

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Alice Rosa da Silveira

**EFEITO DO BETA-CARIOFILENO NA SUSCETIBILIDADE
HEPÁTICA E RENAL À AFLATOXINA B1 EM PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS, OXIDATIVOS E MOLECULARES EM RATOS**

Santa Maria, RS
2021

Alice Rosa da Silveira

**EFEITO DO BETA-CARIOFILENO NA SUSCETIBILIDADE HEPÁTICA E RENAL
À AFLATOXINA B1 EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, OXIDATIVOS E
MOLECULARES EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Toxicologia e Nutracêutica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

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

Santa Maria, RS
2021

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

da Silveira, Alice
EFEITO DO BETA-CARIOFILENO NA SUSCETIBILIDADE
HEPÁTICA E RENAL À AFLATOXINA B1 EM PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS, OXIDATIVOS E MOLECULARES EM RATOS / Alice
da Silveira.- 2021.
103 p.; 30 cm

Orientadora: Ana Flávia Furian
Coorientador: Mauro Schneider Oliveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2021

1. Micotoxinas 2. Keap1/Nrf2 3. Estresse oxidativo 4.
Toxicidade hepatorenal 5. Beta-cariofileno I. Furian,
Ana Flávia II. Schneider Oliveira, Mauro III. 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, ALICE DA SILVEIRA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) 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.

Alice Rosa da Silveira

**EFEITO DO BETA-CARIOFILENO NA SUSCETIBILIDADE HEPÁTICA E RENAL
À AFLATOXINA B1 EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, OXIDATIVOS E
MOLECULARES EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Toxicologia e Nutracêutica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 13 de agosto de 2021:

Ana Flávia Furian

Ana Flávia Furian Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Furian

Silvana Peterini Boeira Dra. (Unipampa)

Ethel Antunes Wilhelm

Ethel Antunes Wilhelm Dra. (UFPeI)

Santa Maria, RS
2021

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista aos meus pais, Glaucia e Daltro. O amor, o incentivo e o apoio que sempre me forneceram foram fundamentais para essa realização.

AGRADECIMENTOS

Expresso a minha gratidão a todos que me auxiliaram nessa trajetória, em especial, agradeço:

–À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade de desenvolver e concretizar esse estudo;

–À CAPES e aos outros órgãos de fomento pelo suporte financeiro;

–A minha orientadora, Ana Flávia Furian, pela oportunidade concedida de fazer parte de seu grupo de pesquisa, por ter me recebido de forma tão acolhedora, pela confiança no meu trabalho e pelos conhecimentos científicos transmitidos;

–Ao Marcel, por ter sido incansável em me ajudar, sempre disponível e dedicado. Tu és um exemplo de profissional e de ser humano. Agradeço pela paciência, atenção e incentivo;

–A Érica, minha companheira de laboratório, que partilhou comigo os perrengues, as inseguranças e as inquietações da vida acadêmica e da vida pessoal. Agradeço pelo companheirismo e pelo bom humor durante essa trajetória;

–A Jamila, nossa colega de laboratório LAFARMT, pelo auxílio nos experimentos e pelos momentos de descontração;

–Aos meus colegas do laboratório LABNEURO, especialmente a Tuane, pela convivência, ensinamentos e auxílio;

–Ao professor Mauro Oliveira, por ter partilhado o seu laboratório LABNEURO e pelos ensinamentos;

–À professora Cristina Wayne Nogueira, por ter compartilhado o espaço do seu laboratório inúmeras vezes, com imensa hospitalidade e estima;

–Aos meus pais, Glaucia e Daltro, por me apoiarem em todos os momentos de minha vida, me encorajando a ir em frente e por sempre tentarem aliviar minhas incertezas e medos. Vocês são a minha fortaleza e meu exemplo de determinação. Amo vocês!

–Ao meu amor, Gabriel Cadore, meu ponto de paz e equilíbrio. Agradeço pela paciência e pelo cuidado que tens comigo, por me ajudar a encontrar as soluções para as minhas angústias, por ser o meu parceiro e por preencher o meu coração de amor. Eu te amo!

–A minha cachorrinha, Lorena, que por mais que não compreenda tais agradecimentos, foi minha fiel companheira e me proporcionou inúmeras alegrias;

–As minhas amigas, Amanda, Dienis, Tacieli, Natieli, Gabriela, Fernanda e Diulia que estão sempre ao meu lado e fizeram essa jornada ser mais leve, descontraída e feliz;

Enfim, agradeço a Deus pela companhia permanente e pelo alento fornecido nos dias difíceis e a todos àqueles que fazem parte da minha vida, agradeço e compartilho esta conquista.

RESUMO

EFEITO DO BETA-CARIOFILENO NA SUSCETIBILIDADE HEPÁTICA E RENAL À AFLATOXINA B1 EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, OXIDATIVOS E MOLECULARES EM RATOS

AUTORA: Alice Rosa da Silveira
ORIENTADOR: Ana Flávia Furian

A Aflatoxina B1 (AFB₁) é uma micotoxina produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Entre as micotoxinas existentes, a AFB₁ tem sido a mais estudada devido ao seu elevado potencial toxigênico. A exposição a AFB₁ promove um desequilíbrio no sistema oxidativo e inflamatório, implicando em danos a diferentes órgãos. Ainda não existem intervenções terapêuticas registradas contra a sua toxicidade. Nesse contexto, compostos bioativos que poderiam ser consumidos naturalmente nas mesmas refeições em que se encontra a contaminação por AFB₁ constituem uma estratégia promissora a ser estudada para a redução dos efeitos nocivos à saúde causados pela micotoxina. Desta forma, o presente estudo investigou os efeitos benéficos do Beta-cariofileno (BCF) contra a toxicidade da AFB₁ nos tecidos hepáticos e renais, em parâmetros bioquímicos para avaliar a função orgânica, oxidação tecidual e o imunoconteúdo de proteínas de vias celulares envolvidas com mecanismos antioxidantes e inflamatórios. Para este propósito, ratos *Wistar* machos foram divididos em quatro grupos: controle; AFB₁ (250 µg/kg, i.g.); BCF (100 mg/kg, i.p.) e grupo AFB₁ + BCF. Os animais foram tratados durante 14 dias, conforme aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria – Anexo A. Os resultados mostraram que a exposição ao AFB₁ causou toxicidade seletiva ao tecido hepático, uma vez que não houve alterações significativas nos parâmetros renais mensurados. Nesse sentido, AFB₁ aumentou biomarcadores de lesão hepática (gama glutamil transferase – GGT e fosfatase alcalina – FAL) e reduziu os níveis das defesas antioxidantes não enzimáticas (ácido ascórbico e tiol não proteico), porém não causou alterações nos níveis de peroxidação lipídica. Além disso, AFB₁ interferiu na via oxidativa regulada pela proteína associada a ECH semelhante a Kelch (Keap1)/fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), aumentando a atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST). Por último, foi observado um efeito significativo da AFB₁ causando aumento no imunoconteúdo da interleucina 1 beta total (IL-1β). Notavelmente, o tratamento associado de AFB₁ + BCF atenuou os parâmetros alterados pela micotoxina. Ainda, os grupos BCF e AFB₁ + BCF mostraram um aumento nos níveis do quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade beta (IKKβ). Portanto, o consumo frequente dessas substâncias em associação, bem como os efeitos do tratamento associado de AFB₁ + BCF apresentados nesse estudo, reforçam o papel terapêutico da biomolécula contra a toxicidade hepática induzida por AFB₁. Considerando o exposto, mais pesquisas são necessárias para complementar nossos resultados.

Palavras-chave: Micotoxinas. Keap1/Nrf2. Estresse oxidativo. Toxicidade hepatorenal. Beta-cariofileno. Roedores.

ABSTRACT

EFFECT OF BETA-CARYOPHYLLENE ON LIVER AND RENAL SUSCEPTIBILITY TO AFLATOXIN B1 IN BIOCHEMICAL, OXIDATIVE AND MOLECULAR PARAMETERS IN RATS

AUTHOR: Alice Rosa da Silveira

ADVISOR: Ana Flávia Furian

Aflatoxin B1 (AFB₁) is a mycotoxin produced mainly by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* fungi. Among the existing mycotoxins, AFB₁ has been the most studied due to its high toxigenic potential. Exposure to AFB₁ promotes an imbalance in the oxidative and inflammatory system, resulting in damage to different organs. There are still no registered therapeutic interventions against its toxicity. In this context, bioactive compounds that could be consumed naturally in the same meals as the AFB₁ contamination is a promising strategy to be studied to reduce the harmful health effects caused by mycotoxin. Thus, the present study investigated the beneficial effects of Beta-caryophyllene (BCP), against AFB₁ toxicity in liver and kidney tissues, on biochemical parameters to assess the organ function, tissue oxidation and the immunoccontent of cellular pathway proteins involved in antioxidants and inflammatory mechanisms. For this purpose, male Wistar rats were divided into four groups: control; AFB₁ (250 µg/kg, i.g.); BCP (100 mg/kg, i.p.) and AFB₁ + BCP group. The animals were treated for 14 days, as approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Santa Maria – Annex A. The results showed that exposure to AFB₁ caused selective toxicity on the liver tissue, since there were no significant changes in the measured renal parameters. In this sense, AFB₁ increased liver injury biomarkers (gamma glutamyl transferase – GGT and alkaline phosphatase – ALP) and reduced levels of non-enzymatic antioxidant defenses (ascorbic acid and non-protein thiol), however did not cause changes in lipid peroxidation levels. Moreover, AFB₁ interfered in oxidative pathway regulated by the Kelch-like ECH-associated protein (Keap1)/ nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), overacting Glutathione-S-Transferase (GST) activity. Lastly, a main effect of AFB₁ on the total interleukin 1 beta (IL-1β) was observed. Remarkably, the associated treatment of AFB₁ + BCP improved altered parameters by the mycotoxin. In addition, the BCP and AFB₁ + BCP groups showed an increase in the levels of kinase inhibitor of nuclear factor kappa-B subunit beta (IKKβ). Therefore, the frequent consumption of these substances in combination, as well as the effects of AFB₁ + BCP treatment presented in this study, reinforce the therapeutic role of the biomolecule against AFB₁-induced liver toxicity. In view of this, more research is needed to complement our results.

Keywords: Mycotoxins. Keap1/Nrf2. Oxidative stress. Hepatorenal toxicity. Beta-caryophyllene. Rodents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Categoria de produtos notificados pelo Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF) por contaminação por micotoxinas (1979 – 2017).....	18
Figura 2 – Categorias de risco notificadas no RASFF de 2000 a 2017.....	22
Figura 3 – Número total de notificações no RASFF para micotoxinas por ano em produtos alimentícios de todos os países (2010 – 2019).	23
Figura 4 – Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 e M2. O núcleo central cumarínico está destacado em azul e a estrutura bi-furanoide, em vermelho.	24
Figura 5 – Frequência (a) e níveis máximos (b) de AFB ₁ relatados em múltiplos estudos. As barras de erro são expressas como desvio padrão. Os valores exibidos acima das barras representam o número de estudos que avaliaram cada produto.....	27
Figura 6 – Estrutura química da AFB ₁ . A ligação dupla C ₈ - C ₉ está destacada em azul e a ligação lactona, em vermelho.	29
Figura 7 – Vias metabólicas da AFB ₁ . Os processos que levam a toxicidade estão em vermelho e os que levam a desintoxicação, em azul.	30
Figura 8 – Vias de ativação metabólica da AFB ₁ que levam à formação de adutos de DNA.	31
Figura 9 – Modelo esquemático da via de sinalização Keap1/Nrf2.	38
Figura 10 – Modelo esquemático da via de sinalização IKK/NF-κB.	39
Figura 11 – Estrutura química do BCF.....	42
Figura 12 – Metabolismo do BCF em coelhos.	46
Figura 13 – Locais para ação antioxidante do BCF.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais micotoxinas e seus efeitos relatados em modelos experimentais.	18
Tabela 2 – Principais micotoxinas e LMT pelos EUA e pela UE em diferentes produtos alimentícios.....	19
Tabela 3 – LMT de micotoxinas no Brasil.	20
Tabela 4 – Relatórios de ocorrência de AFB ₁ em produtos alimentícios (2008-2018).....	26

LISTA DE SÍMBOLOS

GGT	Gama glutamil transferase
AFB ₁	Aflatoxina B1
AFB ₁ -FAPY	8,9-di-hidro-8- (N5-formil-20, 50, 60-triamino-4-oxo-N5-pirimidil)-9-hidroxi-AFB ₁
AFB ₁ -N 7-guanina	AFB ₁ -N 7 -guanina-4-8-(N7-guanil)-9-hidroxi-AFB ₁
AFBO	AFB ₁ -8,9-epóxido
ALARA	Tão baixo quanto razoavelmente possível
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BCF	Beta-cariofileno
CAT	Catalase
CB ₁	Receptores canabinoides do tipo 1
CB ₂	Receptores canabinoides do tipo 2
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CYP	Citocromo P
DL ₅₀	Dose letal 50
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FAL	Fosfatase alcalina
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
GHS	Glutationa reduzida
GPx	Glutationa peroxidase
GST	Glutationa-S-transferases
i.g.	Via intragástrica
i.p.	Via intraperitoneal
I κ B	Elemento inibitório
IKK β	Quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade beta
IL-1 β	Interleucina 1 beta
Keap1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
LMT	Limite máximo tolerado

MDA	Malondialdeído
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NOAEL	Nível sem efeitos adversos
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
ON [•]	Óxido nítrico
RASFF	Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações
RLs	Radicais livres
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UE	União Europeia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo geral.....	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 MICOTOXINAS	16
2.2 AFLATOXINAS	23
2.3 AFLATOXINA B1	25
2.3.1 Incidência em matrizes alimentares.....	25
2.3.2 Toxicocinética e toxicodinâmica.....	28
2.3.3 Aspectos epidemiológicos da toxicidade da AFB ₁	32
2.3.4 Metabolismo oxidativo	34
2.3.4.1 <i>Metabolismo inflamatório associado ao estresse oxidativo</i>	39
2.3.5 Abordagem terapêutica de aflatoxicoses	41
2.4 BETA-CARIOFILENO.....	41
2.4.1 Avaliação de segurança	43
2.4.2 Farmacocinética e farmacodinâmica	45
2.4.2.1 <i>Efeito antioxidante e anti-inflamatório</i>	47
3 MANUSCRITO	50
4 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	84
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	103

1 INTRODUÇÃO

Desde o plantio até o momento do consumo, os alimentos estão sujeitos à contaminação por diversas substâncias altamente tóxicas. Essas contaminações representam não somente problemas na qualidade dos produtos finais, como também podem causar diversos transtornos ao organismo do homem e dos animais (NERÍN; AZNAR; CARRIZO, 2016; WAN; CHEN; RAO, 2020). Dentre as diferentes substâncias com potencial para provocar problemas pela ingestão de alimentos contaminados estão os fungos e seus metabólitos secundários, as micotoxinas (PATRIARCA; FERNÁNDEZ PINTO, 2017). Atualmente estima-se que cerca de 75% de todos os grãos do mundo estejam contaminados por alguma micotoxina, o que representa um sério problema para saúde pública (LEE; RYU, 2017).

Dentre as centenas de micotoxinas existentes, as aflatoxinas B₁ (AFB₁) recebem destaque por serem as de maior recorrência em matrizes alimentares relevantes ao consumo humano e também por sua alta toxicidade (ALSHANNAQ; YU, 2021). São produzidas, em sua maioria, pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, os quais colonizam diversas matrizes alimentares como cereais, sementes oleaginosas e especiarias. Devido às características que lhes conferem resistência, as AFB₁ também podem permanecer em alimentos industrializados derivados dos supracitados (RUSHING; SELIM, 2019).

A toxicidade da AFB₁ está relacionada a sua biotransformação hepática. Após a ingestão de alimentos contaminados, a AFB₁ é absorvida no trato gastrointestinal e posteriormente metabolizada para gerar metabólito AFB₁-exo-8,9-epóxido (AFBO), o qual é capaz de reagir espontaneamente com aminas biológicas em proteínas e ácidos nucleicos, induzindo a produção de mediadores inflamatórios e promovendo estresse oxidativo (ESSIGMANN et al., 1982; FAN; XIE; MA, 2021). Esse desequilíbrio fisiológico é descrito por ser um dos mecanismos subjacentes aos efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos induzidos pela AFB₁ (ABDEL-DAIM et al., 2021; MARIN; TARANU, 2012;).

Com base em inúmeras evidências sobre sua toxicidade, AFB₁ foi classificada no grupo 1 de toxicidade como um carcinógeno humano (IARC, 1993). Além disso, a micotoxina é um dos hepatocarcinógenos mais potentes, sendo considerada o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares (ALPERT et al., 1971; ZHANG et al., 2017; ZHU et al., 2021). Mesmo com isso, ainda não existem intervenções terapêuticas registradas capazes de controlar seus efeitos tóxicos. Nesse sentido, sendo o distúrbio no sistema antioxidante/inflamatório um dos principais processos associados aos danos à saúde

causados pela AFB₁, substâncias capazes de estabilizar o status redox celular têm importância na proteção de indivíduos expostos à micotoxina (MARIN; TARANU, 2012).

Desse modo, os sesquiterpenos são um grupo de compostos bioativos presentes em uma grande variedade de alimentos de origem vegetal e geralmente exibem diferentes propriedades benéficas à saúde. O Beta-cariofileno (BCF) pertence a esse grupo de terpenos e faz parte da composição de alimentos tradicionalmente consumidos, como especiarias, temperos, bebidas alcoólicas, chás, entre outros (CALLEJA et al., 2013; KUMAWAT; KAUR, 2020).

O BCF foi descrito por desempenhar múltiplos efeitos terapêuticos que incluem a modulação de alvos moleculares em diferentes condições patológicas. Possui propriedades regulatórias de genes envolvidos nas defesas antioxidantes e estresse oxidativo, além de possuir efeito anti-inflamatório e capacidade de desintoxicação xenobiótica descritas na literatura (FRANCOMANO et al., 2019; LI et al., 2020; SOTO et al., 2021). Além disso, foi aprovado como aditivo alimentar em diversos países por não apresentar nenhuma preocupação de segurança sob suas condições de uso (SHARMA et al., 2016).

Assim, considerando os efeitos benéficos, o seu perfil de segurança e a possibilidade de ser consumido nas mesmas refeições em que se encontra a contaminação pela micotoxina, o BCF é um candidato promissor a ser estudado como agente terapêutico para o controle dos efeitos nocivos à saúde causados pela AFB₁.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o possível efeito protetor do BCF frente à toxicidade hepática e renal induzida por exposição à AFB₁ em ratos, através de ensaios bioquímicos, oxidativos e moleculares.

1.1.2 Objetivos específicos

a) Analisar se o tratamento com BCF modifica parâmetros de toxicidade através da determinação do peso corporal e peso absoluto e relativo dos órgãos dos animais expostos à AFB₁.

b) Avaliar se o tratamento com BCF altera marcadores plasmáticos de função hepática (fosfatase alcalina – FAL, gama glutamil transferase – GGT) e renal (ureia e creatinina) dos animais expostos à AFB₁.

c) Analisar se o tratamento com BCF altera marcadores de estresse oxidativo, através de técnicas bioquímicas (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS; tióis não proteicos – NPSH; ácido ascórbico e enzima glutationa-S-transferase – GST) no fígado e nos rins dos animais expostos à AFB₁.

d) Investigar se o tratamento com BCF altera a quantidade de proteínas relacionadas com a via oxidativa (proteínas da via de sinalização do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 – Nrf2) e inflamatória (proteínas da via de sinalização do fator nuclear kappa B – NF-κB; interleucina 1 beta total – IL-1β) no fígado dos animais expostos à AFB₁.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICOTOXINAS

O crescimento populacional, bem como a globalização e o desenvolvimento de uma economia baseada no intercâmbio impulsionaram o aumento da produção de alimentos a nível mundial (MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017). No entanto, ao mesmo tempo, aumentou a exposição dos alimentos a contaminantes, os quais colocam em risco a segurança alimentar da população. Nesse contexto, o termo contaminante é definido como qualquer substância indesejável e não intencionalmente adicionada presente no alimento, como resultado das operações efetuadas durante o cultivo, a criação de animais, os tratamentos zoo ou fitossanitários, ou como resultado de contaminação ambiental ou de equipamentos utilizados na elaboração e/ou conservação do alimento (BRASIL, 2001).

Dentre as questões emergentes em segurança alimentar, o aumento da ocorrência de espécies fúngicas associadas às plantações representam uma preocupação séria para saúde humana e animal em todo o mundo. Os fungos são microrganismos eucariontes e heterotróficos que podem ser encontrados em diferentes localidades como na água, no ar e no solo e incluem leveduras, bolores e cogumelos (HIBBETT et al., 2007). Esses organismos possuem importante valor econômico na indústria alimentícia e farmacêutica. No entanto, embora alguns fungos possuam propriedades benéficas, outros são parasitas de plantas e causadores de grandes prejuízos à agricultura e à saúde (AYOFEMI, 2020).

Um dos principais vieses da contaminação alimentar por fungos está relacionado à produção de metabólitos secundários, como as micotoxinas, que são reconhecidamente tóxicas. No entanto, o desenvolvimento de fungos não implica necessariamente na produção desses compostos, uma vez que nem todos os fungos as produzem. Da mesma forma, a ausência de alterações sensoriais no alimento não significa que ele está livre de toxinas, pois as mesmas podem ter sido produzidas antes da inativação do fungo (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; WINTER; PEREG, 2019).

A colonização fúngica e/ou produção de micotoxinas são favorecidas por vários fatores. As condições mais importantes estão associadas a altas temperaturas e atividade de água do produto/planta. Outros fatores relevantes estão relacionados à composição do vegetal, pH, teor de oxigênio e umidade atmosférica. Além disso, fatores de estresse como seca, fertilização insuficiente, altas densidades de cultivo, competição com ervas daninhas, insetos

ou danos mecânicos podem enfraquecer as defesas naturais da planta e promover a colonização de fungos (MAGAN; MEDINA, 2016; MARIN et al., 2013).

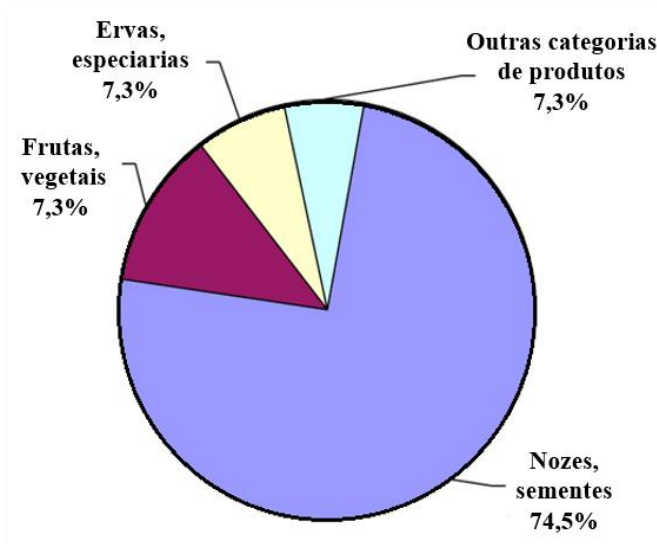
A contaminação dos produtos alimentares ocorre através do contato com os esporos ou com o micélio dos fungos toxigênicos durante qualquer etapa da fase pré ou pós-colheita e está geralmente associada ao manejo inadequado das plantações, bem como à estocagem de safras em condições inapropriadas. As micotoxinas, ao contrário dos seus fungos produtores, não são detectáveis pela visão, odor ou paladar. Uma vez produzidas pelos fungos, as micotoxinas agem de forma independente. Nesse sentido, eliminar os fungos não reduz a concentração ou o efeito das micotoxinas. Além disso, de maneira oposta aos fungos que as produzem, as micotoxinas são extremamente estáveis. Elas são resistentes a temperaturas acima de 250 C° e toleram uma ampla faixa de pH que pode variar de 3 a 10. Devido a essas razões, dificilmente eliminadas das matrizes alimentares durante o processamento (AL-ZOREKY; SALEH, 2019; MARIN et al., 2013). Assim, essas características enfatizam a necessidade de monitoramento da presença de fungos e suas micotoxinas em todos os estágios de produção de alimentos.

As micotoxinas são produzidas por diferentes espécies de fungos e cada fungo pode produzir mais de uma micotoxina. Além disso, as plantas podem ser afetadas por mais de uma espécie fúngica, a qual pode produzir mais de uma micotoxina. Nesse sentido, pode-se observar a co-ocorrência de micotoxinas em alimentos ou na ração animal, aumentando assim as chances de interação entre os toxicantes e a ocorrência de efeitos toxicológicos sinérgicos (LEE; RYU, 2017). Em 2019, o programa interno do Centro de Pesquisa BIOMIN (Tulln, Áustria) divulgou resultados da sua pesquisa anual sobre a ocorrência de micotoxinas. Nesse estudo, 93.543 amostras de vários países foram coletadas no período de janeiro a dezembro de 2019. Nesse âmbito, o resultado apresentou 21.287 amostras positivas para micotoxinas em rações e produtos alimentícios. Ainda, foi verificada a ocorrência de diferentes tipos de micotoxinas em 71% das amostras analisadas, indicando que a co-ocorrência é prevalente e configura uma ameaça global à segurança alimentar (BIOMIN, 2019).

A exposição às micotoxinas ocorre principalmente pela via oral, de maneira direta, por meio da ingestão de alimentos contaminados de origem vegetal como sementes oleaginosas, frutas e especiarias (**Figura 1**). A exposição também pode ocorrer de modo indireto, através da alimentação dos animais com ração contaminada, de forma que subprodutos animais como leite, carne e o ovos também se tornam ameaças potenciais à saúde (CARBALLO et al., 2018; MAHMOUDI; JIA et al., 2016; NORIAN, 2015). Além disso, as vias cutânea e a inalatória

também tem sido descritas por causar toxicidade, através de exposições ocupacionais, por mecanismos ainda pouco elucidados (FERRI et al., 2017).

Figura 1 – Categoria de produtos notificados pelo Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF) por contaminação por micotoxinas (1979 – 2017).



Fonte: Adaptação de Piglowski (2019b).

Atualmente são conhecidos aproximadamente 500 tipos de micotoxinas (BROOM, 2015). As aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, tricotecenos (particularmente o deoxinivalenol), zearalenonas e patulina são as micotoxinas que causam maior preocupação por afetarem a saúde humana e por reduzirem o rendimento das culturas e o potencial produtivo dos animais. Os principais efeitos dessas micotoxinas, bem como seus fungos produtores foram relatados na **Tabela 1**.

Tabela 1– Principais micotoxinas e seus efeitos relatados em modelos experimentais.

Micotoxina	Fungo produtor	Principais efeitos relatados	Referência
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i>	Hepatotoxicidade	(HUA et al., 2020)
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Carcinogenicidade	(FERREIRA et al., 2019)
		Comprometimento do crescimento	(CASTELINO et al., 2015)
Ocratoxina	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Nefrotoxicidade	(LI et al., 2021a)
	<i>Penicillium verrucosum</i>	Hepatotoxicidade	(SHIN et al., 2019)
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Carcinogenicidade	(HERMAN; MANTLE, 2021)
Fumonisina	<i>Fusarium verticillioides</i>	Hepatotoxicidade	(RÉGNIER et al., 2019)

	<i>Fusarium proliferatum</i>	Carcinogenicidade	(YU et al., 2021)
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Atividade estrogênica	(GAO et al., 2018)
	<i>Fusarium culmorum</i>	Disfunções reprodutivas	(YANG et al., 2018)
Deoxinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i>	Toxicidade gastrointestinal	(MISHRA et al., 2020)
	<i>Fusarium culmorum</i>		
Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	Toxicidade gastrointestinal	(JIN et al., 2016)
		Hepatotoxicidade	(LU et al., 2017)
		Nefrotoxicidade	

Fonte: A autora.

Os efeitos negativos relacionados à exposição às micotoxinas geralmente são verificados em populações residentes de países em desenvolvimento. Nesse contexto, a agricultura familiar associada ao pequeno produtor é frequentemente atingida devido à escassez de medidas preventivas e de controle. Com isso, a contaminação alimentar passou a ser uma preocupação para o comércio de *commodities*, o qual estaria sujeito a disseminar a contaminação e colocar populações em risco (RUSHING; SELIM, 2019).

Assim, muitos países implementaram regulamentos que estabelecem os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. A maioria dos regulamentos são aplicados às empresas que importam, produzam, distribuam e comercializam categorias específicas de bebidas, alimentos e matérias primas com alto risco de contaminação. A regulamentação possui o objetivo de controlar o fluxo de *commodities* contaminadas com micotoxinas no comércio nacional e internacional, visando evitar problemas de saúde pública e econômica a nível mundial (HUSSAIN; DAWSON, 2013; MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017).

A **Tabela 2** exibe os LMT de micotoxinas em alimentos, regulamentados pelos Estados Unidos (EUA) e pela União Europeia (UE) (ALSHANNAQ; YU, 2017).

Tabela 2– Principais micotoxinas e LMT pelos EUA e pela UE em diferentes produtos alimentícios.

Micotoxina	Produtos alimentícios	EUA (µg/Kg)	UE (µg/Kg)
Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	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	Leite e Produtos lácteos	0,5	0,05 em leite;

			0,025 produtos para crianças
Ocratoxina A	Cereais, frutas secas, vinho, uvas, café, cacau, queijo	-	2-10
Fumonisinias B1, B2, B3	Milho, produtos de milho, sorgo, aspargos	2000-4000	200-1000
Zearalenona	Cereais, produtos de cereais, milho, trigo, cevada	-	20-100
Deoxinivalenol	Cereais, produtos de cereais	1000	200-500
Patulina	Maçãs, suco de maçã e concentrado	50	10-50

Fonte: Adaptado de Alshannaq; Yu (2017).

O Brasil ocupa a posição de um dos países líderes na produção de alimentos agrícolas e, por apresentar um clima predominantemente tropical, dispõem de condições ambientais ideais para o crescimento de fungos micotoxigênicos (AYOFEMI, 2020). Dessa forma, em 18 de fevereiro de 2011 foi aprovado o Regulamento Técnico sobre limites máximos para micotoxinas admissíveis em alimentos, bebidas e matérias primas sujeitas a contaminação, conforme disposto na **Tabela 3**.

Tabela 3 – LMT de 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
Patulina	Suco de maçã e polpa de maçã	50

Fonte: Adaptação da RDC nº 07, de 18 de Fevereiro de 2011, Brasil, 2011.

Apesar da existência de regulamentos que determinam o LMT de micotoxinas em alimentos, a redução da contaminação permanece um desafio, uma vez que para a manutenção do controle de contaminações, processos rígidos de gerenciamento necessitam ser implementados. Além disso, inúmeros pontos da cadeia produtiva são passíveis de serem contaminados, tornando o controle mais dificultoso. Ainda, procedimentos como análises periódicas, utilizando amostragem representativa e um protocolo robusto de análise dos dados precisariam ser aplicados, além da determinação de um destino adequado para aquelas amostras que superassem os LMT instituídos. Devido à complexidade de controle, a exposição humana e animal às micotoxinas parece ser inevitável (WOOD, 1992).

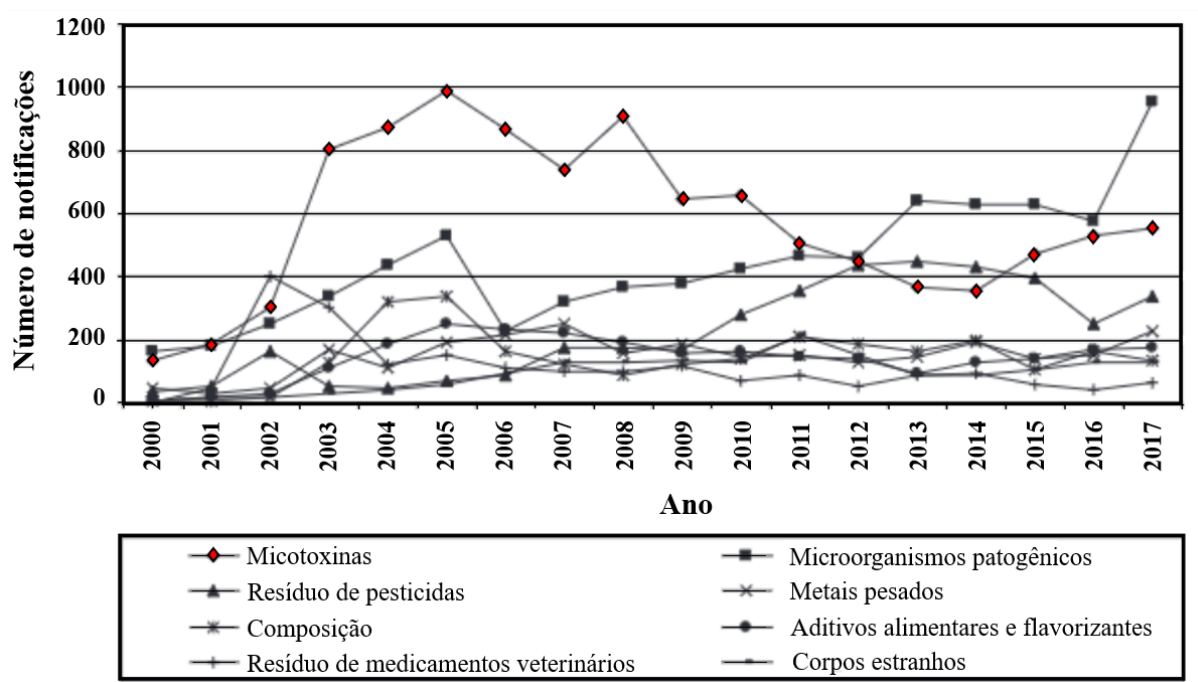
Estima-se que cerca de 75% de todos os grãos do mundo estejam contaminados por micotoxinas (LEE; RYU, 2017). Essa conjuntura afeta o agronegócio de muitos países, pois a presença desses compostos está associada a interferências ou impedimentos de exportações e também a redução da produção animal e agrícola, o que gera numerosos prejuízos (JELINEK; POHLAND; WOOD, 1989; WILD; MILLER; GROOPMAN, 2016).

Além disso, os produtos de melhor qualidade geralmente são destinados à exportação, sendo assim, as *commodities* de qualidade inferior, as quais apresentam níveis de micotoxinas acima do permitido nos países importadores, são vendidas e consumidas no mercado interno, com riscos evidentes para a saúde da população (RUSHING; SELIM, 2019). Esse cenário é ainda mais alarmante em países em desenvolvimento, onde a oferta de alimentos é naturalmente limitada e o cumprimento dos regulamentos de segurança podem levar à falta de alimentos e a

preços excessivos que incentivam a aquisição de medidas que priorizam a suficiência alimentar em detrimento da segurança (EGMOND; JONKER, 2004)

Nesse contexto, desde 1979, os alimentos compõem a categoria que recebeu mais notificações no RASFF, ferramenta implementada para fornecer às autoridades de controle de alimentos informações sobre as ameaças detectadas (PIGLOWSKI, 2019a). Desde então, as micotoxinas permanecem no páreo entre as categorias de risco mais notificadas (**Figura 2**).

Figura 2 – Categorias de risco notificadas no RASFF de 2000 a 2017.

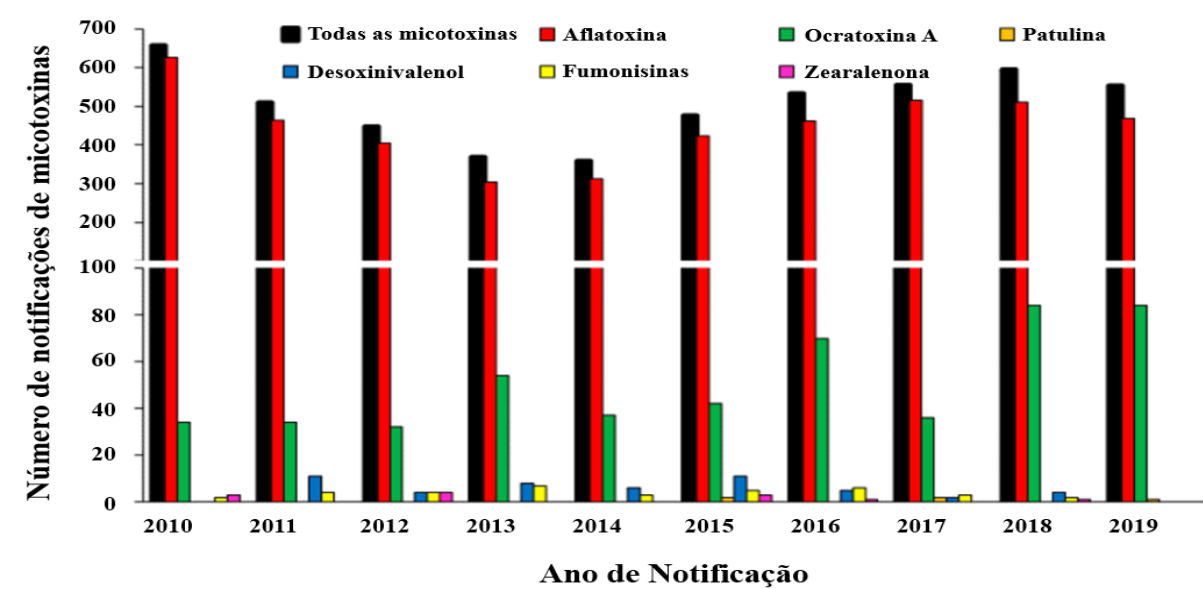


Fonte: Adaptação de Piglowski (2019b).

As micotoxinas têm sido descritas como uma das categorias de ameaça mais frequentemente relatada no RASFF, constituindo cerca de 21% de todas as notificações relatadas de 1981 até 2017 (PIGLOWSKI, 2019b). Recentemente, o RASFF relatou 5045 e 439 notificações para contaminação por micotoxinas em produtos alimentícios e rações, respectivamente, exportados para a UE entre os anos de 2010 e 2019. Quase 90% (n = 4.487) das notificações foram atribuídas à contaminação por aflatoxinas (ALSHANNAQ; YU, 2021) (**Figura 3**). Ainda, em uma análise comparativa de notificações sobre micotoxinas no RASFF, foi verificado que o maior número de notificações estava relacionado à aflatoxina B1 (AFB₁) (8.784, 80%), seguido por aflatoxinas não especificadas (1.376; 13%) e ocratoxina A (550; 5%) (PIGLOWSKI, 2019b). Neste sentido, devido à alta prevalência de contaminação alimentar por

micotoxinas, estudos que analisem o impacto sua exposição à saúde da população são de extrema relevância.

Figura 3 – Número total de notificações no RASFF para micotoxinas por ano em produtos alimentícios de todos os países (2010 – 2019).



Fonte: Adaptação de Alshannaq; Yu (2021).

2.2 AFLATOXINAS

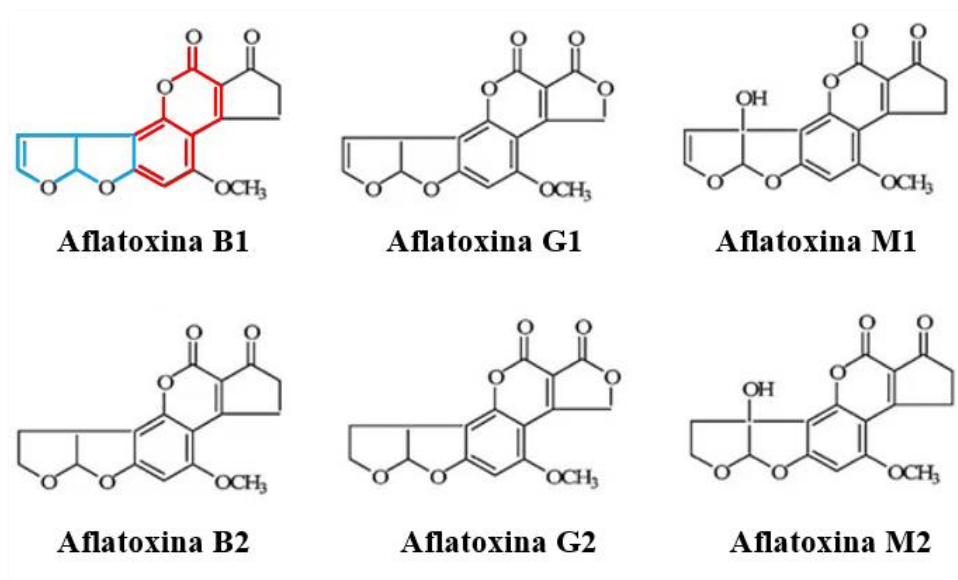
As aflatoxinas são micotoxinas produzidas majoritariamente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, os quais causam grande preocupação para a segurança alimentar devido a ampla distribuição e a alta toxicidade. Esses metabólitos foram inicialmente descritos por Stevens e colaboradores (1960) que relataram o aparecimento de uma nova doença na Inglaterra, a qual foi responsável por matar mais de 100.000 aves que haviam sido alimentados com farinha de amendoim proveniente do Brasil. Pesquisas constataram que o surto estava relacionado à contaminação por *Aspergillus flavus* que produzia uma substância fluorescente, então denominada aflatoxina (STEVENS et al., 1960).

As principais características físicas e químicas das aflatoxinas são a termoestabilidade, o baixo peso molecular e a natureza cristalina. Além disso, são solúveis em solventes moderadamente polares, como clorofórmio e metanol e pouco solúveis em solventes apolares. Ademais, são instáveis quando expostas à luz, particularmente à radiação ultravioleta. Ainda, são incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos (EATON; GROOPMAN, 2013;

WOGAN, 1966). Devido as suas características que lhes conferem estabilidade, as aflatoxinas dificilmente são eliminadas das matrizes que foram contaminadas, representando um grande risco para a população (RUSHING; SELIM, 2019)

Mais de 20 aflatoxinas já foram isoladas, no entanto as de maior interesse toxicológico são as do tipo B1, B2, G1 e G2. Estruturalmente, são compostos orgânicos que possuem um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanoide (**Figura 4**) e se distinguem cromatograficamente pela fluorescência emitida sob luz ultravioleta. Nesse contexto, as aflatoxinas B1 e B2 (do inglês, “blue”) e G1 e G2 (do inglês, “green”) foram assim denominadas devido às fluorescências azul e verde, respectivamente, que emitem quando expostas à luz ultravioleta. As aflatoxinas B2 e G2 são derivados dos compostos originais B1 e G1. As aflatoxinas B1 e B2, após serem consumidas em alimentos contaminados, são metabolizadas pelo fígado e excretadas no leite na forma de aflatoxinas M1 e M2, respectivamente. Ademais, os índices numéricos 1 e 2 indicam compostos com maior e menor toxicidade, nessa ordem, e seguem a sequência B1 > G1 > B2 > G2 (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Nesse cenário, dentre as inúmeras micotoxinas existentes, as AFB₁ se destacam pela ampla distribuição em alimentos e pela maior toxicidade.

Figura 4 – Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 e M2. O núcleo central cumarínico está destacado em azul e a estrutura bi-furanoide, em vermelho.



Fonte: Adaptação de Jiang *et al* (2021)

2.3 AFLATOXINA B1

2.3.1 Incidência em matrizes alimentares

As AFB₁ são contaminantes de matrizes alimentares extremamente relevantes ao consumo humano, fato que torna a situação ainda mais preocupante. As AFB₁ já foram identificadas em inúmeros produtos alimentícios, entre eles destacam-se os cereais como milho, arroz, trigo e cevada e também as sementes oleaginosas como amendoim, nozes e pistache. Além desses alimentos, frutas, especiarias e temperos também podem ser afetados pela contaminação. Ademais, por resistirem a várias técnicas de processamento, tendem a permanecer em produtos finais, a exemplo das cervejas, pães, sucos e vinhos (BRASIL, 2011; KABAK; DOBSON; VAR, 2006; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). Existe também grande preocupação em relação à exposição da AFB₁ por meio da ingestão de alimentos de origem animal, visto que já foram descritos por apresentarem resíduos ou metabólitos da micotoxina (JIA et al., 2016; MAHMOUDI; NORIAN, 2015; MAZIERO; BERSOT, 2010).

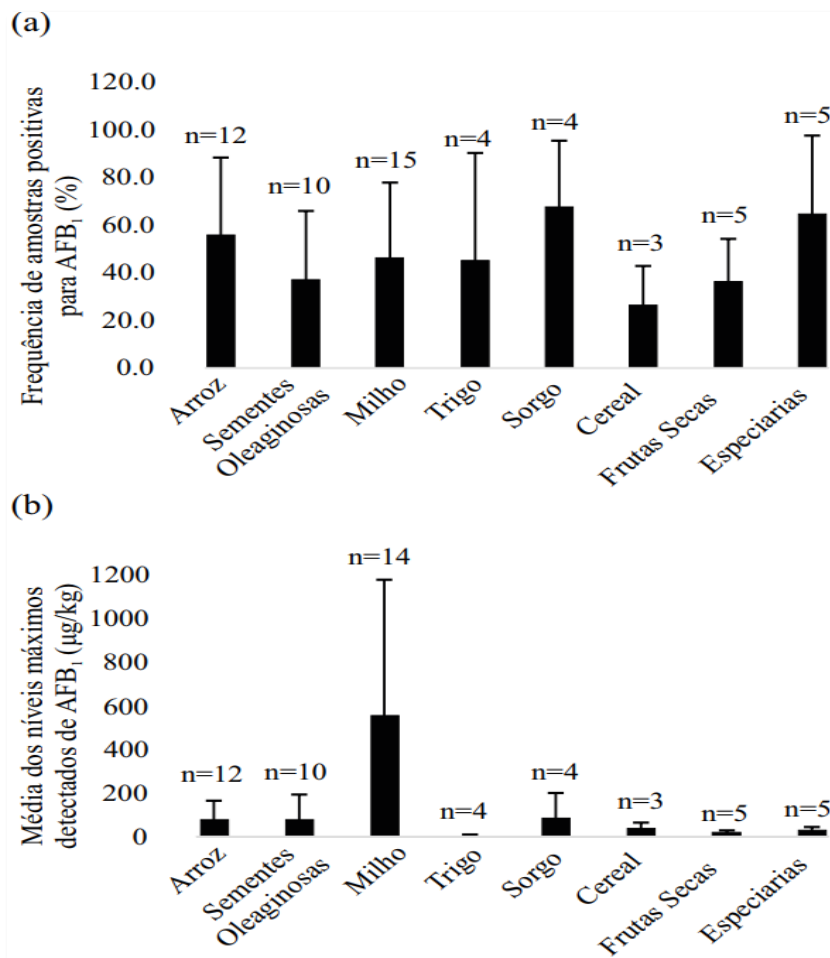
De acordo com um levantamento de dados da literatura sobre a ocorrência de AFB₁ em produtos alimentícios, foi possível verificar um alto percentual de amostras de alimentos contaminados. Além disso, a média das concentrações máximas detectadas nesses estudos muitas vezes excederam o limite regulatório de <20 µg/kg adotado pela maioria dos países. O resumo desses estudos pode ser encontrado na **Tabela 4** e **Figura 5**.

Tabela 4 – Relatórios de ocorrência de AFB₁ em produtos alimentícios (2008-2018).

Alimento	País	Número de amostras	Número positivo para AFB ₁	% positivo para AFB ₁	Nível mínimo de AFB ₁ (µg/kg)	Nível máximo de AFB ₁ (µg/kg)
Arroz	Suécia	99	46	56,6	0,1	46,2
Arroz	Índia	1200	814	67,8	0,1	308
Arroz	China	29	29	100,0	0,1	136,8
Arroz	Brasil	230	128	55,7	0,11	180,74
Arroz	Brasil	187	21	11,2	-	63,32
Nuts	Moçambique	23	3	13,0	3,4	123,0
Nuts	Turquia	302	51	16,9	0,16	368,0
Nuts	Paquistão	180	83	46,1	0,04	14,5
Nuts	Zimbábue	208	26	12,5	0,7	175,9
Milho	China	108	108	100,0	1,0	50,0
Milho	Burquina Faso	26	13	50,0	3,4	636,0
Milho	Iran	373	146	39,1	0,5	241,3
Milho	Croácia	633	241	38,1	1,1	2072,0
Milho	Paquistão	100	52	52,0	2,0	1405,3
Milho	Paquistão	75	73	97,3	0,5	409,3
Milho	República Democrática do Congo	30	30	100,0	1,75	1401,45
Milho	Sérvia	360	206	57,2	1,3	88,8
Trigo	Tunísia	46	4	8,7	0,12	18
Trigo	China	16	16	100,0	0,3	0,9
Trigo	Malásia	14	9	64,3	0,55	5,07
Sorgo	Tunísia	49	36	73,4	0,4	25,1
Sorgo	Índia	1606	1173	73,0	0,01	263,98
Sorgo	Etiópia	90	85	94,4	-	33,1
Cereal	Tunísia	147	42	28,6	0,1	25,1
Cereal	Espanha, Itália, Marrocos, Tunísia	173	14	8,1	6,4	66,7
Cereal	Paquistão	237	98	41,4	0,04	6,9
Frutas secas	Tunísia	20	9	45,0	0,1	34,5
Frutas secas	Paquistão	77	33	42,9	0,04	9,8
Frutas secas	Turquia	130	16	12,3	0,1	12,5
Frutas secas	Irã	88	50	56,8	0,3	8,4
Especiarias	Tailândia	60	40	66,7	0,1	53,62
Especiarias	Itália	130	11	8,5	0,08	>15
Especiarias	Malásia	58	49	84,5	0,01	28,43

Fonte: Adaptação de Rushing; Selim (2019).

Figura 5– Frequência (a) e níveis máximos (b) de AFB₁ relatados em múltiplos estudos. As barras de erro são expressas como desvio padrão. Os valores exibidos acima das barras representam o número de estudos que avaliaram cada produto.



Fonte: Adaptação de Rushing; Selim (2019).

Apesar das altas taxas de contaminação notificadas, foi demonstrado que os dados os quais se tem acesso geralmente são limitados, o que além de dificultar avaliações mais abrangentes e globais da ocorrência de aflatoxina, pode resultar em uma subestimativa da exposição alimentar. Outro importante aspecto é que, embora as concentrações gerais de aflatoxinas no arroz e no trigo sejam menores do que as concentrações no milho e no amendoim, por exemplo, o consumo de arroz e trigo em alguns países pode representar até 80% da dieta, o que evidencia a possibilidade de exposição à altas concentrações (WILD; MILLER; GROOPMAN, 2016).

Além disso, a contaminação por AFB₁ é um impasse principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde as altas temperaturas e umidade favorecem o desenvolvimento de espécies aflatoxigênicas no campo e durante o armazenamento. No entanto, em consequência

das mudanças climáticas, a AFB₁ também tem ocorrido em áreas onde não eram anteriormente detectadas, ao passo que os países os quais já apresentavam contaminação podem começar a ver níveis ainda mais altos nas culturas (BATTILANI et al., 2016; KLERX; LIU; BATTILANI, 2016; MEDINA; RODRIGUEZ; MAGAN, 2014).

2.3.2 Toxicocinética e toxicodinâmica

A toxicidade da AFB₁ apresenta grande variabilidade pois é dependente de vários fatores. Alguns são relacionados ao organismo como espécie, linhagem, sexo, peso corporal e idade. Além disso, o estado nutricional e a composição da dieta são fatores que podem modular a toxicidade da micotoxina. Os níveis e tempo de exposição à toxina também são particularmente relevantes (EATON; GROOPMAN, 2013).

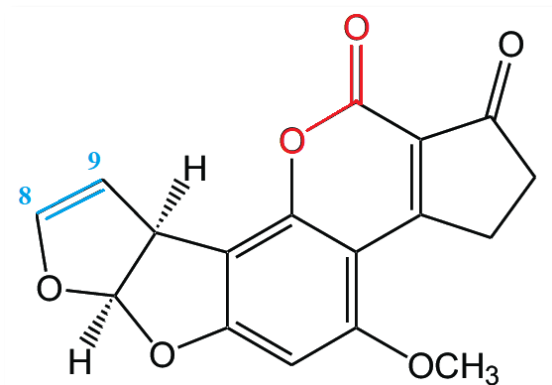
Nesse contexto, a suscetibilidade aos efeitos tóxicos da AFB₁ foi classificada em três graus que compreendem: (1) animais com alta sensibilidade (dose letal 50 – DL₅₀ – ≤ 1 mg/kg) em que estão incluídos patos, trutas arco-íris, cobaias, coelhos, cães, gatos e ratos jovens e perus jovens; (2) animais medianamente sensíveis (requerem doses de aflatoxina até dez vezes maiores do que os animais do primeiro grupo), como suínos, macacos, ratos adultos, bezerros, faisões, pintos, furões, hamsters, vacas, doninhas e perdizes; e (3) animais resistentes, como ovinos e camundongos. Ademais, os animais jovens são mais sensíveis do que os adultos, da mesma forma que os machos são mais suscetíveis que as fêmeas, exceto em estágios específicos relacionados à gestação (SCHOENTAL, 1967).

Por inúmeros fatores, a DL₅₀ da AFB₁ não é exata e possui uma ampla faixa documentada. De mesmo modo, outras informações toxicocinética são variáveis, dependente das informações supracitadas e geralmente específicas de cada experimento (AGAG, 2004; EATON; GROOPMAN, 2013; WONG; HSIEH, 1980).

A toxicidade da AFB₁ é exclusivamente dependente da sua metabolização hepática. Nesse caso, a biotransformação, que geralmente é referida como um processo de desintoxicação, converte a micotoxina inerte em metabólitos tóxicos em um processo conhecido como bioativação (BEYERLE et al., 2015; GUENGERICH et al., 1996).

Nesse contexto, a estrutura molecular da AFB₁ possui grupamentos e ligações que favorecem a toxicidade da micotoxina. O anel lactona do anel cumarínico e a ligação dupla do anel furano terminal, na posição entre os carbonos C8-C9 (**Figura 6**) são regiões de alta reatividade, pois são suscetíveis às reações de epoxidação que acontecem durante a biotransformação da micotoxina (DIAO; HOU; DONG, 2013).

Figura 6– Estrutura química da AFB₁. A ligação dupla C₈ - C₉ está destacada em azul e a ligação lactona, em vermelho.

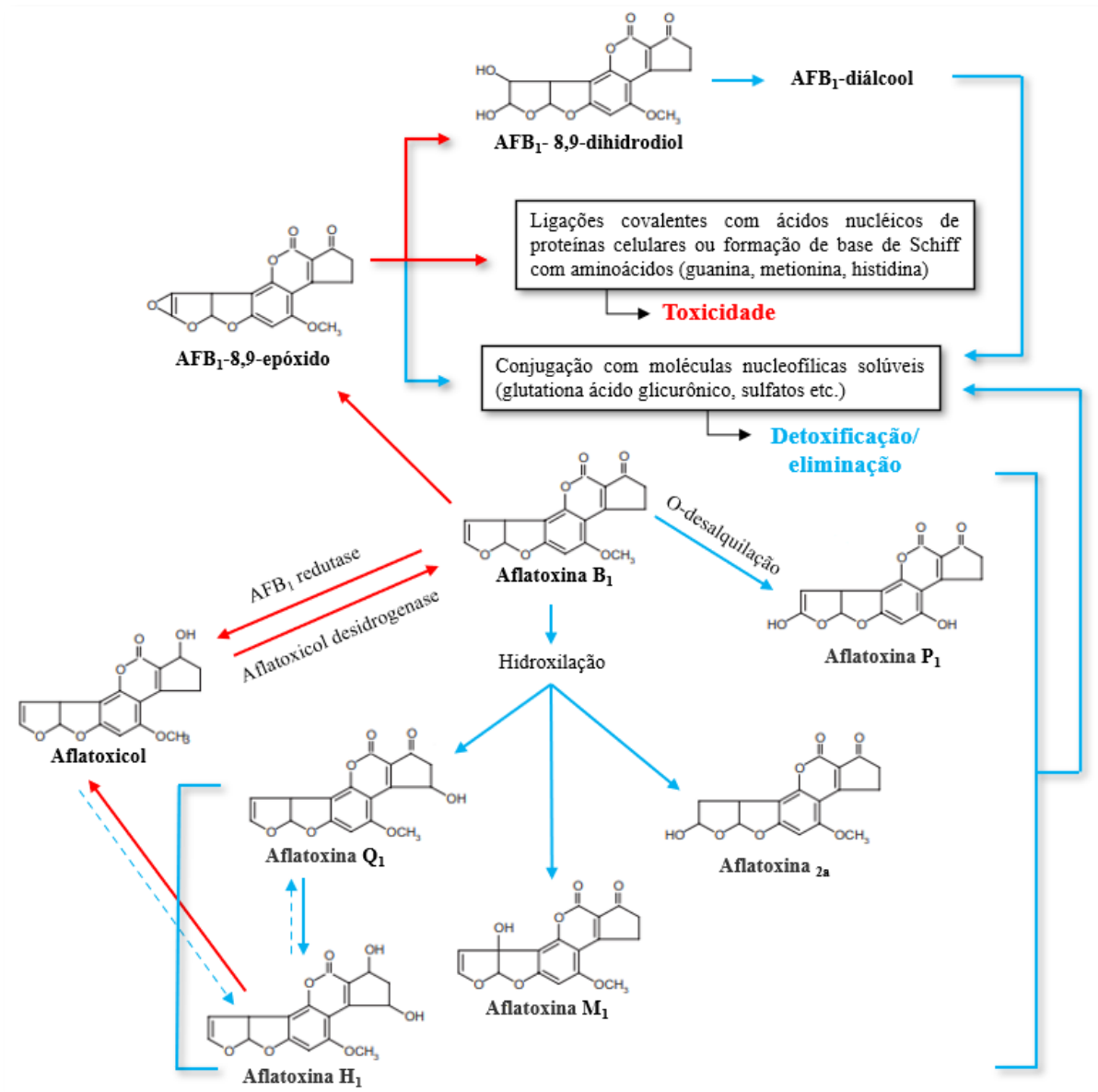


Fonte: Adaptação de Zhou *et al.*, 2020.

A absorção via oral da toxina é facilitada devido a sua característica lipofílica. Após a ingestão, a AFB₁ é absorvida no trato gastrointestinal, distribuída pela circulação sanguínea através da ligação com a albumina e se concentra no tecido hepático devido à alta permeabilidade da membrana do hepatócito à micotoxina (EATON; GROOPMAN, 2013).

O fígado é o órgão primário de bioativação de AFB₁ e quatro vias metabólicas compreendem esse processo: epoxidação para formar AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), cetoredução que forma o composto aflatoxicol, hidroxilação para gerar as aflatoxinas M₁, Q₁ e B_{2a} e O-desalquilação que forma aflatoxina P₁ (WU *et al.*, 2009) (**Figura 7**). As enzimas que participam desse processo pertencem à superfamília do citocromo P (CYP).

Figura 7 – Vias metabólicas da AFB₁. Os processos que levam a toxicidade estão em vermelho e os que levam a desintoxicação, em azul.



Fonte: Adaptação de Yiannikouris; Jouany (2002).

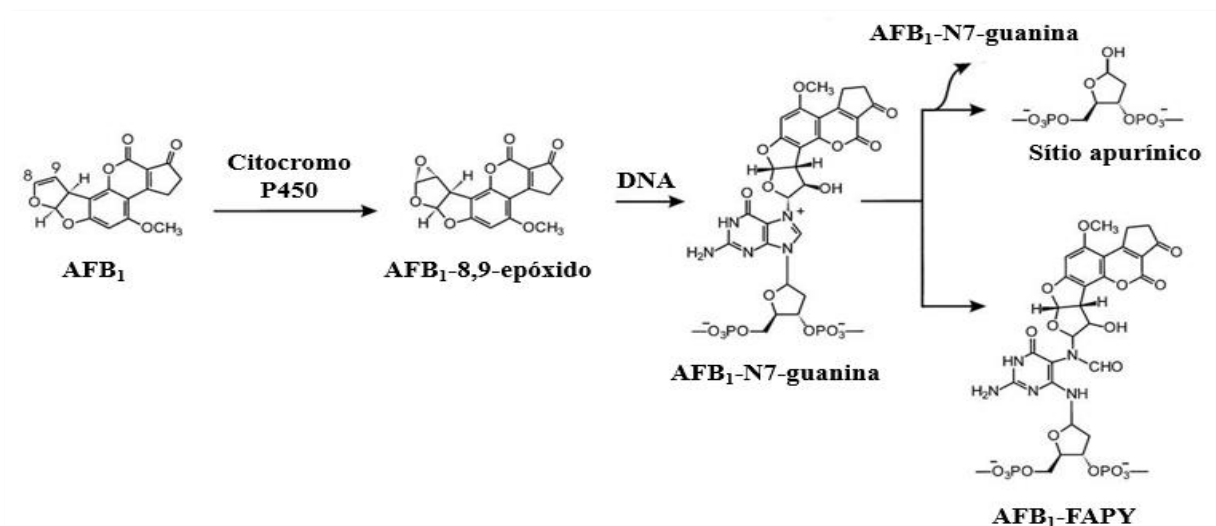
Nesse sentido, em tecido hepático o anel de lactona insaturado sofre epoxidação por enzimas CYP450, gerando o metabólito AFBO e seus isômeros endo-8,9-epóxido e exo-8,9-epóxido. Devido à natureza altamente instável do AFBO, este metabólito pode hidrolisar-se espontaneamente, resultando na formação de AFB₁-8,9-dihidrodiol, o qual reage com grupamentos amino primários de proteínas celulares, originando bases de Schiff. Associado a isso, um desequilíbrio no sistema antioxidante e um estado pró-inflamatório geralmente também é constatado. Posteriormente, AFB₁-8,9-dihidrodiol é metabolizado pela enzima

aflatoxina aldeído redutase para formar AFB₁-diálcool, não tóxico e sem a capacidade de ligação à proteínas (MONSON; COULOMBE; REED, 2015).

Ademais, o exoisômero pode intercalar-se no ácido desoxirribonucleico (DNA) e reagir com a guanina, localizada na posição 7 (N7), para formar o aduto 4-8-(N7-guanil)-9-hidroxi-AFB₁ (AFB₁-N7-guanina). O produto da reação tende a sofrer depuração espontânea pela via urinária, formando um sítio apurínico na molécula de DNA. Os sítios vagos tendem a ser preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina no gene supressor de tumor p53, a qual é observada em diferentes tipos de carcinomas (BRESSAC et al., 1991; OZTURK, et al., 1991; PUISIEUX et al., 1991). Ainda, pode transformar-se em 8,9-di-hidro-8-(N5-formil-2, 5, 6-triamino-4-oxo-N5-pirimidil)-9-hidroxi-AFB₁ (AFB₁-FAPY), quimicamente e biologicamente estável (YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002).

As três interferências no DNA AFB₁-N7-Guanina, formação de sítios apurínicos e AFB₁-FAPY (**Figura 8**), são as vias precursoras de mutações induzidas pela AFB₁. Esse mecanismo modifica a estrutura e a atividade biológica do DNA nativo, originando assim os mecanismos de mutagenicidade e carcinogenicidade, bem como alterações bioquímicas, incluindo a indução de estresse oxidativo, causando a oxidação lipídica, proteica e de ácidos nucleicos (DAI et al., 2017; FEDELES; ESSIGMANN, 2018).

Figura 8 – Vias de ativação metabólica da AFB₁ que levam à formação de adutos de DNA.



Fonte: Adaptação de Fedeles; Essigmann (2018).

Através de uma reação de cetoredução, a via metabólica da AFB₁ também pode dar origem ao composto aflatoxicol de toxicidade moderada (WU et al., 2009). As reações de

hidroxilação e O-desalquilação dos compostos formam produtos de toxicidade reduzida e por isso foram consideradas como uma via de desintoxicação. A exceção está relacionada à geração de aflatoxina M₁, a qual foi determinada como o metabólito mais tóxico entre os hidroxilados (LI et al., 2018). A geração da aflatoxina H₁ permanece controversa, no entanto, sugere-se que seja formada a partir do aflatoxicol ou da aflatoxina Q₁ (SALHAB; HSIEH, 1975). As novas moléculas formadas possuem o grupo hidroxila em sua estrutura, o qual permite a sua conjugação com o ácido glicurônico, sulfatos, entre outros, para posterior excreção principalmente através da urina e, em menor quantidade, através da bile e fezes (ESSIGMANN et al., 1982; MARCHESE et al., 2018).

Como uma importante via de desintoxicação da micotoxina, destaca-se a conjugação enzimática do metabólito AFB₁-8,9-epóxido com o tripeptídeo glutathiona no seu estado reduzido (GSH), catalisada pela glutathiona-S-transferases (GST). Essa conjugação minimiza a afinidade do metabólito pelo DNA, formando um conjugado inativo que é posteriormente excretada na urina (ESSIGMANN et al., 1982).

2.3.3 Aspectos epidemiológicos da toxicidade da AFB₁

Ao longo da história, vários episódios de contaminação por AFB₁ foram descritos na literatura. Em 1974, 200 aldeias no oeste da Índia vivenciaram um surto intoxicação que afetou 397 pessoas, levando a óbito 106 indivíduos por hepatotoxicidade. O surto durou dois meses e foi restrito à população tribal, cujo alimento básico era o milho. A partir da análise das amostras de qualidade duvidosa, foi constatada a contaminação por *Aspergillus flavus* (6,25 - 15,6 mg/kg) e a estimativa de consumo diário da população foi de 2 - 6 mg/kg de aflatoxinas, durante várias semanas. A análise do soro dos pacientes constatou a presença de AFB₁, a qual foi associada a causa da intoxicação (KRISHNAMACHARI et al., 1975).

Em abril de 2004, o Quênia registrou um dos episódios mais graves de intoxicação humana por AFB₁ da história, o qual contabilizou 317 casos e 125 mortes por hepatotoxicidade aguda. O estudo de caso-controle realizados por LEWIS *et al.* (2005) mostrou que as pessoas afetadas consumiam milho caseiro armazenado em condições úmidas e a exposição diária individual de AFB₁ foi estimada em até 50 mg (PROBST; NJAPAU; COTTY, 2007).

Há poucos anos, em 2016, foi relatado um surto caracterizado por sintomas gastrointestinais, insuficiência hepática e morte de vários animais e pessoas de famílias de agricultores de regiões da República Unida da Tanzânia. Após pesquisa epidemiológica, o surto foi atribuído à ingestão de alimentos contaminados com AFB₁, em que as exposições de 20 a

120 µg/kg de peso corporal por dia, por um período de 1-3 semanas ou consumo de alimentos contendo concentrações superiores a 1 mg/kg, foram responsáveis por terem causado aflatoxicose aguda e morte de 20 pessoas, 6 cães e 1 gato (KAMALA et al., 2018).

As aflatoxinas estão entre as substâncias mutagênicas e cancerígenas mais potentes conhecidas (WILD; MILLER; GROOPMAN, 2016). O quadro de intoxicação por aflatoxinas é denominado aflatoxicose e o impacto na saúde humana depende de diferentes fatores e pode ser agravado em organismos com deficiência de vitaminas, baixa ingestão calórica, consumo excessivo de álcool, uso de determinados medicamentos ou presença de doenças infecciosas (BENNETT; KLICH, 2003). Além disso, a dose e a duração da exposição às aflatoxinas têm uma grande relevância na toxicologia e podem causar efeitos decorrentes de exposições agudas e/ou crônicas à micotoxina.

Manifestações agudas se referem à exposição repetida a doses elevadas, por curtos períodos de tempo. Nesses casos, os efeitos da toxina aparecerem logo após o contato (segundos, minutos ou horas) e podem causar vômitos, dor abdominal, anorexia, febre, ascite, edema dos membros inferiores, icterícia e lesão hepática que nos casos mais graves pode ser fatal (AZZIZ et al., 2005; KRISHNAMACHARI et al., 1975; REDDY; RAGHAVENDER, 2007).

As ocorrências crônicas se referem a exposições em baixas doses de AFB₁, por longos períodos de tempo. Os efeitos crônicos foram referidos por ocasionar imunossupressão, genotoxicidade e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, especialmente relacionado à mutação no gene p53, supressor de tumor associado (ALPERT et al., 1971; MARRONE et al., 2015). A carcinogenicidade da AFB₁ está especialmente associada ao fígado, onde a micotoxina é biotransformada em metabólitos reativos. No entanto, pâncreas, bexiga, ossos, vísceras, sistema nervoso central também já foram descritos por serem acometidos (FOUAD et al., 2019). Ademais, sugere-se o envolvimento da aflatoxina em distúrbios nutricionais e déficit de crescimento, provavelmente por prejudicar a absorção de micronutrientes, bem como a síntese de proteínas e o metabolismo enzimático (DE VRIES; MAXWELL; HENDRICKSE, 1990; RAHMANI et al., 2018; SORIANO et al., 2020).

A AFB₁ é considerada um dos principais fatores de risco ambiental para desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (ALPERT et al., 1971; PEERS; LINSELL, 1973; ZHANG et al., 2017) e foi apontada como responsável por até 28% dos casos mundiais desse carcinoma (LIU; WU, 2010). Sabendo que o câncer hepático foi considerado um dos principais em termos de incidência e de mortalidade em todo o mundo, adequar as ações de controle da

AFB₁ é indispensável, uma vez que a toxicidade é atribuída a problemas de saúde gravíssimos (BRAY et al., 2018; FERREIRA et al., 2019).

Além disso, estudos revelaram que AFB₁ piora o prognóstico da infecção causada pelo vírus da hepatite B, de forma a aumentar drasticamente o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HABIBI et al., 2019; KEW, 2003). Da mesma forma, tem sido estudada a relação da micotoxina com o vírus da hepatite C, a qual também demonstrou aumentar o risco para o desenvolvimento do carcinoma hepático (CHU et al., 2018). Portanto, devido às altas taxas mundiais de infecção por essas hepatites e, paralelamente, à recorrente contaminação de alimentos por AFB₁, os infectados encontram-se em um risco superior para os efeitos hepatocarcinogênicos da toxina.

Nesse contexto, através da avaliação dos estudos epidemiológicos que demonstraram a relação entre o consumo de alimentos contaminados com micotoxina e seu efeito cancinogênico, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer concluiu que haviam evidências suficientes da carcinogenicidade da AFB₁ em humanos e a classificou como um agente carcinogênico pertencente ao grupo 1 (IARC, 1993). Para substâncias com esse caráter não há limite abaixo do qual nenhum efeito prejudicial é observado e, portanto, nenhuma ingestão diária admissível pode ser definida pelas autoridades, seguindo os princípios de segurança ALARA (tão baixo quanto razoavelmente possível) (EC, 2002).

2.3.4 Metabolismo oxidativo

Muitos estudos têm atribuído o estresse oxidativo a um dos principais mecanismos que medeiam os efeitos tóxicos causados pela exposição à AFB₁ (MARIN; TARANU, 2012). Nesse sentido, o entendimento sobre os mecanismos oxidativos é de extrema relevância para a compreensão dos efeitos prejudiciais provocados pela micotoxina.

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres (RLs) e espécies reativas é maior do que a capacidade do organismo de neutralizá-los através de seu sistema de defesa (STORZ; IMLAY, 1999). O termo RLs é utilizado para designar átomos ou moléculas que apresentam em sua estrutura atômica um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, característica que confere alta instabilidade e reatividade para esses compostos. Entretanto, algumas espécies não possuem elétrons desemparelhados, mas são tão reativas quanto as que apresentam, é o caso do peróxido de hidrogênio, o qual é categorizado como espécie reativa. Nesse contexto, a maioria dos RLs existentes contém átomos de oxigênio e nitrogênio em sua estrutura e por isso são denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs)

e de nitrogênio (ERNs), respectivamente. Entre as EROs, destacam-se o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio. Entre as ERNs, o principal representante é o óxido nítrico (ON^{\cdot}) (ARUOMA, 1998).

As espécies reativas podem ter origem endógena e/ou exógena. As principais fontes endógenas de geração de RLs se desenvolvem através da atividade de sistemas enzimáticos fisiológicos, como da ciclooxigenase, lipoxigenase, CYP, xantina oxidase e óxido nítrico sintase, e através da mitocôndria no processo de respiração celular. Entre as fontes exógenas, a exposição à poluição ambiental, à radiação e a toxinas são exemplos de fatores que predis põe ao aumento da geração de RLs (ZANGAR; DAVYDOV; VERMA, 2004).

Em condições fisiológicas, os níveis de RLs oscilam em baixas concentrações em virtude da atuação de mecanismos de defesa celular. Nesse sentido, a ação de antioxidantes se destaca pela atividade de neutralização e/ou eliminação dessas espécies. O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em sistema enzimático, composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT), e não enzimático, o qual é composto por substâncias produzidas pela própria célula (glutathiona, coenzima Q, ferritina, ácido alfa-lipóico, ácido úrico, entre outros) e por elementos obtidos através da dieta (vitaminas como a C e a E, alguns minerais e compostos fenólicos) (AHMAD; SARWAT; SHARMA, 2008). Outro sistema protetor que recebe destaque é via de sinalização molecular da proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (Keap1)/fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), a qual regula a transcrição de genes que codificam proteínas e enzimas antioxidantes, bem como de enzimas de fase II de detoxificação metabólica (QIANG, 2013).

Quando o estresse oxidativo é instalado, ocorre o ataque de RLs a biomoléculas celulares essenciais, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Nesse contexto, o distúrbio entre a geração e a eliminação de espécies reativas pode afetar muitos, se não todos, os processos biológicos (BETTERIDGE, 2000), sendo inclusive o mecanismo fisiopatológico de diversas doenças.

Na condição da aflatoxicose, o estresse oxidativo pode ser gerado de forma direta, devido ao processo de biotransformação da AFB_1 ou pode ser induzido de modo indireto, por meio da ação dos metabólitos reativos gerados (WU et al., 2009). Nesse sentido, a biotransformação de xenobióticos mediada pelo CYP450 é um importante processo de geração de EROs, cuja reação pode ser considerada uma consequência indesejada dessas enzimas (LACKNER, 1998; STEGEMAN et al., 1992). Assim, durante o metabolismo hepático da AFB_1 , o qual é realizado principalmente pelas isoformas CYP3A4 e CYP1A2, grande

quantidade de RLs são gerados, os quais perturbam o equilíbrio redox celular. Além disso, o metabólito AFBO gerado exibe alta afinidade para atacar covalentemente heteroátomos nucleofílicos de nitrogênio, oxigênio e enxofre de macromoléculas essenciais, gerando adutos associados a lesões pré-mutagênicas. Dessa forma, a modificação da constituição de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos foi descrita por induzir o estresse oxidativo (RUSHING; SELIM, 2019).

No caso da determinação experimental de espécies reativas, ao invés de serem utilizados métodos de quantificação direta, cujo procedimento é dificultado devido à curta meia vida das substâncias, foram desenvolvidos ensaios que permitem determinar os produtos dos danos produzidos pelo estresse oxidativo, os quais são utilizados com maior frequência. Um dos produtos oxidativos mais estudados é o malondialdeído (MDA), o qual é mensurado através do ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e é gerado a partir da peroxidação de lipídios constituintes de membranas celulares (RAEL et al., 2004). O 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina é o produto gerado em consequência do ataque de EROs ao oitavo átomo de carbono da base guanina do DNA, sendo o principal biomarcador de dano oxidativo ao DNA (VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI; FIOTAKIS, 2009). Como marcador de oxidação de proteínas, a quantificação de grupos carbonil (aldeídos e cetonas), cuja produção ocorre nas cadeias laterais das proteínas após oxidação, é o método mais utilizado (DALLE-DONNE et al., 2003).

Nesse sentido, Yilmaz; Kaya e Comakli (2017) revelaram que uma dose única de AFB₁ (2,5 mg/kg, via intraperitoneal – i.p.) foi suficiente para aumentar os níveis de MDA no fígado de ratos *Wistar*. No mesmo estudo, a redução dos níveis de GSH, bem como da atividade das enzimas antioxidantes GST, CAT, GPx e SOD foi observada. Também foram identificadas alterações plasmáticas na atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL) e lactato desidrogenase e prejuízos histológicos associados a degenerações dos hepatócitos. Esses resultados demonstram o desequilíbrio oxidativo induzido pela exposição à micotoxina e, conseqüentemente, os danos ao tecido hepático, os quais foram marcados por alterações nos parâmetros bioquímicos e histológicos. Vipin e colaboradores (2017) e Owumi e seu grupo de pesquisa (2020), da mesma forma, encontraram alterações semelhantes no tecido hepático em ratos de mesma linhagem, como resultado de 28 dias de exposição alternada (200µg/kg, i.p) e consecutiva (75 µg/kg, via intragástrica – i.g) à AFB₁, respectivamente.

Ainda, uma única administração de AFB₁ (2 mg/kg, i.p.) em ratos *Sprague Dawley*, por sua vez, foi capaz de causar um dano no fígado, semelhante a estudos anteriores. Além disso, alterações em parâmetros sorológicos sugestivos de disfunção hepática também foram relatados. Esse estudo concluiu que as alterações verificadas no órgão foram resultado de um desequilíbrio oxidativo, marcado por redução dos níveis de GSH e atividade da CAT e SOD, associado com o aumento da quantidade de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina e MDA, reforçando o potencial da micotoxina em causar lesões ao DNA e a lipídios, respectivamente (DENG et al., 2020).

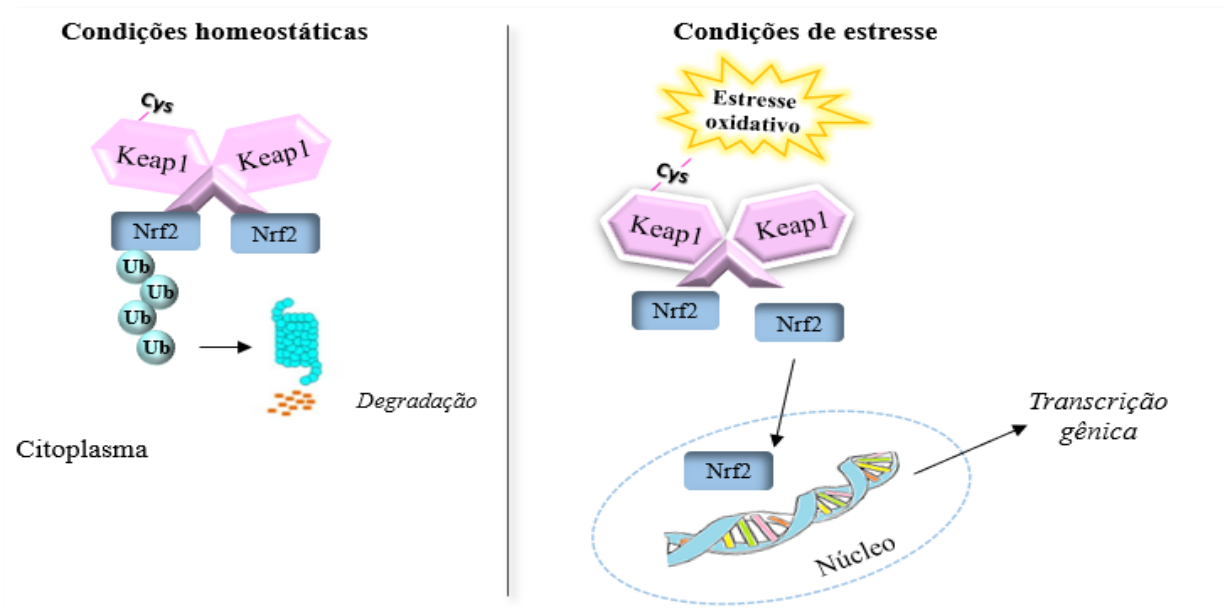
Através de diversas pesquisas, o fígado demonstrou ser o órgão mais afetado pelo efeito oxidativo da AFB₁, principalmente decorrente do acúmulo da mesma nesse órgão (YIANNIKOURIS et al., 2021). No entanto, alguns estudos já demonstraram o acometimento renal no processo. Eraslan e colaboradores (2017) relataram que 21 dias de exposição à AFB₁ (500 µg/kg, i.g) foram suficientes para desequilibrar o tônus oxidativo, confirmado através do aumento dos níveis de MDA, ON e 4-hidroxinonenal em rins de ratos *Wistar*, bem como aumentaram os níveis de nitrogênio não proteico, creatinina e ácido úrico no soro. Achados patológicos como necrose tubular também foram encontrados em tecido renal como resultado do estresse oxidativo. El-Mekkawy e colaboradores (2020) tiveram achados similares após 90 dias de exposição de Ratos *Sprague-Dawley* à AFB₁ (25 µg/kg, ig).

Recentemente, Deabes e seu grupo (2021) observaram significativas alterações oxidativas, histopatológicas e em parâmetros plasmáticos tanto no fígado quanto nos rins de ratos *Sprague Dawley*, após 17 dias de tratamento com AFB₁ (2 mg/kg, i.g.). A exposição causou elevação na atividade de enzimas hepáticas (ALT, AST, FAL e lactato desidrogenase), bem como aumentou os níveis de ureia e creatinina no soro dos animais. Essas modificações indicaram que havia prejuízo na função hepática e renal, cujo comprometimento foi comprovado através da análise histológica dos tecidos. Anormalidades da função de órgãos podem ser atribuídas ao aumento de espécies oxidativas. Nesse sentido, foi verificada uma redução dos níveis da capacidade antioxidante total e um aumento no teor de proteínas carboniladas e de peroxidação lipídica.

Além disso, estudos revelaram que o fator de transcrição Nrf2 é um dos principais mediadores na transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes em resposta ao dano oxidativo. Em condições homeostáticas, a ligação de Keap1 a Nrf2 reprime a transcrição de genes antioxidantes. Isso ocorre pois o complexo Keap1/Nrf2 causa a degradação do Nrf2 por meio da ubiquitinação através do proteossoma. Em resposta ao estresse oxidativo, através da

modificação de resíduos reativos de cisteína, a ubiquitinação é inibida e ocorre liberação de Nrf2, permitindo sua translocação para o núcleo para transcrição de genes que modulam a expressão de enzimas e efetores antioxidantes (**Figura 9**) (BAIRD; YAMAMOTO, 2020).

Figura 9 – Modelo esquemático da via de sinalização Keap1/Nrf2.



Fonte: A autora.

Ji e colaboradores (2020) mostraram que a expressão de Nrf2 foi reduzida no fígado de ratos *Wistar* expostos à dose de 200 mg/kg de AFB₁ por 21 dias alternados, da mesma forma que uma dose de 200 µg/kg, por 28 dias alternados (VIPIN et al., 2017). Associado a isso, o aumento na peroxidação lipídica e a redução da atividade de enzimas antioxidantes, podem estar relacionados a uma disfunção na via Keap1/Nrf2 induzida pelo excesso de espécies reativas geradas pela exposição à AFB₁.

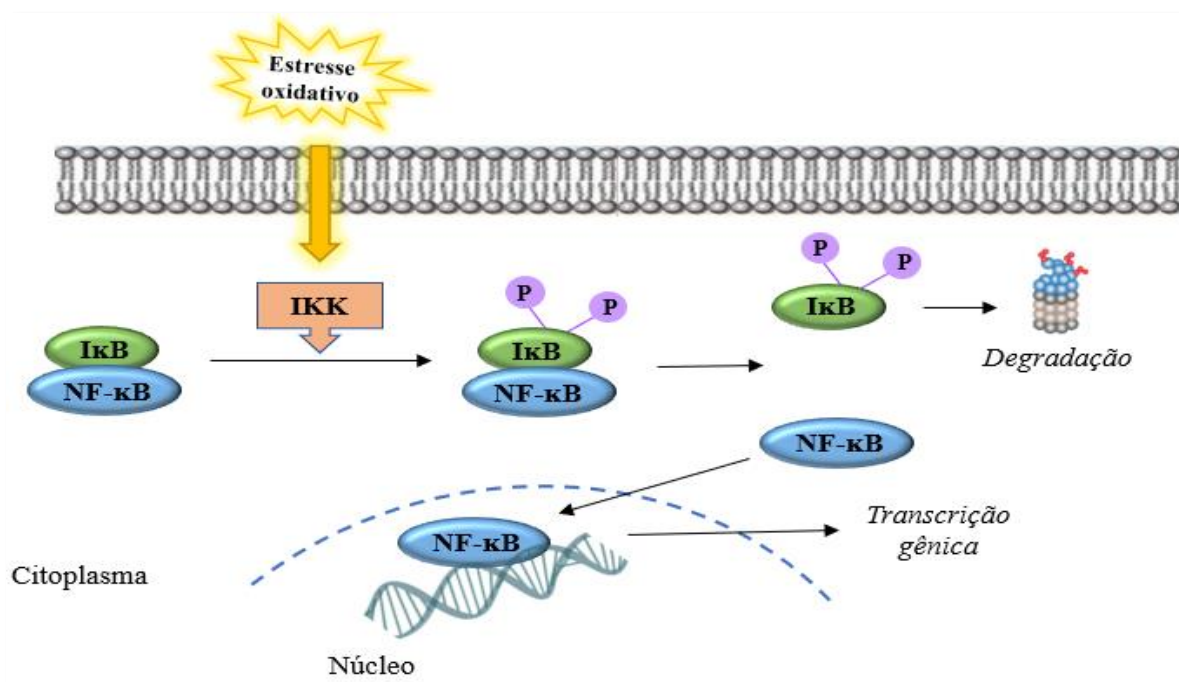
Paralelamente, o estresse oxidativo pode promover a indução da produção de mediadores inflamatórios no organismo. Da mesma forma, a ativação de células imunes durante o processo de inflamação gera RLs que perturbam a homeostase redox. Nesse sentido, estudar a contribuição do processo inflamatório no quadro geral associado ao estresse oxidativo possui extrema relevância.

2.3.4.1 Metabolismo inflamatório associado ao estresse oxidativo

Durante o estresse oxidativo, a alta produção de EROs e ERNs atua como importante sinalizador intracelular para indução de respostas inflamatórias (SERASANAMBATI; CHILAKAPATI, 2016). Esse processo resulta na ativação de vários fatores envolvidos na regulação da expressão gênica, incluindo não somente o Nrf2, mas também o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (BOWIE; O'NEILL, 2000; CAMPO et al., 2008).

Por ser ativado por uma variedade de estímulos, o NF- κ B possui inúmeras funções celulares, incluindo resposta imune à inflamação, apoptose e diferenciação em células eucarióticas (WANG; POTOYAN; WOLYNES, 2016). Em situações homeostáticas, o NF- κ B permanece inativo no citoplasma, associado a um elemento inibitório (I κ B). Quando estimulado, o I κ B é fosforilado pelo complexo IKK (inclui as subunidades catalíticas do I κ B: quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade alfa e subunidade beta – IKK β), ubiquitinado e degradado, o que permite a liberação e translocação do fator de transcrição para o núcleo, promovendo a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico sintase induzível, ciclo-oxigenase-2, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas-1 β (IL-1 β), -6 e -8, entre outras (**Figura 10**) (YAMAMOTO; GAYNOR, 2005).

Figura 10 – Modelo esquemático da via de sinalização IKK/NF- κ B.



Fonte: A autora.

Além disso, outros fatores de transcrição podem modular a expressão NF- κ B. Nesse sentido, várias evidências indicam que as vias de sinalização de IKK β /NF- κ B e Keap1/Nrf2 interagem de forma complementar para manter a homeostase celular (AHMED et al., 2017). Nesse contexto, sabe-se que o Keap1 pode marcar a degradação de I κ B, por meio da atenuação da fosforilação do fator inibitório, evitando a ativação do NF- κ B. Assim, a estimulação da via Keap1/Nrf2 regula negativamente a ativação do NF- κ B, afetando a transcrição de mediadores inflamatórios.

A sinalização de NF- κ B é complexa. Em algumas situações, o estresse oxidativo inibe a atividade de NF- κ B, enquanto em outras circunstâncias desencadeiam a sua ativação (NAKAJIMA; KITAMURA, 2013). Nesse contexto, várias condições estressoras como neoplasias (PARK; HONG, 2016), fumaça de cigarro (GARBIN et al., 2009) e a exposição à xenobióticos (SILVESTRE, 2020) mostraram aumentar a modulação transcricional mediada por NF- κ B. A relação entre o estresse oxidativo e a ativação da via do NF- κ B também depende de muitos fatores como da concentração intracelular de EROs e da duração da exposição (CUI et al., 2019). Dessa forma, essas inconsistências podem ocorrer quando as intervenções antioxidantes do organismo não são suficientes para controlar a quantidade das EROs, ocasionando eventualmente a persistência da sinalização pró-inflamatória (WAKABAYASHI et al., 2010).

No caso da exposição à micotoxina, Mehrzad e colaboradores (2017) mostraram que a AFB₁ causou aumento na produção de RLs, além da ativação da via de sinalização NF- κ B, promovendo a síntese e secreção de TNF- α , IL-1 β , interleucina-6 e outras citocinas pró-inflamatórias em células de astrócitos murinos *in vitro*. Da mesma forma, a administração repetida de AFB₁ (300 μ g/kg/21 dias) em camundongos ICR induziu a expressão gênica de NF- κ B e de citocinas relacionadas (HUANG et al., 2019).

A AFB₁ foi descrita por promover a instalação de um quadro inflamatório em organismos expostos ao toxicante, assim como demonstrou causar um desequilíbrio no sistema antioxidante. Além disso, causou hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e neoplasias tanto em estudos experimentais, como também demonstrou ser um problema atual que permanece causando prejuízos à saúde da população. Mesmo considerando os inúmeros estudos abordando a toxicidade da AFB₁, ainda não existem antídotos ou intervenções terapêuticas registradas contra a toxicidade desta aflatoxina, o que sugere uma urgente necessidade em se investigar abordagens eficazes na desintoxicação e controle da toxicidade induzida pela sua exposição.

2.3.5 Abordagem terapêutica de aflatoxicoses

Abordagens nutricionais são frequentemente estudadas por influenciarem na progressão e/ou prevenção de condições patológicas. Os compostos bioativos geralmente são os responsáveis por essas atividades, pois possuem eficiência em controlar diferentes vias metabólicas (GANESAN; JAYACHANDRAN; XU, 2018). Esses compostos são biomoléculas não essenciais, majoritariamente distribuídas em alimentos de origem vegetal, sobretudo como sistema de defesa contra patógenos e predadores (MITHÖFER; MAFFEI, 2016). Entre os compostos bioativos existentes, destacam-se os polifenóis, carotenoides, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, saponinas, terpenos e compostos organossulfurados (BERNHOF, 2010).

Nesse contexto, pesquisas envolvendo estratégias dietéticas, a base de compostos bioativos, são frequentemente estudadas na tentativa de conter os efeitos tóxicos da AFB₁. Curcumina (WANG et al., 2018), quercetina (GUGLIANDOLO et al., 2020) e licopeno (KARACA et al., 2019) são exemplos de substâncias abundantes em alimentos, as quais se destacaram pelos efeitos potenciais contra a toxicidade da micotoxina.

Considerando que muitos estudos tem associado o estresse oxidativo/inflamatório como mecanismo precursor das lesões celulares induzidas pela exposição à AFB₁, compostos eficientes em estabilizar o estado redox da célula constituem uma estratégia promissora a ser aplicada para a redução dos efeitos prejudiciais da micotoxina à saúde.

Ademais, a maioria das pesquisas tem sido realizadas a fim de encontrar compostos eficientes para ser incluídos na dieta como uma forma de suplementação (ABDEL-DAIM et al., 2021; NAIEL; ISMAEL; SHEHATA, 2019), no entanto, substâncias que poderiam ser consumidas naturalmente nas mesmas refeições em que se encontra a contaminação por AFB₁ apresentam uma relevância ainda maior. Neste contexto, destaca-se o Beta-cariofileno (BCF) como um potencial exemplo.

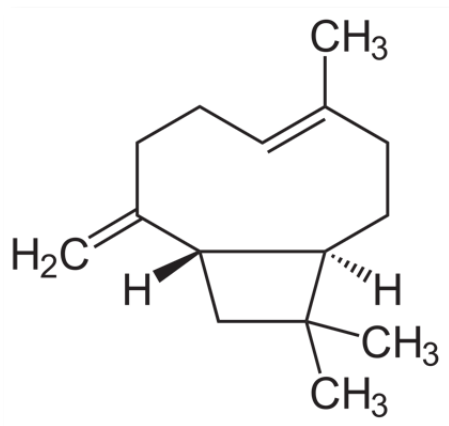
2.4 BETA-CARIOFILENO

O BCF é um composto bioativo derivado de óleos essenciais de diversas plantas. Ele tem despertado grande interesse ao meio científico devido a sua presença em uma variedade de alimentos comuns ao consumo humano e pelas suas diferentes propriedades benéficas à saúde já descritas na literatura (FRANCOMANO et al., 2019).

Na natureza, o BCF geralmente está em maior concentração nas partes aéreas, folhas, flores e florescimento e também em raízes, rizomas, caules e cascas. Entre as diferentes plantas dietéticas cujo BCF é um constituinte, destaca-se o cravo (*Syzygium aromaticum*), o orégano (*Origanum vulgare*), a canela (*Cinnamomum spp.*), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), o lúpulo (*Humulus lupulus*), a pimenta preta (*Piper nigrum*) e o óleo de copaíba (*Copaiba spp.*). Além disso, constitui-se como um dos principais compostos do óleo essencial da *Cannabis sativa L.* (CALLEJA et al., 2013; SHARMA et al., 2016).

De acordo com a sua estrutura química, ele se caracteriza como um hidrocarboneto bicíclico não aromático (**Figura 11**), de fórmula molecular $C_{15}H_{24}$. É descrito como um composto bioativo que pertence à classe dos terpenos e a subclasse dos sesquiterpenos, de acordo com o seu número de unidades de isopreno (C_5H_8) na molécula. Além disso, o BCF possui uma estrutura química molecular incomum que estimulou o interesse dos primeiros pesquisadores em 1964, os quais realizaram a primeira síntese completa do composto (COREY; MITRA; UDA, 1964). A sua estrutura é composta por dois ciclos, entre eles, um formado por nove átomos de carbono com uma dupla ligação na configuração E, e outro ciclobutano, atípico em derivados vegetais (FRANCOMANO et al., 2019).

Figura 11 – Estrutura química do BCF.



Fonte: Fidy (2016).

O BCF é conhecido quimicamente como trans-(1R,9S)-8-metileno-4,11,11-trimetilbicyclo e também reconhecido por seus sinônimos cariofileno, (E)-beta-cariofileno, (-)-trans-cariofileno e L-cariofileno. Nas plantas, o sesquiterpeno é comumente encontrado em combinação com iso-cariofileno, alfa-humuleno e óxido de BCF. Nesse contexto, o BCF e iso-

cariofileno são isômeros trans e cis, respectivamente, alfa-humuleno é um isômero de anel aberto, enquanto o óxido de BCF constitui o seu metabólito oxidado (FIDYT et al., 2016).

No que se refere as suas propriedades físicas, o BCF existe no estado líquido, com densidade de 0,89 g/mL à 20 °C e possui ponto de ebulição no intervalo de 253-262°C, a 760 mmHg. Caracteriza-se como uma substância levemente amarelada, oleosa e, portanto, pouco solúvel em solventes polares. O BCF é sensível à luz, à umidade e a altas temperaturas. Além disso, na exposição ao oxigênio se auto oxida em óxido de cariofileno e em outros compostos de atividade biológica reduzida ou nula (ROTICHRON, 2016; SHARMA et al., 2016).

O BCF geralmente não é consumido como uma entidade única, mas como um componente da dieta por meio de vegetais, especiarias, frutas, grãos e alimentos derivados. Dessa forma, o BCF pode ser consumido na mesma refeição que foi contaminada com micotoxinas (SHARMA et al., 2016). Assim, o sesquiterpeno parece ser um importante candidato a ser estudado para minimizar ou combater a toxicidade da AFB₁. Nesse sentido, a avaliação de segurança da substância torna-se fundamental ao cogitá-lo como agente terapêutico.

2.4.1 Avaliação de segurança

A presença do BCF em milhares de plantas que fazem parte da dieta humana é indicativa da sua segurança. Nesse sentido, vários estudos *in vivo* e *in vitro* foram realizados a fim de confirmar o perfil de segurança do composto. Alguns trabalhos foram utilizados por autoridades regulatórias com a finalidade de regulamentar o seu uso em alimentos.

Oliveira e colaboradores (2018) avaliaram a toxicidade oral aguda de uma única dose de BCF (300 ou 2000 mg/kg), através de 14 dias de monitoramento e a toxicidade de dose repetida (28 dias) de BCF (300 ou 2000 mg/kg) em camundongos *Swiss* fêmea, conforme as Diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico. A ausência de sinais clínicos adversos e mortalidade dos animais em ambos os protocolos durante o período de exposição, conduziu a classificação do BCF como uma substância de categoria 5 (tóxica em doses superiores a 2000 mg/kg de peso corporal).

A avaliação toxicológica subcrônica (90 dias) por via i.g., realizada por Schmitt, Levy e Carroll (2016) demonstrou ausência de sintomas indicativos de toxicidade na dose de 700 mg/kg/dia de BCF em ratos *Wistar*. Da mesma forma, Hart e Wong (1971) verificaram em seu experimento uma DL₅₀ oral superior a 5000 mg/kg em ratos da mesma linhagem supracitada.

Ademais, a via de administração intraperitoneal também foi relatada sem toxicidade em vários estudos (BAHI et al., 2014; CHO et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2016).

Assim, nenhuma alteração fisiológica biologicamente relevante foi observada nos estudos que avaliaram a exposição do BCF. Não foi constatada nenhuma alteração na ingestão de água e alimentos, no peso corporal e em marcadores de estresse oxidativo. Além disso, foram preservados os parâmetros hematológicos e a morfologia e histologia dos principais órgãos e tecidos (cérebro, coração, fígado, pulmões, baço, rins), o que demonstrou experimentalmente sua segurança e tolerabilidade em animais (OLIVEIRA et al., 2018; SCHMITT; LEVY; CARROLL, 2016). Ainda, não foi constatada mutagenicidade no teste de Ames e instabilidades cromossômicas no teste do micronúcleo (DI GIACOMO et al., 2018; DI SOTTO; EVANDRI; MAZZANTI, 2008; JASSO; GONZÁLEZ; BUJAJIDAR, 2009).

Um estudo de toxicidade subcrônica de 90 dias de exposição ao BCF em ratos do sexo masculino e feminino da linhagem *Sprague-Dawley* (BAUTER, 2012) foi encaminhado para análise do Painel Científico de Materiais de Contato com Alimentos, Enzimas, Aromas e Auxiliares de Processamento da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). Esse Painel avalia a segurança de substâncias adicionadas a alimentos antes que seu uso possa ser autorizado na UE. Com base nos achados toxicológicos, foi concluído que a dose de 222 mg/kg de peso corporal por dia de BCF fornece um nível sem efeitos adversos (NOAEL) (EFSA CEF PANEL, 2015).

A avaliação do perfil de segurança do composto culminou na sua aprovação para o consumo humano como aditivo alimentar, intensificador de sabor e agente aromatizante por agências americanas (Administração de Alimentos e Medicamentos – FDA) e europeias (EFSA) e também pelo Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e da Organização Mundial da Saúde, que declarou que o BCF não apresentava nenhuma preocupação de segurança sob suas condições de uso (JECFA, 2004; SHARMA et al., 2016). Nos EUA, o Painel de Especialistas da Associação de Fabricantes de Sabor e Extrato atribuiu ao composto o status de "Geralmente reconhecido como seguro" (ADAMS et al., 2011). Além disso, também foi aprovado como aromatizante em produtos de higiene (BHATIA; LETIZIA; API, 2008) e como aditivo permitido em produtos do tabaco (FOWLES; BATES; NOITON, 2000).

A alta segurança relatada em estudos experimentais faz do BCF um candidato promissor para pesquisas clínicas e usos terapêuticos. Para isso, é fundamental explorar as propriedades

relacionadas ao percurso do composto no organismo, bem como sobre o mecanismo pelo qual ele exerce sua atividade.

2.4.2 Farmacocinética e farmacodinâmica

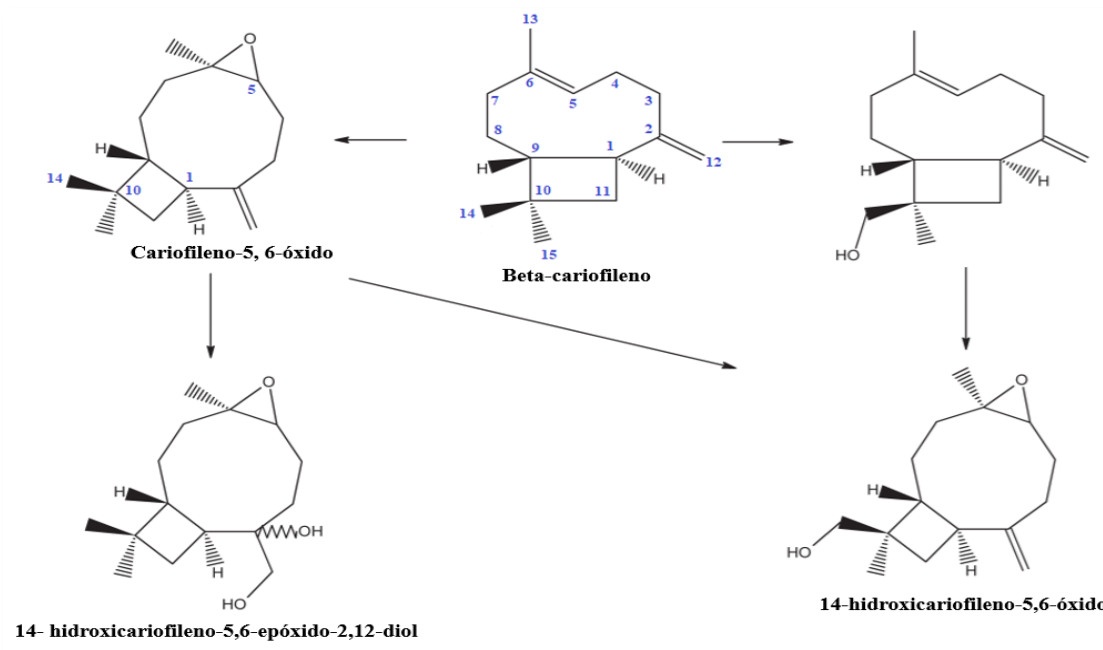
Embora as evidências experimentais disponíveis sobre o BCF sejam promissoras, ainda existem lacunas referentes a sua farmacocinética e farmacodinâmica. Os estudos relacionados ao composto tiveram início há algum tempo, no entanto, o número anual de publicações sobre o sesquiterpeno foi amplificado apenas a partir dos anos 2000 (SHARMA et al., 2016).

Acerca da sua solubilidade, o coeficiente de partição octanol/água descrito foi 6,3 (FEEDAP, 2016), o qual indica a tendência do composto em se difundir no meio lipossolúvel. Nesse contexto, o BCF demonstrou a capacidade de interagir com as bicamadas fosfolipídicas através de um modelo de biomembrana *in vitro* de vesículas multilamelares de dimiristoilfosfatidilcolina, o que sugere a sua capacidade de ser absorvido pelas membranas biológicas (SARPIETRO et al., 2015).

Asakawa e seu grupo de pesquisa (1986) estudaram o metabolismo do BCF em coelhos após a administração de uma única dose de 2 g (i.g.). Dois dias após a exposição, os metabólitos do composto foram detectados na urina, demonstrando que o BCF é absorvido pelo organismo. Em coelhos, o BCF se converte, inicialmente, em dois metabólitos por meio de diferentes reações químicas. O primeiro é formado através da epoxidação da ligação dupla localizada entre os carbonos 5 e 6 do BCF para produzir o metabólito cariofileno-5, 6-óxido. O segundo ocorre por meio da hidrólise no carbono 14 do sesquiterpeno, gerando, por fim, o metabólito 14-hidroxicariofileno-5,6-óxido. O cariofileno-5, 6-óxido pode sofrer hidroxilação da dupla ligação localizada entre o carbono 2 e 12 e, resultando no composto 14- hidroxicariofileno-5,6-epóxido-2,12-diol (**Figura 12**). A biotransformação do BCF gera metabólitos mais polares, os quais são eliminados pela via urinária.

Apesar de a farmacocinética do BCF ter sido demonstrada em coelhos, suspeita-se que o mesmo sofra transformações sequenciais semelhantes também em humanos, contudo, faltam dados experimentais que confirmem esta hipótese (FIDYT et al., 2016).

Figura 12 – Metabolismo do BCF em coelhos.



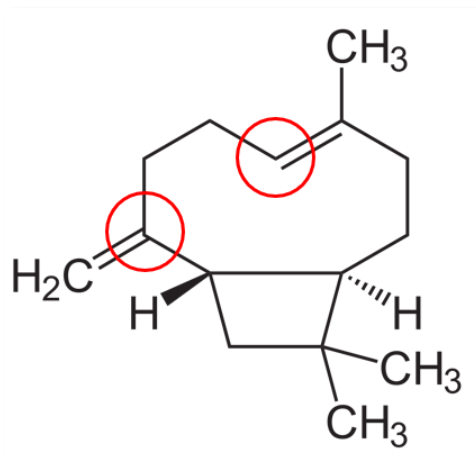
Fonte: Adaptação de Asakawa (1986) e Fidy (2016).

Os numerosos benefícios terapêuticos promovidos pelo BCF estão relacionados a ativação de diferentes alvos moleculares. O principal descrito na literatura relaciona-se ao sistema endocanabinoide, o qual é composto pelos receptores canabinoides do tipo 1 e 2 (CB₁ e CB₂). Os receptores CB₁ encontram-se distribuídos principalmente no sistema nervoso central e CB₂ em órgãos periféricos e células imunes. Além disso, fazem parte do sistema os agonistas desses receptores, entre eles se destacam os endocanabinoides, cuja ativação está relacionada ao controle de diversas funções fisiológicas como cognição, nocicepção, inflamação, cardioproteção, metabolismo energético e hepatoproteção. Algumas substâncias exógenas, como o BCF, são capazes de mimetizar a ação dos agonistas endógenos. Nesse sentido, o BCF é agonista seletivo de CB₂, por isso é desprovido dos efeitos psicoativos associados à ativação dos receptores CB₁ (BATTISTA et al., 2012; DE FONSECA et al., 2005;). Assim, o BCF denota um importante potencial para pesquisa e intervenção em múltiplas áreas da saúde humana. Outros alvos moleculares cujo BCF demonstrou se ligar para exercer efeitos protetores foram os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma α/γ , μ -opioides, tipo Toll, entre outros. No entanto, são escassas as publicações que avaliaram o efeito do sesquiterpeno mediado por esses alvos (SHARMA et al., 2016).

Além disso, BCF pode promover efeitos benéficos que estão associados as características estruturais e químicas do composto. Em reação com espécies reativas, os sítios

de ligação que compreendem as olefinas favorecem a geração de radicais terciários que estabilizam os RLs, impedindo a continuidade da reação radicalar oxidativa (**Figura 13**) (MAHMOUD et al., 2014; OJHA et al., 2016).

Figura 13 – Locais para ação antioxidante do BCF.



Fonte: Ojha (2016).

O BCF atua modulando diversos alvos moleculares em diferentes distúrbios, por alteração da expressão gênica e de vias moleculares e celulares de sinalização, através da interação direta ou indireta com receptores. Seu efeito como antioxidante e anti-inflamatório é muitas vezes atribuído a atenuação de processos patológicos (LI et al., 2021b; SOTO et al., 2021).

2.4.2.1 Efeito antioxidante e anti-inflamatório

Um dos efeitos mais estudados do BCF está relacionado a sua capacidade de modular o estresse oxidativo e o processo inflamatório, ambos relatados em diversas condições patológicas (FRANCOMANO et al., 2019). Nesse sentido, sendo esse o principal mecanismo subjacente aos danos causados pela exposição à AFB₁, a associação da micotoxina com composto bioativo tem grande potencial de minimizar tal toxicidade. Ainda, alguns estudos demonstraram a atividade hepatoprotetora do BCF em diversas condições deletérias, fato que reforça a hipótese do benefício da sua associação com AFB₁.

Nesse sentido, o BCF foi descrito por atenuar o estresse oxidativo através de três principais mecanismos: estímulo ao sistema antioxidante endógeno, atividade de neutralização direta de RLs ou ainda mediante a redução do processo inflamatório (SIBIN et al., 2018).

González e colaboradores (2014) demonstraram a capacidade do BCF em aumentar a atividade de GST, em um modelo de toxicidade por exposição ao poluente benzopireno em camundongos *Swiss*. Esse aumento sugere que o BCF poderia catalisar o processo de conjugação de metabólitos tóxicos com GSH, favorecendo a eliminação mais rápida do toxicante pelo organismo. A este respeito, foi relatado que o BCF induz a translocação nuclear Nrf2 que regula a expressão de genes antioxidantes como SOD, GSH, GST e CAT (LOU et al., 2016; MEERAN et al., 2021).

Ademais, foi relatado que o BCF apresenta ação antioxidante associada às características estruturais e químicas do composto, por meio da estabilização de RLs. Calleja e seu grupo de pesquisa (2013) relataram a atividade antioxidante de uma dose única de BCF (215 ou 430 mg/kg, i.g.) em um modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por tetracloreto de carbono em ratos *Wistar*. O BCF mostrou aumentar a capacidade antioxidante total nas duas doses e foi eficiente em inibir a peroxidação lipídica, provavelmente devido à capacidade de estabilizar os radicais $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} verificadas nesse estudo. Além disso, o composto restaurou os marcadores plasmáticos de lesão hepática (ALT, AST, FAL) reduziu o grau de esteatose e a extensão da fibrose no fígado. Outros autores descreveram atividades antioxidantes semelhantes do composto (OJHA et al., 2016; VINHOLES et al., 2014). Assim, BCF demonstra ser um inibidor eficaz do dano celular induzido por espécies reativas de oxigênio.

Ademais, foi relatado que o BCF melhora o dano hepático induzido por D-galactosamina e lipopolissacarídeo por meio da supressão de vias de sinalização inflamatória associadas ao NF- κ B (CHO et al., 2015). Esses achados estão de acordo com os encontrados por Louvet e seu grupo de pesquisa (2011) que mostraram que o BCF apresentou efeitos hepatoprotetores ao induzir a expressão de genes que limitam a ativação do NF- κ B e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) em células hepáticas em um modelo experimental de doença hepática induzida por álcool. Outras pesquisas relataram a capacidade do BCF de regular negativamente a expressão da ciclo-oxigenase-2, da 5-lipoxigenase, do TNF- α e das interleucina-6 e IL-1 β em estudos *in vitro* e em modelos animais de neuroinflamação (GUO et al., 2014; OJHA et al., 2016).

Além de seus efeitos hepatoprotetores, o BCF também atuou como nefroprotetor em um modelo de dano induzido por cisplatina em camundongos C57Bl/6J, ação esta que também pode apresentar benefícios no quadro de toxicidade causado por exposições à AFB₁. Nesse estudo, o BCF melhorou os parâmetros bioquímicos de função renal e os parâmetros

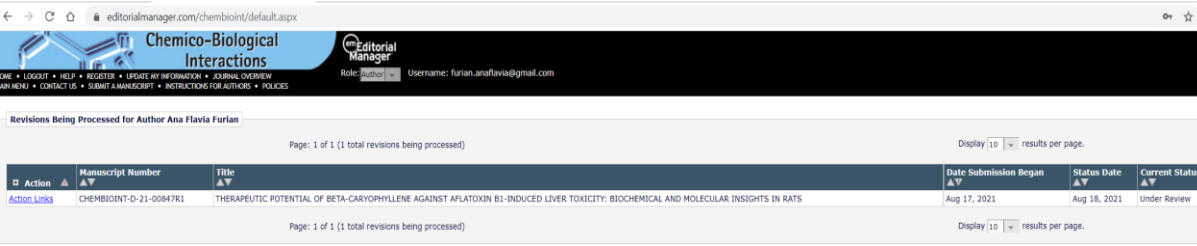
morfológicos analisados. Também reduziu as respostas inflamatórias, estresse oxidativo-nitrativo observados, atuando como protagonista no reestabelecimento da homeostase redox celular (HORVÁTH et al., 2012).

O efeito do BCF (50 mg/kg, i.g.) também foi avaliado após isquemia e reperfusão renal em ratos *Wistar*. O composto reduziu as citocinas pró-inflamatórias e a peroxidação lipídica e aumentou o conteúdo renal de GSH. O BCF não afetou significativamente os parâmetros hemodinâmicos renais ou tubulares, possivelmente devido à gravidade da lesão induzida, no entanto, mostrou atenuar o processo oxidativo e inflamatório gerado no protocolo estudado (HAMMAD et al., 2018).

Assim, os efeitos benéficos do BCF em diversos estudos e situações patológicas, a segurança e tolerabilidade do composto e a possibilidade de ser consumido nas mesmas refeições em que se encontra a contaminação pela micotoxina, são particularidades que justificam o estudo do BCF contra a toxicidade induzida por exposições à AFB₁.

3 MANUSCRITO

Após a obtenção da carta de aprovação desse projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa instituição (protocolo CEUA nº 5234060519 - Anexo A), os experimentos foram conduzidos e os dados obtidos processados. O presente trabalho contempla os materiais, métodos, resultados e discussão dos dados obtidos, os quais estão apresentados na forma de manuscrito científico, intitulado “*Therapeutic potential of beta-caryophyllene against aflatoxin b1-induced liver toxicity: biochemical and molecular insights in rats*”, atualmente submetido na revista *Chemico-Biological Interactions*, em fase de revisão R1 (Qualis B1 – Ciências Biológicas II).



editorialmanager.com/chembioint/default.aspx

Chemico-Biological Interactions

Editorial Manager

Role: Author Username: furlan.anafavia@gmail.com

Revisions Being Processed for Author Ana Flavia Furlan

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed)

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
Action Links	CHEMBIOINT-D-21-00847R1	THERAPEUTIC POTENTIAL OF BETA-CARYOPHYLLENE AGAINST AFLATOXIN B1-INDUCED LIVER TOXICITY: BIOCHEMICAL AND MOLECULAR INSIGHTS IN RATS	Aug 17, 2021	Aug 18, 2021	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed)

<< Author Main Menu

**THERAPEUTIC POTENTIAL OF BETA-CARYOPHYLLENE
AGAINST AFLATOXIN B1-INDUCED LIVER TOXICITY:
BIOCHEMICAL AND MOLECULAR INSIGHTS IN RATS**

Running title: THERAPEUTIC EFFECTS OF BETA-CARYOPHYLLENE IN
AFLATOXIN B1 -INDUCED LIVER TOXICITY

Da SILVEIRA, Alice Rosa^a; ROSA, Érica Vanessa Furlan^a, SARI, Marcel Henrique
Marcondes^a, SAMPAIO, Tuane Bazanella^a, Dos SANTOS, Jamila Trindade^a, JARDIM,
Natália Silva^b, MÜLLER, Sabrina Grendene^b, OLIVEIRA, Mauro Schneider^a;
NOGUEIRA, Cristina Wayne^b; FURIAN, Ana Flávia^{a,c*}.

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

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

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

*Corresponding author: Ana Flávia Furian, Ph.D.

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
ORCID: 0000-0002-8536-1352

Abstract

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a mycotoxin highly toxic and carcinogenic to humans due to its potential to induce oxidative stress. The Beta-caryophyllene (BCP) have been highlighted for its broad spectrum of pharmacological effects. The present study aimed to investigate the beneficial effects of BCP against the susceptibility of hepatic and renal tissues to AFB₁ toxicity, in biochemical parameters to assess organ function, tissue oxidation, and the immunocontent of oxidative and inflammatory proteins. Male Wistar rats was exposed to AFB₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or BCP (100 mg/kg, i.p.) for 14 successive days. It was found that exposure to AFB₁ did not change the measured renal toxicity parameters. Also, AFB₁ increased liver injury biomarkers (gamma glutamyl transferase and alkaline phosphatase) and reduced levels of non-enzymatic antioxidant defenses (ascorbic acid and non-protein thiol), however did not cause changes in the lipid peroxidation levels. Moreover, AFB₁ interfered in oxidative pathway regulated by Kelch-like ECH-associated protein (Keap1)/nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), overacting Glutathione-S-Transferase (GST) activity. Lastly, a main effect of AFB₁ on the total interleukin 1 beta (IL-1β) was observed. Remarkably, the associated treatment of AFB₁ + BCP improved altered liver parameters. In addition, BCP and AFB₁ + BCP groups showed an increase in the levels of inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKKβ). Thus, these results indicated that BCP has potential protective effect against AFB₁ induced hepatotoxicity.

Keywords: Mycotoxins, Keap1/Nrf2, oxidative stress, hepatorenal toxicity, rodents.

1 Introduction

Aflatoxins are mycotoxins produced by *Aspergillus* species of fungi which contaminate improperly stored grains and other staple food products [1]. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most prevalent and toxic among the existing mycotoxins [2]. Humans are exposed to aflatoxins

through ingestion of contaminated food such as corn, rice, wheat, oilseeds and spices [3]. Of highlight, the AFB₁ biotransformation to AFB₁-exo-8,9-epoxide (AFBO) isomer is related to its toxic effects [4]. It affects especially the liver and also other organs such as the kidneys [5]. AFB₁ is a potent hepatic carcinogen, lethal when consumed in large quantities. Aflatoxin chronic exposures may lead to immunosuppression and genotoxicity, while acute exposures can result in oxidative damage and neoplasms [6]. Therefore, AFB₁ pose a serious risk to human health as well as a challenge to food security.

The disturbance in the balance between antioxidants and pro-oxidants (free radicals and other reactive species – RS) is described as the mechanism underlying the toxigenic potential of AFB₁ [7]. Therefore, natural compounds which could stabilize redox status are a promising strategy for reducing the harmful health effects of mycotoxin. Bioactive compounds such as curcumin, quercetin and lycopene demonstrated to inhibit the AFB₁ induced toxicity by expression of antioxidant enzymes and biotransformation enzymes against AFB₁-induced toxicity [8-10].

During oxidative stress, the high production of free radicals and RS acts as an important intracellular signal to induce inflammatory responses [11]. This process results in the activation of factors involved in the gene expression regulation, such as erythroid nuclear factor 2 related to factor 2 (Nrf2) and nuclear factor kappa B (NF-κB) [12,13]. Nrf2 is one of the main mediators in the transcription of genes that encode antioxidant and metabolic detoxification enzymes in response to oxidative damage [14]. Induction of Nrf2 signaling is associated with the prevention of hepatotoxicity *in vivo* and *in vitro* [15,16]. NF-κB plays a key role in regulating inflammatory responses [17]. Some evidence indicate that Nrf2 and NF-κB signaling pathways interact in a complementary way to maintain cell homeostasis [18]. In addition, conjugation of AFBO to glutathione (GSH) is mediated by glutathione S-transferases (GSTs), is a key endogenous

AFBO detoxification mechanism [19]. Thus, bioactive compounds present in foods that have activity on these pathways may be beneficial in protecting against AFB₁-induced toxicity.

Beta-caryophyllene (BCP) is a sesquiterpene found in essential oils of a wide variety of plant origin products such as in black pepper, cloves, cinnamon, rosemary, oregano and copaiba [20,21]. BCP drew attention for its broad bioactivity, mainly related to its antioxidant and anti-inflammatory effects [22,23]. Studies have shown that BCP induces the nuclear translocation of Nrf2 [24,25]. In this regard, BCP has been described as a hepatic inducer of GST activity [26]. In addition, BCP had hepatoprotective effects through the suppression of NF-κB-associated inflammatory signaling pathways [27,28]. However, the protective effects of BCP against AFB₁-induced toxicity remain unknown. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of BCP against toxicity induced by exposure to AFB₁. Therefore, findings were reported on the effects of AFB₁ and BCP on hepatorenal function in Wistar rats submitted to 14 days of subacute administration to the substances.

2 Materials and methods

2.1 Drugs and reagents

AFB₁ (Cas No. 1162-65-8, ≥ 95% purity) and BCP (Cas No. 22839-47-0; ≥95% purity) were obtained from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). A stock solution of AFB₁ was prepared by dissolving it in 2% of dimethyl sulfoxide (DMSO) and daily diluted in 0.9% NaCl up to the working concentration. BCP was daily prepared, immediately before administration, diluting it in 0.9% NaCl containing 0.05% Tween 80[®]. The commercial kits used for biochemical assays were obtained from Bioclin (Minas Gerais, Brazil). The antibodies sources are described in **Table S1**. All other chemicals used for these experiments were of pure analytical grade or obtained from standard commercial suppliers.

2.2 Animals

Twenty-eight 3-week-old male Wistar rats, weighing 50-60 g were used in the study. The animals were distributed in four rats per cages (polypropylene, 41 cm × 34 cm × 16 cm L × W × H, 1394 cm²), with a floor covered by autoclaved shavings, housed on a ventilated rack, under controlled environmental conditions (12:12 h light-dark cycle, with lights turned on at 07:00 a.m.; 24 ± 1 °C; 45-65% relative humidity) and with free access to water and food. In order to avoid the unnecessary use of animals, every effort was made to reduce the number of them used in the experiments, as well as minimize their suffering. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria, Brazil (Process n° 5234060519/2019) and carried out in strict accordance with the recommendations in the 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).

2.3 Experimental Design

Initially, the animals were randomly divided in four different groups (control, AFB₁, BCP, AFB₁+BCP, n = 7 animals/group) and received one daily administration both AFB₁ and BCP, for 14 days. Throughout the subacute treatment, all animals received AFB₁ or its vehicle by intragastric gavage (i.g.) and, subsequently, BCP or its vehicle by intraperitoneal route (i.p.) as follows:

Group 1 – Control: 2% DMSO, i.g. + 0.9% NaCl and 0.05% Tween 80, i.p.;

Group 2 – AFB₁: AFB₁ 250 µg/kg, i.g. + 0.9% NaCl and 0.05% Tween 80, i.p.;

Group 3 – BCP: 2% DMSO, i.g. + BCP 100 mg/kg, i.p.;

Group 4 – AFB₁+BCP: AFB₁ 250 µg/kg, i.g. + BCP 100 mg/kg, i.p.

Rats received treatments in a repeated administration 1 mL/kg of body weight (BW). The dose, administration route and treatment schedule of BCP were based on previous studies by our research group [29] and AFB₁ administration protocol was based on previous studies of our group and literature [30-33].

The animals were daily monitored, before receiving the treatment, to record the BW gain and also to evaluate the health status. On the fourteenth day, approximately 2 hours after the last treatment, animals were euthanized by decapitation and their blood collected from the body trunk in heparinized vials for analysis of liver and kidney injury biomarkers. Their organs (adrenal glands, brain, heart, liver, lungs, kidneys, and testicles) were dissected, removed and weighed as a measure of general toxicity. Furthermore, the liver and kidneys were saved for biochemical evaluations or molecular analyzes. Organ weights and relative organ weights

This toxicity parameter was measured through the wet organ weight (absolute weight) and BW of the rat on the day of euthanasia. From that, organ weight and relative organ weight were calculated.

2.4 Plasma biochemical parameters

In order to get the plasma fractions, heparin was used for collecting blood samples. Following, they were centrifuged at $2500 \times g$ for 10 min. Plasma samples were used to estimate some biomarkers of hepatorenal function using commercial kits (Bioclin, Minas Gerais, Brazil). The alkaline phosphatase (ALP) and gamma glutamyl transferase (GGT) activities were measured to investigate liver functionality while urea and creatinine levels to assess renal function.

2.5 Tissue preparation for biochemical assays

Rat liver and kidneys samples were homogenized in 30 mM Tris hydrochloride (Tris-HCl) buffer at pH 7.4, 1:10 (w/v), and then centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at 4 °C to yield the supernatant fraction (S_1). Freshly prepared S_1 was used for determining some oxidative status and antioxidant defense parameters described below.

2.5.1 TBARS levels determination

To measure the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, S_1 aliquots of liver or kidneys were incubated with a mix containing 0.8% thiobarbituric acid, acetic acid buffer (2.5 M, pH 3.4), 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and water for 2 h at 95 °C. The absorbance in the supernatant was measured at 532 nm. The results were calculated as nmol of malondialdehyde (MDA)/g of tissue. The TBARS assay was performed according to methodology described by Ohkawa et al. [34].

2.5.2 Non-protein thiol levels

To determine the non-protein thiol (NPSH) content, S_1 aliquots of liver or kidneys were mixed with 10% trichloroacetic acid (TCA) (1:1, v/v), centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at 4 °C for obtaining S_2 fraction. The NPSH levels were determined using 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), which reacts with the free thiol groups contained in S_2 , generating a yellow complex measurable in the spectrophotometer (412 nm) [35]. The results were expressed as nmol of NPSH/g of tissue.

2.5.3 Ascorbic acid levels

To determine the ascorbic acid content, S_1 aliquots of liver or kidneys were precipitated with 5% TCA (1:2) and centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at 4 °C (S_2). The S_2 generated was incubated at 37 °C for 3 h with 13.3% TCA, thiourea (0.03 M), dinitrophenyl hydrazine (0.1 M) and copper sulfate (0.017 M) as color reagent in acid ambient. The reaction was quenched

by addition of 65% sulfuric acid (v/v). The reaction product was spectrophotometrically determined at 520 nm [36]. The results were expressed as nmol of acid ascorbic/g of tissue.

2.5.4 Glutathione-S-transferase activity

To determine the Glutathione-S-Transferase (GST) activity, S₁ aliquots of liver or kidneys were mixed with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM glutathione and 100 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) were used. The reaction product was spectrophotometrically detected at 340 nm [37]. The results were expressed as CDMB conjugated nmol/min/mg protein.

2.6 Protein content

The protein content in each sample of S₁ was performed according to Bradford method [38]. Protein quantification for western blot assay was measured by the bicinchoninic acid (BCA) method with a commercially available kit (Thermo-Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Bovine serum albumin (1 mg/ml) was used as standard for both methods.

2.7 Western blot assay

Based on the results of oxidative status, the hepatic tissue was selected to further investigate the putative mechanisms underlying the BCP beneficial action against AFB₁ toxicity. The liver samples (n=5-7 per group) were homogenized in an ice-cold RIPA lysis buffer supplemented with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and a protein inhibitor cocktail (Thermo-Fisher Scientific, Massachusetts, USA). The lysate was centrifuged at 13000 × g for 20 min at 4 °C. The supernatant was used for protein quantification that was measured by the BCA method (*Section 2.6*). The final protein concentration in each sample was adjusted to 2 µg/µL with a sample buffer containing 2-mercaptoethanol. The samples (30 µg of protein) and the pre-stained molecular weight standards (Bio-rad, California, USA) were separated by

12% SDS-PAGE electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane (0.45 μm by Transfer-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-rad, California, USA) (1.0 A) and protein loading was confirmed by Ponceau Red. The membranes were blocked with 5% milk solution and were incubated overnight at 4 °C with anti-rabbit Nrf2 (1:1000, Santa Cruz), anti-goat Keap1 (1:1000, Santa Cruz), anti-rabbit NF- κ B (1:1000, Abcam), anti-rabbit I κ B β (1:1000, Cell Signaling) and anti-goat IL-1 β (1:1000, Santa Cruz) antibodies (**Table S1**). After 24 h, the membranes were washed and incubated with the respective secondary antibody over 1 h at 4 °C. For protein immunodetection, a chemiluminescence kit was used (Bio-rad, California, USA) and the signals were captured by exposing the blots to ChemiDoc MP (Bio-rad, California, USA). The intensity of each protein band was quantified by densitometry using Image J for Windows (NHI, Bethesda, MD, USA). The values were derived from the ratio between units obtained by the protein band and the respective Ponceau Red band [39]. Data are expressed as percentage of control.

2.8 Statistical Analysis

The data were expressed as mean (s) \pm standard deviation (SD), using the Statistica 7 software for data evaluation. The Gaussian distribution was checked by Shapiro-Wilk and Kolmogorov- Smirnov's omnibus normality test to assess the homogeneity of variances. Statistical analysis was carried out by two-way ANOVA and Duncan post hoc used for multiple comparisons. *P* values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as indicative of significance. All *F* values, degrees of freedom and *P*-values are available in the supplementary material (**Table S2**).

3 Results

3.1 Effects of AFB₁ and BCP treatments on rats' body weight and organo-somatic indices

Data from BW gain (**Figure 1**) and relative weight of liver and kidneys (**Table 1**) in repeated AFB₁ and BCP exposure, separately or in combination for 14 days, showed no statistical difference among the groups. In addition, AFB₁ and/or BCP have no effect regarding absolute or relative weight of adrenal glands, brain, heart, liver, lungs, kidneys and testicles ($p>0.05$; Data not shown). Over the experimental period, there was no animal mortality in any treatment group.

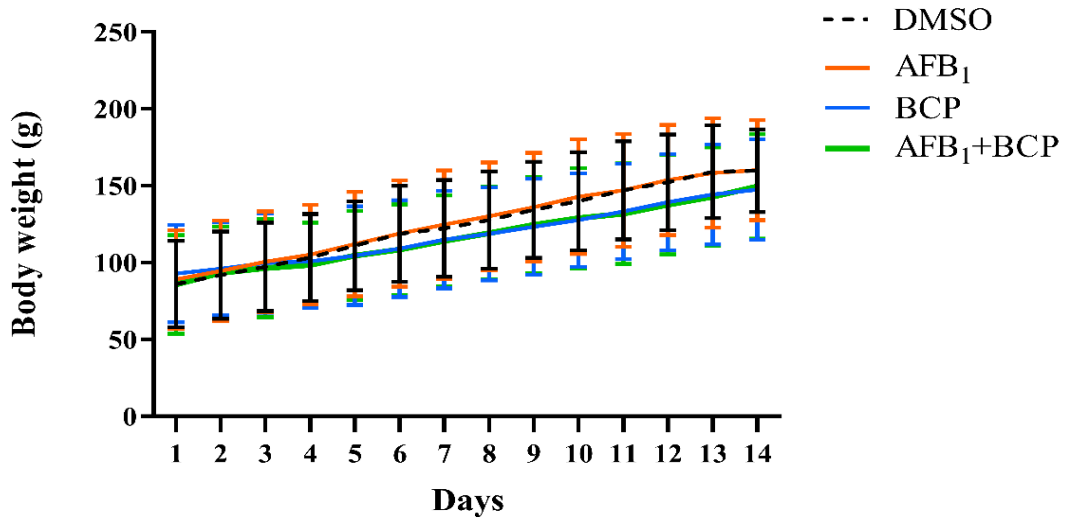


Figure 1 – Effect of AFB₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or BCP (100 mg/kg, i.p.) on BW gain. Data are mean ± SD for n = 7 animals in each group. The results were evaluated by repeated measures two-way ANOVA ($p>0.05$).

Table 1 – Effect of AFB₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or BCP (100 mg/kg, i.p) on organ-to-BW ratio of animals.

Relative weight	Treatment			
	Control	BCP	AFB ₁	AFB ₁ +BCP
Kidneys	0.893 ± 0.180	0.928 ± 0.096	0.924 ± 0.067	0.926 ± 0.137
Liver	4.353 ± 0.387	4.513 ± 0.614	4.313 ± 0.323	4.590 ± 0.371

Data are mean ± SD for n = 7 animals in each group. The results were evaluated by Two-way ANOVA ($p>0.05$).

3.2 Biomarkers of hepatorenal function in rats treated with AFB₁ and BCP

GGT and ALP activities were increased in AFB₁ group compared with control. The BCP co-treatment (AFB₁+BCP group) reduced GGT alteration at the control level and attenuated the ALP activity. Urea and creatinine levels showed no statistical difference among the groups. No statistically significant differences were found in the biochemical parameters of the BCP plasma compared to the control (Table 2).

Table 2 – Effect of AFB₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or BCP (100 mg/kg, i.p) on hepatic and renal biochemical parameters in plasma.

Parameters	Treatment			
	Control	BCP	AFB ₁	AFB ₁ +BCP
GGT^a	1.928 ± 0.285	1.875 ± 0.388 [#]	2.460 ± 0.529 [*]	2.024 ± 0.326 [#]
ALP^a	359.667 ± 89.978	389.103 ± 73.892 [#]	524.759 ± 172.071 [*]	433.563 ± 91.262
Urea^b	330.000 ± 91.589	325.510 ± 132.420	263.926 ± 75.582	309.116 ± 114.575
Creatinine^b	1.697 ± 0.067	1.501 ± 0.118	1.888 ± 0.862	1.568 ± 0.362

Data are mean ± SD for n = 7 animals in each group. The results were evaluated by Two-way ANOVA followed by Duncan' test. The asterisk (*) means p<0.05 in comparison to control group; the hashtag (#) means p<0.05 in comparison to AFB₁ group. Abbreviations: GGT, Gamma Glutamyl transferase; ALP, alkaline phosphatase; (^a) means U/L; (^b) means mg/L.

3.3 Oxidative stress parameters in rats treated with AFB₁ and BCP

Lipid peroxidation in liver was analyzed using the TBARS assay, but there were no changes between the groups. The hepatic NPSH content was evaluated to investigate the non-enzymatic antioxidant defenses. AFB₁ reduced NPSH content in the liver when compared to those from control group. Importantly, BCP co-treatment (AFB₁+BCP) prevented this alteration. In addition, AFB₁ group showed reduced content of ascorbic acid in the liver in comparison to control. The BCP co-treatment (AFB₁+BCP group) attenuated the ascorbic acid levels reduction induced by AFB₁. Furthermore, the GST activity in the liver of animals

receiving AFB₁ showed a statistically marked increase in comparison to all groups. Of note, AFB₁+BCP treatments normalized GST activity to control levels (**Table 3**). Lastly, repeated exposure to AFB₁ and BCP, separately or in combination caused no significant changes in renal oxidative stress parameters evaluated among the groups (**Table 3**).

Table 3 – Effect of AFB₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or BCP (100 mg/kg, i.p.) on oxidative stress parameters: thiobarbituric acid reactive substances levels (TBARS); non-protein thiols content (NPSH); ascorbic acid content; glutathione-S-transferase (GST) in liver and kidney samples.

Parameters	Organ	Treatment			
		Control	BCP	AFB ₁	AFB ₁ +BCP
TBARS levels ^a	Liver	21.649 ± 4.011	22.755 ± 6.545	21.007 ± 2.332	21.905 ± 5.602
	Kidney	1.717 ± 0.220	1.766 ± 0.331	1.698 ± 0.096	1.637 ± 0.363
NPSH levels ^a	Liver	154.508 ± 9.603	147.670 ± 40.971 [#]	105.641 ± 29.390 [*]	150.16 ± 23.45 [#]
	Kidney	49.243 ± 8.022	46.037 ± 14.234	49.539 ± 16.324	46.626 ± 18.890
Ascorbic acid levels ^a	Liver	9.222 ± 3.738	8.640 ± 3.262 [#]	4.910 ± 1.389 [*]	6.453 ± 2.549
	Kidney	8.126 ± 3.935	8.984 ± 3.627	8.421 ± 3.579	8.957 ± 6.128
GST activity ^b	Liver	555.151 ± 38.194	539.065 ± 112.643 [#]	887.670 ± 84.987 [*]	493.3 ± 65.355 [#]
	Kidney	207.541 ± 76.429	184.700 ± 94.642	202.216 ± 63.368	170.729 ± 61.896

Data are mean ± SD for n = 7 animals in each group. The results were evaluated by Two-way ANOVA followed by Duncan' test. The asterisk (*) means p<0.05 in comparison to control group; the hashtag (#) means p<0.05 in comparison to AFB₁ group. Abbreviations: (a) means nmol/g tissue; (b) means nmol CDNB/mg protein/min

3.4 BCP effect on the liver oxidative and inflammatory pathways

The effects of AFB₁ and/or BCP treatment on oxidative pathway were analyzed trough of Nrf2 and Keap1 immunocontents. Two-way ANOVA revealed a main effect of BCP treatment on the Nrf2 levels. In this sense, AFB₁+BCP group showed an increase in the Nrf2 levels, whereas those from AFB₁ group were not altered when compared to the control (**Figure 2A**). Contrarily, a main effect of AFB₁ was found in the Keap1 immunocontent. Furthermore, AFB₁+BCP group presented an increase in the Keap1 immunoreactivity levels when compared to control group (**Figure 2B**).

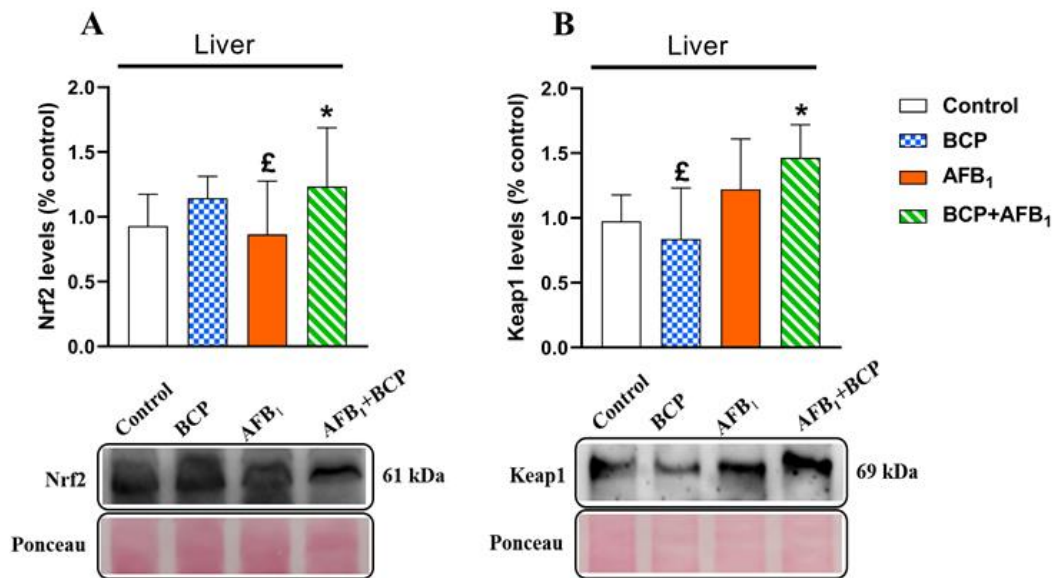


Figure 2 – Effect of AFB₁ (250 µg/kg, i.g.) and/or BCP (100 mg/kg, i.p) on the oxidative pathway: (A) nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2); (B) Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) in the liver. Data are mean ± SD for n = 5-7 animals in each group. The results were evaluated by Two-way ANOVA followed by Duncan' test. The asterisk (*) means p<0.05 in comparison to control group; The pound (£) sign means p<0.05 in comparison to AFB₁+BCP group.

Regard inflammatory pathways, NF-κB levels showed no statistical difference among the groups (**Figure 3A**). On the other hand, the BCP group increased IKKβ quantity in comparison with control and AFB₁ groups, while AFB₁+BCP group increased IKKβ quantity only compared to the control group. AFB₁ showed no significant difference compared to the control group (**Figure 3B**). Lastly, AFB₁ showed a main effect on the total IL-1β levels (p<0.05), which were verified by adding the precursor (pre) and mature (mat) fractions of IL-1β, although no changes between groups were observed (**Figure 3C**).

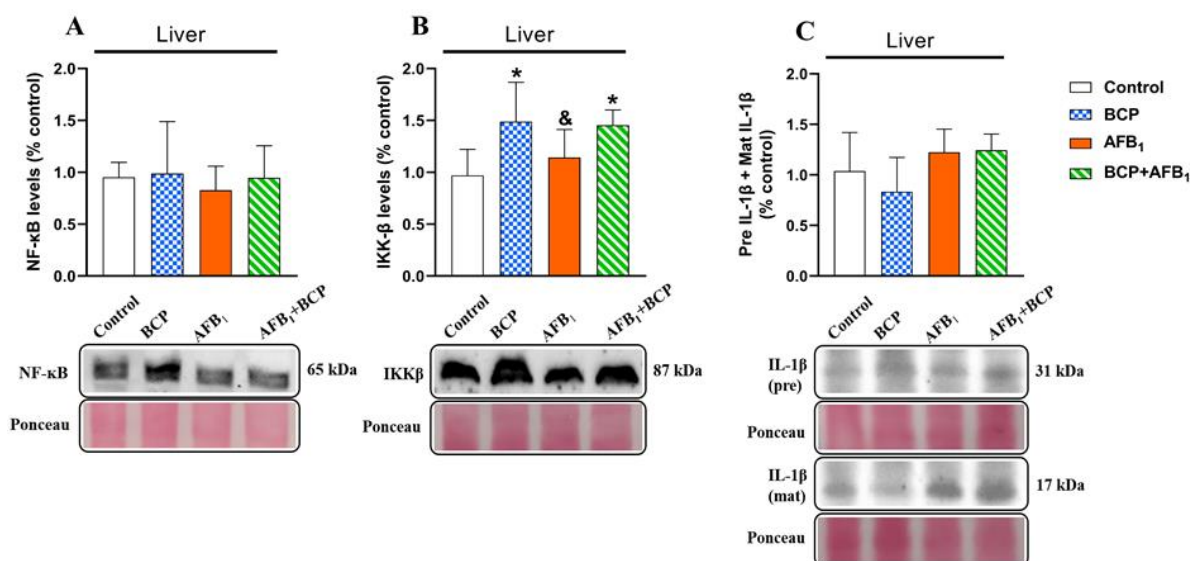


Figure 3 – Effect of AFB₁ (250 μg/kg, i.g.) and/or BCP (100 mg/kg, i.p) on the inflammatory pathways: (A) nuclear factor kappa b (NF-κB); (B) inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKKβ); (C) total interleukin 1 beta (IL-1β) in the liver. Data are mean ± SD for n = 5-7 animals in each group. The results were evaluated by Two-way ANOVA followed by Duncan's test. The asterisk (*) means p<0.05 in comparison to control group; The ampersand (&) means p<0.05 in comparison to BCP group.

4 Discussion

Bioactive compounds are often studied for the attenuation of many pathological conditions [40,41]. Inhibition of oxidative stress-induced tissue damage by association with these compounds has been studied as a promising strategy to contain the toxic effects of AFB₁ [42,43]. We found that BCP co-treatment (AFB₁+BCP group) increased non-enzymatic antioxidant defense levels and attenuated AFB₁-induced hepatotoxicity *in vivo*. For the first time we showed that BCP has a modulatory role on the Nrf2 pathway in liver tissue, suggesting that the regulation of GST activity in the AFB₁+BCP co-treatment group was through this pathway. Thus, in the present study, the attenuation of the toxic effects induced by the mycotoxin after BCP administration might be through its antioxidant activity.

Animal body weight and organ weight assessments have conventionally been used to evaluate the toxic effect of compounds [44]. In this sense, it is important to highlight those isolated changes in these parameters do not necessarily indicate toxic effects, just as the non-alteration does not signal the absence of toxicity [45]. In this context, there were no significant changes among the groups in body weight gain, as well as in the total and relative weights of the organs. However, a significant increase in the levels of plasma biomarkers GGT and ALP was verified in the animals' exposure to mycotoxin. In general, plasma enzymes are released into plasma when the liver is damaged, or the cell membrane integrity is lost [46]. Therefore, the alteration of these enzymes indicates that there was a liver function impairment. Of special importance, the AFB₁ treatment associated with BCP normalized the GGT and ALP activity, resulting in reduced release of markers into the plasma, indicating the hepatoprotective effect of BCP against AFB₁ induced liver damage. In addition, BCP co-treatment (AFB₁+BCP group) increased the content of NPSH at control level and attenuated the ascorbic acid levels reduction, evidencing the antioxidant BCP effect already shown in previous studies [21]. Emphasizing this argument, BCP attenuated these and other parameters through the high activity against OH[•] and O₂⁻, improving liver functions in carbon tetrachloride-induced lesions [21]. Previous studies have also demonstrated the efficacy of natural compounds in attenuate hepatotoxicity associated with oxidative stress. Similar results were found when rats exposed to AFB₁ were treated with lycopene, coumarin and quercetin. The antioxidant properties of these compounds have been associated with preventing AFB₁-induced toxicity [8,9,47].

The selected dose of AFB₁ (250 µg/kg) represents an estimated human dose of 0.040 mg/kg (40 µg/kg), according to the formula proposed by Reagan-Shaw et al. [48]. The acceptable tolerable daily intake of total aflatoxins recommended by the World Health Organization is 20 µg/kg. In this way, such a dose would represent occasional intoxication by high amounts of aflatoxins, since higher doses of AFB₁ were found in food products such as

corn (1401.45 µg/kg) [49] and peanuts (3000 µg/kg) [50]. On the other hand, BCP toxicity was classified in category 5 (toxicity greater than 2.000 mg/kg of BW), according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) [51], reinforcing the safety of the experimental dose of 100 mg/kg used in this protocol, which represents an estimated human dose of 16,21 mg/kg, conforming to the same formula aforementioned [48]. Further, no precise data was found on the amount of the compound in food, but it is known that BCP compose up to 70% of the essential oil of black pepper [52], as well as 24% of oregano [53].

An important aspect observed by our results is that the exposure protocol used in this experiment caused toxicity only in liver tissue. It was concluded by analyzing changes in plasma biomarkers and in oxidative parameters linked to hepatorenal function. Our data are in agreement with the findings by Yiannikouris et al. [54], which examined the radiolabeled AFB₁ toxicokinetic in rats and detected a high concentration of the substance in hepatic tissue, while only a low proportion was found in the kidneys. Notably, kidney involvement in AFB₁ toxicity may vary depending on factors related to the treatment protocol and the animal species. Eraslan et al. [55] showed that 21 days of exposure to AFB₁ (500 µg/kg/day, i.g.) increased malondialdehyde (MDA), nitric oxide and 4-hydroxynonenal levels in Wistar rat's kidneys. Furthermore, El-Mekkawy et al. [5] found increased levels of TBARS and hydrogen peroxide (H₂O₂) and reduction in the activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) after 90 days of exposure of Sprague-Dawley rats to AFB₁ (25 µg/kg/day, i.g.). Thus, the absence of changes in the kidneys may have occurred due to the use of insufficient dose and/or treatment period and also because it is not the main organ related to mycotoxin toxicity [2].

AFB₁-induced toxicity is commonly initiated by the imbalance between the generation of oxidizing compounds and the action of the antioxidant defense systems [42]. Lipid peroxidation is one of the key indicators of oxidative damage and is a feature that occurs in the

course of AFB₁ toxicity. In this study, we performed the TBARS assay, but no changes were found in this parameter to any groups, probably due to the high efficiency of the antioxidant defenses in counterbalancing the oxidative products generated. The organism has an effective defense mechanism to prevent and neutralize the RS and tissue peroxidation by a set of endogenous enzymatic and non-enzymatic antioxidants [56]. In fact, we found that the repeated exposure protocol to AFB₁ induced a non-enzymatic antioxidant defenses reduction, through decreasing NPSH and ascorbic acid levels, and an increase in the GST activity in the liver tissue. Other studies have shown that lipid peroxidation was associated with reduced antioxidant defenses [5,57]. Therefore, the antioxidant defenses changes may represent an increased demand for defense mechanisms to minimize the oxidative damage induced by mycotoxin, since reduced glutathione (GSH) (measured by NPSH levels) and GST play fundamental role in detoxification reactions [58].

In summary, GST catalyzes the conjugation of GSH with xenobiotics and electrophilic substances, favoring their detoxification [59]. This enzyme acts through prevention and control of the formation of RS involved in the initiation of reactions that generate oxidative damage [60]. In the present study, we verified an increase in GST activity in the liver tissue in AFB₁ group in comparison with all groups. Specifically, AFB₁ + BCP group showed their enzyme activity restored at the control level, in agreement with the results of other studies published previously [61]. In this sense, Johnson et al. [62] showed that the reactive metabolites generated from AFB₁ bioactivation demand a high activity of the GST enzyme to neutralize and eliminate them. These data also reinforce our findings associated with TBARS levels, suggesting that the high activity of GST was efficient in countering the RS verified through the non-alteration of the lipid peroxidation content in animals exposed for 14 days to AFB₁. Therefore, our findings concerning TBARS levels are contradictory with some previous works related to this marker, but in these studies higher doses and/or longer periods of exposure were applied, such as 28

$\mu\text{g}/\text{kg}/42$ days [63], $500 \mu\text{g}/\text{kg}/7$ days [10], $3 \text{ mg}/\text{kg}/\text{single dose}$ [64], suggesting a dose- and/or time-dependent damage. Thus, these data evidenced that when higher doses and/or longer treatment times than those used in this protocol were applied, the constitutive activity of GST may be depleted, which could induce oxidative stress, such as verified in the studies reported above.

The Keap1/Nrf2 pathway is the principal protective response to oxidative stress [65,66]. The expression of Nrf2 and its natural inhibitor, the Keap1 protein, were analyzed to appreciate the role of Nrf2 in the hepatoprotective efficiency of BCP. Importantly, we observed an increase on the Nrf2 levels to BCP co-treatment (AFB₁ + BCP) group. These findings agree with the results obtained for GST activity, in which the animals of the AFB₁ + BCP group had their enzyme levels stabilized at the control level. It is possible to suggest that BCP acts as an inducer of Nrf2 (**Figure 4**). Through its binding to cysteine residues existing in Keap1, it inhibits Nrf2 ubiquitination dependent on Keap1, which allows the accumulation of nuclear factor inside the cell and its subsequent nucleus translocation, where it promote antioxidant transcription [14,67]. As far as we know, this was the first study to evaluate the effect of BCP on the Keap1/Nrf2 pathway in rat liver. However, other studies have shown its protective efficiency in brain [24] and cardiac tissues [25] associated with this pathway, in different pathological conditions. Oppositely, 14 days of administration of AFB₁ ($250 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, i.g.) in rats seems to induce the formation of de Keap1/Nrf2 complex, since a main effect of mycotoxin was observed on the Keap1 levels, which is supported by the study of inactivating mutations in Keap1 [14,68,69]. Thus, these data show that the interaction between the complex is not enough to promote the ubiquitination of Nrf2, possibly caused by some factor related to the studied protocol [14]. Interestingly, Ji et al [14] showed that the Nrf2 expression was reduced in the liver of Wistar rats exposed to the $200 \text{ mg}/\text{kg}$ dose of AFB₁, i.p., administered for 21 alternate days, in the same way as a dose of $200 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.p., for 28 days [15]. Thus, a study using higher

doses or longer period of exposure to AFB₁ should be carried out to confirm the effects of BCP on the course of mycotoxin hepatotoxicity.

Liver inflammatory injury is closely related to xenobiotics exposure, such as mycotoxins [70]. Several evidences indicate that Nrf2 and NF- κ B signaling pathways interact in a complementary and specialized way to maintain cellular homeostasis [67,71]. In our study, there was no difference between groups for the NF- κ B immunocontent. However, it was observed a positive regulation of IKK β levels (which is essential for the NF- κ B activation) in liver tissue of animals from BCP and BCP + AFB₁ groups. In this context, it is known that Keap1 can mark the IKK β degradation by ubiquitination, preventing the NF- κ B activation [72]. On the other hand, our results showed a main effect of AFB₁ on total IL-1 β levels, consistent with previous reports [66]. In this sense, our findings demonstrated that IKK β /NF- κ B immunocontents were not altered in animals exposed to AFB₁ due to modulation mediated by increased Keap1 levels. AFB₁ appears to promote pro-inflammatory responses through the release of IL-1 β independently of NF- κ B. In contrast, previous researches have demonstrated that AFB₁ stimulated activation of the NF- κ B signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [68,73]. In this sense, the dose used in this protocol was not sufficient to generate an inflammatory response dependent on NF- κ B pathway. This made it difficult to interpret the results regarding the effect of co-treatment with BCP in the context of inflammation induced by exposure to AFB₁. However, BCP was reported to improve liver damage induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide through the suppression of inflammatory signaling pathways associated with NF- κ B and cytokines such as IL-1 β [27]. In this context, other inflammatory markers [74] should be evaluated to verify the inflammatory potential of AFB₁ (250 μ g/kg/14 days, i.g.), as well as the role of BCP in this condition.

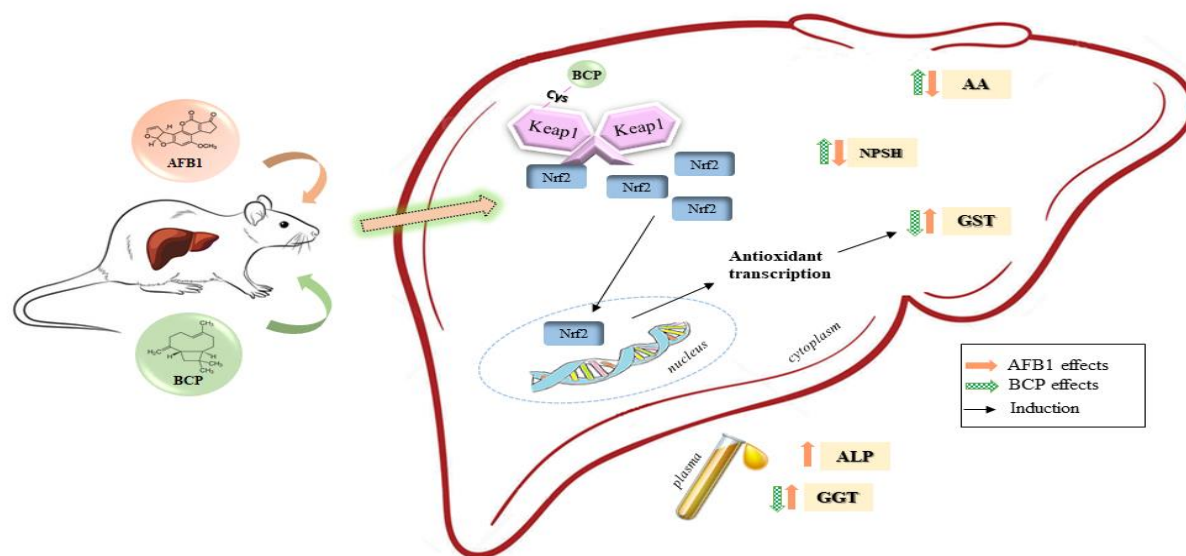


Figure 4 – Overview of antioxidant effect of BCP against the liver toxicity induced by AFB₁ exposure.

Exposure of animals to AFB₁ caused hepatotoxicity visualized mainly through changes in liver injury biomarkers (GGT and ALP), in the non-enzymatic antioxidant system (ascorbic acid and NPSH) and in the GST activity. We suggest that BCP acts as an inducer of Nrf2 through its binding to cysteine residues. This prevented Nrf2 ubiquitination and degradation and allowing its translocation to the nucleus to promote antioxidant transcription. This may have been the mechanism by which BCP co-treatment (AFB₁ + BCP) regulated the levels of GST and consequently increased the levels of non-enzymatic antioxidant defenses, controlling the mycotoxin-induced hepatotoxicity.

Although the current study provided important results on the therapeutic effects of BCP on AFB₁-induced toxicity, we must recognize some limitations of this study for proper data comprehension. First, in this study, we use an accessible dose of AFB₁ administered by i.g. route, in which the extent of absorption and metabolism may have changed the concentration of AFB₁ and its metabolites and, consequently, the degree and rate of hepatic and renal exposure [75]. Thereby, we cannot rule out that other losses may be obtained through other exposure routes. Similar occurs with the BCP, in which the i.p. route does not represent actual compound

exposure, in the same way that harmful effects could be generated when organisms are exposed by other routes. However, we consider this route to the BCP administration because previous studies of our research group have already demonstrated pharmacological action at this route/dosage [29]. Second, it is important to mention that our findings related to the kidneys may not demonstrate the actual organs involvement in AFB₁ toxicity, since the non-alteration of the analyzed biochemical parameters may have been a consequence of molecular signals to control the oxidative stress induced by the mycotoxin. Third, the toxicity of aflatoxins can vary according to several parameters such as animal species, age and sex [2]. In this study we use young male rats due to the animals' greater sensitivity to the effects of mycotoxin [76]. However, it is not possible to rule out that other effects are observed in animals with parameters different from those used in this experiment. Fourth, the single dosage and the schedule treatment tested in the current study could limit the mechanistic conclusions regarding the biological properties of BCP. Despite the interesting results obtained, different doses and treatment protocols must be evaluated to better understand the therapeutic potential of the compound.

In conclusion, in the present study we investigated the protective effects and molecular mechanisms of BCP action against the oxidative and inflammatory responses of AFB₁ in the liver and kidneys of rats. Of particular importance, our results suggest that liver tissue is more susceptible to AFB₁ toxicity compared to the kidneys. Considering the current results, as well as previous reports in the literature, it is possible to propose dose- and time-dependent toxicity for AFB₁. Further, the present study demonstrated that co-treatment with BCP protects the liver against AFB₁-induced hepatotoxicity. BCP significantly decreased GGT and ALP levels and increased non-enzymatic antioxidant levels. BCP was shown to have activity in the Nrf2 pathway in liver tissue and regulated GST activity in the AFB₁ + BCP co-treatment group. Thus, our results suggest that the hepatoprotective action of BCP may be linked to its

antioxidant potential. The results obtained in the analysis of inflammatory markers were not conclusive, so more inflammatory pathways need to be studied in the context of AFB₁ intoxication to understand the possible role of BCP in this condition. Our findings suggest that BCP might be considered as a potential natural agent for the prevention of AFB₁ induced oxidative stress and hepatotoxicity. Therefore, future studies with BCP should be carried out using an acute or longer protocol of AFB₁ toxicity to confirm the effects reported here.

5 Acknowledgements and fundings

This 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). A.F.F. (grant #304824/2016-0 and 304825/2020-4), M.S.O., C.W.N., are the recipients of CNPq fellowships; A.R.S., E.V.F.R., M.H.M.S., T.B.S., N.S.J. and S.G.M. are the recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships. J.T.S. is the recipient of Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (*PIBIC/CNPq*) fellowship. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

6 Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interests in the present study.

7 Author contributions

All authors substantially contributed to develop this study, by discussion and commenting results. The final version of this manuscript was approved. **Da SILVEIRA, A. R.:** Methodology, Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Conceptualization; **ROSA, E. V. F.:** Methodology, Data

curation, Investigation; **SARI, M. H. M.:** Methodology, Data curation, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Conceptualization; **SAMPAIO, T. B.** Methodology, Data curation, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Conceptualization; **Dos SANTOS, J. T.:** Methodology, Data curation, Conceptualization; **JARDIM, N. S.:** Methodology, Data curation, Formal analysis; **MÜLLER, S. G.:** Methodology, Data curation, Formal analysis. **OLIVEIRA, M. S.:** Data curation, Writing - review & editing, Conceptualization; **WAYNE, C.:** Data curation, Writing - review & editing, Conceptualization; **FURIAN, A.A.:** Conceptualization, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Antibodies used in this study.

Antibody	Molecular Weight (kDa)	Species	Dilution	Source
Nrf2 (nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2)	90-110	rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich
Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)	69	goat	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
NF- κ B (nuclear factor- κ B)	65	rabbit	1:1000	Abcam
I κ κ β (NF κ β /Rel transcription factor)	87	rabbit	1:1000	Upstate Cell Signaling
IL-1 β (interleukin 1 β)	17/31	goat	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

Table S2. Statistical summary of biochemical evaluations.

Statistical Summary					
Biochemical parameters	Tissue	Variables Two-way ANOVA	DF	F value	P value
GGT	Plasma	BCP factor	1	2.727	0.112
		AFB ₁ factor	1	5.305	0.030
		BCP x AFB ₁	1	1.679	0.207
ALP	Plasma	BCP factor	1	0.518	0.478
		AFB ₁ factor	1	5.969	0.022
		BCP x AFB ₁	1	1.978	0.172
Urea	Plasma	BCP factor	1	0.259	0.615
		AFB ₁ factor	1	0.106	0.313
		BCP x AFB ₁	1	0.356	0.540
Creatinine	Plasma	BCP factor	1	1.486	0.240
		AFB ₁ factor	1	0.371	0.551

		BCP x AFB ₁	1	0.086	0.773
TBARS	Liver	BCP factor	1	0.294	0.593
		AFB ₁ factor	1	0.163	0.690
		BCP x AFB ₁	1	0.003	0.955
	Kidney	BCP factor	1	0.003	0.955
		AFB ₁ factor	1	0.514	0.480
		BCP x AFB ₁	1	0.279	0.602
NPSH	Liver	BCP factor	1	2.504	0.127
		AFB ₁ factor	1	3.793	0.063
		BCP x AFB ₁	1	4.652	0.041
	Kidney	BCP factor	1	0.294	0.592
		AFB ₁ factor	1	0.006	0.938
		BCP x AFB ₁	1	0.001	0.979
Ascorbic Acid	Liver	BCP factor	1	0.196	0.662
		AFB ₁ factor	1	8.949	0.006
		BCP x AFB ₁	1	0.957	0.338
	Kidney	BCP factor	1	0.172	0.682
		AFB ₁ factor	1	0.006	0.937
		BCP x AFB ₁	1	0.009	0.924
GST	Liver	BCP factor	1	45.982	0.000
		AFB ₁ factor	1	22.455	0.001
		BCP x AFB ₁	1	39.056	0.000
	Kidney	BCP factor	1	0.912	0.349
		AFB ₁ factor	1	0.115	0.737
		BCP x AFB ₁	1	0.023	0.880
Nrf2	Liver	BCP factor	1	7.181	0.015
		AFB ₁ factor	1	0.300	0.590
		BCP x AFB ₁	1	1.084	0.311
Keap1	Liver	BCP factor	1	13.780	0.001
		AFB ₁ factor	1	0.374	0.547
		BCP x AFB ₁	1	0.857	0.365
Nf-kb	Liver	BCP factor	1	0.340	0.567
		AFB ₁ factor	1	0.379	0.545
		BCP x AFB ₁	1	0.094	0.762
IKKB	Liver	BCP factor	1	0.339	0.567
		AFB ₁ factor	1	0.379	0.545
		BCP x AFB ₁	1	0.094	0.762
Total IL-1B	Liver	BCP factor	1	0.399	0.539
		AFB ₁ factor	1	4.904	0.045
		BCP x AFB ₁	1	0.611	0.448

REFERENCES

- [1]S. Marin, A.J. Ramos, G. Cano-Sancho, V. Sanchis, Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment, *Food Chem. Toxicol.* 60 (2013) 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>.
- [2]B.R. Rushing, M.I. Selim, Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods, *Food Chem. Toxicol.* 124 (2019) 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>.

- [3] Y. Dai, K. Huang, B. Zhang, L. Zhu, W. Xu, Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview, *Food Chem. Toxicol.* 109 (2017) 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.034>.
- [4] E.A. Bailey, R.S. Iyer, M.P. Stone, T.M. Harris, J.M. Essigmann, Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 1535–1539. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.4.1535>.
- [5] H.I. El-Mekawy, M.A. Al-Kahtani, A.A. Shati, M.A. Alshehri, A.A. Al-Doaiss, A.A. Elmansi, A.E. Ahmed, Black tea and curcumin synergistically mitigate the hepatotoxicity and nephropathic changes induced by chronic exposure to aflatoxin-B1 in Sprague–Dawley rats, *J. Food Biochem.* 44 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13346>.
- [6] Wang J.-S. and Groopman J.D., DNA damage by mycotoxins, *Mutat. Res.* 424 (1999) 167–181. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00017-2).
- [7] D.E. Marin, I. Taranu, Overview on aflatoxins and oxidative stress, *Toxin Rev.* 31 (2012) 32–43. <https://doi.org/10.3109/15569543.2012.730092>.
- [8] X. Wang, I. Muhammad, X. Sun, M. Han, S. Hamid, X. Zhang, Protective role of curcumin in ameliorating AFB1-induced apoptosis via mitochondrial pathway in liver cells, *Mol. Biol. Rep.* 45 (2018) 881–891. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4234-4>.
- [9] E. Gugliandolo, A.F. Peritore, R. D’amico, P. Licata, R. Crupi, Evaluation of neuroprotective effects of quercetin against aflatoxin b1-intoxicated mice, *Animals.* 10 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10050898>.
- [10] A. Karaca, S. Yilmaz, E. Kaya, S. Altun, The effect of lycopene on hepatotoxicity of aflatoxin B1 in rats, *Arch. Physiol. Biochem.* (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1648516>.
- [11] M. Serasanambati, S.R. Chilakapati, Function of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in Human Diseases-A Review, *South Indian J. Biol. Sci.* 2 (2016) 368. <https://doi.org/10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443>.
- [12] A. Bowie, L.A. O’Neill, Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 13–23. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00296-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00296-8).
- [13] G.M. Campo, A. Avenoso, S. Campo, A. D’Ascola, P. Traina, D. Samà, A. Calatroni, NF- κ B and caspases are involved in the hyaluronan and chondroitin-4-sulphate-exerted antioxidant effect in fibroblast cultures exposed to oxidative stress, *J. Appl. Toxicol.* 28 (2008) 509–517. <https://doi.org/10.1002/jat.1302>.
- [14] L. Baird, M. Yamamoto, The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway, *Mol. Cell. Biol.* 40 (2020). <https://doi.org/10.1128/mcb.00099-20>.
- [15] A. V. Vipin, R.K. Raksha, N.K. Kurrey, A.K.A. Anu, G. Venkateswaran, Protective effects of phenolics rich extract of ginger against Aflatoxin B1-induced oxidative stress and hepatotoxicity, *Biomed. Pharmacother.* 91 (2017) 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.107>.

- [16] Y. Ji, S.B. Nyamagoud, N. SreeHarsha, A. Mishra, S.K. Gubbiyappa, Y. Singh, Sitagliptin protects liver against aflatoxin B1-induced hepatotoxicity through upregulating Nrf2/ARE/HO-1 pathway, *BioFactors*. 46 (2020) 76–82. <https://doi.org/10.1002/biof.1573>.
- [17] Z. Wang, D.A. Potoyan, P.G. Wolynes, Molecular stripping, targets and decoys as modulators of oscillations in the NF-kB/IkB α /DNA genetic network, *J. R. Soc. Interface*. 13 (2016) 6. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0606>.
- [18] S.M.U. Ahmed, L. Luo, A. Namani, X.J. Wang, X. Tang, Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863 (2017) 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>.
- [19] J.M. Essigmann, R.G. Croy, R.A. Bennett, G.N. Wogan, Metabolic activation of aflatoxin b1: Patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis, *Drug Metab. Rev.* 13 (1982) 581–602. <https://doi.org/10.3109/03602538209011088>.
- [20] D. Schmitt, R. Levy, B. Carroll, Toxicological Evaluation of β -Caryophyllene Oil: Subchronic Toxicity in Rats, *Int. J. Toxicol.* 35 (2016) 558–567. <https://doi.org/10.1177/1091581816655303>.
- [21] M.A. Calleja, J.M. Vieites, T. Montero-Meterdez, M.I. Torres, M.J. Faus, A. Gil, A. Suárez, The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation, *Br. J. Nutr.* 109 (2013) 394–401. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001298>.
- [22] H. Li, D. Wang, Y. Chen, M. Yang, β -Caryophyllene inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation and extracellular matrix accumulation in mesangial cells, *Int. Immunopharmacol.* 84 (2020) 106556. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106556>.
- [23] F. Francomano, A. Caruso, A. Barbarossa, A. Fazio, C. La Torre, J. Ceramella, R. Mallamaci, C. Saturnino, D. Iacopetta, M.S. Sinicropi, β -caryophyllene: A sesquiterpene with countless biological properties, *Appl. Sci.* 9 (2019) 5420. <https://doi.org/10.3390/app9245420>.
- [24] J. Lou, G. Cao, R. Li, J. Liu, Z. Dong, L. Xu, β -Caryophyllene Attenuates Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Nrf2/HO-1 Pathway in Rats, *Neurochem. Res.* 41 (2016) 1291–1304. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1826-z>.
- [25] M.F.N. Meeran, F. Laham, S. Azimullah, C. Sharma, A.J. Al Kaabi, S. Tariq, E. Adeghate, S.N. Goyal, S. Ojha, β -Caryophyllene, a Natural Bicyclic Sesquiterpene Attenuates B-Adrenergic Agonist-Induced Myocardial Injury in a Cannabinoid Receptor-2 Dependent and Independent Manner, *Free Radic. Biol. Med.* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.046>.
- [26] I.Á. González, E.M. Bujaidar, S.C. García, Antigenotoxic capacity of beta-caryophyllene in mouse, and evaluation of its antioxidant and GST induction activities, *J. Toxicol. Sci.* 39 (2014) 849–859. <https://doi.org/10.2131/jts.39.849>.
- [27] H.I. Cho, J.M. Hong, J.W. Choi, H.S. Choi, J. Hwan Kwak, D.U. Lee, S. Kook Lee, S.M. Lee, β -Caryophyllene alleviates d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced

hepatic injury through suppression of the TLR4 and RAGE signaling pathways., *Eur. J. Pharmacol.* 764 (2015) 613–621. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.001>.

[28] A. Louvet, F. Teixeira-Clerc, M.N. Chobert, V. Deveaux, C. Pavoine, A. Zimmer, F. Pecker, A. Mallat, S. Lotersztajn, Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice, *Hepatology*. 54 (2011) 1217–1226. <https://doi.org/10.1002/hep.24524>.

[29] C.C. de Oliveira, C.V. de Oliveira, J. Grigoletto, L.R. Ribeiro, V.R. Funck, A.C.B. Grauncke, T.L. de Souza, N.S. Souto, A.F. Furian, I.R.A. Menezes, M.S. Oliveira, Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures, *Epilepsy Behav.* 56 (2016) 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.040>.

[30] G. Qian, F. Wang, L. Tang, M.E. Massey, N.J. Mitchell, J. Su, J.H. Williams, T.D. Phillips, J.S. Wang, Integrative Toxicopathological Evaluation of Aflatoxin B1 Exposure in F344 Rats, *Toxicol. Pathol.* 41 (2013) 1093–1105. <https://doi.org/10.1177/0192623313477256>.

[31] N.S. Souto, A.C.M. Braga, M.L. de Freitas, M.R. Fighera, L.F.F. Royes, M.S. Oliveira, A.F. Furian, Aflatoxin B1 reduces non-enzymatic antioxidant defenses and increases protein kinase C activation in the cerebral cortex of young rats, *Nutr. Neurosci.* 21 (2018) 268–275. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1278837>.

[32] N.S. Souto, M. Dassi, A.C.M. Braga, E.V.F. Rosa, M.R. Fighera, L.F.F. Royes, M.S. Oliveira, A.F. Furian, Behavioural and biochemical effects of one-week exposure to aflatoxin B1 and aspartame in male Wistar rats, *World Mycotoxin J.* 12 (2019) 293–305. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2424>.

[33] N.S. Souto, M. Dassi, A.C.M. Braga, E.V.F. Rosa, M.R. Fighera, L.F.F. Royes, M.S. Oliveira, M.H. Sari, A.F. Furian, Hepatic Susceptibility to Oxidative Damage after Repeated Concomitant Exposure to Aspartame and Aflatoxin B1 in Rats, *Drug Chem. Toxicol.*, accepted manuscript (2021).

[34] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).

[35] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).

[36] M. Benderitter, V. Maupoil, C. Vergely, F. Dalloz, F. Briot, L. Rochette, Studies by electron paramagnetic resonance of the importance of iron in the hydroxyl scavenging properties of ascorbic acid in plasma: Effects of iron chelators, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12 (1998) 510–516. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1998.tb00979.x>.

[37] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8).

- [38] M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding., *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [39] I. Romero-Calvo, B. Ocón, P. Martínez-Moya, M.D. Suárez, A. Zarzuelo, O. Martínez-Augustin, F.S. de Medina, Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots, *Anal. Biochem.* 401 (2010) 318–320. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.036>.
- [40] T. Luetragoon, R.P. Sranujit, C. Noysang, Y. Thongsri, P. Potup, N. Suphrom, N. Nuengchamngong, K. Usuwanthim, Bioactive compounds in moringa oleifera Lam. Leaves inhibit the pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced human monocyte-derived macrophages, *Molecules.* 25 (2020) 191. <https://doi.org/10.3390/molecules25010191>.
- [41] D. Cerdá-Bernad, E. Valero-Cases, J.-J. Pastor, M.J. Frutos, Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: Effect on oxidative stress and mechanisms of action., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (n.d.) 1–18. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1864279>.
- [42] I.G. Encinas, J.N.G. González, L.S. López, A.M. Almazán, H.S. Garcia, M.A.M. Manzano, B.V. Cordoba, A.F.G. Córdova, A.H. Mendoza, Protective Effect of *Lactobacillus casei* CRL 431 Postbiotics on Mitochondrial Function and Oxidative Status in Rats with Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress, *Probiotics Antimicrob. Proteins.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09747-x>.
- [43] M.S. Aleissa, S. Alkahtani, M.A. Abd Eldaim, A.M. Ahmed, S.G. Bungău, B. Almutairi, M. Bin-Jumah, A.A. Alkahtane, M.S. Alyousif, M.M. Abdel-Daim, Fucoidan Ameliorates Oxidative Stress, Inflammation, DNA Damage, and Hepatorenal Injuries in Diabetic Rats Intoxicated with Aflatoxin B1, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2020) 10. <https://doi.org/10.1155/2020/9316751>.
- [44] M. Loha, A. Mulu, S.M. Abay, W. Ergete, B. Geleta, Acute and Subacute Toxicity of Methanol Extract of *Syzygium guineense* Leaves on the Histology of the Liver and Kidney and Biochemical Compositions of Blood in Rats, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/5702159>.
- [45] B. Michael, B. Yano, R.S. Sellers, R. Perry, D. Morton, N. Roome, J.K. Johnson, K. Schafer, S. Pitsch, Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices., *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 742–750. <https://doi.org/10.1080/01926230701595292>.
- [46] A. El Arem, F. Ghrairi, L. Lahouar, A. Thouri, E.B. Saafi, A. Ayed, M. Zekri, H. Ferjani, Z. Haouas, A. Zakhama, L. Achour, Hepatoprotective activity of date fruit extracts against dichloroacetic acid-induced liver damage in rats, *J. Funct. Foods.* 9 (2014) 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.018>.
- [47] X. Wang, L. Li, G. Zhang, Quercetin protects the buffalo rat liver (BRL-3A) cells from aflatoxin B1-induced cytotoxicity via activation of Nrf2-ARE pathway, *World Mycotoxin J.* 13 (2020) 299–312. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2465>.
- [48] S. Reagan-Shaw, M. Nihal, N. Ahmad, Dose translation from animal to human studies revisited, *FASEB J.* 22 (2008) 659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574lsf>.

- [49] I. Kamika, K. te N. Ngbolua, M. Tekere, Occurrence of aflatoxin contamination in maize throughout the supply chain in the Democratic Republic of Congo, *Food Control*. 69 (2016) 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.014>.
- [50] S.M.C. Njoroge, L. Matumba, K. Kanenga, M. Siambi, F. Waliyar, J. Maruwo, N. Machinjiri, E.S. Monyo, Aflatoxin B1 levels in groundnut products from local markets in Zambia, *Mycotoxin Res.* 33 (2017) 113–119. <https://doi.org/10.1007/s12550-017-0270-5>.
- [51] G.L. da S. Oliveira, K.C. Machado, K.C. Machado, A.P. dos S.C.L. da Silva, C.M. Feitosa, F.R. de C. Almeida, Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 92 (2018) 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.013>.
- [52] A. Orav, I. Stulova, T. Kailas, M. Müürisepp, Effect of Storage on the Essential Oil Composition of *Piper nigrum* L. Fruits of Different Ripening States, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2582–2586. <https://doi.org/10.1021/jf030635s>.
- [53] M.R. Morshedloo, S.A. Salami, V. Nazeri, F. Maggi, L. Craker, Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions, *Ind. Crops Prod.* 119 (2018) 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.049>.
- [54] A. Yiannikouris, J. Apajalahti, O. Siikanen, G.P. Dillon, C.A. Moran, *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall-Based Adsorbent Reduces Aflatoxin B1 Absorption in Rats, *Toxins (Basel)*. 13 (2021) 209. <https://doi.org/10.3390/toxins13030209>.
- [55] G. Eraslan, Z.S. Sarıca, L.Ç. Bayram, M.Y. Tekeli, M. Kanbur, M. Karabacak, The effects of diosmin on aflatoxin-induced liver and kidney damage, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 27931–27941. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0232-7>.
- [56] P. Ahmad, M. Sarwat, S. Sharma, Reactive oxygen species generation and signaling in plants, *J. Plant Biol.* 51 (2008) 167–173. <https://doi.org/10.4161/psb.22455>.
- [57] S. Yilmaz, E. Kaya, S. Comakli, Vitamin E (α tocopherol) attenuates toxicity and oxidative stress induced by aflatoxin in rats, *Adv. Clin. Exp. Med.* 26 (2017) 907–917. <https://doi.org/10.17219/acem/66347>.
- [58] P. Di Simplicio, F. Franconi, S. Frosalí, D. Di Giuseppe, Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells, *Amino Acids*. 25 (2003) 323–339. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0020-1>.
- [59] N.H.P. Cnubben, I.M.C.M. Rietjens, H. Wortelboer, J. van Zanden, P.J. Bladeren, The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10 (2001) 141–152. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(01\)00077-1](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(01)00077-1).
- [60] K.D. Tew, Z. Ronai, GST function in drug and stress response, *Drug Resist. Updat.* 2 (1999) 143–147. <https://doi.org/10.1054/drup.1999.0086>.
- [61] R.H. Basha, C. Sankaranarayanan, β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated.pdf, *Chem. Biol. Interact.* 245 (2016) 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.019>.

- [62] W.W. Johnson, Y.F. Ueng, M. Widersten, B. Mannervik, J.D. Hayes, P.J. Sherratt, B. Ketterer, F.P. Guengerich, Conjugation of highly reactive aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide catalyzed by rat and human glutathione transferases: Estimation of kinetic parameters, *Biochemistry*. 36 (1997) 3056–3060. <https://doi.org/10.1021/bi962537o>.
- [63] A.M. Abdel-Salam, A.N. Badr, A.H. Zaghoul, A.R.H. Farrag, Functional yogurt aims to protect against the aflatoxin B1 toxicity in rats, *Toxicol. Reports*. 7 (2020) 1412–1420. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.10.012>.
- [64] S.M. El-Bahr, Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin B1, *Phyther. Res*. 29 (2015) 134–140. <https://doi.org/10.1002/ptr.5239>.
- [65] M. Qiang, Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 53 (2013) 401–426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>.
- [66] L. Baird, A.T. Dinkova-Kostova, The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway, *Arch. Toxicol*. 85 (2011) 241–272. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0674-5>.
- [67] K. Taguchi, H. Motohashi, M. Yamamoto, Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution, *Genes to Cells*. 16 (2011) 123–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>.
- [68] L. Huang, Z. Zhao, C. Duan, C. Wang, Y. Zhao, G. Yang, L. Gao, C. Niu, J. Xu, S. Li, *Lactobacillus plantarum* C88 protects against aflatoxin B1-induced liver injury in mice via inhibition of NF- κ B-mediated inflammatory responses and excessive apoptosis, *BMC Microbiol*. 19 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1525-4>.
- [69] C. Tulotta, P. Ottewell, The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis, *Endocr. Relat. Cancer*. 25 (2018) 421–434. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0309>.
- [70] L.Y. Zhang, D.L. Zhan, Y.Y. Chen, W.H. Wang, C.Y. He, Y. Lin, Y.C. Lin, Z.N. Lin, Aflatoxin B1 enhances pyroptosis of hepatocytes and activation of Kupffer cells to promote liver inflammatory injury via dephosphorylation of cyclooxygenase-2: an in vitro, ex vivo and in vivo study, *Arch. Toxicol*. 93 (2019) 3305–3320. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02572-w>.
- [71] J.E.A. Toalá, H.A. García, M.C.E. Montoya, H.S. Garcia, B.V. Cordoba, A.F.G. Córdova, A.H. Mendoza, A. Hernández-Mendoza, Modulatory Effect of the Intracellular Content of *Lactobacillus casei* CRL 431 Against the Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress in Rats, *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 11 (2019) 470–477. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9433-8>.
- [72] D.F. Lee, H.P. Kuo, M. Liu, C.K. Chou, W. Xia, Y. Du, J. Shen, C. Te Chen, L. Huo, M.C. Hsu, C.W. Li, Q. Ding, T.L. Liao, C.C. Lai, A.C. Lin, Y.H. Chang, S.F. Tsai, L.Y. Li, M.C. Hung, KEAP1 E3 Ligase-Mediated Downregulation of NF- κ B Signaling by Targeting IKK β , *Mol. Cell*. 36 (2009) 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.025>.
- [73] J. Mehrzad, A.M. Malvandi, M. Alipour, S. Hosseinkhani, Environmentally relevant level of aflatoxin B1 elicits toxic pro-inflammatory response in murine CNS-derived cells, *Toxicol. Lett*. 279 (2017) 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.902>.

[74] L. Yang, H. Wang, X. Yang, Q. Wu, P. An, X. Jin, W. Liu, X. Huang, Y. Li, S. Yan, S. Shen, T. Liang, J. Min, F. Wang, Auranofin mitigates systemic iron overload and induces ferroptosis via distinct mechanisms, *Signal Transduct. Target. Ther.* 5 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00253-0>.

[75] D.L. Eaton, J.D. Groopman, *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*, 1st ed., Elsevier, San Diego, 2013.
https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=6SA1BQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA73&dq=pharmacokinetics+aflatoxin+b1&ots=_E_KA2TdIh&sig=RJKje2gU5_Cw6nFW-iz2x_0TbiA#v=onepage&q=pharmacokinetics+aflatoxin+b1&f=false (accessed May 1, 2021).

[76] R. Schoental, Aflatoxins, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 7 (1967) 343–356.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.07.040167.002015>.

4 CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados nesse estudo, pode-se concluir que:

1. As exposições à AFB₁ e/ou o co-tratamento com BCF (AFB₁+BCF) não promoveram modificações no peso corporal, assim como no peso absoluto e relativo dos órgãos dos animais.
2. As exposições à AFB₁ causaram toxicidade seletiva ao tecido hepático, uma vez que não houveram alterações significativas nos parâmetros renais mensurados. Da mesma forma, o co-tratamento com BCF (AFB₁+BCF) não alterou esses parâmetros.
3. Na dose e tempo de exposição utilizados nesse protocolo, a AFB₁ não causou alterações nos níveis de peroxidação lipídica no fígado dos animais. O co-tratamento com BCF (AFB₁+BCF) também não alterou esse parâmetro.
4. O co-tratamento com BCF (AFB₁+BCF) restaurou o marcador plasmático de função hepática GGT e atenuou a atividade da FAL nos animais expostos à AFB₁.
5. As exposições à AFB₁ interferiram na via oxidativa regulada por Keap1/Nrf2, aumentando a atividade da enzima GST no fígado dos animais.
6. O tratamento associado com BCF (AFB₁+BCF) reestabeleceu os níveis de NPSH e GST ao nível do controle no fígado dos animais expostos à AFB₁.
7. As exposições à AFB₁ causaram um efeito principal no imunoconteúdo hepático de IL-1 β .
8. O co-tratamento com BCF (AFB₁+BCF) aumentou o imunoconteúdo hepático de IKK β nos animais expostos à AFB₁.

Concluimos que o tratamento com BCF foi eficiente em restaurar os parâmetros alterados pela exposição à AFB₁. Os nossos resultados sugerem que o tecido hepático é mais suscetível à toxicidade de AFB₁ em comparação com os rins. Assim, o BCF demonstrou ser

eficiente em controlar a homeostase redox celular, ao equilibrar os níveis das defesas antioxidantes ao normal, bem como ao regular positivamente a via do Nrf2 que contribuiu para a transcrição de genes de enzimas antioxidantes de fase II. Portanto, estudos futuros com AFB₁ devem ser realizados usando um protocolo agudo ou mais longo para confirmar os efeitos aqui relatados do BCF e melhor compreender os mecanismos moleculares associados com tais ações.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-DAIM, M. M. et al. Fucoïdan supplementation modulates hepato-renal oxidative stress and DNA damage induced by aflatoxin B1 intoxication in rats. **Science of The Total Environment**, v. 768, p. 144781, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969720383145>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144781.
- ADAMS, T. B. et al. The FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2471–2494, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.011>>. Acesso em: 14 mar. 2019. DOI: 10.1016/j.fct.2011.06.011.
- AGAG, B. I. Mycotoxins in foods and feeds: 1-aflatoxins. **Assiut University Bulletin for Environmental Researches**, v. 7, n. 1, p. 173–205, 2004. Disponível em: <https://journals.ekb.eg/article_150623.html>. Acesso em: 17 abr. 2021. DOI: 10.21608/auber.2004.150623.
- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, v. 51, n. 3, p. 167–173, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23072988/>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.4161/psb.22455.
- AHMED, S. M. U. et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 585–597, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>>. Acesso em: 16 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
- AL-ZOREKY, N. S.; SALEH, F. A. Limited survey on aflatoxin contamination in rice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 225–231, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X17301481>>. Acesso em: 3 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.05.010.
- ALPERT, M. E. et al. Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. **Cancer**, v. 28, n. 1, p. 253–260, 1971. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4329335/>>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.1002/1097-0142(197107)28:1<253::AID-CNCR2820280151>3.0.CO;2-G.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J. Analysis of EU Rapid Alert System (RASFF) Notifications for Aflatoxins in Exported US Food and Feed Products for 2010–2019. **Toxins**, v. 13, n. 2, p. 90, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/13/2/90>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.3390/toxins13020090.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 632, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28608841/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.3390/ijerph14060632.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American oil chemists' society**, v. 75, n. 2, p. 199–212, 1998. Disponível

em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7101596/>>. Acesso em: 21 jun. 2021. DOI: 10.1007/s11746-998-0032-9.

ASAKAWA, Y. et al. Terpenoid biotransformation in mammals IV biotransformation of (+)longifolene, (-)-caryophyllene, (-)-caryophyllene oxide, (-)-cyclocolorenone, (+)nootkatone, (-)-elemol, (-)-abietic acid and (+)dehydroabietic acid in rabbits. **Xenobiotica**, v. 16, n. 8, p. 753–767, 1986. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3765656/>>. Acesso em: 2 jul. 2021. DOI: 10.3109/00498258609043566.

AYOFEMI, S. O. A. Aflatoxigenic fungi and mycotoxins in food: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 709–721, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1548429>>. Acesso em: 7 jun. 2021. DOI: 10.1080/10408398.2018.1548429.

AZZIZ, E. B. et al. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1779–1783, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1314920/>>. Acesso em: 23 jun. 2021. DOI: 10.1289/ehp.8384.

BAHI, A. et al. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology and Behavior**, v. 135, p. 119–124, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24930711/>>. Acesso em: 3 abr. 2021. DOI: 10.1016/j.physbeh.2014.06.003.

BAIRD, L.; YAMAMOTO, M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 40, n. 13, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32284348/>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1128/mcb.00099-20.

BATTILANI, P. et al. Aflatoxin B 1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep24328>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1038/srep24328.

BATTISTA, N. et al. The endocannabinoid system: An overview. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, p. 1–7, 2012. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2012.00009/full?mod=article_inline>. Acesso em: 29 jun. 2021. DOI: 10.3389/fnbeh.2012.00009.

BAUTER, M. R. Beta-Caryophyllene: a 90-day dietary study in rats. In: Safety and efficacy of eight compounds belonging to chemical group 31 (aliphatic and aromatic hydrocarbons) when used as flavourings for all animal species and categories. **Unpublished report**, 2012.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497.

BERNHOF, A. Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals. **The Norwegian Academy of Science and Letters**, v. 88, n. 50, p. 11–17, 2010. Disponível em: <<http://english.dnva.no/binfil/download.php?tid=48677>>. Acesso em: 18 jun. 2021.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 22, p. 3–8, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026049500800773>>. Acesso em: 21 jun. 2021. DOI: 10.1016/S0026-0495(00)80077-3.

BEYERLE, J. et al. Biotransformation of xenobiotics in the human colon and rectum and its association with colorectal cancer. **Drug Metabolism Reviews**, v. 47, n. 2, p. 199–221, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25686853/>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.3109/03602532.2014.996649.

BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on β -caryophyllene alcohol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. 95–96, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18640216/>>. Acesso em: 29 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2008.06.030.

BIOMIN. **World Mycotoxin Survey 2019**. Disponível em: <<https://www.biomin.net/downloads/2019-biomin-world-mycotoxin-survey-report/#c6102>>. Acesso em: 18 jul. 2021. .

BOWIE, A.; O'NEILL, L. A. . **Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation** **Biochemical Pharmacology**, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29862377/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. DOI: 10.1016/s0006-2952(99)00296-8.

BRASIL. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, que dispõe sobre aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União, Secretaria de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde**, p. 5, 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1/1997/prt0540_27_10_1997.html>. Acesso em: 9 jun. 2021.

BRASIL. RDC Nº 07, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União, Diretoria Colegiada - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 8, 2011. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-7-de-18-de-fevereiro-de-2011.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2021.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30207593/>>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.3322/caac.21492.

BRESSAC, B. et al. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from Southern Africa. **Nature**, v. 354, p. 56–58, 1991. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/350429a0>>. Acesso em: 6 set. 2020. DOI: 10.1038/350429a0.

BROOM, L. Mycotoxins and the intestine. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 4, p. 262–265, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2015.11.001>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.aninu.2015.11.001.

CALLEJA, M. A. et al. The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 394–401, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22717234/>>. Acesso em: 14 mar. 2019. DOI: 10.1017/S0007114512001298.

CAMPO, G. M. et al. NF- κ B and caspases are involved in the hyaluronan and chondroitin-4-sulphate-exerted antioxidant effect in fibroblast cultures exposed to oxidative stress. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 509–517, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17879260/>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1002/jat.1302.

CARBALLO, D. et al. Presence of mycotoxins in ready-to-eat food and subsequent risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 558–565, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.054>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2018.09.054.

CASTELINO, J. M. et al. Aflatoxin exposure is inversely associated with IGF1 and IGF1BP3 levels in vitro and in Kenyan schoolchildren. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 3, p. 574–581, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111788/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1002/mnfr.201300619.

CHO, H. I. et al. β -Caryophyllene alleviates d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury through suppression of the TLR4 and RAGE signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 764, p. 613–621, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26254779/>>. Acesso em: 29 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.08.001.

CHU, Y. J. et al. Aflatoxin B1 exposure increases the risk of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection or alcohol consumption. **European Journal of Cancer**, v. 94, p. 37–46, 2018. Disponível em: <[https://www.ejcancer.com/article/S0959-8049\(18\)30179-5/fulltext](https://www.ejcancer.com/article/S0959-8049(18)30179-5/fulltext)>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.02.010.

COREY, E. J.; MITRA, R. B.; UDA, H. Total Synthesis of d, l-Caryophyllene and d, l-Isocaryophyllene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 3, p. 485–492, 1964. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja01057a040>>. Acesso em: 2 jul. 2021. DOI: 10.1021/ja01057a040.

CUI, Q. et al. Benzo[a]pyrene (BaP) exposure generates persistent reactive oxygen species (ROS) to inhibit the NF- κ B pathway in medaka (*Oryzias melastigma*). **Environmental Pollution**, v. 251, p. 502–509, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31103010/>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.04.063.

DAI, Y. et al. Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 683–689, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28645871/>>. Acesso em: 27 mar. 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2017.06.034.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica**

Chimica Acta, v. 329, n. 1–2, p. 23–38, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12589963/>>. Acesso em: 21 jun. 2021. DOI: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2.

DE FONSECA, F. R. et al. The endocannabinoid system: Physiology and pharmacology. **Alcohol and Alcoholism**, v. 40, n. 1, p. 2–14, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15550444/>>. Acesso em: 29 jun. 2021. DOI: 10.1093/alcalc/agh110.

DE OLIVEIRA, C. C. et al. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 56, p. 26–31, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525505015006952>>. Acesso em: 23 maio. 2021. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.12.040.

DE VRIES, H. R.; MAXWELL, S. M.; HENDRICKSE, R. G. Aflatoxin excretion in children with kwashiorkor or marasmic kwashiorkor - a clinical investigation. **Mycopathologia**, v. 110, n. 1, p. 1–9, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2112691/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1007/BF00442763.

DEABES, M. M. et al. Assessment of the ameliorative effect of *Bacillus subtilis* against the toxicity induced by aflatoxin B1 in rats. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 2141–2164, 2021. Disponível em: <https://journals.ekb.eg/article_159596.html>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.21608/EJCHEM.2021.67171.3450.

DENG, Z. J. et al. Protective Effect of Procyanidin B2 on Acute Liver Injury Induced by Aflatoxin B 1 in Rats. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 33, n. 4, p. 238–247, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089539882030101X>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.3967/bes2020.033.

DI GIACOMO, S. et al. Caryophyllane sesquiterpenes inhibit DNA-damage by tobacco smoke in bacterial and mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 393–404, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.018>>. Acesso em: 2 jul. 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2017.11.018.

DI SOTTO, A.; EVANDRI, M. G.; MAZZANTI, G. Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 653, n. 1–2, p. 130–133, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18514567/>>. Acesso em: 2 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.04.004.

DIAO, E.; HOU, H.; DONG, H. Ozonolysis mechanism and influencing factors of aflatoxin B1: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 21–26, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224413001155>>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.06.002.

EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. **The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance**. 1. ed. San Diego: Elsevier,

EC. Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC)

No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, p. 3, 2002. Disponível em: <<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/997b6e24-351e-4cce-81a9-0e9cb0ffc244>>. Acesso em: 9 jun. 2021.

EFSA CEF PANEL. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 25, Revision 3 (FGE.25Rev3): Aliphatic hydrocarbons from chemical group 31. **EFSA Journal**, v. 13, n. 4, p. 4069, 2015. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2015.4069>>. Acesso em: 2 jun. 2021.

EGMOND, H. P. Van; JONKER, M. A. Worldwide regulations on aflatoxins - The situation in 2002. **Journal of Toxicology - Toxin Reviews**, v. 23, n. 2–3, p. 273–293, 2004. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/TXR-200027844?journalCode=itxr19>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1081/TXR-200027844.

EL-MEKKAWY, H. I. et al. Black tea and curcumin synergistically mitigate the hepatotoxicity and nephropathic changes induced by chronic exposure to aflatoxin-B1 in Sprague–Dawley rats. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32602579/>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1111/jfbc.13346.

ERASLAN, G. et al. The effects of diosmin on aflatoxin-induced liver and kidney damage. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 36, p. 27931–27941, 2017. Disponível em: <<https://europemc.org/article/med/28988357>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1007/s11356-017-0232-7.

ESSIGMANN, J. M. et al. Metabolic activation of aflatoxin b1: Patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. **Drug Metabolism Reviews**, v. 13, n. 4, p. 581–602, 1982. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6813091/>>. Acesso em: 23 jun. 2021. DOI: 10.3109/03602538209011088.

FAN, T.; XIE, Y.; MA, W. Research progress on the protection and detoxification of phytochemicals against aflatoxin B1-Induced liver toxicity. **Toxicon**, v. 195, p. 58–68, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010121000805?casa_token=3WQW CdceL9gAAAAA:hsuvYwG9osz-NGtSh8f9X28P8bLOzviGExXOlU1zazj7Ehbl_I19Q0whSY-QuJWRfch5Cf7ZNHO>. Acesso em: 17 ago. 2021. DOI: 10.1016/j.toxicon.2021.03.007.

FEDELES, B. I.; ESSIGMANN, J. M. Impact of DNA lesion repair, replication and formation on the mutational spectra of environmental carcinogens: Aflatoxin B 1 as a case study. **DNA Repair**, v. 71, p. 12–22, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30309820/>>. Acesso em: 21 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.08.008.

FEEDAP. Safety and efficacy of eight compounds belonging to chemical group 31 (aliphatic and aromatic hydrocarbons) when used as flavourings for all animal species and categories. **EFSA Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2016. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2016.4339>>. Acesso em: 2 jul. 2021. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4339.

FERREIRA, R. G. et al. Epigenetic alterations caused by aflatoxin b1: a public health risk in the induction of hepatocellular carcinoma. **Translational Research**, v. 204, p. 51–71, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30304666/>>. Acesso em: 16 set. 2020. DOI: 10.1016/j.trsl.2018.09.001.

FERRI, F. et al. Survey on urinary levels of aflatoxins in professionally exposed workers. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408191/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.3390/toxins9040117.

FIDYT, K. et al. β -caryophyllene -and - β -caryophyllene-oxide—natural compounds -of anticancer -and -analgesic -properties. **Cancer medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007–3017, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27696789/>>. Acesso em: 3 abr. 2021. DOI: 10.1002/cam4.816.

FOUAD, A. M. et al. Harmful effects and control strategies of aflatoxin B1 produced by aspergillus flavus and aspergillus parasiticus strains on poultry: Review. **Toxins**, v. 11, n. 3, p. 1–21, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468546/>>. Acesso em: 26 jun. 2021. DOI: 10.3390/toxins11030176.

FOWLES, J.; BATES, M.; NOITON, D. The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke. **A report to the New Zealand Ministry of health**, p. 1–65, 2000. Disponível em: <<https://www.health.govt.nz/system/files/documents/publications/chemicalconstituentscigarettespriorities.pdf>>. Acesso em: 29 jun. 2021.

FRANCOMANO, F. et al. β -caryophyllene: A sesquiterpene with countless biological properties. **Applied Sciences**, v. 9, n. 24, p. 5420, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/9/24/5420>>. Acesso em: 3 abr. 2021. DOI: 10.3390/app9245420.

GANESAN, K.; JAYACHANDRAN, M.; XU, B. A critical review on hepatoprotective effects of bioactive food components. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 7, p. 1165–1229, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1244154>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.1080/10408398.2016.1244154.

GAO, X. et al. Prenatal exposure to zearalenone disrupts reproductive potential and development via hormone-related genes in male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 116, p. 11–19, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.011>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2018.04.011.

GARBIN, U. et al. Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20011043/>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0008225.

GONZÁLEZ, I. Á.; BUJAI DAR, E. M.; GARCÍA, S. C. Antigenotoxic capacity of beta-caryophyllene in mouse, and evaluation of its antioxidant and GST induction activities. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 39, n. 6, p. 849–859, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25374376/>>. Acesso em: 29 jun. 2021. DOI:

10.2131/jts.39.849.

GUENGERICH, F. P. et al. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 3, p. 557–562, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8781383/>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.1289/ehp.96104s3557.

GUGLIANDOLO, E. et al. Evaluation of neuroprotective effects of quercetin against aflatoxin b1-intoxicated mice. **Animals**, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/10/5/898>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.3390/ani10050898.

GUO, K. et al. Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation in microglia. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 41–48, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24488604/>>. Acesso em: 28 jun. 2021. DOI: 10.1007/s12031-014-0243-5.

HABIBI, N. et al. Aflatoxin B1 exposure and the risk of hepatocellular carcinoma in Iranian carriers of viral hepatitis B and C. **Toxin Reviews**, v. 38, n. 3, p. 234–239, 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15569543.2018.1446027>>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.1080/15569543.2018.1446027.

HAMMAD, F. T. et al. Does β -caryophyllene protect against renal dysfunction following ischemia-reperfusion injury in them rat? **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 10, n. 6, p. 163, 2018.

HART, E. R.; WONG, L. C. K. Acute oral toxicity studies in rats, acute dermal toxicity and primary skin irritation studies in rabbits of 17 fragrance materials. **Bionetics Research Laboratories**, v. 30, 1971. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cam4.816>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

HERMAN, D.; MANTLE, P. Rat Tumour Histopathology Associated with Experimental Chronic Dietary Exposure to Ochratoxin A in Prediction of the Mycotoxin's Risk for Human Cancers. **Toxins**, v. 13, n. 3, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/13/3/205>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.3390/toxins13030205.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17572334/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.03.004.

HORVÁTH, B. et al. β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2. **Free radical biology and medicine**, v. 52, n. 8, p. 1325–1333, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312970/>>. Acesso em: 23 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.014.

HUA, Z. et al. Contamination of Aflatoxins Induces Severe Hepatotoxicity Through Multiple Mechanisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 605823, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33505311/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.3389/fphar.2020.605823.

HUANG, L. et al. Lactobacillus plantarum C88 protects against aflatoxin B1-induced liver injury in mice via inhibition of NF- κ B-mediated inflammatory responses and excessive apoptosis. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31357935/>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1186/s12866-019-1525-4.

HUSSAIN, M. A.; DAWSON, C. O. Economic impact of food safety outbreaks on food businesses. **Foods**, v. 2, n. 4, p. 585–589, 2013. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/2/4/585>>. Acesso em: 23 jun. 2021. DOI: 10.3390/foods2040585.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101–134, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11567776/>>. Acesso em: 23 maio. 2021. DOI: 10.1016/S0300-483X(01)00471-1.

IARC. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. v. 56, 1993. Disponível em: <<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Naturally-Occurring-Substances-Food-Items-And-Constituents-Heterocyclic-Aromatic-Amines-And-Mycotoxins-1993>>. Acesso em: 27 mar. 2021.

JASSO, D. M.; GONZÁLEZ, I. A.; BUJ AidAR, E. M. Clastogenicity of beta-caryophyllene in mouse. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 3, p. 520–522, 2009. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/32/3/32_3_520/_article/-char/ja/>. Acesso em: 2 jun. 2021. DOI: 10.1248/bpb.32.520.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Sixty-third meeting Geneva, 8-17 June 2004. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, n. 65, p. 1–16, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/at878e/at878e.pdf>>. Acesso em: 2 jul. 2021.

JELINEK, C. F.; POHLAND, A. E. ; WOOD, G. E. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - An updated review. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 2, p. 223–230, 1989. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR1998004063>>. Acesso em: 17 jun. 2021.

JI, Y. et al. Sitagliptin protects liver against aflatoxin B1-induced hepatotoxicity through upregulating Nrf2/ARE/HO-1 pathway. **BioFactors**, v. 46, n. 1, p. 76–82, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31600004/>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1002/biof.1573.

JIA, R. et al. The toxic effects of combined aflatoxins and zearalenone in naturally contaminated diets on laying performance, egg quality and mycotoxins residues in eggs of layers and the protective effect of Bacillus subtilis biodegradation product. **Food and Chemical Toxicology**, v. 90, p. 142–150, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26891816/>>. Acesso em: 2 set. 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2016.02.010.

JIANG, Y. et al. Aflatoxin in Dairy Cows: Toxicity, Occurrence in Feedstuffs and Milk and

Dietary Mitigation Strategies. **Toxins**, v. 13, n. 4, p. 283, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/13/4/283>>. Acesso em: 21 jun. 2021. DOI: 10.3390/toxins13040283.

JIN, H. et al. P53 activation contributes to patulin-induced nephrotoxicity via modulation of reactive oxygen species generation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27071452/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1038/srep24455.

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 8, p. 593–619, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17092826/>>. Acesso em: 26 ago. 2020. DOI: 10.1080/10408390500436185.

KAMALA, A. et al. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. **World Mycotoxin Journal**, v. 11, n. 3, p. 311–320, 2018. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/wagac/wmj/2018/00000011/00000003/art00002>>. Acesso em: 16 set. 2020. DOI: 10.3920/WMJ2018.2344.

KARACA, A. et al. The effect of lycopene on hepatotoxicity of aflatoxin B1 in rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1648516>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1080/13813455.2019.1648516.

KEW, M. C. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. **Liver International**, v. 23, n. 6, p. 405–409, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14986813/>>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2003.00869.x.

KLERX, H. J. V. D. F.; LIU, C.; BATTILANI, P. Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 5, p. 717–726, 2016. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/wagac/wmj/2016/00000009/00000005/art00007>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.3920/WMJ2016.2066.

KRISHNAMACHARI, K. A. V. R. et al. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. **The Lancet**, v. 305, n. 7915, p. 1061–1063, 1975. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/48730/>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1016/s0140-6736(75)91829-2.

KUMAWAT, V. S.; KAUR, G. Insulinotropic and antidiabetic effects of β -caryophyllene with l-arginine in type 2 diabetic rats. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 4, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfbc.13156?casa_token=19NCp--DLdwAAAAA%3AjSh-0vNfvwGe2qo5ehRfIJKKXsy2ZGF3Ijp4e5bZp94OcIh02binYWX0qyxfrD3rhfTKklSjWK-70FRwEA>. Acesso em: 17 ago. 2021. DOI: 10.1111/jfbc.13156.

LACKNER, R. **Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: Fish ecotoxicology**. 1. ed. Birkhäuser, Basel: Birkhauser Publishers,

LEE, H. J.; RYU, D. Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 33, p. 7034–7051, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27976878/>>. Acesso em: 24 ago. 2020. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04847.

LEWIS, L. et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1763–1767, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1314917/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1289/ehp.7998.

LI, H. et al. The Toxic Effects of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 on Kidney through Regulating L-Proline and Downstream Apoptosis. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/9074861/>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1155/2018/9074861.

LI, H. et al. β -Caryophyllene inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation and extracellular matrix accumulation in mesangial cells. **International immunopharmacology**, v. 84, p. 106556, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32416450/>>. Acesso em: 3 abr. 2021. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106556.

LI, H. et al. Ochratoxin A induces nephrotoxicity in vitro and in vivo via pyroptosis. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 1489–1502, 2021a. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/33543323>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1007/s00204-021-02993-6.

LI, W.-Y. et al. β -Caryophyllene Ameliorates MSU-induced gouty. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 951, 2021b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33967792/>>. Acesso em: 2 jul. 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.651305.

LOU, J. et al. β -Caryophyllene Attenuates Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Nrf2/HO-1 Pathway in Rats. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 6, p. 1291–1304, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11064-016-1826-z.pdf>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1007/s11064-016-1826-z.

LOUVET, A. et al. Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1217–1226, 2011. Disponível em: <<https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.24524>>. Acesso em: 2 jul. 2021. DOI: 10.1002/hep.24524.

LU, X. et al. Methylseleninic Acid Prevents Patulin-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity via the Inhibition of Oxidative Stress and Inactivation of p53 and MAPKs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 26, p. 5299–5305, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28594550/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01338.

MAGAN, N.; MEDINA, A. Integrating gene expression, ecology and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species in relation to interacting environmental factors. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 5, p. 673–684, 2016. Disponível em:

<<https://www.ingentaconnect.com/content/wagac/wmj/2016/00000009/00000005/art00004>>. Acesso em: 24 ago. 2020. DOI: 10.3920/WMJ2016.2076.

MAHMOUD, M. F. et al. Role of cannabinoid receptors in hepatic fibrosis and apoptosis associated with bile duct ligation in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 742, p. 118–124, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.08.021>>. Acesso em: 2 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.08.021.

MAHMOUDI, R. B. and M. contamination in cow feeds and milk from I.; NORIAN, R. Aflatoxin B1 and M1 contamination in cow feeds and milk from Iran. **Food and Agricultural Immunology**, v. 26, n. 1, p. 131–137, 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09540105.2013.876977>>. Acesso em: 2 set. 2020. DOI: 10.1080/09540105.2013.876977.

MARCHESE, S. et al. Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 1–19, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29794965/>>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.3390/toxins10060214.

MARIN, D. E.; TARANU, I. Overview on aflatoxins and oxidative stress. **Toxin Reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 32–43, 2012. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15569543.2012.730092>>. Acesso em: 3 abr. 2021. DOI: 10.3109/15569543.2012.730092.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218–237, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>>. Acesso em: 22 ago. 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.047.

MARRONE, A. K. et al. MicroRNA responses to the genotoxic carcinogens aflatoxin B1 and benzo [a] pyrene in human HepaRG cells. **Toxicological Sciences**, v. 149, n. 2, p. 496–502, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/toxsci/article-abstract/149/2/496/2461655>>. Acesso em: 23 jun. 2021. DOI: 10.1093/toxsci/kfv253.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas Em Alimentos Produzidos No Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228448438_Micotoxinas_em_alimentos_produzidos_no_brasil>. Acesso em: 2 set. 2020. DOI: 10.15871/1517-8595/rbpa.v12n1p89-99.

MEDINA, A.; RODRIGUEZ, A.; MAGAN, N. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 348, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4106010/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00348.

MEERAN, M. F. N. et al. B-Caryophyllene, a Natural Bicyclic Sesquiterpene Attenuates B-Adrenergic Agonist-Induced Myocardial Injury in a Cannabinoid Receptor-2 Dependent and Independent Manner. **Free Radical Biology and Medicine**, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.046>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.046.

MEHRZAD, J. et al. Environmentally relevant level of aflatoxin B1 elicits toxic pro-

inflammatory response in murine CNS-derived cells. **Toxicology Letters**, v. 279, p. 96–106, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28789997/>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.07.902.

MISHRA, S. et al. Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: a survey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 8, p. 1346–1374, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30761910/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1080/10408398.2019.1571479.

MITHÖFER, A.; MAFFEI, M. E. General Mechanisms of Plant Defense and Plant Toxins. **Plant Toxins**, p. 1–22, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-94-007-6728-7_21-1>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1007/978-94-007-6728-7_21-1.

MONSON, M.; COULOMBE, R.; REED, K. Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B1 in Poultry. **Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 742–777, 2015. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0472/5/3/742>>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.3390/agriculture5030742.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. Mycotoxins: An underhand food problem. **Methods in Molecular Biology**, v. 1542, n. 58, p. 3–12, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6707-0_1>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1007/978-1-4939-6707-0_1.

NAIEL, M. A. E.; ISMAEL, N. E. M.; SHEHATA, S. A. Ameliorative effect of diets supplemented with rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on aflatoxin B1 toxicity in terms of the performance, liver histopathology, immunity and antioxidant activity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 511, n. June, p. 734264, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734264>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734264.

NAKAJIMA, S.; KITAMURA, M. Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 162–174, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584913003018?casa_token=aAcQ0GDscawAAAAA:OYJjqsGNA178zpXLSJuRtzZfKpd5tCqtYb1iYxNNXK_uvbhVsRA3PPaANvT5F-T6ASsIVdqu80Jh>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.020.

NERÍN, C.; AZNAR, M.; CARRIZO, D. Food contamination during food process. **Trends in Food Science and Technology**, v. 48, p. 63–68, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224415301370?casa_token=P0UT_1X37ZsAAAAA:0Mw5NoxNqrrKWgUp2KvJKmu24xQrPO2--5qveFyX_rYt_BlbWFqhIwSc3aZeACTGlb6q856tjw2y>. Acesso em: 6 jul. 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.12.004.

OJHA, S. et al. β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 418, n. 1–2, p. 59–70, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27316720/>>. DOI: 10.1007/s11010-016-

2733-y.

OLIVEIRA, G. L. da S. et al. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 338–346, 2018. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29258925/>>. Acesso em: 3 abr. 2021. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.12.013.

OWUMI, S. et al. Gallic acid protects against Aflatoxin B1-induced oxidative and inflammatory stress damage in rats kidneys and liver. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1–12, 2020. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfbc.13316?casa_token=cmfvh9InygzAAA:AA:TNzc3dUGUSKDFRcWtc4s-bz1Z9qHH5EapY0uhpkp8jhl_WBnTPJTWi1kuycA9NjFJ3HCz3_boKJyppovnQ>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1111/jfbc.13316.

OZTURK, M. et al. P53 Mutation in Hepatocellular Carcinoma After Aflatoxin Exposure. **The Lancet**, v. 338, n. 8779, p. 1356–1359, 1991. DOI: 10.1016/0140-6736(91)92236-U.

PARK, M.; HONG, J. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic. **Cells**, v. 5, n. 2, p. 15, 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931664/>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.3390/cells5020015.

PATRIARCA, A.; FERNÁNDEZ PINTO, V. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 50–60, 2017. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.01.011.

PEERS, F. G.; LINSELL, C. A. Dietary aflatoxins and liver cancer—A population based study in Kenya. **British Journal of Cancer**, v. 27, n. 6, p. 473–484, 1973. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2008812/>>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.1038/bjc.1973.60.

PIGLOWSKI, M. Food hazards on the European Union market: The data analysis of the Rapid Alert System for Food and Feed. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1603–1627, 2019a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32180969/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1002/fsn3.1448.

PIGLOWSKI, M. Comparative analysis of notifications regarding mycotoxins in the rapid alert system for food and feed (RASFF). **Quality Assurance and Safety of Crops and Foods**, v. 11, n. 8, p. 725–735, 2019b. Disponível em:

<<https://www.qascf.com/index.php/qas/article/view/681>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.3920/QAS2018.1398.

PROBST, C.; NJAPAU, H.; COTTY, P. J. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2762–2764, 2007. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1855601/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1128/AEM.02370-06.

PUISIEUX, A. et al. Selective Targeting of p53 Gene Mutational Hotspots in Human Cancers

by Etiologically Defined Carcinogens. **Cancer Research**, v. 51, n. 22, p. 6185–6189, 1991. Disponível em: <<https://cancerres.aacrjournals.org/content/51/22/6185>>. Acesso em: 6 set. 2020. DOI: 10.1038/350429a0.

QIANG, M. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401–426, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4680839/>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.

RAEL, L. T. et al. Lipid peroxidation and the thiobarbituric acid assay: Standardization of the assay when using saturated and unsaturated fatty acids. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 6, p. 749–752, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15607036/>>. Acesso em: 21 jun. 2021. DOI: 10.5483/bmbrep.2004.37.6.749.

RAHMANI, J. et al. The prevalence of aflatoxin M1 in milk of Middle East region: A systematic review, meta-analysis and probabilistic health risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, n. February, p. 653–666, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.016>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2018.06.016.

REDDY, B. N.; RAGHAVENDER, C. R. Outbreaks of aflatoxicosis in India. **African journal of food, agriculture, nutrition and development**, v. 7, n. 5, p. 1–15, 2007. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajfand/article/view/136173>>. Acesso em: 18 jun. 2021.

RÉGNIER, M. et al. The protective role of liver X receptor (LXR) during fumonisin B1-induced hepatotoxicity. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 2, p. 505–517, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00204-018-2345-2>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1007/s00204-018-2345-2.

ROTICROM. **Ficha de Dados de Segurança do Beta-cariofileno**. Disponível em: <<https://www.carlroth.com/medias/SDB-7232-PT-PT.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyNzc0MzN8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oYzkvaDZmLzgw5NzEyMjYzMTY4MzAucGRmfDJiOTRkMzZkN2Y1YTEwODMzOWM3YTdmNDAYmWIwMDAxMmM5OGM0MDdkMjg1MzYxZGQ5N2Zh>>. Acesso em: 2 jul. 2021. .

RUSHING, B. R.; SELIM, M. I. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, p. 81–100, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>>. Acesso em: 22 ago. 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2018.11.047.

SALHAB, A. S.; HSIEH, D. P. Aflatoxicol H1: a major metabolite of aflatoxin B1 produced by human and rhesus monkey livers in vitro. **Research communications in chemical pathology and pharmacology**, v. 10, n. 3, p. 419–429, 1975. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1135508/>>. Acesso em: 23 jun. 2021.

SARPIETRO, M. G. et al. Interaction of β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide with phospholipid bilayers: Differential scanning calorimetry study. **Thermochemica Acta**, v. 600, p. 28–34, 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040603114005450>>. Acesso em: 28 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.tca.2014.11.029.

SCHMITT, D.; LEVY, R.; CARROLL, B. Toxicological Evaluation of β -Caryophyllene Oil: Subchronic Toxicity in Rats. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 558–567, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27358239/>>. Acesso em: 3 abr. 2021. DOI: 10.1177/1091581816655303.

SCHOENTAL, R. Aflatoxins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 343–356, 1967. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5337085/>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1146/annurev.pa.07.040167.002015.

SERASANAMBATI, M.; CHILAKAPATI, S. R. Function of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in Human Diseases-A Review. **South Indian Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 368, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15175863/>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443.

SHARMA, C. et al. Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 21, p. 3237–3264, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26965491/>>. Acesso em: 3 abr. 2021. DOI: 10.2174/1381612822666160311115226.

SHIN, H. S. et al. Ochratoxin a-induced hepatotoxicity through phase i and phase ii reactions regulated by ahr in liver cells. **Toxins**, v. 11, n. 7, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6669489/>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.3390/toxins11070377.

SIBIN, A. P. A. et al. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 12, p. 10262–10277, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30132972/>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.1002/jcb.27369.

SILVESTRE, F. Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 333, n. 6, p. 436–448, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32216128/>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1002/jez.2356.

SORIANO, J. M. et al. Aflatoxins in organs and biological samples from children affected by kwashiorkor, marasmus and marasmic-kwashiorkor: A scoping review. **Toxicon**, v. 185, p. 174–183, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.010>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.07.010.

SOTO, M. E. F. et al. β -Caryophyllene exerts protective antioxidant effects through the activation of NQO1 in the MPTP model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 742, p. 135534, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304394020308041>>. Acesso em: 2 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.neulet.2020.135534.

STEGEMAN, J. J. et al. **Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme**

and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. 1 st ed. USA: Lewis Publisher,

STEVENS, A. J. et al. Investigations into "diseases" of turkey poult. **Veterinary Record**, v. 72, n. 31, p. 627–628, 1960. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528810001116?casa_token=9DZkyk_6v0EAAAAA:KMdWljEokLjsk8iez2reJ8uPEXJUj1IMNfRIUKQBcmSyPGIRT-IOf00Qqf0_3Ne0uppvSZbhRTXh>. Acesso em: 24 ago. 2021.

STORZ, G.; IMLAY, J. A. Oxidative stress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 188–194, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10322176/>>. Acesso em: 21 jun. 2021. DOI: 10.1016/s1369-5274(99)80033-2.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 168–180, 2009. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267008019193>>. Acesso em: 2 set. 2020. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.010.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **Journal of environmental science and health Part C**, v. 27, n. 2, p. 120–139, 2009. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10590500902885684>>. Acesso em: 21 jun. 2021. DOI: 10.1080/10590500902885684.

VINHOLES, J. et al. Hepatoprotection of sesquiterpenoids: A quantitative structure-activity relationship (QSAR) approach. **Food Chemistry**, v. 146, p. 78–84, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.039>>. Acesso em: 2 jul. 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.039.

VIPIN, A. V. et al. Protective effects of phenolics rich extract of ginger against Aflatoxin B1-induced oxidative stress and hepatotoxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 415–424, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.107>>. Acesso em: 3 abr. 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.04.107.

WAKABAYASHI, N. et al. When NRF2 talks, who's listening? **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 13, n. 11, p. 1649–1663, 2010. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3216>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1089/ars.2010.3216.

WAN, J.; CHEN, B.; RAO, J. Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 3, p. 928–953, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12546>>. Acesso em: 17 ago. 2021. DOI: 10.1111/1541-4337.12546.

WANG, X. et al. Protective role of curcumin in ameliorating AFB1-induced apoptosis via mitochondrial pathway in liver cells. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 881–891, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29974318/>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.1007/s11033-018-4234-4.

WANG, Z.; POTOYAN, D. A.; WOLYNES, P. G. Molecular stripping, targets and decoys as

modulators of oscillations in the NF- κ B/I κ B α /DNA genetic network. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 13, n. 122, p. 6, 2016. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsif.2016.0606>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.1098/rsif.2016.0606.

WILD, C. P.; MILLER, J. D.; GROOPMAN, J. D. Mycotoxin control in low - and middle - income countries. **IARC Working group reports**, n. 9, p. 1–66, 2016. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/4264/f4032be5bbc99862a91d2677e6cc902a08faf7fa.pdf>. Acesso em: 19 set. 2020.

WINTER, G.; PEREG, L. A review on the relation between soil and mycotoxins: Effect of aflatoxin on field, food and finance. **European Journal of Soil Science**, v. 70, n. 4, p. 882–897, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ejss.12813>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1111/ejss.12813.

WOGAN, G. N. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. **Bacteriological reviews**, v. 30, n. 2, p. 460, 1966. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC441006/>>. Acesso em: 23 jun. 2021. DOI: 10.1128/br.30.2.460-470.1966.

WONG, Z. A.; HSIEH, D. P. H. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in the monkey, rat, and mouse. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 115–125, 1980. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7423498/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1016/0041-008x(80)90227-6.

WOOD, G. E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. **Journal of animal science**, v. 70, n. 12, p. 3941–3949, 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1474031/>>. Acesso em: 31 maio. 2021. DOI: 10.2527/1992.70123941x.

WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–7, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19514968/#:~:text=Some aflatoxin-producing fungi from,tract of humans and animals.>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.1080/03602530802563850.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. Role of the NF- κ B Pathway in the Pathogenesis of Human Disease States. **Current Molecular Medicine**, v. 1, n. 3, p. 287–296, 2005. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmm/2001/00000001/00000003/art00001>>. Acesso em: 17 jun. 2021. DOI: 10.2174/1566524013363816.

YANG, D. et al. Toxic effects of zearalenone on gametogenesis and embryonic development: A molecular point of review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 24–30, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.003>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2018.06.003.

YIANNIKOURIS, A. et al. Saccharomyces cerevisiae Cell Wall-Based Adsorbent Reduces Aflatoxin B1 Absorption in Rats. **Toxins**, v. 13, n. 3, p. 209, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/13/3/209>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.3390/toxins13030209.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.-P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a

review. **Animal Research**, v. 51, n. 2, p. 81–99, 2002. Disponível em: <<https://animres.edpsciences.org/articles/animres/abs/2002/02/01/01.html>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.1051/animres.

YILMAZ, S.; KAYA, E.; COMAKLI, S. Vitamin E (α tocopherol) attenuates toxicity and oxidative stress induced by aflatoxin in rats. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 26, n. 6, p. 907–917, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29068590/>>. Acesso em: 1 maio. 2021. DOI: 10.17219/acem/66347.

YU, S. et al. Fumonisin B1 triggers carcinogenesis via HDAC/PI3K/Akt signalling pathway in human esophageal epithelial cells. **Science of The Total Environment**, v. 787, p. 147405, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969721024761>>. Acesso em: 18 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.147405.

ZANGAR, R. C.; DAVYDOV, D. R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 199, n. 3, p. 316–331, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X04001231?casa_token=Ad0LWR_VpF4AAAAA:7PFh0z1SdyJEEgY_yc7QPj4xyU-_B5aiYdKFY1K7l73xoD3cjh3YG2WCtw611_fJmvilcI3-rd1p>. Acesso em: 21 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.taap.2004.01.018.

ZHANG, W. et al. Genetic Features of Aflatoxin-Associated Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, v. 153, n. 1, p. 249–262, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28363643/>>. Acesso em: 15 set. 2020. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.03.024.

ZHOU, Z. et al. A New Laccase of Lac 2 from the White Rot Fungus *Cerrena unicolor* 6884 and Lac 2-Mediated Degradation of Aflatoxin B1. **Toxin**, v. 12, n. 8, p. 476, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7472184/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. DOI: 10.3390/toxins12080476.

ZHU, Q. et al. AHR mediates the aflatoxin B1 toxicity associated with hepatocellular carcinoma. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41392-021-00713-1>>. Acesso em: 17 ago. 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00713-1.

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 COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DO B-CARIOFILENO FRENTE À EXPOSIÇÃO A AFLATOXINA B1 EM RATOS.", protocolada sob o CEUA nº 5234060519, sob a responsabilidade de **Ana Flávia Furian e equipe; Alice da Silveira Rosa; Andressa Amaral Vaz ; Érica Vanessa Furlan Rosa; Mauro Schneider Oliveira** - 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 06/08/2019.

We certify that the proposal "BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF β -CARIOPHILENE AGAINST EXPOSURE TO AFLATOXIN B1 IN RATS.", utilizing 80 Heterogenics rats (80 males), protocol number CEUA 5234060519, under the responsibility of **Ana Flávia Furian and team; Alice da Silveira Rosa; Andressa Amaral Vaz ; Érica Vanessa Furlan Rosa; Mauro Schneider Oliveira** - 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 08/06/2019.

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

Vigência da Proposta: de **07/2019** a **03/2022** Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 30 dias**

N: **80**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **40 a 60 g**

Resumo: A Aflatoxina B1 (AFB1) é uma micotoxina produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* que contamina diversas matrizes alimentares, como milho, sementes oleaginosas e especiarias. A AFB1 exerce efeitos deletérios à saúde humana e animal a partir da sua biotransformação no metabólito AFB1-8,9-epóxido que reage com macromoléculas celulares e promove o aumento do estresse oxidativo, implicando em processos pré-mutagênicos e hepatotóxicos. O β -cariofileno (BCF) é um sesquiterpeno bicíclico conhecido por ser um dos principais componentes ativos de óleos essenciais derivados de grande número de ervas, especiarias e alimentos e por exibir uma série de efeitos biológicos e farmacológicos bem pronunciados, como antioxidante e antiproliferativo. A AFB1 e o BCF podem ser comumente consumidos na alimentação, muitas vezes na mesma refeição. Nesse contexto, esse projeto tem por objetivo verificar o efeito do BCF (100 mg/kg, i.p.) frente a toxicidade causada por exposições à AFB1 (250 μ g/kg, v.o.) sobre parâmetros comportamentais, a fim de avaliar locomoção, ansiedade, aprendizado, memória e depressão, e sobre parâmetros bioquímicos para determinar parâmetros enzimáticos e não enzimáticos do estresse oxidativo e também expressões proteicas. Também será avaliado se o tratamento com BCF altera a morfologia do fígado e cérebro dos animais expostos à AFB1. Além disso, esse projeto pretende verificar o potencial efeito protetor do BCF sobre o dano no DNA induzido por exposição à AFB1 em ensaios de genotoxicidade. Os resultados obtidos permitirão a avaliação dos possíveis efeitos positivos do BCF frente à exposição a AFB1.

Local do experimento: Laboratório 5219, prédio 21

Santa Maria, 21 de agosto de 2019

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

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria