*, 2018). Of note, AFB1 is stable and can resist thermal processes such as roasting and cooking, being present in roasted nuts and cooked products, as well as other foods such as spices, fruits, cereals and their derivatives (Marin *et al.*, 2013).

Interestingly, mycotoxin-contaminated foods and feedstocks may be consumed in the same meal with products containing aspartame (ASP), such as in a breakfast cereals (AFB1) with yogurt (ASP); bread (AFB1) with jam/jellie (ASP) and coffee with ASP, bakery products (AFB1) and soft drinks (ASP) (Lee and Ryu, 2017; Magnuson *et al.*, 2007; Marinovich *et al.*, 2013; Rushing and Selim, 2019). Mechanisms underlying ASP and AFB1 toxicity involve oxidative stress, that may influence behavioral changes Therefore, in the present study we tested the hypothesis that concomitant administration of ASP and AFB1 may predispose to toxic effects after 14 days of exposition, and we investigated biochemical and behavioral parameters in male wistar rats.

2 Materials and methods

2.1 Animals and Reagents

Male Wistar rats (50–60g), with 21 days of age were used. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with controlled access of water (100 mL) and food (40 g) daily. Experimental protocols were performed with the objective of keeping the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (Process n° 3403220317). Aflatoxin B1 (Cas No. 1162-65-8, $\geq 95\%$ purity) and Aspartame (Cas No. 22839-47-0; $\geq 95\%$ purity) were obtained from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). A stock solution of AFB1 was prepared dissolving it in 2% DMSO. ASP was prepared daily, dissolving it in NaCl 0.9%.

2.2 Experimental Design

Rats were divided randomly into four groups, with 8 rats in each group. The experimental protocol was repeated four times to ensure the reproducibility of the results. Each animal received a dose of treatment by intragastric gavage, for 14 days.

Group I (the control group): DMSO (2%; i.g.) + NaCl (0.9 %, i.g.)

Group II: AFB1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$; i.g.) + NaCl (0.9%, i.g.)

Group III: ASP (75 mg/kg; i.g.) + DMSO (2%; i.g.)

Group IV: AFB1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$; i.g.) + ASP (75 mg/kg i.g.)

Dose and schedule for AFB1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) administration followed previous studies of Souto et al (2018, 2019) and Quian et al. (2013), whereas ASP dose (75 mg/kg) was based on Souto et al (2019) and Ashok et al., (2014).

During the treatment, water, feed intake and weight were monitored once daily. On the fourteen day, after behavioral tests, animals were sacrificed by decapitation and the liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus were removed, weighed and homogenized in 30 mM Tris-HCl (pH 7.4), centrifuged for 10 min. at 3000 g to obtain the supernatant for the biochemical analysis.

2.3 Organ Weights and Relative Organ Weight Ratios

The organs adrenal gland, spleen, brain, heart, liver, lung, kidney and testicles were dissected, removed and weighed. According to wet weight (absolute weight) and body weight at necropsy, organ weight and organ body weight (relative weight) were calculated.

2.4 Behavioral tests

2.4.1 Open-field test

The open field task is a simple assessment used to determine overall activity levels, gross locomotor activity and rodent exploration habits. On the thirteenth day after treatment

with AFB1 and/or ASP, the rats were evaluated for 10 minutes and the records were made according to Souto et al. 2019.

2.4.2 Marble Burying test

The buried marbles test is used to evaluate the anxiety of animals. In response to a new or aversive stimulus, when animals are placed in the box with glass beads (balls), the animals will seek to leave this environment, burying the offending object as a defense mechanism. Increased burial of the beads is interpreted as neophobic, a marker of fear/anxiety in rodents (Burke *et al.*, 2016). The test was performed based on the method described by Deacon, 2006 with some modifications by Souto 2019.

2.4.3 Nesting test

The construction of the nest can be used as a parameter to evaluate the anxiety of the animal, since the anxious animal would seek the construction of the nest as a form of protection (Tsai-Teng *et al.*, 2016). The nest quality was assessed on a 1-5 rating scale, with 1 – nest let was not noticeable touched; 2 – nest let was partially shredded and scattered on the floor; 3 – nest let was mostly shredded but only flat nest was build; 4 – nest was identifiable but flat; and 5 – nest was built in a burrow (Deacon, 2012).

2.4.4 Splash test

The splash test is a valid behavioral marker of anhedonia induced in models of depression (Steckert *et al.*, 2017). The test was performed based on the method described by Souto et al., 2019.

2.5 Biochemical analysis

2.5.1 Non-protein thiol (NPSH) determination

NPSH levels of the cerebral cortex, hippocampus, liver and kidney samples were determined according to the methodology described by Ellman (1959) with some modifications. Samples were precipitated with TCA (10%), centrifuged at 3000 g for ten minutes at 4°C. After the centrifugation, the supernatant fraction (60 µl) was added to a reaction medium containing potassium phosphate buffer (1 M, pH 7.4) and DTNB (10 mM). The samples were read in a spectrophotometer at the wavelength of 412 nm. The results were calculated in relation to a standard curve constructed with cysteine and corrected for the protein content. The results were calculated as nmol NPSH/mg protein.

2.5.2 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) determination

TBARS was performed according to methodology described by Ohkawa et al. (1979) with some modifications. The cerebral cortex, hippocampus, liver and kidney samples were centrifuged at 3000 g for ten minutes at 4 °C and the supernatant (80 µL) was incubated with 460 µl of a mix containing thiobarbituric acid 0.8%, acetic acid buffer (2.5 M, pH 3.4), SDS 8.1% and water for 2h at 95°C. After cooling to room temperature, the absorbance in the supernatant was measured at 532 nm. The results were calculated as nmol MDA/mg protein.

2.5.3 Ascorbic acid determination

The determination of ascorbic acid content (vitamin C) was according to the methodology described by Jacques-Silva et al. (2001). The cerebral cortex, hippocampus, liver and kidney samples where the homogenized tissues were precipitated with TCA 5% (1:2), centrifuged at 3000 g for 10 minutes at 4°C and the supernatant (300 µL) incubated at 37°C for 3 h with TCA 13.3% and a color reagent containing dinitrophenylhydrazine (DNPH), thiourea and CuSO₄. The reaction was quenched by addition of 65% H₂SO₄ (v/v). The reaction product was determined spectrophotometrically at 520 nm and the results calculated as nmol of ascorbic acid/mg of protein.

2.5.4 Antioxidant power of iron reduction (FRAP) determination

The FRAP assay followed the method described by Benzie and Strain (1996), performed on cerebral cortex, hippocampus, liver and kidney. Samples (25 µL) were incubated for 60 min at 37 °C in 275 µL of FRAP working solution (25 volumes of 300 mM acetate buffer – pH 3.6, 2.5 volumes of 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine and 2.5 volumes of 20 mM FeCl₃·3H₂O). We measured the reaction product on a spectrophotometer on 630 nm and the results presented in nmol Fe²⁺/mg protein.

2.5.5 Na⁺, K⁺ATPase activity measurements

The cerebral cortex was homogenized in ice cold 30 mM imidazole buffer (pH 7.4) and determination of Na⁺, K⁺-ATPase activity was performed as described by Funck et al., 2014 and Souto 2019. Specific Na⁺, K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain).

2.5.6 Catalase (CAT) activity

CAT activity was determined following the decomposition of 30 mM hydrogen peroxide in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) maintained at a temperature of 37°C. The reading was performed at a wavelength of 240 nm for 75s, according to the method proposed by Aebi (1984), in the liver and kidneys. CAT specific activity was expressed as first-order rate constant k, per mg of protein. Appropriate controls for non-enzymatic decomposition of hydrogen peroxide were included in the assays.

2.5.7 Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method of Habig et al., (1974). The reaction mixture contained an aliquot of supernatant of liver or kidney, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM GSH and 100 mM CDNB, which was used as substrate. We expressed enzymatic activity as nmol CDNB/mg of protein/min.

2.5.8 Protein determination

Total protein measurement was performed according to Bradford (1976).

2.5.9 Western blot analysis

Western blot analysis was carried out, as described previously Casu et al. (2007) with minor modifications. The cerebral cortex and hippocampus was removed, dissected homogenized on ice in tissue protein extraction reagent T-PER (Thermo Scientific) supplemented with HaltTM protease and phosphatase inhibitors Cocktail (100x) (Thermo Scientific). Homogenized samples were then centrifuged at 10,000g at 4 °C for 5 min and supernatant kept for further manipulation.

An aliquot (20 µg protein) of the supernatant was diluted in Laemmli buffer and distilled water, and subjected to a temperature of 90 °C for 5 min. The protein was then subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF). After blocking the membrane with 2.5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in Tris (TBS) for 1 h, then exposed to primary antibody for 12 h at a temperature of 4 °C. At the end of this period the membranes are washed three times in Tris containing 0.01% (v/v) Tween 20 (TBS-T) and incubated again with a secondary antibody for 3 h. We used antibodies to GST-M, NOS-2 and SOD-2, the membranes were visualized by chemiluminescence ECL (Thermo Scientific) and quantified with Image Lab 6.0 software (Bio Rad) and ImageJ software (RIID: nif-0000-30467).

2.6 Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out by two-way ANOVA and post hoc analyses were carried out by the Newman-Keuls, using a Graphpad prism 6.0 software. A probability of $P < 0.05$ was considered significant, and all data are reported as mean and S.E.M.

3 Results

3.1 Body Weight, Food and Water Consumption and Relative Organs Weight

Body weight gain (Figure 1), water and food consumption were not statistically significant along the fourteen days of treatment between groups (Figure 2 A and B).

In addition, AFB1 and/or ASP have no effect regarding absolute (Table 1) or relative weight of adrenal gland, spleen, brain, heart, liver, lung, kidney or testes (Table 2).

Figure 1: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on body weight in all groups along the fourteen days of treatment. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

Figure 2: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on water (A) and food consumption (B) along the fourteen days of treatment. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

Table 1: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on the organ absolute weight of animals. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

Table 2: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on organ-to-body weight ratio and organ-to-brain weight ratio. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

3.2 Behavioral tests

In the open field test, we observed that AFB1 and/or ASP affects the motor and exploratory behavior of rats. Statistical analysis showed that treatment with AFB1 alone and associated with ASP increased the number of crossings when compared to the control group (Figure 3A). ASP and AFB1+ASP treated group decreased the number of rearing when compared to control and AFB1 group (Figure 3B). The latency to explore and time spent in

the center of the open field is higher in all treated groups compared to control group (Figure 3C, 3D). Grooming behavior is higher in the AFB1-treated group when compared to control, however ASP and AFB1+ASP decreased grooming behavior compared to control and AFB1 (Figure 3E). The number of feces did not differ (Figure 3F).

Figure 3: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on open-field parameters: Crossing (A), Rearing (B), Latency to exploration (C), Time spent in center (D), Grooming behavior (E), Feces number (F). Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

- * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/NaCl group.
- + Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1/NaCl group.
- £ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/ASP group.

In addition to open field, some anxiety parameters were evaluated in marble burying and nesting test (Figure 4). AFB1 and AFB1+ASP groups increased the number of buried balls when compared to the control group (Figure 4A). The nesting test showed no score differences between groups (Figure 4B).

Figure 4: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg / kg, i.g.) on marble burying test (A) and nesting test (B). Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

- * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/NaCl group.

Concerning results of splash test, we show no difference in the immobility time (latency to clean) (Figure 5A). However, we observe a reduced time to grooming face and body in all treated groups compared to the control (Figure 5 B) and (Figure 5C).

Figure 5: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on splash test parameters: immobility time (A), grooming face (B) and grooming body (C). Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

- * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/NaCl group.
- + Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1/NaCl group.
- £ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/ASP group.

3.3 Biochemical analyses

We determine oxidative stress parameters in cerebral cortex, hippocampus, liver and kidneys of rats after 14 days of exposition to ASP and/or AFB1. Figure 6 shows that AFB1 and AFB1+ASP increased TBARS content in liver, cerebral cortex and hippocampus. In kidney, only the combined treatment increase TBARS content. ASP decreased TBARS content in cerebral cortex and hippocampus and increased it in liver (Fig 6 A-D). In addition, ascorbic acid content was reduced in cerebral cortex, hippocampus and liver after AFB1, ASP and AFB1+ASP treatments. In kidneys no statistical difference was observed, (Fig 6 E-H).

Moreover, the NPSH content of cerebral cortex, hippocampus, liver and kidneys was also evaluated to investigate the non enzymatic antioxidant defenses. AFB1, ASP and its association reduced NPSH content in cerebral cortex and liver. Also, NPSH content was decreased in liver, hippocampus and kidney in AFB1+ASP group (Fig 7A-D).

Furthermore, AFB1 and ASP decreased FRAP content in cerebral cortex, hippocampus and liver when compared to control group. The combination of AFB1+ASP decrease FRAP levels compared to all other groups. Renal FRAP levels are reduced only by AFB1 (Fig 7E-H).

Figure 6: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on TBARS content and ascorbic acid content in liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

- * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO group.
- + Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1 group.
- £ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with ASP group.

Figure 7: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on non protein thiols content (NPSH) and antioxidant power of iron reduction (FRAP) content in liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO group.

+ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1 group.

£ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with ASP group.

In addition, we investigated if AFB1 and/or ASP administration modify neuronal excitability by determination of Na^+ , K^+ -ATPase activity in the cerebral cortex. Statistical analyses revealed that the total Na^+ , K^+ -ATPase, $\alpha 1$ and $\alpha 2/\alpha 3$ activities were not altered by the treatments (Table 3).

Table 3: Effect of AFB1 (250µg/kg, i.g) and/or ASP (75mg/kg, i.g) on Na^+ , K^+ ,ATPase activity (Δ min/mg protein) in cerebral cortex. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

Interestingly, AFB1 and/or ASP modified enzymatic defenses, increasing hepatic and renal GST and CAT activities in all groups when compared to the control group (Figure 8 A-D).

Figure 8: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g) on glutathione-S-transferase activity (GST) and catalase activity in liver and kidney. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO group.

+ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1 group.

£ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with ASP group.

3.4 Western blot analysis

In order to investigate other mechanisms underlying the effects of AFB1 and/or ASP, we determine the immunoreactivity of mitochondrial SOD-2, glutathione S-transferase M(GST-M) and nitric oxide synthase 2 (NOS-2) in cerebral cortex and hippocampus. Interestingly, in the hippocampus AFB1 and ASP alone decreased mitochondrial SOD-2 immunoreactivity when compared to control. AFB1+ASP group increased SOD expression compared to AFB1 and ASP groups (Figure 9A). In the cerebral cortex, mitochondrial SOD was not modified Figure 9B. Also, GSTM and NOS-2 protein expression was evaluated after treatments, and in this protocol there were no changes in the immunoreactivity of these proteins in cerebral cortex and hippocampus (Fig 9C-9F).

Figure 9: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g) on immunoreactivity mitochondrial SOD, glutathione S-transferase mu (GSTM) and NOS-2 in hippocampus and cerebral cortex. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO group.

+ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1 group.

£ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with ASP group.

4 Discussion

The results of this study show the effects of combined treatment with AFB1 and ASP on behavioral and biochemical parameters in liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus after two weeks of exposition. We demonstrate that these compounds altered behavioral pattern in rodents as well as oxidative stress markers.

Weight gain, water and food intake were not altered by AFB1 and/or ASP. In addition, body weight gain, and body relative weight are not modified by co-exposition to AFB1 and ASP. Accordingly, a previous study of our group showed that one week exposure do not change these same signs of toxicity (Souto et al., 2019). Our results agree with the literature where weight changes are identified in treatments with higher doses of AFB1 or ASP

accompanied by longer periods and exposure (Coulombe and Sharma, 1985; Finamor *et al.*, 2014; Raisuddin *et al.*, 1990; Trebak *et al.*, 2015).

In order to investigate if ASP and AFB1 could modify the behavior of animals, since it is known that these compounds have influence on neurotransmitter synthesis (Abdel-Salam *et al.*, 2012; Coulombe and Sharma, 1985), we investigated the effect of these compounds alone or in association on open field, marble burying, nest and splash test. In the open field, animals treated with AFB1 alone and associated with ASP increased the number of crossings when compared to the control group (Figure 3A). ASP and AFB1+ASP treated group decreased the number of rearing when compared to control and AFB1 group (Figure 3B), and the latency to explore and time spent in the center of the open field is higher in all treated groups compared to control group (Figure 3C-D). The same pattern of behavior was seen in a one week treatment (Souto *et al.*, 2019), but in this study differences between treatments are more evident. Grooming behavior is higher in the AFB1-treated group when compared to control, however ASP and AFB1+ASP decreased grooming behavior compared to control and AFB1 (Figure 3E). In this context, Ashok and colleagues (2014) reported that long-term (90 day) oral administration of ASP (75 mg/kg) perturbed locomotor activity and emotional behavior of rats in open field and elevated plus maze. Furthermore, cliff avoidance, negative geotaxis, surface righting activity, ascending wire mesh, open-field behavior, exploratory and locomotor activities are modified by prenatal exposition to AFB1 (Kihara *et al.*, 2000; Supriya and Reddy, 2015).

In the marble burying test, we can evaluate repetitive and compulsive behavior in rodents. Our results show that AFB1 and AFB1+ASP increased buried balls (Figure 4A). Similarly, one week exposure to ASP and AFB1+ASP increased buried balls (Souto *et al.*, 2019). An increased number of buried balls is a marker of fear/anxiety or obsessive-compulsive disorder in rodents (Deacon, 2006), so it's suggestive that the AFB1 exposition affects anxiety of animals. Therefore, these results suggest that AFB1 and/or ASP could predispose to an increased locomotor activity, anxiety and compulsive behavior, even at short time. The nest building test is considered a specific form of active interaction with the environment for shelter and temperature control (Filali and Lalonde, 2009). In addition, building nest can serve as protection against predators by hiding or camouflaging the rats (Deacon, 2006). However, in this protocol we did not observe differences regarding nesting parameters (Figure 4B), accordingly the previous results from one week of exposure to AFB1 and or ASP (Souto *et al.*, 2019).

Thus, further evaluation of depressive-type behavior was accessed by splash test after 14 days of treatment. This test is used to measure self-care and motivational behavior (Willner, 2005). We show that AFB1, ASP and AFB1+ASP decreased the time cleaning face and body, and the co-exposition reduced more the time of grooming face (Fig 5B). Similarly, in one week exposition we show the decreased latency to grooming and reduced time to grooming face (Souto *et al.*, 2019). These results indicate an anhedonia- or depressive-like behavior, since the animals showed shorter self-grooming time when compared to control. Luo and collaborators (2008) and Wang and collaborators (2008) reported that rats exposed to chronic unpredicted mild stress showed a significant decrease in their rearing and grooming activity in a novel open field, and this indicates a “refractory loss of interest” which is one of the core symptoms of depression. In this study, we also show a decreased rearing number and grooming time, so AFB1 and or ASP could contribute to the development of depression.

It is interesting to note that a single oral dose of AFB1(250 µg/kg/i.g.) does not alter open field test, forced swim, elevated plus maze, taste preference test and novel object recognition performance after 48 hours (Souto *et al.*, 2018), showing that the time of exposition to these mycotoxin, and the association with ASP is very relevant to trigger behavioral changes.

Beyond behavioral changes, we also investigate oxidative stress markers after 14 days of exposition to AFB1 and ASP. Oxidative stress is characterized by increased level of pro-oxidants such as reactive oxygen species and reactive nitrogen species or decreased level of antioxidants that could lead to cell dysfunction and degradation (Gutteridge and Halliwell, 1992). Toxicity of ASP and AFB1 include overproduction of reactive oxygen species such as superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide, disturbing antioxidant defenses and eventually promoting oxidative stress (Towner *et al.*, 2003). In the present study, we found that 14 days of exposure to AFB1 and/or ASP induced oxidative stress in the cerebral cortex, hippocampus, liver and kidneys of male Wistar rats.

It has been reported that oxidative stress is the main mechanism underlying AFB1 and ASP toxicity. In this protocol, AFB1 and AFB1+ASP increased TBARS content in liver, cerebral cortex and hippocampus. In kidney, only the combined treatment increase TBARS content. ASP decreased TBARS content in cerebral cortex and hippocampus and increased it in liver (Fig 6 A-D), demonstrating the involvement of oxidative stress. Agreeing to the data showing lipoperoxidation we show a reduction in antioxidant defenses after AFB1 or ASP treatment. Ascorbic acid content was reduced in cerebral cortex, hippocampus and liver after AFB1, ASP and AFB1+ASP treatments (Fig 6 E-H). Moreover, the NPSH content of cerebral cortex, hippocampus, liver and kidneys was also evaluated to investigate the non-enzymatic antioxidant defenses. AFB1, ASP and its association reduced NPSH content in cerebral cortex and liver. Also, NPSH content was decreased in liver, hippocampus and kidney in AFB1+ASP group (Fig 7 A-D). On the other hand, in a previous study with 7 days of exposition, we did not observed differences in NPSH and ascorbic acid content in cerebral cortex and hippocampus (Souto *et al.*, 2019).

Furthermore, AFB1 and ASP decreased FRAP content in cerebral cortex, hippocampus and liver when compared to control group, and the association of AFB1+ASP decrease FRAP levels compared to all other groups. Renal kidney FRAP levels are reduced only by AFB1 (Fig 7 E-H). So, it is another significantly alteration compared to a previous 7 days of exposition protocol, where no alteration on FRAP levels were observed in all organs and treatments (Souto *et al.*, 2019).

Recent studies emphasize the harmful effects by AFB1 and ASP on oxidative stress parameters. Rotimi and colleagues (2018) show that the association of AFB1 (40 ppb) with a low protein diet (5% protein) for 8 weeks decrease weight gain, enhances kidney damage, decrease antioxidant enzymes and increase the oxidative status in tissues. Yılmaz and collaborators (2017) showed that a single dose of AFB1 (2.5 mg/kg, i.p.) increased MDA levels and a reduces GSH, glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH- Px), superoxide dismutase (SOD) and the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in liver and kidneys. Iyaswamy and contributors (2018) studied the effect of long-term administration (90 days) of aspartame (40 mg/kg) in male wistar rats, and observed an interference in body weight and corticosterone levels, promoted a marked increase in protein expression of nitric oxide synthase (nNOS, iNOS) in brain tissues, accompanied by changes in behavioral parameters. Hamza and collaborators (2019) after 30 days of treatment, found that ASP at doses of 75 mg/kg and 150 mg/kg (p.o.) promotes increased activity of some hepatic enzymes, disturbance in the levels of the lipid profile, decreased hepatic levels of reduced glutathione (GSH), in a dose-dependent manner.

In this context, AFB1 and/or ASP modified enzymatic defenses, increasing hepatic and renal GST and CAT activities in all groups when compared to the control group (Fig 8 A-D).

In a recent study of our group, we found that same doses of AFB1 and ASP, after 7 days of exposure promoted an increase in GST activity in the liver and kidneys of male Wistar rats (Souto *et al.*, 2019). Alm-Eldeen *et al.* (2015) showed that AFB1 (750 µg/kg i.g.)

decreased antioxidant enzyme activities (SOD, CAT and GSH-Px), increased lipid peroxidation and hydrogen peroxide in male rats. El-Nekeety et al. (2011) found increased lipid peroxidation in the liver and kidneys and severe histological changes in the liver after 2 weeks of treatment with AFB1 (2.5 mg/kg/i.g.). Naaz et al. (2014) shows increased lipoperoxidation (LPO) level and a decreased GSH levels and GPX, GST, GR, SOD, CAT activity after 90 days of treatment with AFB1 (66.60 µg/kg i.g.).

Considering the results showed in this study, the previous study of our group (Souto et al., 2019), and the literature with AFB1 and ASP, we demonstrate a dose-dependent and time-dependent toxicity (Abdel-Salam *et al.*, 2012; Adaramoye and Akanni, 2016; Ashok and Sheeladevi, 2015). Our results show that after 14 days of treatment it is possible to verify changes in the contents of TBARS, ascorbic acid, NPSH and FRAP in liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus of treated animals (Figure 6 and Figure 7). We emphasize the importance of dose/time enhancement in light of these findings, considering that the dose of 75 mg/kg/day used of ASP here translates into an estimated human dose of 12.15 mg/kg (Reagan-Shaw *et al.*, 2008), which represents about one third of the maximum permitted levels (40 mg/kg) (JECFA, 1980). In view of AFB1 dosing, the acceptable tolerable daily intake of 20 µg/kg for total aflatoxins was recommended by WHO. Translating this dose (250 µg/kg) we found a human estimated dose of 0.040 mg/kg (40 µg/kg) (Reagan-Shaw et al., 2008). So, this dose would represent occasional intoxication by high amounts of aflatoxins, since it has been found higher doses of AFB1, from 6.7 mg kg in peanut products to 36.9 mg/kg in Brazil nuts (Andrade *et al.*, 2013).

Contemplating the discussion of doses and protocols, in another study of our group we show that after 48 hours of a single acute oral administration of AFB1 (250 µg/kg/i.g.) decrease NPSH and ascorbic acid levels and increased the expression of the p-PKCα Ser957/PKCα subunit ratio in the cerebral cortex (Souto et al., 2018). With the increase in exposure time to AFB1 and the association with ASP, we have been able to identify behavioral and biochemical changes not yet recorded (Souto et al., 2019). Through these findings we seek to further strengthen the mechanisms that may be involved in the induction of damage, and we quantify immunoreactivity off some proteins associated with the oxidative stress (Figure 9 A-F). The immunoreactivity of mitochondrial SOD-2 in hippocampus was decreased by the AFB1 and ASP (Fig 9A), an important enzyme in dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide. In addition, altered expression or activity of mitochondrial SOD has been linked to many disorders (Holley *et al.*, 2010), suggesting an important role for mitochondrial SOD in disease development. Regarding the mechanism for decreased mitochondrial SOD activity, it has been demonstrated that this enzyme is a target for peroxynitrite-mediated nitration, which ultimately decreases its activity (MacMillan-Crow *et al.*, 1998; Yamakura *et al.*, 1998). In fact, mitochondrial SOD appears to be hypersensitive toward nitration, accounting for as much as 20% of total protein nitration under conditions of oxidative stress (Guo *et al.*, 2003). So, in this study we determinate one indicator of nitration, the nitric oxide synthase-2 (NOS-2) immunoreactivity, that was not altered by treatments (Fig 9C). Further studies may include more indicators of nitrosative stress.

In conclusion, AFB1 and/or ASP exposure for 14 days induced alterations in biochemical and behavioral parameters in different organs. Considering the previous study with 7 days of exposition marked differences could be observed, and confirms the relevance of time of exposition to observe toxic effects of these compounds that could occur in a meal of many people every day.

5 Acknowledgements

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS grant#16/2551-0000365-3). M.D., L.F.F.R, M.R.F., M.S.O., and A.F.F. (grant #304824/2016-0) are the recipients of CNPq fellowships; A.C.M.B., F.M.K. and N.S.S. are the recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

6 References

- Abdel-Salam, O.M., Salem, N.A., El-Shamarka, M.E., Hussein, J.S., Ahmed, N.A. and El-Nagar, M.E., 2012. Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16: 2092-2101.
- Abhilash, M., Alex, M., Mathews, V.V. and Nair, R.H., 2014. Chronic Effect of Aspartame on Ionic Homeostasis and Monoamine Neurotransmitters in the Rat Brain. *Int J Toxicol* 33: 332-341. 1091581814537087 [pii] 10.1177/1091581814537087
- Abhilash, M., Paul, M.V., Varghese, M.V. and Nair, R.H., 2011. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. *Food Chem Toxicol* 49: 1203-1207. 10.1016/j.fct.2011.02.019 S0278-6915(11)00063-9 [pii]
- Adaramoye, O.A. and Akanni, O.O., 2016. Effects of long-term administration of aspartame on biochemical indices, lipid profile and redox status of cellular system of male rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 27: 29-37. 10.1515/jbcpp-2014-0130 /j/jbcpp.2016.27.issue-1/jbcpp-2014-0130/jbcpp-2014-0130.xml [pii] /j/jbcpp.ahead-of-print/jbcpp-2014-0130/jbcpp-2014-0130.xml [pii]
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126. 10.1016/s0076-6879(84)05016-3
- Alm-Eldeen, A.A., Mona, M.H., Shati, A.A. and El-Mekaway, H.I., 2015. Synergistic effect of black tea and curcumin in improving the hepatotoxicity induced by aflatoxin B1 in rats. *Toxicol Ind Health* 31: 1269-1280. 10.1177/0748233713491807 0748233713491807 [pii]
- Andrade, P.D., de Mello, M.H., Franca, J.A. and Caldas, E.D., 2013. Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminary dietary risk assessment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 30: 127-136. 10.1080/19440049.2012.720037
- Ashok, I., Poornima, P.S., Wankhar, D., Ravindran, R. and Sheeladevi, R., 2017. Oxidative stress evoked damages on rat sperm and attenuated antioxidant status on consumption of aspartame. *Int J Impot Res* 29: 164-170. 10.1038/ijir.2017.17 ijir201717 [pii]
- Ashok, I. and Sheeladevi, R., 2015. Oxidant stress evoked damage in rat hepatocyte leading to triggered nitric oxide synthase (NOS) levels on long term consumption of aspartame. *J Food Drug Anal* 23: 679-691. S1021-9498(14)00158-6 [pii] 10.1016/j.jfda.2014.07.011
- Ashok, I., Sheeladevi, R. and Wankhar, D., 2014. Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behavior in Wistar Albino rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4: 3943.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76. S0003-2697(96)90292-4 [pii] 10.1006/abio.1996.0292
- Bondy, G.S. and Pestka, J.J., 2000. Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 3: 109-143. 10.1080/109374000281113
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254. 0003-2697(76)90527-3 [pii] 10.1006/abio.1976.9999
- Burke, N.N., Coppinger, J., Deaver, D.R., Roche, M., Finn, D.P. and Kelly, J., 2016. Sex differences and similarities in depressive- and anxiety-like behaviour in the Wistar-Kyoto rat. *Physiol Behav* 167: 28-34. S0031-9384(16)30432-2 [pii] 10.1016/j.physbeh.2016.08.031
- Butchko, H.H. and Stargel, W.W., 2001. Aspartame: scientific evaluation in the postmarketing period. *Regul Toxicol Pharmacol* 34: 221-233. 10.1006/rtph.2001.1500 S0273-2300(01)91500-4 [pii]
- Casu, M.A., Sanna, A., Spada, G.P., Falzoi, M., Mongeau, R. and Pani, L., 2007. Effects of acute and chronic valproate treatments on p-CREB levels in the rat amygdala and nucleus accumbens. *Brain Res* 1141: 15-24. S0006-8993(07)00011-X [pii] 10.1016/j.brainres.2007.01.004
- Coulombe, R.A., Jr. and Sharma, R.P., 1985. Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B1 in the rat. *Food Chem Toxicol* 23: 827-830. 0278-6915(85)90283-2 [pii] 10.1016/0278-6915(85)90283-2

- Deacon, R., 2012. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp*: e2607. 10.3791/2607 2607 [pii]
- Deacon, R.M., 2006. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nat Protoc* 1: 122-124. nprot.2006.20 [pii] 10.1038/nprot.2006.20
- El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E. and Abdel-Wahhab, M.A., 2011. Antioxidant properties of Thymus vulgaris oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicol* 57: 984-991. 10.1016/j.toxicol.2011.03.021
- S0041-0101(11)00123-1 [pii]
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77. 0003-9861(59)90090-6 [pii] 10.1016/0003-9861(59)90090-6
- Eze, U.A., Huntriss, J., Routledge, M.N. and Gong, Y.Y., 2018. Toxicological effects of regulated mycotoxins and persistent organochloride pesticides: In vitro cytotoxic assessment of single and defined mixtures on MA-10 murine Leydig cell line. *Toxicol In Vitro* 48: 93-103. S0887-2333(17)30385-5 [pii] 10.1016/j.tiv.2017.12.019
- Figlewicz, D.P., Ioannou, G., Bennett Jay, J., Kittleson, S., Savard, C. and Roth, C.L., 2009. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiol Behav* 98: 618-624. 10.1016/j.physbeh.2009.09.016
- S0031-9384(09)00315-1 [pii]
- Filali, M. and Lalonde, R., 2009. Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APP^{swe}/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1292: 93-99. 10.1016/j.brainres.2009.07.066
- S0006-8993(09)01530-3 [pii]
- Finamor, I.A., Ourique, G.M., Pes, T.S., Saccol, E.M., Bressan, C.A., Scheid, T., Baldissarotto, B., Llesuy, S.F., Partata, W.A. and Pavanato, M.A., 2014. The protective effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in the brain caused by the long-term intake of aspartame by rats. *Neurochem Res* 39: 1681-1690. 10.1007/s11064-014-1360-9
- Funck, V.R., Ribeiro, L.R., Pereira, L.M., de Oliveira, C.V., Grigoletto, J., Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F. and Oliveira, M.S., 2014. Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. *Epilepsy Res* 108: 1705-1710. 10.1016/j.eplepsyres.2014.09.025
- S0920-1211(14)00258-7 [pii]
- Guo, W., Adachi, T., Matsui, R., Xu, S., Jiang, B., Zou, M.H., Kirber, M., Lieberthal, W. and Cohen, R.A., 2003. Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1396-1403. 10.1152/ajpheart.00096.2003 00096.2003 [pii]
- Gutteridge, J.M. and Halliwell, B., 1992. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med* 12: 93-95. 0891-5849(92)90062-L [pii] 10.1016/0891-5849(92)90062-L
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
- Hamza, R.Z., Al-Eisa, R.A., Mehana, A.E. and El-Shenawy, N.S., 2019. Effect of l-carnitine on aspartame-induced oxidative stress, histopathological changes, and genotoxicity in liver of male rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 30: 219-232. 10.1515/jbcpp-2018-0064
- /j/jbcpp.2019.30.issue-2/jbcpp-2018-0064/jbcpp-2018-0064.xml [pii]
- /j/jbcpp.ahead-of-print/jbcpp-2018-0064/jbcpp-2018-0064.xml [pii]
- Hoffmann, V., Jones, K. and Leroy, J.L., 2018. The impact of reducing dietary aflatoxin exposure on child linear growth: a cluster randomised controlled trial in Kenya. *BMJ Glob Health* 3: e000983. 10.1136/bmjgh-2018-000983
- bmjgh-2018-000983 [pii]
- Holley, A.K., Dhar, S.K. and St Clair, D.K., 2010. Manganese superoxide dismutase vs. p53: regulation of mitochondrial ROS. *Mitochondrion* 10: 649-661. 10.1016/j.mito.2010.06.003
- S1567-7249(10)00106-6 [pii]
- Humphries, P., Pretorius, E. and Naude, H., 2008. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European Journal of Clinical Nutrition* 62: 451-462. 1602866 [pii] 10.1038/sj.ejcn.1602866
- Iyaswamy, A., Kammella, A.K., Thavasimuthu, C., Wankupar, W., Dapkupar, W., Shanmugam, S., Rajan, R. and Rathinasamy, S., 2018. Oxidative stress evoked damages leading to attenuated memory and inhibition of NMDAR-CaMKII-ERK/CREB signalling on consumption of aspartame in rat model. *J Food Drug Anal* 26: 903-916. S1021-9498(17)30200-4 [pii] 10.1016/j.jfda.2017.11.001
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M. and Rocha, J.B., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 88: 119-125. 10.1034/j.1600-0773.2001.d01-92.x
- Khlangwiset, P., Shephard, G.S. and Wu, F., 2011. Aflatoxins and growth impairment: a review. *Crit Rev Toxicol* 41: 740-755. 10.3109/10408444.2011.575766
- Kihara, T., Matsuo, T., Sakamoto, M., Yasuda, Y., Yamamoto, Y. and Tanimura, T., 2000. Effects of prenatal aflatoxin B1 exposure on behaviors of rat offspring. *Toxicol Sci* 53: 392-399. 10.1093/toxsci/53.2.392
- Lee, H.J. and Ryu, D., 2017. Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. *J Agric Food Chem* 65: 7034-7051. 10.1021/acs.jafc.6b04847
- Liu, Y. and Wu, F., 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect* 118: 818-824. 10.1289/ehp.0901388

- Luo, D.D., An, S.C. and Zhang, X., 2008. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. *Brain Res Bull* 77: 8-12. 10.1016/j.brainresbull.2008.05.010 S0361-9230(08)00222-0 [pii]
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P. and Thompson, J.A., 1998. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37: 1613-1622. 10.1021/bi971894b bi971894b [pii]
- Magnuson, B.A., Burdock, G.A., Doull, J., Kroes, R.M., Marsh, G.M., Pariza, M.W., Spencer, P.S., Waddell, W.J., Walker, R. and Williams, G.M., 2007. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Crit Rev Toxicol* 37: 629-727. 781888262 [pii] 10.1080/10408440701516184
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. and Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol* 60: 218-237. 10.1016/j.fct.2013.07.047 S0278-6915(13)00502-4 [pii]
- Marinovich, M., Galli, C.L., Bosetti, C., Gallus, S. and La Vecchia, C., 2013. Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: regulatory safety and epidemiological issues. *Food Chem Toxicol* 60: 109-115. 10.1016/j.fct.2013.07.040 S0278-6915(13)00495-X [pii]
- Mitchell, N.J., Bowers, E., Hurburgh, C. and Wu, F., 2016. Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 33: 540-550. 10.1080/19440049.2016.1138545
- Naaz, F., Abdin, M.Z. and Javed, S., 2014. Protective effect of esculin against prooxidant aflatoxin B1-induced nephrotoxicity in mice. *Mycotoxin Res* 30: 25-32. 10.1007/s12550-013-0185-8
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358. 0003-2697(79)90738-3 [pii] 10.1016/0003-2697(79)90738-3
- Orina, I., Manley, M. and Williams, P.J., 2017. Non-destructive techniques for the detection of fungal infection in cereal grains. *Food Research International* 100: 74-86. S0963-9969(17)30409-X [pii] 10.1016/j.foodres.2017.07.069
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J. and Grosse, Y., 2017. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Res* 33: 65-73. 10.1007/s12550-016-0265-7 [pii] 10.1007/s12550-016-0265-7 [pii]
- Peters, J., van Dam, R., van Doorn, R., Katerere, D., Berthiller, F., Haasnoot, W. and Nielen, M.W.F., 2017. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *PLoS One* 12: e0185887. 10.1371/journal.pone.0185887
- PONE-D-16-50399 [pii]
- Qian, G., Wang, F., Tang, L., Massey, M.E., Mitchell, N.J., Su, J., Williams, J.H., Phillips, T.D. and Wang, J.S., 2013. Integrative toxicopathological evaluation of aflatoxin B(1) exposure in F344 rats. *Toxicol Pathol* 41: 1093-1105. 10.1177/0192623313477256 0192623313477256 [pii]
- Raisuddin, Singh, K.P., Zaidi, S.I., Saxena, A.K. and Ray, P.K., 1990. Effects of aflatoxin on lymphoid cells of weanling rat. *J Appl Toxicol* 10: 245-250. 10.1002/jat.2550100404
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M. and Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22: 659-661. fj.07-9574LSF [pii] 10.1096/fj.07-9574LSF
- Rencuzogullari, E., Tuylu, B.A., Topaktas, M., Ila, H.B., Kayraldiz, A., Arslan, M. and Diler, S.B., 2004. Genotoxicity of aspartame. *Drug Chem Toxicol* 27: 257-268. 10.1081/dct-120037506
- Rotimi, O.A., Rotimi, S.O., Oluwafemi, F., Ademuyiwa, O. and Balogun, E.A., 2018. Oxidative Stress in Extrahepatic Tissues of Rats Co-Exposed to Aflatoxin B1 and Low Protein Diet. *Toxicol Res* 34: 211-220. 10.5487/TR.2018.34.3.211 tr-34-211 [pii]
- Rushing, B.R. and Selim, M.I., 2019. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food Chem Toxicol* 124: 81-100. S0278-6915(18)30849-4 [pii] 10.1016/j.fct.2018.11.047
- Sadhasivam, S., Britzi, M., Zakin, V., Kostyukovsky, M., Trostanetsky, A., Quinn, E. and Sionov, E., 2017. Rapid Detection and Identification of Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in Stored Wheat Grain. *Toxins (Basel)* 9: E302 [pii] 10.3390/toxins9100302 toxins9100302 [pii]
- Schatzmayr, G. and Streit, E., 2013. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin Journal* 6: 213-222. 10.3920/WMJ2013.1572
- Simintzi, I., Schulpis, K.H., Angelogianni, P., Liapi, C. and Tsakiris, S., 2007. The effect of aspartame metabolites on the suckling rat frontal cortex acetylcholinesterase. An in vitro study. *Food Chem Toxicol* 45: 2397-2401. S0278-6915(07)00204-9 [pii] 10.1016/j.fct.2007.06.016
- Singh, S.D. and Chuturgoon, A.A., 2017. A comparative analysis of mycotoxin contamination of supermarket and premium brand pelleted dog food in Durban, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 88: e1-e6. 10.4102/jsava.v88i0.1488

- Souto, N.S., Claudia Monteiro Braga, A., Lutchemeyer de Freitas, M., Rechia Figuera, M., Royes, L.F.F., Schneider Oliveira, M. and Furian, A.F., 2018. Aflatoxin B1 reduces non-enzymatic antioxidant defenses and increases protein kinase C activation in the cerebral cortex of young rats. *Nutr Neurosci* 21: 268-275. 10.1080/1028415X.2017.1278837
- Souto, N.S., Dassi, M., Braga, A.C.M., Rosa, E.V.F., Figuera, M.R., Royes, L.F.F., Oliveira, M.S. and Furian, A.F., 2019. Behavioural and biochemical effects of one-week exposure to aflatoxin B1 and aspartame in male Wistar rats. *World Mycotoxin Journal* 12: 293-305. DOI 10.3920/WMJ2018.2424
- Steckert, A.V., Dominghini, D., Michels, M., Abelaira, H.M., Tomaz, D.B., Sonai, B., de Moura, A.B., Matos, D., da Silva, J.B.I., Reus, G.Z., Barichello, T., Quevedo, J. and Dal-Pizzol, F., 2017. The impact of chronic mild stress on long-term depressive behavior in rats which have survived sepsis. *J Psychiatr Res* 94: 47-53. S0022-3956(17)30147-4 [pii]
- 10.1016/j.jpsychires.2017.06.006
- Stoeb, S.D., 2015. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environ Toxicol Pharmacol* 39: 794-809. 10.1016/j.etap.2015.01.022
- S1382-6689(15)00041-1 [pii]
- Supriya, C. and Reddy, P.S., 2015. Prenatal exposure to aflatoxin B1: developmental, behavioral, and reproductive alterations in male rats. *Naturwissenschaften* 102: 26. 10.1007/s00114-015-1274-7
- Towner, R.A., Qian, S.Y., Kadiiska, M.B. and Mason, R.P., 2003. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radic Biol Med* 35: 1330-1340. S0891584903005380 [pii]
- 10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.002
- Trebak, F., Alaoui, A., Alexandre, D., El Ouezzani, S., Anouar, Y., Chartrel, N. and Magoul, R., 2015. Impact of aflatoxin B1 on hypothalamic neuropeptides regulating feeding behavior. *Neurotoxicology* 49: 165-173. 10.1016/j.neuro.2015.06.008
- S0161-813X(15)00095-9 [pii]
- Tsai-Teng, T., Chin-Chu, C., Li-Ya, L., Wan-Ping, C., Chung-Kuang, L., Chien-Chang, S., Chi-Ying, H.F., Chien-Chih, C. and Shiao, Y.J., 2016. Erinacine A-enriched *Hericium erinaceus* mycelium ameliorates Alzheimer's disease-related pathologies in APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice. *J Biomed Sci* 23: 49. 10.1186/s12929-016-0266-z
- 10.1186/s12929-016-0266-z [pii]
- Wang, D., An, S.C. and Zhang, X., 2008. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett* 433: 59-64. 10.1016/j.neulet.2007.12.041
- S0304-3940(07)01322-5 [pii]
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M. and Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80: 1106-1122. 80/5/1106 [pii]
- 10.1093/ajcn/80.5.1106
- Willner, P., 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52: 90-110. 87097 [pii]
- 10.1159/000087097
- Wogan, G.N., Kensler, T.W. and Groopman, J.D., 2012. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29: 249-257. 10.1080/19440049.2011.563370
- 938093501 [pii]
- Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T. and Murayama, K., 1998. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 273: 14085-14089. 10.1074/jbc.273.23.14085
- Yilmaz, S., Kaya, E. and Comakli, S., 2017. Vitamin E (alpha tocopherol) attenuates toxicity and oxidative stress induced by aflatoxin in rats. *Adv Clin Exp Med* 26: 907-917. 10.17219/acem/66347

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on body weight in all groups along the fourteen days of treatment. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

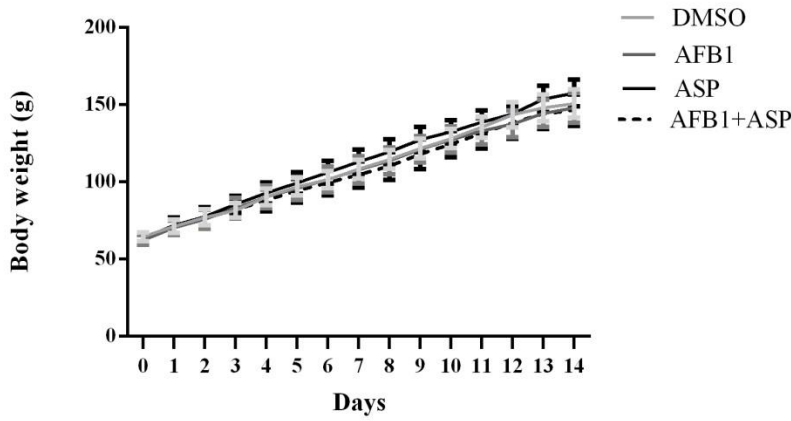


Figure 2: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on water (A) and food consumption (B) along the fourteen days of treatment. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

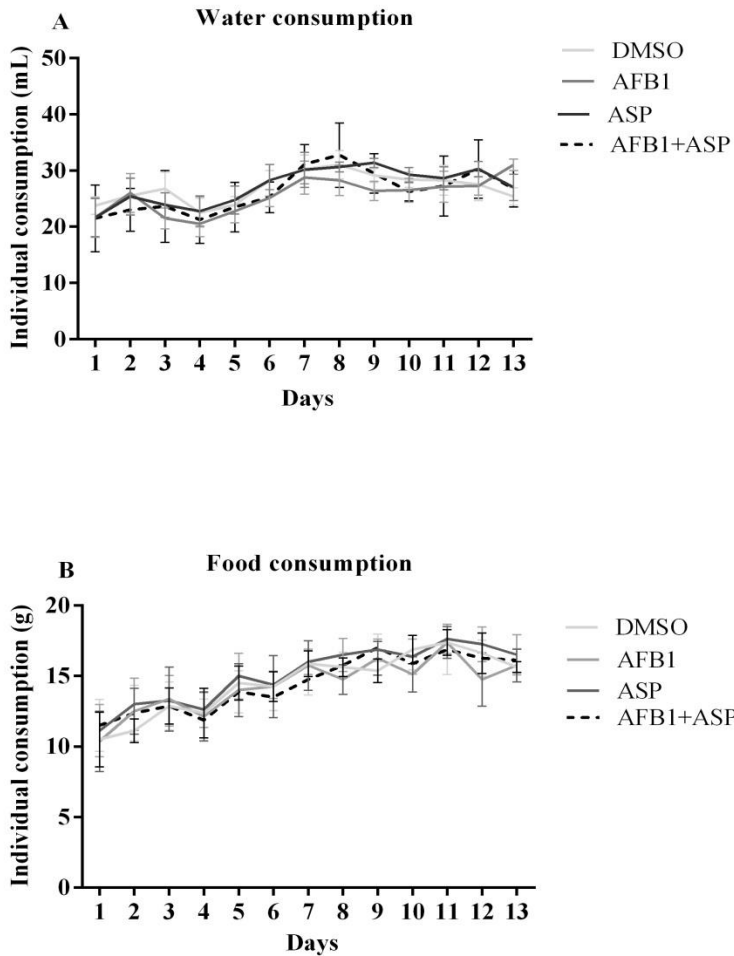


Figure 3: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on open-field parameters: Crossing (A), Rearing (B), Latency to exploration (C), Time spent in center (D), Grooming behavior (E), Feces number (F). Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/NaCl group.

+ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1/NaCl group.

£ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/ASP group.

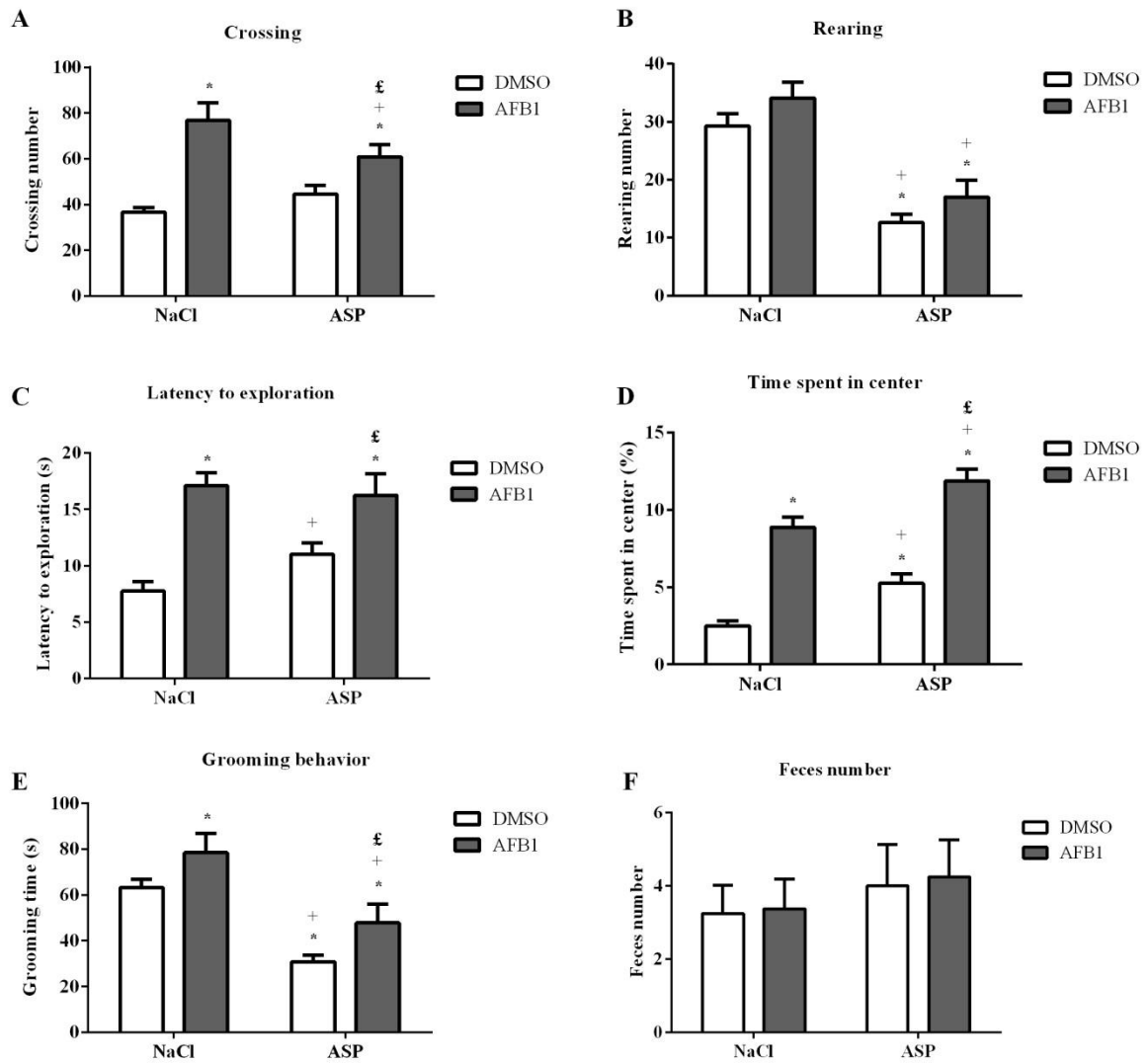


Figure 4: Effect of AFB1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.g.) and/or ASP (75 mg / kg, i.g.) on marble burying test (A) and nesting test (B). Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/NaCl group.

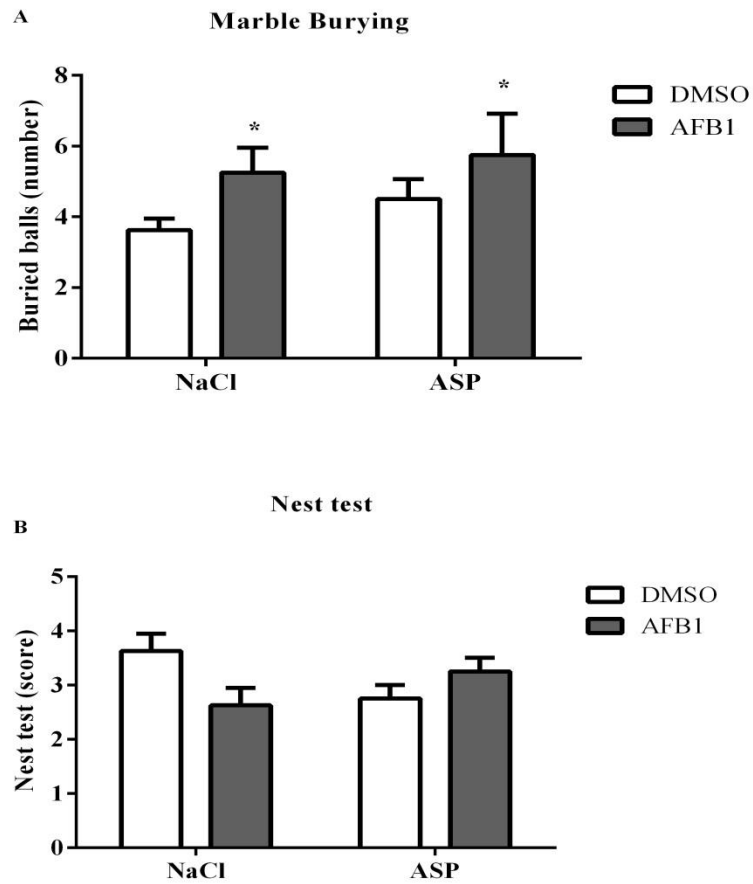


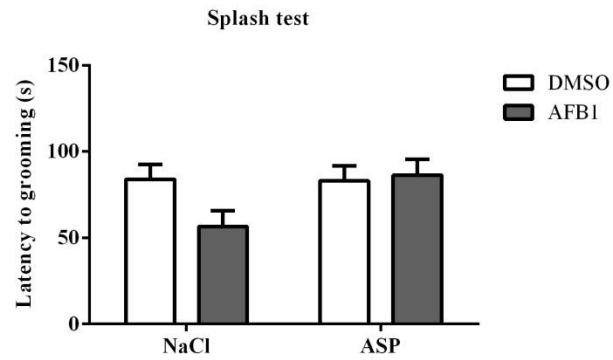
Figure 5: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on splash test parameters: immobility time (A), grooming face (B) and grooming body (C). Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/NaCl group.

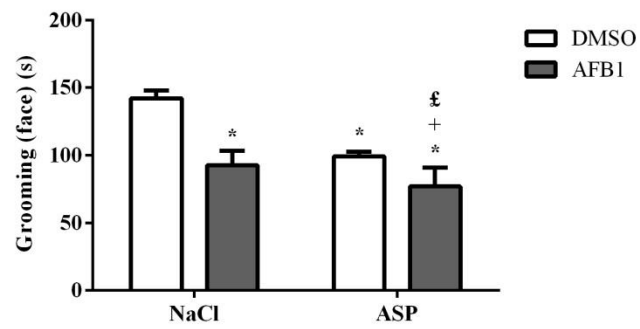
+ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1/NaCl group.

£ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO/ASP group.

A



B



C

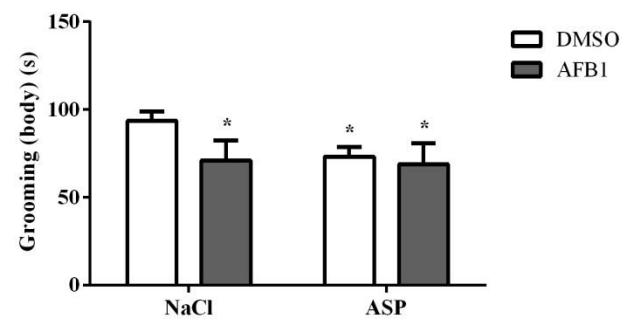


Figure 6: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on TBARS content and ascorbic acid content in liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO group.

+ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1 group.

£ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with ASP group.

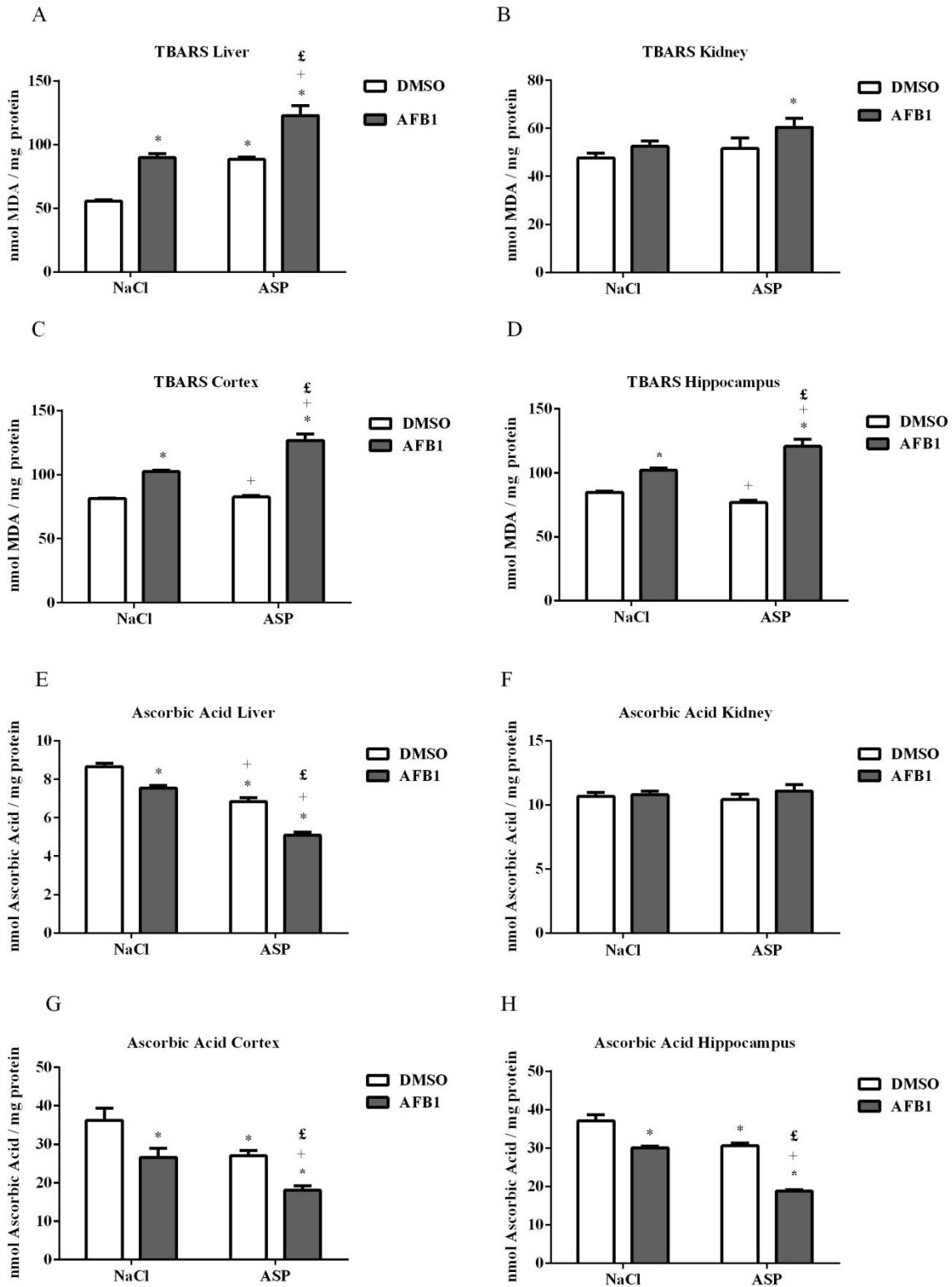


Figure 7: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on non protein thiols content (NPSH) and antioxidant power of iron reduction (FRAP) content in liver, kidneys, cerebral cortex and hippocampus. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.
 * Indicates a significant difference (P < 0.05) compared with DMSO group.
 + Indicates a significant difference (P < 0.05) compared with AFB1 group.
 £ Indicates a significant difference (P < 0.05) compared with ASP group.

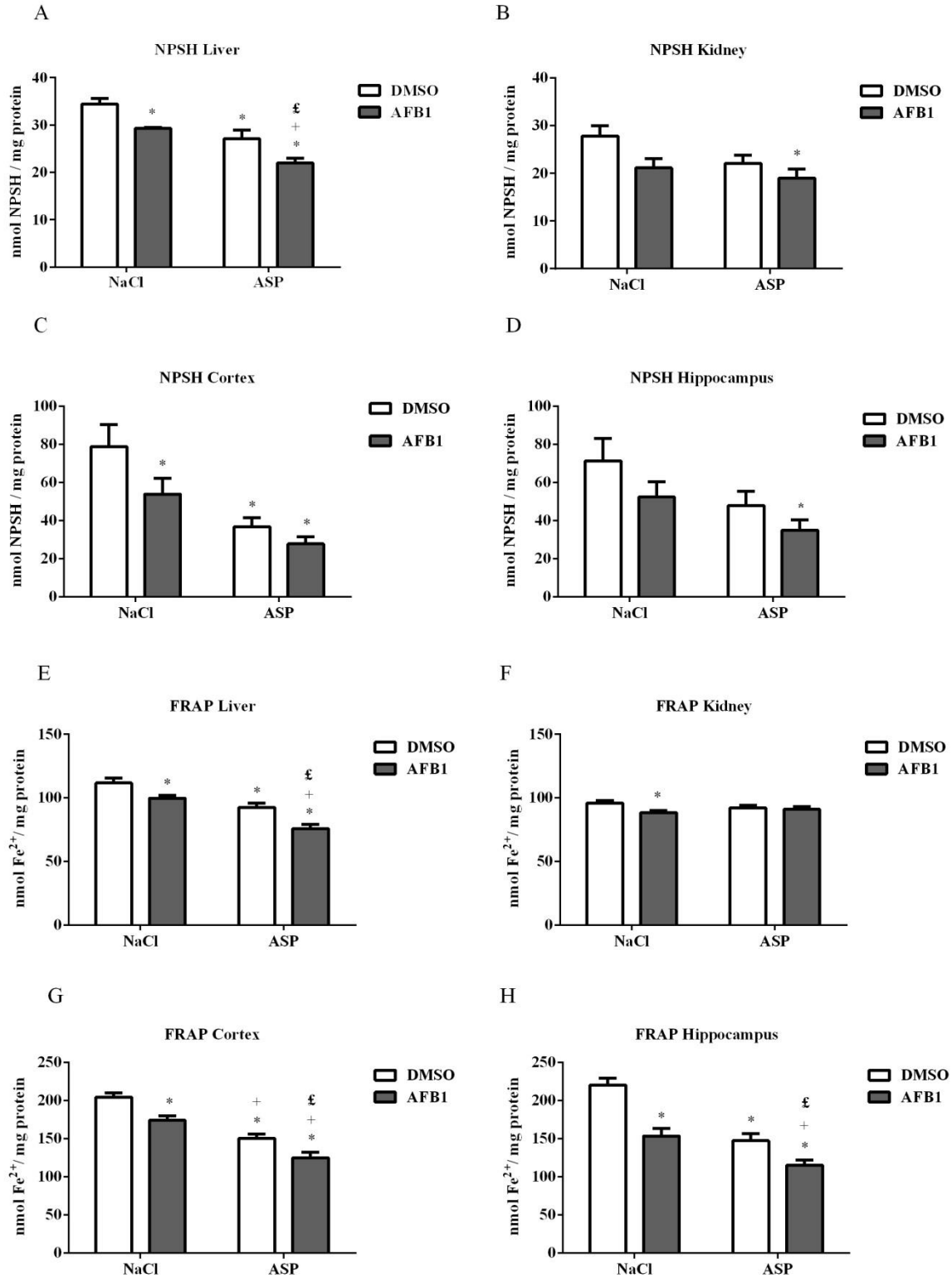


Figure 8: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g) on glutathione-S-transferase activity (GST) and catalase activity in liver and kidney. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO group.

+ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1 group.

£ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with ASP group.

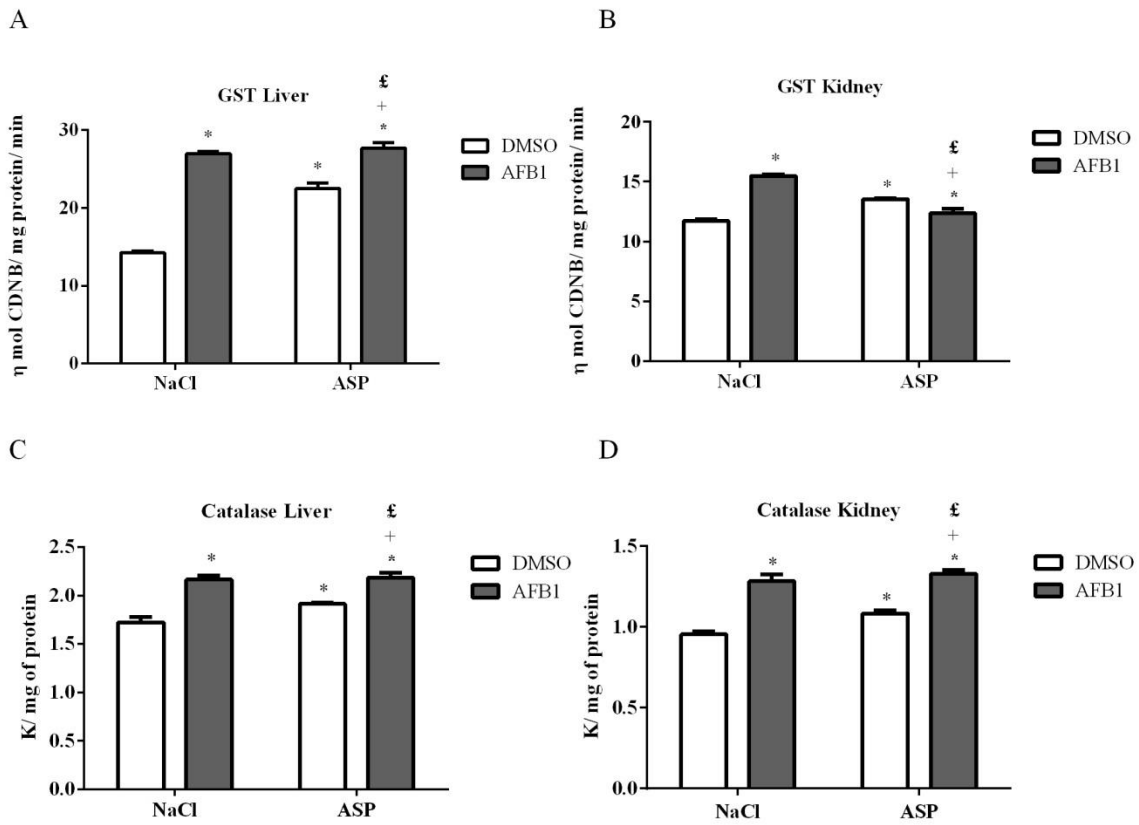


Figure 9: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on immunoreactivity mitochondrial SOD, glutathione S-transferase mu (GSTM) and NOS-2 in hippocampus and cerebral cortex. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with DMSO group.

+ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with AFB1 group.

£ Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with ASP group.

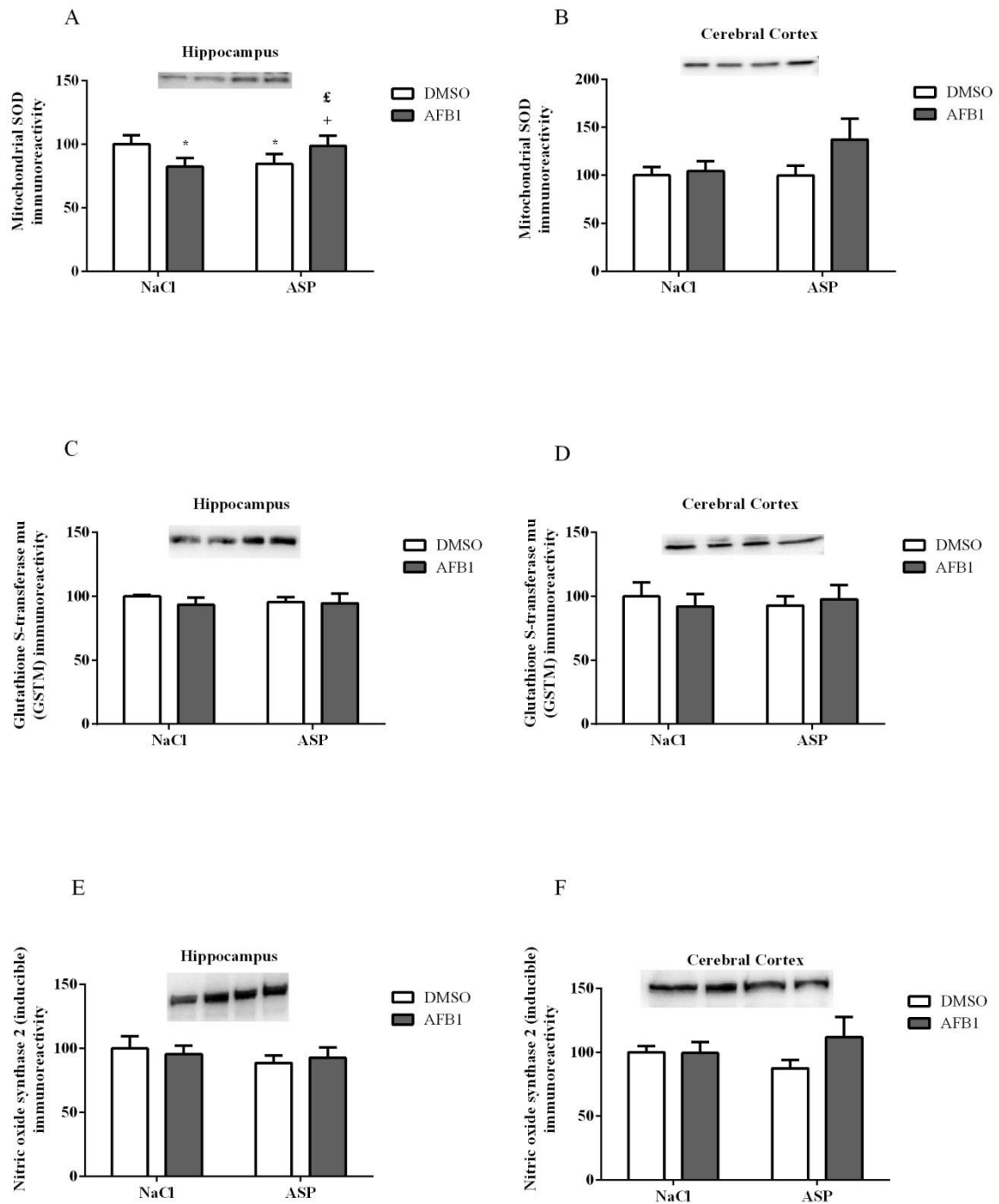


Table 1: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on the organ absolute weight of animals. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

	Treatment			
	DMSO	AFB1	ASP	AFB1+ASP
Adrenal Gland	0.065±0.005	0.063±0.005	0.068±0.008	0.057±0.007
Spleen	0.519±0.038	0.524±0.047	0.579±0.042	0.504±0.034
Brain	1.240±0.019	1.213±0.014	1.230±0.023	1.203±0.026
Heart	0.657±0.031	0.663±0.047	0.703±0.051	0.643±0.037
Liver	7.660±0.648	7.510±0.534	8.307±0.662	7.561±0.520
Lung	1.172±0.076	1.326±0.130	1.151±0.149	1.102±0.131
Kidney	1.387±0.077	1.361±0.090	1.418±0.074	1.391±0.090
Testicles	1.500±0.075	1.380±0.130	1.394±0.097	1.468±0.120

Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

Table 2: Effect of AFB1 (250 µg/kg, i.g.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on organ-to-body weight ratio and organ-to-brain weight ratio. Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

Organs	Organ-to-body weight ratio				Organ-to-brain weight ratio			
	DMSO	AFB1	ASP	AFB1+ASP	DMSO	AFB1	ASP	AFB1+ASP
Adrenal Gland	0.045±0.007	0.043±0.002	0.044±0.003	0.039±0.005	5.304±0.435	5.184±0.392	5.501±0.671	4.709±0.524
Brain	0.844±0.052	0.844±0.057	0.798±0.045	0.844±0.051	-	-	-	-
Spleen	0.346±0.021	0.352±0.020	0.370±0.026	0.347±0.018	41.825±3.102	43.200±3.876	47.000±3.051	41.763±2.372
Heart	0.440±0.014	0.449±0.013	0.444±0.013	0.444±0.015	52.911±2.194	54.777±4.092	57.097±3.967	53.404±2.668
Liver	5.036±0.221	5.069±0.107	5.253±0.243	5.170±0.092	697.693±53.033	620.104±46.495	673.618±48.318	628.745±42.094
Lung	0.813±0.109	0.924±0.118	0.723±0.071	0.738±0.037	94.988±7.144	108.988±10.143	93.688±12.385	91.500±10.192
Kidney	0.926±0.016	0.920±0.015	0.905±0.033	0.952±0.022	111.941±6.354	112.351±7.763	115.204±5.469	115.315±6.360
Testicles	1.020±0.085	0.931±0.057	0.882±0.026	1.009±0.027	121.330±6.802	114.154±11.151	113.387±7.490	121.800±9.101

Data are mean ± S.E.M. for n = 8 animals in each group.

Table 3: Effect of AFB1 (250 μ g/kg, i.g) and/or ASP (75mg/kg, i.g) on Na⁺,K⁺,ATPase activity (Δ / min/mg protein) in cerebral cortex. Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.

Na⁺,K⁺,ATPase activity (Δ min/mg protein)				
	DMSO	AFB1	ASP	AFB1+ASP
NaK Total	51.6 \pm 9,54	59.90 \pm 10.09	62.05 \pm 12.01	71.27 \pm 4.13
NaK α -1subunit	36.82 \pm 6.47	41.56 \pm 6.48	43.59 \pm 7.51	51.02 \pm 2.74
NaK α -2.3subunit	14.78 \pm 3.38	18.35 \pm 3.74	18.45 \pm 4.60	20.25 \pm 2.18

Data are mean \pm S.E.M. for n = 8 animals in each group.

5 DISCUSSÃO

Alimentos que possuem alta concentração de carboidratos, baixa atividade de água, alta acidez, em grande parte constituem a dieta da população mundial, pois sua durabilidade e praticidade tornam estes produtos amplamente consumidos. Porém, estas mesmas características proporcionam ao alimento um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos, principalmente os fungos, e dentre estes fungos, podem surgir espécies produtoras de micotoxinas, que são capazes de levar à intoxicação e/ou toxi-infecção alimentar grave em indivíduos saudáveis e imunossuprimidos (PERSON et al., 2017; SILVA, 2014; STELATO et al., 2010; WHO, 2013).

A ocorrência de micotoxinas em alimentos e derivados é considerada um problema mundial. Dentre as centenas de micotoxinas existentes, as aflatoxinas têm recebido grande atenção em comparação com as demais, pois além de serem classificadas pela IARC como Grupo 1 de carcinógenos humanos (IARC, 1993), também são conhecidas por sua ação hepatotóxica, nefrotóxica, mutagênica, genotóxica, imunotóxica e neurotóxica. A exposição à aflatoxina B1 (AFB1) está associada com aproximadamente 40% das doenças relatadas em países em desenvolvimento, tornando-se além de um problema de saúde pública uma preocupação econômica que ocasiona uma perda mundial de aproximadamente 75% de grãos produzidos (ABDEL-WAHHAB, 2005; LEE; RYU, 2017; STOEV, 2015; WILLIAMS et al., 2004).

Um dos mecanismos de toxicidade induzidos pela AFB1 é o estresse oxidativo (SOUZA et al., 1999) o qual desempenha um papel fundamental, evidenciado principalmente pela diminuição dos parâmetros antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica. Kanbur e colaboradores em 2011 observaram que 14 dias de exposição a AFB1 na dose 1250 µg/kg aumentou a atividade da SOD e diminuiu a atividade GSH-Px no cérebro, fígado, pulmão e rins, sem alterar os níveis de MDA e a atividade da CAT no coração e baço. Yılmaz (2017) mostrou que AFB1 administrada em dose única (2.5 mg/ kg b.w. i.p) causou aumento do nível de MDA e redução nos níveis de GSH, GST, CAT, GSH-Px, SOD e a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) no fígado e rim. Nosso grupo de pesquisa no ano de 2017 verificou que 48 horas após uma dose única de 250 µg/kg via intragástrica de AFB1 em ratos machos promoveu efeitos neurotóxicos, evidenciados pela redução significativa nos níveis de defesas antioxidantes não enzimáticas, ácido ascórbico e grupos de tióis não proteicos (SOUTO et al., 2017). Rotimi e colaboradores (2018) observaram que a associação da AFB1 (40 ppb) a uma dieta pobre em proteínas (5% proteína) realizada durante 8 semanas,

promoveu diminuição do ganho de peso, potencialização da disfunção renal, diminuição da concentração de glutathione e aumento nos níveis de TBARS no fígado e rim dos animais tratados. O aparecimento de sinais e sintomas desencadeados pela AFB1 se mostra diretamente relacionado à sua concentração e ao tempo de exposição.

O ASP por ser um aditivo alimentar amplamente utilizado na indústria alimentícia (gomas de mascar, balas, sobremesas, bebidas, congelados, refrigerantes, coberturas, xaropes e produtos lácteos), e também na indústria farmacêutica, torna o seu consumo expressivo e capaz de atingir grandes concentrações (CHATTOPADHYAY et al., 2014; FREITAS, 2006; PHILIPPI, 2014). Estudo realizado por Mourad no ano de 2011 mostrou que a administração de ASP na dose de 40mg/kg em ratos machos tratados por 2, 4 e 6 semanas, promoveu aumento na formação de MDA e diminuição da glutathione reduzida no fígado e rim. Finamor e colaboradores (2014) observaram que o tratamento com ASP na dose de 40mg/kg utilizando ratos wistar machos realizado durante 6 semanas promoveu redução dos níveis de TBARS, hidroperóxidos lipídicos e aumento nos níveis de proteína carbonil. Lebda e colaboradores (2017) verificaram que o tratamento com ASP na dose de 240 mg/kg por via oral em ratos wistar machos, durante 2 meses promoveu interrupção da produção de energia, desequilíbrio hormonal, além do aumento do estresse oxidativo e ativação da via de apoptose neuronal. Ashok e colaboradores (2015) utilizando um protocolo agudo, verificou que o ASP na dose de 75 mg/kg após 24 horas da administração, promoveu aumento nos níveis de peroxidação lipídica, na atividade da SOD, nos níveis de GPx e na atividade da enzima CAT acompanhado da diminuição da GSH. Assim como os mecanismos de toxicidade da AFB1, o ASP também apresenta sua ação tóxica atrelada à indução de estresse oxidativo.

Desta forma, este trabalho buscou investigar as possíveis alterações causadas em marcadores de estresse oxidativo e parâmetros comportamentais após a administração de AFB1 (250 µg/kg, i.g.) e/ou ASP (75mg/kg, i.g.) por 7 e 14 dias.

Os resultados obtidos mostram que as alterações causadas pela AFB1 e/ou ASP nas condições dos protocolos testados, variam de acordo com os órgãos analisados, porém são mais evidentes no protocolo com 14 dias de exposição. Observou-se uma diminuição significativa nos níveis de NPSH, FRAP e ácido ascórbico no fígado, córtex e hipocampo nos grupos tratados com AFB1 e/ou ASP, após 14 dias sem alterações significativas no período de 7 dias. Sugere-se pelos resultados encontrados, que a exposição à AFB1 e/ou ASP reduziu as defesas antioxidantes não enzimáticas frente ao estresse oxidativo induzido.

Observamos um aumento nos níveis de TBARS em todos os órgãos analisados após 14 dias, e um aumento no hipocampo, após 7 dias. Considerando que o MDA é um marcador

tardio de estresse oxidativo, foi necessário um período maior de tratamento para que fosse possível observar a formação das espécies reativas (SOUTO et al., 2018; SOUTO et al., 2019; VENKATARAMANA et al., 2014).

Outro importante parâmetro analisado neste estudo foi à determinação da atividade das enzimas CAT e GST, a enzima CAT diminuiu após 7 dias no fígado e no rim, e aumentou após 14 dias. A atividade da enzima GST aumentou no fígado e rim após os 7 e 14 dias de tratamento, a toxicidade da AFB1 e do ASP provavelmente incluiu o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, o que fez aumentar a atividade das defesas antioxidantes.

Tais resultados enfatizam a importância do monitoramento da formação dos radicais livres e seus focos de ação, os quais podem atuar, no desenvolvimento e progressão de muitas doenças assim como no desenvolvimento de transtornos afetivos, aumentando o risco de doenças psiquiátricas ou neurodegenerativas (BALMUS et al., 2016; BENDICH, 1993).

Os parâmetros comportamentais analisados neste estudo, se mostraram alterados após 7 e 14 dias de exposição a AFB1 e ASP, evidenciados pelo teste de campo aberto, onde observamos um efeito proeminente em relação à atividade locomotora e exploratória e aumento no tempo gasto no centro quando comparados ao controle. No teste de Marble Burying houve aumento no número de bolinhas enterradas no grupo AFB1+ASP quando comparados ao controle após 7 e 14 dias, e segundo Deacon (2006) o aumento no número de bolas enterradas é um marcador de medo/ansiedade ou distúrbio obsessivo-compulsivo em roedores. No teste de borrifagem de sacarose encontramos uma diminuição no tempo de autolimpeza da face para todos os grupos quando comparados ao controle após 7 e 14 dias, Luo e colaboradores (2008) e Wang e colaboradores (2008) relataram que ratos expostos a estresse leve imprevisível crônico mostraram uma diminuição significativa de suas atividades de criação e higiene, e isso indica uma "Perda refratária de interesse", que é um dos principais sintomas da depressão.

Kihara e colaboradores (2000) mostraram que o tratamento pré-natal com a AFB1 (0,3 mg/kg dia) diminuiu o desempenho dos filhotes em parâmetros avaliados no teste de natação, além disso no teste de rotarod o grupo AFB1 permaneceu na haste por um tempo menor que os controles. Estes resultados revelam que o tratamento com AFB1 produziu um atraso na coordenação locomotora. Supriya e Reddy (2015), também observaram comportamento prejudicado de filhotes tratados com AFB1 quando comparados com os controles no teste de campo aberto quando avaliados as atividades exploratórias e locomotoras.

Estudos anteriores em nosso grupo também examinaram os efeitos da administração oral aguda de AFB1 em testes comportamentais de campo aberto, nado forçado, labirinto em cruz elevado, reconhecimento de objetos, utilizando uma dose de 250 µg/kg em ratos machos analisados após 48 horas de exposição. Neste intervalo tempo, não foram observadas diferenças nos testes comportamentais (SOUTO et al., 2017). Ashok e colaboradores (2014) verificaram em seu estudo que a administração oral de ASP durante 90 dias na dose de 75 mg/kg alterou os níveis de ansiedade, atividade locomotora e o comportamento emocional de ratos Wistar em testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado evidenciado pela diminuição dos parâmetros analisados em relação ao grupo controle. Os resultados desses estudos sugerem que a administração de AFB1 e ASP pode estar associada a alterações comportamentais as quais estão diretamente relacionadas à via de administração, dose e duração do tratamento.

Levando em consideração que 14 dias de exposição a AFB1 e ao ASP representou um maior impacto quanto aos parâmetros bioquímicos e comportamentais analisados, buscamos fortalecer ainda mais os mecanismos que podem estar envolvidos na indução de danos e quantificamos a imunorreatividade de algumas proteínas associadas ao estresse oxidativo (SOD-2, GST-m e NOS-2). Foi possível observar a diminuição da imunorreatividade da SOD-2 no hipocampo após os tratamentos, tendo esta enzima um papel fundamental como antioxidante, atuando na dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Além disso, a expressão ou atividade alterada da SOD mitocondrial tem sido associada a muitos distúrbios, principalmente em tecidos com alta produção energética (músculo, coração e cérebro), pois sua atividade é considerada vital para a vida em uma atmosfera rica em oxigênio. Além disso, muitas moléculas de sinalização e fatores de transcrição são regulados por espécies reativas de oxigênio derivadas das mitocôndrias (HOLLEY et al., 2010), sugerindo um papel importante da SOD mitocondrial no desenvolvimento de doenças.

Frente aos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que a administração de AFB1 (250 µg/kg; i.g.) e/ou ASP (75 mg/kg i.g.) durante um período de 7 e 14 dias, é capaz de induzir alterações em marcadores de estresse oxidativo em órgãos periféricos (fígado e rins) e no sistema nervoso central (córtex e hipocampo). Mostrou-se também, que o tempo de exposição é fundamental para a incidência dos efeitos, tanto a nível comportamental quanto sobre marcadores de estresse oxidativo. Desta forma, mais estudos que envolvam outros protocolos de exposição, bem como marcadores de dano celular que possam esclarecer e complementar os mecanismos envolvidos nestes processos são necessários.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que:

- 1- As exposições à AFB1 e/ou ASP não promoveram alterações peso corporal, no peso relativo dos órgãos dos animais, e não alteraram o consumo de água e ração nos diferentes períodos de tratamento.
- 2- A AFB1 sozinha e associada ao ASP diminui a atividade da enzima catalase (CAT) no fígado e aumenta nos rins; a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) aumenta nos grupos AFB1 e ASP sozinhos, e no grupo AFB1 + ASP no fígado, sendo que nos rins ocorre um aumento no grupo AFB1 sozinha e AFB1 associada ao ASP para o grupo tratado por 7 dias. O tratamento por 14 dias aumentou a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) e catalase (CAT) no fígado e nos rins em todos os grupos.
- 3- A AFB1 e/ou ASP não alteram os marcadores de estresse oxidativo, ácido ascórbico, tióis não proteicos (NPSH), peroxidação lipídica (TBARS) no córtex cerebral, hipocampo, fígado e rins, no entanto o poder antioxidante usando ferro reduzido (FRAP) no hipocampo dos animais tratados com AFB1 sozinha diminuiu em comparação ao controle após 7 dias de tratamento. No tratamento de 14 dias observamos uma diminuição em todos os grupos quanto ao conteúdo de ácido ascórbico, NPSH e FRAP no fígado, córtex e hipocampo, e um aumento no TBARS em todos os grupos no fígado, rins, córtex cerebral e hipocampo.
- 4- A AFB1 e/ou ASP, não alteram a atividade da enzima Na^+/K^+ , ATPase no córtex cerebral nos diferentes tempos.
- 5- A AFB1 e/ou ASP após 7 dias de tratamento alteraram o comportamento motor e exploratório dos animais, através dos parâmetros analisados no campo aberto, promovendo uma diminuição no número de cruzamentos horizontais e respostas de levantar no grupo ASP. O grupo AFB1 aumentou a latência para explorar quando comparado aos demais grupos, seguido de um aumento no tempo gasto no centro. Este último parâmetro também modificado pela associação dos dois compostos quando comparado ao grupo ASP. No tratamento de 14 dias verificamos um aumento número de cruzamentos horizontais nos grupos AFB1, e AFB1 + ASP, e um aumento na latência para explorar; tempo gasto no centro em todos os grupos. Verificamos também uma diminuição nas respostas de levantar no grupo ASP e na

associação, o tempo de limpeza aumentou no grupo AFB1 e diminuiu nos grupos ASP e na associação.

- 6- O ASP sozinho e associado a AFB1 após 7 dias de tratamento, promoveu um aumento no número de esferas enterradas no teste de Marble Burying, este mesmo parâmetro analisado após 14 dias, foi aumentado nos grupos AFB1 e na associação.
- 7- A AFB1, o ASP e a associação, após 7 dias promovem uma diminuição na latência para limpeza e no tempo de limpeza da face no teste de borrifagem de sacarose. Após 14 dias, a AFB1, o ASP e a associação promoveram uma diminuição do tempo de limpeza da face e do dorso.
- 8- A AFB1 e/ou ASP não interferiram no escore de nidificação dos animais nos dois períodos de exposição.
- 9- Houve a diminuição na imunorreatividade da superóxido dismutase 2 (SOD-2) no hipocampo dos animais dos grupos AFB1 e ASP. A AFB1 e/ou ASP não interferiram na imunorreatividade da glutathione-S-transferase mitocondrial (GST-m) e na óxido nítrico sintase (NOS-2) no córtex e hipocampo dos animais.

Os principais resultados encontrados neste trabalho, para os tratamentos de 7 e 14 dias com AFB1 e/ou ASP, estão agrupados na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da exposição a AFB1 e ASP após 7 e 14 dias

(continua)

Análises Comportamentais	7 dias			14 dias		
	AFB1	ASP	AFB1+ASP	AFB1	ASP	AFB1+ASP
Campo Aberto						
Latência	↑	-	-	↑	-	↑
Cruzadas	-	-	-	↑	-	↑
R. Levantar	-	-	-	-	↓	↓
Tempo Centro	↑	-	-	↑	↑	↑
Limpeza	-	-	↑	↑	↓	↓
Enterramento de Bolinhas	-	↑	↑	↑	-	↑
Borrifagem de sacarose						
Latência	↓	↓	↓	-	-	-
Limpeza da Face	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Limpeza do Dorso	-	-	-	↓	↓	↓

Tabela 9 – Resultados da exposição a AFB1 e ASP após 7 e 14 dias

(conclusão)

Análises Comportamentais	7 dias			14 dias		
	AFB1	ASP	AFB1+ASP	AFB1	ASP	AFB1+ASP
Bioquímicas						
Ácido Ascórbico						
Fígado	-	-	-	↓	↓	↓
Rim	-	-	-	-	-	-
Córtex Cerebral	-	-	-	↓	↓	↓
Hipocampo	-	-	-	↓	↓	↓
FRAP						
Fígado	-	-	-	↓	↓	↓
Rim	-	-	-	↓	-	-
Córtex Cerebral	-	-	-	↓	↓	↓
Hipocampo	↓	-	-	↓	↓	↓
NPSH						
Fígado	-	-	-	↓	↓	↓
Rim	-	-	-	-	-	↓
Córtex Cerebral	-	-	-	↓	↓	↓
Hipocampo	-	-	-	-	-	↓
TBARS						
Fígado	-	-	-	↑	↑	↑
Rim	-	-	-	-	-	↑
Córtex Cerebral	-	-	-	↑	-	↑
Hipocampo	↓	-	↑	↑	-	↑
CAT						
Fígado	↓	-	↓	↑	↑	↑
Rim	↑	-	↑	↑	↑	↑
GST						
Fígado	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Rim	↑	-	↑	↑	↑	↑

Fonte: Autor.

– indica nenhuma alteração em relação ao controle;

↑ indica aumento em comparação ao controle;

↓ indica diminuição em relação ao controle.

Diante destes resultados podemos concluir que a exposição a AFB1 e/ou ASP por 7 e 14 dias é capaz de promover efeitos sobre a atividade da GST e CAT nos órgãos periféricos (fígado e rim) e à nível de sistema nervoso central (córtex e hipocampo). Os efeitos

comportamentais também mostraram a ação dos compostos isolados ou em combinação, evidenciados pela alteração nos parâmetros de locomoção (número de cruzamentos e respostas de levantar), no comportamento tipo ansiolítico, determinado através da latência para explorar e do tempo gasto no centro no teste de campo aberto, no número de esferas enterradas no teste de Marble Burying e no comportamento tipo depressivo através da latência e do tempo de limpeza da face e do dorso observados no teste de borrifagem de sacarose. Verificamos que os efeitos se mostram de forma tempo depende uma vez que foram mais evidentes no tratamento de 14 dias.

Como o ASP pode estar presente em milhares de produtos alimentícios os quais podem estar sujeitos à contaminação por aflatoxinas, salientamos a importância do conhecimento dos efeitos tóxicos e do sinergismo que pode ocorrer entre estes diferentes componentes alimentares, os quais podem ser capazes de promover o aumento do estresse oxidativo e facilitar para o desenvolvimento de doenças.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M. E. et al., Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 2092-2101, 2012. PMID 23280025.
- ABHILASH, M.; PAUL, M. V.; VARGHESE, M. V.; NAIR, R. H. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 6, p. 1203-7, jun. 2011. DOI: 10.1016/j.fct.2011.02.019.
- ABU-TAWEEL, G. M. et al. Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 42, p. 60-67, 2014. DOI: 10.1016/j.ntt.2014.02.001.
- ADARAMOYE, O. A.; AKANNI, O. O. Effects of long-term administration of aspartame on biochemical indices, lipid profile and redox status of cellular system of male rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 29-37, jan. 2016. Doi: 10.1515/jbcpp-2014-0130.
- AHMAD, I. et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1523, n. 1, p. 37-48, set. 2000. PMID 11099856.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 632, jun. 2017. DOI: 10.3390/ijerph14060632.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Define os níveis de Ingestão Diária Aceitável (IDA) de adoçantes é a JECFA, que faz parte da OMS. Brasília, DF: Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 12 jan. 2020.
- ASHOK, I.; SHEELADEVI, R. Oxidant stress evoked damages in rat hepatocyte leading to triggered NOS levels on long term consumption of aspartame. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 679-691, 2015. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.07.011.
- ASHOK, I. et al. Oxidative stress evoked damages on rat sperm and attenuated antioxidant status on consumption of aspartame. **International Journal of Impotence Research**, v. 29, n. 4, p. 1-7, abr. 2017. DOI: 10.1038/ijir.2017.17.
- BAGH, M. B.; MAITI, A. K.; JANA, S.; BANERJEE, K.; ROY, A.; CHAKRABARTI, S. Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. **Free Radical Research**, v. 6, p. 574-581, 2008.
- BAHLS, S. C. Depressão: uma breve revisão dos fundamentos biológicos e cognitivos. **Interação**, v. 3, p. 49-60, 1999.

BALMUS, I. M.; CIOBICA, A.; ANTIOCH, I.; DOBRIN, R.; TIMOFTE, D. Oxidative Stress Implications in the Affective disorders: main biomarkers, animal models relevance, genetic perspectives, and antioxidant approaches. **Oxid Med Cell Longev**, 2016.

BARBIROLI, A. et al. Binding of Aflatoxin M1 to Different Protein Fractions in Ovine and Caprine Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 532-540, fev. 2007. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71536-9.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécie reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006. DOI: org/10.1590/S0100-40422006000100021.

BARTOLOMUCCI, A.; LEOPARDI, R. Stress and Depression: Preclinical Research and clinical implications. **Stress & Depression**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2009.

BEDARD, L. L.; MASSEY, T. E. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. **Cancer Letters - Journal - Elsevier**, v. 241, n. 2, p. 174-83, sept. 2006. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.11.018.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, n. 3, p. 497-516, jul. 2003. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, jul. 1996. DOI: 10.1006/abio.1996.0292.

BERKEY, C. S. et al. Sugar-added beverages and adolescent weight change. **Obesity Research**, v. 12, n. 5, p. 778-788, may 2004. DOI: 10.1038/oby.2004.94.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 32, p. 19633-19636, 1997.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical Contaminants: Their Metabolism and their Residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, dec. 1987. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.12.1058>.

BISCHOF, K. R. S. K. Liver Toxicity. In: GUPTA, R. C. **Veterinary toxicology: basic and clinical principles**. 2007. p. 145-160,

BLUM, J. W.; JACOBSEN, D. J.; DONNELLY, J. E. Beverage consumption patterns in elementary school aged children across a two-year period. **The Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 93-98, apr. 2005. PMID: 15798075.

BLUNDELL, J. E.; HILL, A. J. Paradoxical effects of an intense sweetener (aspartame) on appetite. **The Lancet**, v. 10, n. 1, p. 1092-1093, may 1986. PMID: 2871354.

BLUNDELL, J. E.; GREEN, S. M. Effects of sucrose and sweeteners on appetite and energy intake. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v. 20, n. 2S, p. 12-17, mar. 1996. PMID 8646266.

BOK, J. W.; KELLER, N. P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 2, p. 527-35, abr. 2004. DOI: 10.1128/EC.3.2.527-535.2004.

BORETTI, L. Micotoxinas em poedeiras. **Revista Avicultura Industrial**, v. 1059, p. 41-44, 1998.

BOWER, J. A.; WHITTEN, R. Sensory characteristics and consumer liking for cereal bar snack foods. **Journal of Sensory Studies**, v. 15, n. 3, p. 327-345, 2000. DOI: 10.1111/j.1745-459X.2000.tb00274.x.

BRASIL. **RDC nº 6, de 20 de fevereiro de 2008**. Dispõe sobre a extensão de uso de aditivos alimentares para adoçantes de mesa. Brasília, DF: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/28126>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

BRASIL. **Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, DF: ANVISA, 2011.

BRITO, I. P. et al. Elaboração e avaliação global de barra de cereais caseira. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (EPPA)**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 35-50, jan./jun. 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v22i1.1178>.

BROWN, L. A. Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 266, n. 2, p. L172-L177, 1994.

CANI, P. D.; BIBLIONI, R.; KNAUF, C. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, p. 1470-1481, 2008.

CAPITAN-VALLVEY, L. F. et al. Resolution of an intense sweetener mixture by use of a flow injection sensor with on-line solid-phase extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 2, p. 385-391, may 2006. PMID: 16804990.

CARDOSO, J. M. P.; BATTOCHIO, J. R.; CARDELLO, H. M. A. B. Equi-sweetness and sweetening power of different sweetening agents in different temperatures of consumption of tea drink in soluble power. **Food Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 448-452, jul./sept. 2004. DOI: 10.1590/S0101-20612004000300025.

CABRERA, M. A. S.; JACOB FILHO, W. Obesidade em idosos: prevalência, distribuição e associação com hábitos e co-morbidades. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 494-501. out. 2001.

CHATTOPADHYAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Artificial sweeteners – a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 4, p. 611-621, apr. 2014. DOI: 10.1007/s13197-011-0571-1.

CHOUDHARY, A. K. Aspartame: should individuals with Type II Diabetes be taking it? **Current Diabetes Reviews**, may 2017. DOI: 10.2174/1573399813666170601093336.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637S-646S, aug. 2000. PMID 10919970.

- COLDITZ, G. A. et al. Patterns of weight change and their relation to diet in a cohort of healthy women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 1100-1105, jun. 1990. PMID 2349925.
- CORTÉS, G. et al. Identification and quantification of aflatoxins and aflatoxicol from poultry feed and their recovery in poultry litter. **Poultry Science Association**, v. 89, p. 993-1001, feb. 2010. DOI: 10.3382/ps.2009-00019.
- DAMASCENO, D. C. et al. Effects of a saccharin and cyclamate mixture on rat embryos. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, p. 157-159, jun. 2003. PMID 12776796.
- DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 257, n. 4, p. L163-L173, 1989.
- DINIZ, S. P. S. S. Micotoxinas. **Livraria e Editora Rural**, p. 181, 2002.
- DOROKHOV, Y. L.; SHINDYAPINA, A. V.; SHESHUKOVA, E. V.; KOMAROVA, T. V. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 2, p. 603-644, apr. 2015. DOI: 10.1152/physrev.00034.2014.
- DREWNOWSKI, A. et al. Comparing the effects of aspartame and sucrose on motivational ratings, taste preferences, and energy intakes in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 338-345, feb. 1994. PMID: 8310983.
- DROGE, W. et al. Oxidant-antioxidant status in human immunodeficiency virus infection. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 594-601, 1994.
- DUFFEY, K. J.; POPKIN, B. M. Adults with healthier dietary patterns have healthier beverage patterns. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 11, p. 2901-2907, nov. 2006. PMID 17056820.
- DUSTING, G. J.; MACDONALD, P. S. Endogenous Nitric Oxide in Cardiovascular Disease and Transplantation. **Journal Annals of Medicine**, v. 27, n. 3, 1995. DOI: <https://doi.org/10.3109/07853899509002593>.
- EFSA, ANS. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. **EFSA Journal**, v. 12, n. 11, p. 3496, 2013.
- EL-NEKEETY, A. A. et al. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. **Toxicol**, v. 57, n. 7-8, p. 984-991, jun. 2011. DOI: 10.1016/j.toxicol.2011.03.021.
- ESSIGMANN, J. M.; CROY, R. G.; BENNETT, R. A.; WOGAN, G. N. Metabolic activation of aflatoxin B1: patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. **Drug Metabolism Reviews**, v. 13, p. 581-602, 1982. DOI: 10.3109/03602538209011088.
- ESTIMA, C. de C. P.; PHILIPPI, S. T.; ALVARENGA, M. Fatores determinantes de consumo alimentar: por que os indivíduos comem o que comem? **Revista brasileira de nutrição clínica**, Porto Alegre, v. 24, n. 4, p. 263-268, 2009. DOI: <http://producao.usp.br/handle/BDPI/14114>.

EVANS, M. D. et al. Aqueous cigarette tar extracts damage human alpha-1-proteinase inhibitor. **Chemico-biological interactions**, v. 79, n. 2, p. 151-164, 1991.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, jan./mar. 1997. PMID 9224995.

FINAMOR, I. A. et al. The Protective Effect of N-Acetylcysteine on Oxidative Stress in the Brain Caused by the Long-Term Intake of Aspartame by Rats. **Neurochemical Research**, v. 39, p. 1681-1690, jun. 2014. DOI: 10.1007/s11064-014-1360-9.

FOLMER, V. et al. High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na⁺/K⁺ -ATPase but not on delta-aminolevulinatase in mice. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 3, p. 333-341, nov. 2004. DOI: 10.1016/j.toxlet.2004.06.002.

FORSHEE, R. A.; STOREY, M. L. Total beverage consumption and beverage choices among children and adolescents. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 54, n. 4, p. 297-307, jul. 2003. DOI: 10.1080/09637480120092143.

FOWLER, S. P. et al. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. **Obesity journal**, v. 16, n. 8, p. 1894-1900, aug. 2008. DOI: 10.1038/oby.2008.284.

FRANÇA, B. K. et al. Lipid peroxidation and obesity: Methods to measure the oxidative stress of the obese patient's plasma. **GE Jornal Português de Gastrenterologia**, v. 20, p. 199-206, sept./oct. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>.

FRANCO, L. D. P. **Dieta hiperlipídica e exercício físico: consequências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica - estudo em modelo animal**. 2007. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

FREITAS, D. G. C.; MORETTI, R. H. Caracterização e avaliação sensorial de barra de cereais funcional de alto teor proteico e vitamínico. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 318-324, 2006. DOI: 10.1590/S0101-20612006000200014.

GAETANI, G. F. et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood Journal**, v. 73, n. 1, p. 334-339, jan. 1989. PMID 2491951.

GARCÍA-ALMEIDA, J. M.; CASADO FDEZ, G. M.; GARCÍA-ALEMÁN, J. A current and global review of sweeteners. Regulatory aspects. **Nutricion Hospitalaria**, v. 28, n. 4, p. 17-31, jul. 2013. DOI: 10.3305/nh.2013.28.sup4.6793.

GLORIEUX, C. et al. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 84-97, 2015.

GOVARIS, A.; ROUSSI, V.; KOIDIS, P. A.; BOTSOGLU, N. A. Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Telemes cheese. **Food Additives & Contaminants**, v. 18, n. 5, p. 437-43, may 2001. DOI: 10.1080/02652030120550.

GREMBECKA, M.; SZEFER, P. Simultaneous determination of caffeine and aspartame in diet supplements and non-alcoholic beverages using liquid-chromatography coupled to Corona CAD and UV-DAD detectors. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1010-1017, 2012. DOI: 10.1007/s12161-011-9334-x.

HALLDORSSON, T. I.; STROM, M.; PETERSEN, S. B.; OLSEN, S. F. Intake of artificially sweetened soft drinks and risk of preterm delivery: A prospective cohort study in 59,334 Danish pregnant women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 626-633, sept. 2010. DOI: 10.3945/ajcn.2009.28968.

HALLIWEL B.; GUTTERIDGE J. **Free Radicals in Biology and medicine**. Nova York: Oxford University Press, 2007. v. 1, p. 851.

HALLIWELL, B. G. J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 617-783.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637-644, mar. 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x.

HUMPHRIES, P.; PRETORIUS, E.; NAUDE, H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 4, p. 451-462, 2008. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1602866.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, oct. 2001. PMID 11567776.

HWANG, C. J. S. A. et al. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. **Science**, v. 257, n. 5076, p. 1496-1502, 1992.

IARC. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IRAC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **World health organization international agency for research on cancer**, França, v. 82, n. 56, p. 171-249, feb. 1993.

IGNARRO, L. J. **Rev. Farm. Bioquim.**, Univ. S. Paulo. 34 (C04), 3. 1998.

JACOB, S. E.; STECHSCHULTE, S. Formaldehyde, aspartame, and migraines: a possible connection. **Dermatitis**, v. 19, n. 3, p. E10-E11, jun. 2008.

JEFCA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Foods Additives. **Evaluation of caertain food additives and contaminants**: seventy-fourth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, 2011.

JOVICIC, M. E. et al. Aging, aluminium and basal forebrain lesions modify substrate kinetics of erythrocyte membrane Na⁺,K⁺-ATPase in the rat. **J Alzheimers Dis**, v. 1, p. 85-93, 2008.

JOHNSON R.J.et al., Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 1, p. 96-116, feb. 2009. DOI: 10.1210/er.2008-0033.

JOSEPH, P. D. et al. **Molecular Toxicology**. 1st ed. New York: Oxford University Press, 1997. p. 152-186.

JORDÃO-JUNIOR, A. A. Urinary excretion and plasma vitamin E levels in patients with AIDS. **Nutrition**, v. 14, n. 5, p. 423-426, may 1998. PMID 9614305.

KANBUR, M. et al. The effects of evening primrose oil on lipid peroxidation induced by subacute aflatoxin exposure in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 1960-1964, sept. 2011. Doi: 10.1016/j.fct.2011.05.006.

KARABACAK, M. et al. Effects of *Tarantula cubensis* D6 on aflatoxin-induced injury in biochemical parameters in rats. **Homeopathy**, v. 104, n. 3, p. 205-210, jul. 2015. DOI: 10.1016/j.homp.2015.02.005.

KINNULA, V. L. et al. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. Laboratory investigation; **A journal of technical methods and pathology**, v. 73, n. 1, p. 3, 1995.

KONG, L. N. et al. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 6, n. 6, p. 66-72, 2005.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003. DOI: 10.1590/S1415-52732003000400007.

KROGER, M.; MEISTER, K.; KAVA, R. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 2, p. 35-47, 2006.

LAVIN, J. H.; FRENCH, S. J.; READ, N. W. The effect of sucrose- and aspartame sweetened drinks on energy intake, hunger and food choice of female, moderately restrained eaters. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v. 21, p. 37-42, jan. 1997. PMID 9023599.

LEBDA, M. A.; SADEK, K. M.; EL-SAYED, Y. S. Aspartame and Soft Drink-Mediated Neurotoxicity in Rats: Implication of Oxidative Stress, Apoptotic Signaling Pathways, Electrolytes and Hormonal Levels. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 5, p. 1639-1647, oct. 2017. DOI: 10.1007/s11011-017-0052-y.

LEE, H. J.; RYU, D. Advances in Mycotoxin Research: Public Health Perspectives. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, oct. 2015. DOI: 10.1111/1750-3841.13156.

LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. **Guelph: University Books**, 1995. p. 352.

LEZAK, K. R.; MISSIG, G.; CARLEZON, W. A. JR. Behavioral methods to study anxiety in rodents. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 19, n. 2, p. 181-191, jun. 2017.

LESAGE, J. et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. **Journal of Endocrinology**, v. 181, n. 2, p. 291-296, may 2004. PMID 15128277.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-126, jul. 2010. DOI: 10.4103/0973-7847.70902.

LUSHCHAK, O. V. et al. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, n. 7, p. 932-937, aug. 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.04.045.

MAGNUSON, B. A. et al. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, n. 8, p. 629-727, 2007. DOI: 10.1080/10408440701516184.

MAIA, J. T. L. S.; SAKATA, R. A. P.; SABBAG, S. P. Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 1477-1498, 2011.

MALIK, V. S. et al. Sugar-sweetened beverages, obesity, Type 2 Diabetes Mellitus, and cardiovascular disease risk. **Journal American Heart Association Circulation**, v. 121, p.1356-1364, mar. 2010. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876185.

MALIK, V. S.; SCHULZE, M. B.; HU, F. B. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 2, p. 274-288, aug. 2006. PMID 16895873.

MALMANN, C. A.; DILKIN, P. Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos. Santa Maria, RS: Sociedade Vicente Pallotti, 2007. v. 1, p. 31-73.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, aug. 2013. DOI: org/10.1016/j.fct.2013.07.047.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Review**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORETTI, M.; COLLA, A.; DE OLIVEIRA BALEN, G.; DOS SANTOS, D. B.; BUDNI, J.; DE FREITAS, A. E.; FARINA, M.; SEVERO RODRIGUES, A. L. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr**, v. 46, p. 331-340, 2012. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2011.11.009.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577-586, oct. 2005. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.

MATTES, R. Effects of aspartame and sucrose on hunger and energy intake in humans. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 6, p. 1037-1044, jun. 1990. PMID: 2395908.

MATTES, R. D.; POPKIN, B. M. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms1-3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p. 1-14, 2009. DOI: 10.3945/ajcn.2008.26792.

MAZUR, R. H.; GOLDKAMP, A. H.; JAMES, P. A. SCHLATTER, J. M. Structure-taste relationships of aspartic acid amides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 1217-1221, nov. 1970. PMID 5479870.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 711-760, 1983.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 294-299, jan. 2010. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.047.

MOLINA, A. M. et al. High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solidphase extraction on-line coupled to laser-induced fluorescence screening and determination by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 7, p.1115-1125, feb. 2009. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.049.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. Mycotoxins: An underhand food problem. **Methods in Molecular Biology**, v. 1542, p. 3-12, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-6707-0_1.

MOURAD, N.; NOOR, A. Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 4-10, apr. 2011.

MURPHY, P. A. H.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, dec. 2001. PMID 11728801.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxins in foodstuffs: current concepts on mechanisms of toxicity and its involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997. DOI: org/10.1590/S0034-89101997000400011.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 112-117, jul. 2005. DOI: 10.1016/j.etap.2004.11.002.

PEARSON, N. et al. Clustering and correlates of screen-time and eating behaviours among young adolescents. **Bio Med Central Public Health**, v. 31, n. 533, p. 17, 2017. DOI: 10.1186/s12889-017-4441-2.

PERRY, J. J. P. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 245-262, 2010.

PEREGRINO, A. Ansiedade Normal e Patológica. **J Bras Psiquiat**, v. 45, n. 3, p. 129-134, 1996.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, p. 96-136, jan. 2014. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.01.005.

PETERS, J. et al. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. **PLOS ONE: accelerating the publication of peer-reviewed science**, v. 12, n. 10, p. e0185887, oct. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0185887.

PHILIPPI, S. T. **Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2014.

PIERCE, J. D.; CACKLER, A. B.; ARNETT, M. G. Why should you care about free radicals? **RN Journal**, v. 67, p. 38-42, 2004. PMID: 14979192.

PIRES, A. S. S. **Citotoxicidade da vitamina C em células tumorais – Estudos in vitro e in vivo através de métodos bioquímicos e de imagiologia nuclear**. 2008. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

PITT, J. I.; TOMASKA, L. Are mycotoxins a health hazard in Australia? **Australian Institute of Food Science**, v. 53, n. 12, p. 545-559, 2001.

PITT, J. I.; MILLER, J. D. A Concise History of Mycotoxin Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, n. 65, p. 7021-7033, aug. 2016. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04494.

PORIKOS, K. P.; HESSER, M. F.; VAN ITALLIE, T. B. Caloric regulation in normal-weight men maintained on a palatable diet of conventional foods. **Physiology & Behavior**, v. 29, p. 293-300, aug. 1982. PMID: 7146134.

PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 984-991, may 2009. DOI: 10.1016/j.fct.2007.10.005.

PRASAD, A. S. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 3, p. 837-844, mar. 2007. PMID 17344507.

RABEN, A.; VASILARAS, T. H.; MOLLER, A. C.; ASTRUP, A. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 4, p. 721-729, oct. 2002. PMID: 12324283.

RASFF. Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Reports, 2011. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/1599_rasff_publications_en.htm>. Acesso em: 10 de Dezembro 2019.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. 2015 annual report. European Commission. **Health and Food Safety**, 2015. p. 22-24. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm>. Acesso em: 13 jan. 2020.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. 2015 annual report. European Commission. **Health and Food Safety**, 2018. p. 26-53. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2018.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2020.

RAVINAYAGAM, V. et al. Potential Antioxidant Role of Tridham in Managing Oxidative Stress against Aflatoxin-B (1)-Induced Experimental Hepatocellular Carcinoma. **International Journal of Hepatology**, v. 2012, p. 428373, oct. 2012. DOI: 10.1155/2012/428373.

RAHMAN, K. S. M.; BANAT, I. M.; THAHIRA, J.; THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of Gasoline contaminated soil by a

bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technol**, v. 81, p. 25-32, 2002.

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. **Toxins**, v. 4, n. 9, p. 663-675, sept. 2012. DOI: 10.3390/toxins4090663.

RODRIGUES, N. R. D. **Medidas de indicadores de estresse oxidativo e de remodelamento cardíaco em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental durante o desenvolvimento embrionário pós-natal**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ROGERS, P. J.; PLEMING, H. C.; BLUNDELL, J. E. Aspartame ingested without tasting inhibits hunger and food intake. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 6, p. 1239-1243, jun. 1990. PMID: 2395929.

ROLLS, B. J. Effects of intense sweeteners on hunger, food intake, and body weight: a review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 872-878, apr. 1991. PMID: 2008866.

ROTRUCK, J. T. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, p. 588-590, 1972.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.

RYCERZ, K.; JAWORSKA-ADAMU, J. E. Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. **Folia Neuropathologica**, v. 51, n. 1, p. 10-17, 2013. PMID 23553132.

SACRAMENTO, T. R. The Importance of Food Contamination by Aflatoxins for Liver Cancer Incidence. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, jan./jun. 2016.

SATO, T. et al. Effects of steroid hormones on (Na⁺, K⁺)-ATPase activity inhibition-induced amnesia on the step-through passive avoidance task in gonadectomized mice. **Pharmacological Research**, v. 49, p. 151-159, feb. 2004. PMID 14643695.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 295-301, oct. 2003. PMID 12927561.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9, p. 916-921, 1999.

SIES, H.; MOSS, K. M. A Role of Mitochondrial Glutathione Peroxidase in Modulating Mitochondrial Oxidations in Liver. **European Journal of Biochemistry**, v. 84, n. 2, p. 377-383, 1978.

SCHATZMAYR, G.; STREIT, E. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. **World Mycotoxin Journal**, v. 6, n. 3, p. 213-222, aug. 2013. DOI: 10.3920/WMJ2013.1572.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicales libres de oxígeno y ejercicio: mecanismos de formación y adaptación al entrenamiento. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 10, p. 308-313, 2004. DOI: org/10.1590/S1517-86922004000400008.

SHEPHARD, G. et al. Exposure assessment for fumonisins in the former Transkei region of South Africa. **Food Additives & Contaminants**, v. 24, n. 6, p. 621-629, jun. 2007. DOI: 10.1080/02652030601101136.

SEN, S. et al. Maintenance of higher H₂O₂ levels, and its mechanism of action to induce growth in breast cancer cells: important roles of bioactive catalase and PP2A. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 8, p. 1541-1551, 2012.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, 2014. ISSN 2317-6660.

SOUTO, N. S. et al. Aflatoxin B1 reduces non-enzymatic antioxidant defenses and increases protein kinase C activation in the cerebral cortex of young rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 24, p. 1-8, jan. 2017. DOI: 10.1080/1028415X.2017.1278837.

SLOT, J. W. et al. Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 55, n. 3, p. 363-371, 1986.

SPANEL, P.; DRYAHINA, K.; VICHERKOVA, P.; SMITH, D. Increase of methanol in exhaled breath quantified by SIFT-MS following aspartame ingestion. **Journal of Breath Research**, v. 9, n. 4, p. 047104, nov. 2015. DOI: 10.1088/1752-7155/9/4/047104.

STAHL, G. et al. Programmed +1 translational frameshifting in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* results from disruption of translational error correction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 66, p. 249-58, 2001.

STEGINK, L. D. The aspartame story: a model for the clinical testing of a food additive. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, n. 1, p. 204-215, jul. 1984. PMID 3300262.

STELATO, M. et al., Fungi contamination in cereal bars commercialized. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 285-290, set. 2010.

STELLMAN, S. D.; GARFINKEL, L. Artificial sweetener use and one-year weight change among women. **Preventive medicine**, v. 15, p. 195-202, 1986. PMID 3714671.

STORY, M.; KAPHINGST, K. M.; ROBINSON-O'BRIEN, R.; GLANZ, K. Creating healthy food and eating environments: policy and environmental approaches. **Annual Review of Public Health**, v. 29, p. 253-272, 2008. DOI: 10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090926.

STORY, M.; NEWMARK-SZTAINER, D.; FRENCH, S. Individual and environmental influences on adolescent eating behaviours. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, n. 3, p. S40-S51, 2002. PMID: 11902388.

- STRIEGEL-MOORE, R. H. et al. Correlates of beverage intake in adolescent girls: the National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. **Journal of Pediatrics**, v. 148, n. 2, p. 183-187, feb. 2006. DOI: 10.1016/j.jpeds.2005.11.025.
- STROSNIDER, H. et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1898-1903, dec. 2006. PMID: 1764136.
- SWITHERS, S. E.; DAVIDSON, T. L. A role for sweet taste: Calorie predictive relations in energy regulation by rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 1, p. 161-173, feb. 2008. DOI: 10.1037/0735-7044.122.1.161.
- SWITHERS, S. E.; BAKER, C. R.; DAVIDSON, T. L. General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 123, n. 4, p. 772-780, aug. 2009. DOI: 10.1037/a0016139.
- SYLVETSKY, A. C. et al. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 640-646, jun. 2012. DOI: 10.3945/ajcn.112.034751.
- TSANG, C. K. et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nature communications**, v. 5, 2014.
- TE MORENGA, L.; MALLARD, S.; MANN, J. Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. **British medical journal**, v. 346, p. 7492, jan. 2012. DOI: 10.1136/bmj.e7492.
- THOMAS, A. E. et al. Toxicity of aflatoxins from selected consumables in Lagos (Nigeria). **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 1111-1116, 2005.
- TOLEDO, M. C.; IOSHI, S. H. Potential intake of intense sweeteners in Brazil. **Food Additives & Contaminants**, v. 12, n. 6, p. 799-808, nov./dez. 1995. DOI: 10.1080/02652039509374372.
- TORDOFF, M. G.; ALLEVA, A. M. Oral stimulation with aspartame increases hunger. **Physiology & Behavior**, v. 47, p. 555-559, mar. 1990. PMID: 2359769.
- TORLONI, M. R. et al. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 267-273, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S010072032007000500008>.
- TOWNER, R. A. et al. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 10, p. 1330-1340, nov. 2003. PMID: 14607532.
- TURNER, J. H. Global warmth for Patients with Cancer. **World Journal of Nuclear Medicine**, v. 11, n. 3, p. 103-104, sept. 2012. DOI: 10.4103/1450-1147.103407.
- TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 9, p. 203-222, 1985.

- UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Prog Lipid Res**, v. 42, p. 318-343, jul. 2003. DOI: 10.1016/s0163-7827(03)00014-6.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.
- VAN BAAK, M. A.; ASTRUP, A. Consumption of sugars and body weight. **Obesity Reviews**, v. 1, p. 9-23, mar. 2009. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2008.00561.x.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, feb. 2003. PMID 21782649.
- VAN WYMELBEKE, V.; BERIDOT-THEROND, M. E.; LA GUERONNIERE, V. Influence of repeated consumption of beverages containing sucrose or intense sweeteners on food intake. **European Journal of Clinical Nutrition - Nature**, v. 58, p. 154-161, jan. 2004. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601762.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007. DOI: org/10.1590/S0100-40422007000500046.
- VEGA, J.; DIAZ, J.; SERRANO, E.; CARBONELL, F. Oxidative Stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 30, p. 1782-1786, 2002.
- VIPIN, A. V. et al. Protective effects of phenolics rich extract of ginger against Aflatoxin B1-induced oxidative stress and hepatotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 415-424, apr. 2017. DOI: org/10.1016/j.biopha.2017.04.107.
- WAGNER, C. Critical practicalities in sampling for mycotoxins in feed. **Journal of AOAC international**, v. 98, n. 2, p. 301-308, mar./apr. 2015. DOI: 10.5740/jaoacint.14-235.
- WANG, X. et al. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Aquaculture**, v. 215, n. 10, p. 203-211, jan. 2003. DOI: org/10.1016/S0044-8486(02)00042-X.
- WENZEL, E. **Radicaux libres, antioxydants et nutraceutiques - fenoliques et polyphenoliques vegetaux**. 1. ed. [S.l.]: Editora Unisinos, 2013. p. 262.
- WHO. World Health Organization. **Global Recommendations on Physical Activity for Health, World Health Organization can be obtained from WHO Press**. Geneva: World Health Organization, 2010. 20v. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44399/1/9789241599979_eng.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- WHO. World Health Organization. **The World Health Report 2003: Risks to Health 2003**. Geneva: World Health Organization, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2003/en/whr03_en.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2020.

WHO. World Health Organization/Food and Agriculture Organization (WHO/FAO). **Evaluation of certain food additives and contaminants**: seventy-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: WHO/FAO, 2013.

WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 16, n. 1, p. 1-18, may 1994. PMID 8142473.

WILD, C. P.; MONTESANO, R. A model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. **Cancer Letters**, v. 286, n. 1, p. 22-28, dec. 2009. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.02.053.

WILLIAMS, J. H. et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 5, p. 1106-1122, nov. 2004. PMID: 15531656.

WILLIAMS, R. A.; MAMOTTE, C. D.; BURNETT, J. R. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 12, p. 13, 2008. PMCID: PMC2423317.

WU, F.; KHLANGWISSET, P. Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa: Case studies in biocontrol and postharvest interventions. **Food Additives & Contaminants**, v. 27, n. 4, p. 496-509, apr. 2010. DOI: 10.1080/19440040903437865.

WURTMAN, R. J. Neurochemical changes following high-dose aspartame with dietary carbohydrates. **The New England Journal of Medicine**, v. 309, n. 7, p. 429-430, aug. 1983. DOI: 10.1056/NEJM198308183090710.

WYSE, A. et al. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺, K⁺ -ATPase activity in rats hippocampus. **Physiology & Behavior**, v. 80, p. 475-479, jan. 2004. PMID: 14741232.

WU, D.; YOTNDA; P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. **J. Visualized**, v. 21, n. 57, p. 3357, 2011.

YAGASAKI, M.; HASHIMOTO, S. I. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 13-22, 2008. DOI: 10.1007/s00253-008-1590-3.

YANG, Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 83, n. 2, p. 101-108, 2010. PMCID: PMC2892765.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da associação da aflatoxina B1 com aspartame em parâmetros bioquímicos e cognitivos em ratos", protocolada sob o CEUA nº 3403220317, sob a responsabilidade de **Ana Flávia Furian e equipe; Ana Claudia Monteiro Braga; Micheli Dassi; Naieli Schiefelbein Souto; Marina Venturini Copetti** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 27/04/2017.

We certify that the proposal "Effects of the association of aflatoxin B1 with aspartame on biochemical and cognitive parameters in rats", utilizing 179 Heterogenics rats (179 males), protocol number CEUA 3403220317, under the responsibility of **Ana Flávia Furian and team; Ana Claudia Monteiro Braga; Micheli Dassi; Naieli Schiefelbein Souto; Marina Venturini Copetti** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 04/27/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2017** a **03/2020**

Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 23 dias**

N: **179**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **40 a 50 g**

Resumo: As micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de fungos, sendo conceituadas como compostos não-essenciais ao desenvolvimento fúngico, formadas no estágio final da fase exponencial de crescimento. São produzidas por diversos gêneros de fungos, que contaminam produtos agrícolas em toda cadeia de produção alimentar desde o campo, colheita, transporte e armazenamento. As condições de pré e pós-colheita e os cultivos determinam o crescimento de gêneros específicos de fungos. Os mais importantes gêneros fúngicos produtores de micotoxinas são os *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* e *Fusarium*. Quando produzidos em associação com alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicose. Entre as diversas micotoxinas, a aflatoxina B1 (AFB1) apresenta o maior potencial tóxico, é comumente encontrada em uma variedade de alimentos como o milho e outros tipos de culturas, especialmente durante o processo de produção, colheita, armazenamento ou processamento. O consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas afeta negativamente até 5 bilhões de pessoas que vivem em climas quentes e úmidos. Sendo classificada como um carcinógeno para humanos do grupo 1 pela Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer (IARC). A AFB1 é metabolizada no fígado, pela ação de enzimas do citocromo P-450 à um metabólito 8,9 epóxido, o qual reage com macromoléculas celulares, incluindo proteínas, RNA e DNA, alterando o metabolismo celular, e assim pode provocar câncer principalmente no fígado, por agir dessa forma ela altera parâmetros hematológicos e promove um desequilíbrio no sistema oxidativo, especialmente nas enzimas antioxidantes. Além da sua ação a nível periférico, há grande necessidade de estudos dos seus efeitos no sistema nervoso central. Os adoçantes são substâncias utilizadas como substitutos da sacarose, são utilizados em mais de 90 países. São constituintes de muitos alimentos mais de 6000, dentre eles podemos destacar alimentos constituídos de cereais (pães, bolachas, cereais matinais). Dentre estes compostos, destacamos o Aspartame (ASP), que foi descoberto em 1965 por James Schlatter, pesquisador dos Laboratórios de G. D. Searle (empresa farmacêutica) nos Estados Unidos. Foi desenvolvido por acaso na tentativa de se encontrar um novo medicamento para o tratamento da úlcera, mas seu consumo só foi liberado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1981, após a realização de diversos estudos toxicológicos. No Brasil, o livre comércio de dietéticos, entre eles os que continham aspartame, foi autorizado em 1988. O ASP é conhecido comercialmente como [Zero Cal], é N-L-alfa-aspartil-L-fenilalanina-1-metil-éster, um dipeptídeo esterificado sintético, composto pelos aminoácidos ácido aspártico e fenilalanina, sendo 200 vezes mais doce que a sacarose. O ASP é metabolizado no trato gastrointestinal em 50% de fenilalanina, 40% de ácido aspártico e 10% de metanol. Os produtos de degradação, D-fenilalanina, ácido d-aspártico e metanol podem ser formados por exposição ao calor, durante o transporte, cozadura em alimentos e bebidas. De todos os metabólitos do ASP, o metanol é o mais tóxico e provoca toxicidade sistêmica no fígado. O metanol é oxidado para formaldeído, depois para ácido fórmico e finalmente para água e CO₂. Portanto, durante o metabolismo do metanol, o nível de NADH é elevado, o que leva à formação de radical aniônico superóxido (O₂⁻). Os metabólitos do metanol reagem com a citocromo c oxidase nas mitocôndrias, causam danos que resultam em um aumento da produção de radicais de oxigênio. Estudos clínicos demonstram que a



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

administração de ASP é responsável por distúrbios neurológicos e comportamentais. Já foi demonstrado que seu uso crônico pode contribuir para reações de hipersensibilidade e aterosclerose. O mecanismo de toxicidade baseia-se principalmente na indução de estresse oxidativo, uma vez que pode atuar em diferentes tecidos, desta forma, existe uma grande preocupação em relação a se estudar os efeitos colaterais do consumo do ASP, bem como os reais níveis de segurança. Atualmente existe um incentivo muito grande ao consumo de alimentos ricos em cereais e com baixo teor de açúcar, no entanto deve-se levar em consideração o risco de contaminação dos cereais por micotoxinas e a possível toxicidade causada pela ingestão excessiva de adoçantes, uma vez que a associação de cereais e adoçantes é comum nos alimentos que compõem a nossa dieta, desta forma existe a necessidade de estudos que possam avaliar a segurança e os possíveis danos ao organismo. Portanto, o objetivo do nosso trabalho será avaliar o efeito causado por exposições a AFB1 (250 µg/kg, v.o.) e/ou Aspartame (75mg/kg, v.o.), por 7 dias. Após os tratamentos serão realizados testes comportamentais a fim de avaliar parâmetros de locomoção, ansiedade, aprendizado, memória e depressão (teste de campo aberto, reconhecimento de objetos, teste de bolinhas enterradas (murple burying), teste de construção do ninho e teste da borrifagem da sacarose (splash)). Após os testes comportamentais, serão analisados parâmetros bioquímicos no fígado, rins, pulmão, baço e córtex cerebral. Serão quantificados parâmetros de estresse oxidativo, através da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona-S-transferase (GST). Também vamos quantificar a carbonilação proteica e níveis de 3-nitrotirosina, a atividade da enzima Na⁺/K⁺ ATPase, determinação de ácido ascórbico, determinação de tióis não-proteicos (NPSH), determinação do poder antioxidante usando ferro reduzido (FRAP) e avaliação da peroxidação lipídica pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como alterações na morfologia dos tecidos, e imunorreatividade da proteína quinase A (PKA-Ser96) e proteína quinase C (PKC-Ser957). Os resultados obtidos permitirão uma visão mais ampla dos efeitos da AFB1 combinada com o ASP.

Local do experimento: prédio 21, sala 5219

Santa Maria, 02 de maio de 2017

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria