



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**INFLUÊNCIA DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS RICOS
EM FIBRA NA BIODISPONIBILIDADE DE CÁDMIO E
DE METAIS ESSENCIAIS EM RATOS**

TESE DE DOUTORADO

Maria da Graça Kolinski Callegaro

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**INFLUÊNCIA DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS RICOS EM
FIBRA NA BIODISPONIBILIDADE DE CÁDMIO E DE
METAIS ESSENCIAIS EM RATOS**

por

Maria da Graça Kolinski Callegaro

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Prof^a. Dra. Tatiana Emanuelli

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

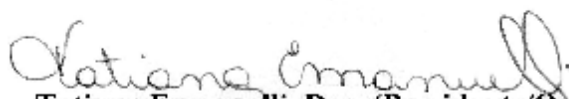
**INFLUÊNCIA DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS RICOS EM FIBRA NA
BIODISPONIBILIDADE DE CÁDMIO E DE METAIS ESSENCIAIS EM
RATOS**

elaborada por

Maria da Graça Kolinski Callegaro

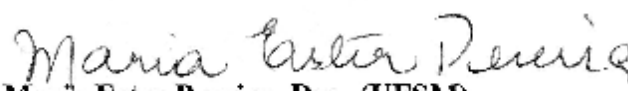
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:


Tatiana Emanuelli, Dra. (Presidente/Orientadora)


Carla Denise Bonan, Dra. (PUC,RS)


Solange Cristina Garcia, Dra. (UFRGS)


Maria Ester Percira, Dra. (UFSM)


Vera Maria Melchior Morsch, Dra. (UFSM)

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que possam ter proveito de nosso trabalho.

No entanto, gostaria de dedicar ainda:

***Ao meu Pai Cirenio e à minha mãe Geni,
agradecendo pelo grande Amor de vocês!***

***Ao meu professor de Bioquímica,
Professor Romeo Ernesto Rieghel,
agradecendo por muito ter contribuído para despertar
em mim o interesse pelos conhecimentos desta área!***

***Aos meus professores da área de Alimentos,
Cyro e Lori Schmitz,
agradecendo pelas primeiras e fundamentais oportunidades
que tive de trabalhar nesta área!***

AGRADECIMENTOS

Ô *Ao Divino Pai–Divina Mãe que tem me conduzido, através de tantos mestres e companheiros, a realizar o que percebo como propósitos essenciais de minha Vida!*

Ô *À estrutura desta Universidade, a qual, em primeiro lugar, é um bem público, mas que somente existe e evolui porque muitos dão aqui o melhor de si mesmos!*

Ô *São tantas as pessoas que participam de nossa Vida/nosso trabalho que não é possível citar todos. Citarei apenas alguns daqueles que participaram mais diretamente na realização deste trabalho.*

Na Universidade, principal contexto onde realizamos este trabalho, agradeço em especial:

Ô *À orientadora deste trabalho, professora Tatiana Emanuelli, que me convidou, me estimulou, me orientou, acreditou em mim e proporcionou muitos (muitos!) meios e teve muita paciência! No contexto da Universidade, Tatiana, você é a principal responsável pela minha realização deste doutorado e é uma Mestre Maravilhosa, fonte de grande inspiração para nosso exercício profissional!*

Ô *A todas as estudantes que trabalharam nos ensaios. Quero agradecer especialmente (em ordem alfabética) à Bruna Milbradt, à Elizângela e à Taíse, estagiárias-parceiras em tantas etapas! Fazer junto com vocês tornou tudo possível e quase sempre agradável. Foi tanto trabalho, tantos ratinhos criados, tanto material analisado,... que nos tornamos parceiras, acredito, para toda a Vida! Quero agradecer também às demais acadêmicas, entre as quais Isaura, Daiane e Bruna H., que também foram muito importantes em etapas do trabalho!*

Ô *À professora Leila Piccoli da Silva, pela articulação do projeto que incluiu grande parte do nosso trabalho, pelo estímulo e pelo exemplo de dinamismo!*

Ô *À Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, pela estrutura e apoio. Aos Professores, por muitas oportunidades valiosas de aprendizagem, inclusive sobre o exercício da docência!*

Ô *Aos meus colegas do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, principalmente aos que me auxiliaram, procurando me liberar de parte de meus encargos e todos aqueles que tiveram aquele gesto de ajuda, aquela palavra estimulante, aquele carinho... que ajudavam a prosseguir!*

Ô *Aos colegas de trabalho no NIDAL, pela parceria e todos os auxílios.*

Ô *Aos meus colegas de curso durante a realização do doutorado; foram muitos com os quais foi proveitoso compartilhar! Especialmente agradeço à Paula, Greicy e à Taís! E ainda mais: Paula, naquela hora do “já quase sem forças”, receber sua ajuda foi fundamental!*

Ô *Ao professor Érico Marlon de Moraes Flores, ao Fábio Andrei Duarte e ao professor Valderi Luiz Dressler, pela parceria em nosso trabalho!*

Ô *Aos alunos de graduação deste período, que me estimularam de diversas formas!*

Ô *Entre tantas ajudas importantes, obrigada ao Seu Finamor (do Laboratório de Solos-CCR), pela ajuda na determinação dos minerais; à Cristiane Denardin, pela ajuda com os ratinhos, e à minha professora de inglês Viviani!*

Ô *Após a defesa, também agradeço às Professoras que fizeram parte da comissão de avaliação desta tese, pela disponibilidade e pelas contribuições valiosas!*

No contexto paralelo à Universidade (e igualmente importante), agradeço em especial:

Ô *À PASTORAL DA CRIANÇA que, através de seu trabalho solidário com aqueles que ainda têm falta de alimentos, tem sido uma grande fonte de motivação no sentido de avançarmos no desenvolvimento do conhecimento na área pertinente!*

Ô *Aos meus Pais Cirenio e Geni que são um exemplo de trabalho, de honestidade, de solidariedade! Pai, obrigada por ter sido tanto a ponto de continuar tão maravilhosamente presente! Mãe, precisamos que tu permaneça mais “um punhado” de anos por aqui!*

Ô *A minha filha, Maria Júlia, com quem mais aprendo Amar e ampliar este Amor e que muito me ajuda a redescobrir partes importantes de mim! Gracias, minha Flor!*

Ô *Aos meus manos Cireno e Válter e Iara! E aos que foram chegando nesta ordem: Vera, João, Joana, Darla-Alencastro, Marina, Andria, Chico, André, Gean, Clara e Nina Luiza. Cada um de vocês faz parte do meu caminho, me estimula e me alimenta de algum jeito!!!*

Ô *A todos os mestres/amigos, aqueles que sempre estão comigo, apesar de tanto deixar de encontrá-los nesta fase do doutorado! Gracias, Luiz Carlos, Dorli, Eugenio, Cris, Dionéia, Antonia, Marlove, Sw. Sírio e Dulce, Elma e José Américo e Lucy, Beta e Sandra, Fátima e Vilson e todos os demais, os quais não consigo citar aqui!*

Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô Ô

*“Criar é
tão fácil
ou tão difícil
como viver,
que é,
do mesmo modo,
necessário.”
(Fayga Ostrower)*

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

INFLUÊNCIA DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS RICOS EM FIBRA NA BIODISPONIBILIDADE DE CÁDMIO E DE METAIS ESSENCIAIS

AUTORA: MARIA DA GRAÇA KOLINSKI CALLEGARO

ORIENTADORA: TATIANA EMANUELLI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de Dezembro de 2009.

As fibras alimentares (FA) podem interferir na biodisponibilidade de elementos minerais tanto negativa quanto positivamente. Este tem sido um assunto de diversas pesquisas e grande interesse em relação aos minerais essenciais e alguns estudos também têm sido feitos em relação aos elementos tóxicos como o cádmio (Cd). A contaminação ambiental com Cd e sua conseqüente entrada na cadeia alimentar pode levar a graves problemas no homem e nos animais em geral, afetando vários órgãos, o que pode ser mais grave quando a exposição se dá durante a fase de crescimento. Suplementos ricos em fibra são utilizados por parte da população em face da falta deste constituinte em suas dietas. Por outro lado, as multimisturas (MMs) são suplementos alimentares de composição variável e baixo custo, utilizados para melhorar o estado nutricional de crianças, sendo que estes suplementos são normalmente ricos em fibra e também em elementos minerais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de MMs e outros produtos alimentícios ricos em FA sobre a absorção de elementos minerais e sobre a absorção, acumulação e toxicidade do Cd, em ratos em crescimento. Foram conduzidos três experimentos independentes. No primeiro experimento as multimisturas, usadas como suplementos na proporção de 5% da dieta, aumentaram a absorção absoluta aparente de fósforo, magnésio e manganês, proporcionalmente ao seu teor de fibra alimentar, não chegando a interferir na absorção de cálcio e cobre, o que sugere que estes suplementos podem ser fonte de alguns minerais na dieta e, em proporções semelhantes àquela utilizada neste estudo, não reduziram a absorção de cálcio ou cobre. Num segundo estudo, uma MM, rica em fibra e em minerais essenciais, não reduziu a acumulação nem a toxicidade do Cd quando este foi utilizado na dose de 25 mg/kg de dieta, mas reduziu a acumulação renal do metal quando este foi utilizado na dose de 5 mg/kg de dieta, a qual é compatível com a exposição humana em algumas áreas contaminadas, sugerindo que a multimistura poderia contribuir para reduzir a toxicidade do Cd em zonas de contaminação ainda inevitável. No terceiro experimento, em que se comparou a linhaça e o farelo de trigo com a celulose purificada, observou-se que a linhaça, que contém maior proporção de fibra solúvel, aumentou a quantidade de Cd retido no fígado e rins dos ratos em crescimento em comparação com as outras duas fontes, que contêm predominantemente fibra insolúvel. Estes resultados indicam que alimentos com maior proporção de fibra solúvel podem aumentar a deposição corporal de Cd, sugerindo que deve haver cuidado na ingestão dos mesmos em regiões contaminadas com Cd. A linhaça e o farelo de trigo, usados como fonte de fibra alimentar para os ratos expostos ao Cd, reduziram a absorção aparente do cálcio e do fósforo e aumentaram a absorção aparente de magnésio em comparação com a celulose, o que poderia ser atribuído a uma interação do Cd com o fitato presente naquelas fontes de fibra. Os resultados deste trabalho mostram que as MMs podem ser fonte de alguns minerais essenciais, além de reduzir a acumulação renal de cádmio, após exposição a baixas doses deste metal. Também observou-se que diferentes fontes de fibra podem interferir de forma diversa na retenção de minerais tóxicos como o Cd, devendo-se ter cuidado com fontes ricas em fibras solúveis, como a linhaça, que podem aumentar a retenção do metal.

Palavras-chave: fibra alimentar solúvel; fibra alimentar insolúvel; multimistura; farelo de cereais; linhaça; minerais essenciais; cádmio.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Graduate Program on Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

INFLUENCE OF FOOD RICH IN DIETARY FIBERS ON CADMIUM AND ESSENTIAL METALS AVAILABILITY

AUTHOR: MARIA DA GRAÇA KOLINSKI CALLEGARO

ADVISOR: TATIANA EMANUELLI

Date and Place of the Defense: Santa Maria, December 21, 2009.

Dietary fibers can interfere in the bioavailability of mineral elements both negatively and positively. This has been the subject of several researches because there is a great interest in essential minerals; also, some studies have been done regarding toxic elements such as cadmium (Cd). Environmental contamination with Cd and its consequent interference in the food chain can cause serious problems in humans and animals affecting several organs in general, and this can become even worse when exposure takes place during growth. Fiber-rich supplements are employed by people that have low levels of fiber in the diet. On the other hand, multimixtures (MMs) are low-cost food supplements with different compositions that are used to improve the nutritional conditions of children. These supplements are normally rich in fibers and mineral elements. The objective of this study was to evaluate the effect of MMs and other food products rich in dietary fibers on the absorption of mineral elements and on Cd absorption, accumulation, and toxicity in growing rats. Three independent experiments were conducted. In the first experiment, MMs, used as supplements at a 5% proportion in diets, increased apparent absolute absorption of phosphorus, magnesium and manganese, proportionally to its level of dietary fiber, but did not interfere in calcium or copper absorption. This suggests that these supplements can be a source of some minerals in the diet, and similar proportions to those employed in this study did not diminish calcium and copper absorption. In the second experiment, one MM, rich in fibers and essential minerals did not diminish either Cd accumulation or toxicity when this metal was employed at 25 mg/kg in the diet, but MM diminished Cd accumulation in the kidneys when it was employed at 5 mg/kg in the diet. This latter Cd level is similar to human exposure in some contaminated areas, which suggests that MM may contribute to diminish Cd toxicity in polluted areas. In the third experiment, when flaxseed and bran wheat were compared to purified cellulose, it was observed that flaxseed, which has a higher proportion of soluble fiber, increased Cd accumulation in the liver and kidneys of growing rats in comparison to the other two fiber sources, which have basically insoluble fiber. These results indicate that foods with a higher proportion of soluble fiber can increase Cd body retention, suggesting that one should be careful when ingesting these foods in Cd contaminated areas. Flaxseed and bran wheat, used as sources of dietary fiber for rats exposed do Cd, decreased apparent absorption of Ca and P and increased apparent absorption of Mg in comparison to purified cellulose, which might be attributed to an interaction of Cd and phytate present in these fiber sources. Results of the present study show that MMs can be source of some essential mineral, besides reducing renal Cd accumulation, after exposure to low Cd doses. It was also observed that different sources of fiber may differentially affect the retention of toxic metals like Cd, and one should be careful when using foodstuffs rich in soluble fiber, like flaxseed, which can increase Cd retention.

Keywords: insoluble dietary fiber, soluble dietary fiber, multimixtures, cereal bran, flaxseed, essential minerals, cadmium.

LISTAS DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Constituintes da fibra alimentar | 20 |
| Quadro 2 - Mecanismos propostos para influência da fibra ou de produtos ricos em fibra na absorção de minerais | 25 |

MANUSCRITO 1:

| | |
|---|----|
| Table 1 - Ingredients of the different multimixtures evaluated | 56 |
| Table 2 - Composition of multimixtures and experimental diets (wet weight basis) | 57 |
| Figure 1 - Feed intake (A), body weight gain (B), and feed efficiency ratio (C) of growing rats fed diets without or with multimixtures. | 58 |
| Table 3 - Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of calcium in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods..... | 59 |
| Table 4 - Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of phosphorus in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods..... | 60 |
| Table 5 - Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of magnesium in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods..... | 61 |
| Table 6 - Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of manganese in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods..... | 62 |
| Table 7 - Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of copper in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods..... | 63 |

ARTIGO 1:

| | |
|---|----|
| Table 1 - Ingredient composition of basic diet (BD)..... | 67 |
| Table 2 - Energy and chemical composition of MM and the experimental diets..... | 69 |
| Table 3 - Feed intake, body weight gain, and feed efficiency ratio of rats exposed to a Cd-containing diet (0, 5 or 25 mg/kg) without or with multimixture (+ MM) during 30 days..... | 69 |

Table 4 - Liver parameters of rats exposed to a Cd-containing diet (0, 5 or 25 mg/kg) without or with multimixture (+ MM) during 30 days 70

Table 5 - Renal parameters of rats exposed to a Cd-containing diet (0, 5 or 25 mg/kg) without or with multimixture (+MM) during 30 days 70

MANUSCRITO 2:

Table 1 - Energy and chemical composition of sources of dietary fiber and the experimental diets..... 95

Table 2 - Experimental groups, diets and the concentration of Cd found in diets 97

Table 3 - Feed intake, body weight gain, feed efficiency ratio and epididymal fat relative weight of rats fed with different fiber sources exposed or not to 50 mg Cd kg⁻¹ during 30 days.....98

Table 4 - Liver parameters of rats fed with different fiber sources exposed or not to 50 mg Cd kg⁻¹ during 30 days 99

Table 5 - Renal parameters of rats fed with different fiber sources exposed or not to 50 mg Cd kg⁻¹ during 30 days 100

Figure 1 - Apparent mineral absorption (relative and absolute) of rats fed with different fiber sources exposed or not to 50 mg Cd/kg diet..... 101

ANEXO:

ANEXO A – Comparação entre recomendações nutricionais para seres humanos e para ratos, em fase de crescimento, considerando a ingestão energética de 1000 kcal 124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACC - American Association of Cereal Chemists

(Associação Americana de Químicos de Cereais)

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

(Associação Oficial de Químicos Analíticos)

Cd - Cádmio

FA – fibra alimentar

FAI – fibra alimentar insolúvel

FAS – fibra alimentar solúvel

FAT – fibra alimentar total

MM – Multimistura

MMs - Multimisturas

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| DEDICATÓRIA | 3 |
| AGRADECIMENTOS | 4 |
| RESUMO | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| LISTA DE TABELAS | 9 |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1. OBJETIVOS | 16 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 17 |
| 2.1. Fibra alimentar..... | 17 |
| 2.1.1. Definição | 17 |
| 2.1.2 Constituintes e classificação..... | 19 |
| 2.1.3. Efeitos biológicos | 20 |
| 2.1.4. Recomendação nutricional | 21 |
| 2.2. Minerais..... | 22 |
| 2.2.1. Fatores que interferem na biodisponibilidade de minerais..... | 22 |
| 2.2.2. Fibra alimentar e biodisponibilidade de minerais..... | 23 |
| 2.3. Multimisturas..... | 27 |
| 2.3.1. Multimisturas e minerais | 27 |
| 2.4. Cádmio | 28 |
| 2.4.1. Identificação e ocorrência..... | 28 |
| 2.4.2. Formas de exposição | 29 |
| 2.4.3. Absorção por via oral | 30 |
| 2.4.3.1. Fibra alimentar e absorção de Cd | 31 |
| 2.4.4. Distribuição, metabolismo e excreção..... | 31 |
| 2.4.5. Toxicidade | 33 |
| 3. RESULTADOS | 35 |
| 3.1. Manuscrito 1 | 36 |

| | |
|------------------------------------|-----|
| 3.2. Artigo 1..... | 65 |
| 3.3. Manuscrito 2..... | 75 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 103 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 114 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 115 |
| 7. ANEXO..... | 124 |

1. INTRODUÇÃO

A fibra alimentar, constituída principalmente por carboidratos indigeríveis, é um dos constituintes essenciais na dieta humana em face das suas funções no funcionamento intestinal e na regulação da glicose e do colesterol sanguíneos. Além disso, o consumo de fibra ou de alimentos ricos em fibra tem sido associado com a prevenção de distúrbios, como a obesidade, e de doenças como câncer de cólon (AACC, 2001; Eastwood e Kritchevsky, 2005).

A presença da fibra na dieta pode interferir com a biodisponibilidade de outros nutrientes, como os elementos minerais. Embora tenha se considerado inicialmente o efeito negativo das fibras sobre a biodisponibilidade de minerais, sabe-se hoje que diferentes tipos de fibras podem ter efeitos distintos. De modo geral, considera-se que os constituintes insolúveis da fibra, bem como substâncias associadas, têm maior potencial para ligar minerais e diminuir sua absorção e que os constituintes solúveis têm efeito mais variável, podendo interferir mais positivamente. Além disso, alguns dos produtos ricos em fibra, como os farelos de cereais contêm também relevantes quantidades de elementos minerais, os quais são em parte biodisponíveis (Ruiz-Roso et al., 2001; Filisetti e Lobo, 2007).

Multimisturas (MMs) são suplementos alimentares formulados a base de produtos alimentícios subutilizados na alimentação humana, usados amplamente no Brasil e também em outros países, com o objetivo de melhorar o estado nutricional de crianças. Existem controvérsias quanto à eficiência das MMs como suplementos nutricionais, sendo que um dos questionamentos é sobre sua interferência na biodisponibilidade de minerais (Ferreira et al., 2005; Kaminski et al., 2006).

Sabe-se que a fibra alimentar também pode interferir negativa ou positivamente sobre a biodisponibilidade de elementos minerais tóxicos (Filisetti e Lobo, 2007). O cádmio (Cd) é um dos metais tóxicos com ampla distribuição, devido à sua ocorrência natural, mas principalmente em decorrência do seu uso industrial e como contaminante de alguns insumos agrícolas (Satarug et al., 2003). Devido a sua longa meia-vida (até 26 anos no homem; WHO, 1992), o Cd pode se acumular no organismo de animais, entre os quais o homem, causando danos ao fígado, rins, ossos e pulmões, entre outros órgãos (WHO, 1992; ATSDR, 2008). A principal ação necessária em relação ao Cd é evitar a contaminação do ambiente com este metal; no entanto, em regiões onde a contaminação ambiental ainda é preocupante, o conhecimento de condições que possam diminuir sua acumulação nos organismos vivos é de grande importância.

Tendo em vista as controvérsias ainda existentes sobre o efeito das MMs e de outros suplementos ricos em fibra sobre a biodisponibilidade de elementos minerais essenciais e da importância de elucidar a interferência destes produtos sobre absorção e toxicidade do Cd foi proposto o presente trabalho, visando avaliar o efeito de suplementos dietéticos sobre a absorção de minerais essenciais e sobre a absorção, acumulação e toxicidade do Cd.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de suplementos dietéticos com diferentes teores e qualidade de fibras sobre a absorção de minerais essenciais e sobre a absorção, a acumulação e a toxicidade do Cd..

1.1.2. Objetivos específicos

- Verificar a influência de multimisturas com diferentes teores de fibra alimentar sobre a absorção de minerais essenciais em ratos;

- Avaliar o efeito da suplementação de uma dieta (nutricionalmente incompleta) com a multimistura, sobre a acumulação e toxicidade do Cd em ratos;

- Comparar o efeito de fontes de fibra com diferentes proporções de fibra solúvel e insolúvel sobre a absorção, acumulação e toxicidade do Cd e sobre a absorção de macrominerais essenciais em ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fibra alimentar

A idéia sobre a importância da ingestão de alimentos ricos em fibra apareceu na literatura muito antes do conhecimento da fibra como um dos constituintes dos alimentos. Já no século VI aC, Hipócrates observou que “ao corpo humano faz uma grande diferença se o pão é feito de farinha de trigo fina ou grossa, com ou sem farelo” (AACC, 2001). Ao longo da história, foram registradas outras observações sobre a importância dos alimentos fibrosos, todavia a primeira determinação da fibra como uma fração dos alimentos data de 1850, através do método da “fibra bruta”. Apesar de terem sido publicados alguns estudos importantes sobre a determinação e também sobre as funções da fibra a partir de então, foi somente a partir de 1950 que a comunidade científica voltou maior atenção para esta fração da dieta, no sentido de elucidar sua importância para o organismo humano e também de desenvolver metodologias mais adequadas para sua quantificação nos alimentos (Asp e Johansson, 1984; Eastwood e Kritchevsky, 2005).

2.1.1. Definição

Existe uma grande variedade de definições de fibra, sendo que algumas delas são baseadas somente em um ou mais métodos analíticos usados para isolar fibra, enquanto outras são baseadas em sua função fisiológica. A definição de fibra tem se modificado, historicamente, com o desenvolvimento do conhecimento das funções desta fração e também dos métodos analíticos para sua determinação (Asp e Johansson, 1984; AACC, 2001; Dreher, 2001, Eastwood e Kritchevsky, 2005).

Considera-se que o termo “fibra alimentar” foi usado pela primeira vez em 1953, por Hipsley, para designar “constituintes não-digeríveis da parede celular vegetal”. Até então, usava-se o termo “fibra bruta” (determinada pelo método correspondente) ou simplesmente “fibra”. Na década de 1970, baseada em observações sobre condições de saúde de populações, foi lançada a “hipótese da fibra alimentar”, a qual relacionava o consumo de fibra com a menor incidência de diversas doenças (ver no item 2.1.3). Neste contexto, a definição de fibra foi ampliada, passando a incluir todos os polissacarídeos resistentes a digestão (e não somente os constituintes da parede celular), além de oligossacarídeos resistentes a digestão, incluindo também outras substâncias, como taninos e fitatos, as quais ocorrem associadas aos constituintes majoritários da fibra. Foi também a partir da década de 1970 que houve um

trabalho mais intensivo por parte de pesquisadores visando desenvolver metodologias adequadas para quantificar os constituintes da fibra incluídos na definição então proposta. Tais pesquisas levaram ao desenvolvimento de novas metodologias, as quais foram oficialmente recomendadas, a partir da década 1980, pela Associação Oficial de Químicos Analíticos (Association of Official Analytical Chemists - AOAC) e também pela Associação Americana de Químicos de Cereais (American Association of Cereal Chemists - AACC) (AACC, 2001; Dreher, 2001).

Apesar do grande desenvolvimento do conhecimento sobre a fração fibra alimentar, tem havido ainda muita controvérsia sobre sua definição, funções e quantificação. Tendo em vista estas controvérsias, em 1998, a AACC estabeleceu um comitê científico objetivando rever e, se necessário, atualizar, a definição de “fibra alimentar” (AACC, 2001). Após uma ampla discussão a nível mundial, envolvendo pesquisadores, membros da indústria e público em geral, o referido comitê chegou, em 1999, à definição de fibra colocada a seguir, a qual inclui os mesmos constituintes da definição anterior, delimitando-os mais claramente e incluindo, ainda, o aspecto da funcionalidade.

“Fibras alimentares consistem em constituintes remanescentes de partes comestíveis de plantas e carboidratos análogos, os quais são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano, podendo ser fermentados completa ou parcialmente no intestino grosso. A fibra alimentar inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias vegetais associadas. A fibra alimentar promove efeitos fisiológicos benéficos incluindo efeitos laxativos e/ou redução do colesterol sanguíneo e/ou redução da glicose sanguínea” (AACC, 2001).

Quanto à metodologia para quantificação da fibra, o comitê acima citado considerou que as metodologias recomendadas pela AACC e AOAC, correntemente usadas para determinar fibra alimentar, continuavam sendo adequadas para a determinação de fibra na maior parte dos alimentos, de acordo com a definição proposta nesta oportunidade. No entanto, foi também indicada, pelo mesmo comitê, a necessidade de desenvolvimento de metodologia adicional para a quantificação de fibra alimentar em alguns alimentos que contivessem substâncias não determinadas pelos métodos correntemente usados (frutanas, dextrinas modificadas e/ou substâncias sintéticas análogas a fibra) (AACC, 2001).

Considera-se importante chamar a atenção para o fato de que ainda permanecem dúvidas e controvérsias sobre a definição de fibra alimentar (Dreher, 2001; Eastwood e Kritchevsky, 2005). No contexto desta tese, adota-se o conceito de fibra alimentar proposto pela AACC

(2001), que também está de acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2003) e tem sido encontrado amplamente na literatura.

No Brasil, a fibra alimentar é um dos 7 itens obrigatórios na informação nutricional de alimentos a serem comercializados embalados, constando da legislação pertinente conforme a seguinte definição: “Fibra alimentar é qualquer material comestível que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano”. Tendo em vista que esta mesma legislação também recomenda método indicado pela AACC, considera-se que os constituintes da fibra são os mesmos (Brasil, 2003).

2.1.2. Constituintes e classificação

Os constituintes da fibra são, na sua maior parte, substâncias de origem vegetal, predominantemente originados da parede celular e, em menor parte, alguns polissacarídeos extraídos de plantas ou sintetizados por microrganismos. Sendo assim, a fibra alimentar está presente na dieta humana através do consumo de uma grande variedade de alimentos de origem vegetal (ex.: grãos, frutos, raízes), nos quais está presente normalmente como constituinte natural e/ou em alimentos em geral onde tenha sido adicionada e/ou na forma de suplementos alimentares ricos em fibra.

As substâncias incluídas como constituintes da fibra, conforme a definição da AACC estão listadas no Quadro 1. A composição da fibra presente nos vegetais é bastante variável, na dependência de muitos fatores, podendo-se destacar que esta variação provém principalmente de diferenças: a) entre diferentes espécies vegetais; b) entre variedades, dentro da mesma espécie vegetal; c) entre os diferentes órgãos ou tecidos vegetais, inclusive dentro da mesma espécie; d) num mesmo órgão ou tecido, na dependência da fase de desenvolvimento e/ou maturidade do vegetal; e) ocasionadas por processamentos industriais ou culinários; f) ocasionadas por condições de armazenamento (Buckeridge e Tiné, 2001; Dreher, 2001).

Conforme a grande maioria dos autores, a fibra alimentar total (FAT) é classificada de acordo com sua solubilidade em água, em duas frações: fibra alimentar insolúvel (FAI) e fibra alimentar solúvel (FAS). A FAI consiste principalmente de constituintes da parede celular que incluem a celulose, lignina e hemiceluloses e a sua ingestão está relacionada principalmente com a diminuição do tempo de trânsito intestinal e o aumento de volume do bolo fecal. A FAS consiste de polissacarídeos não-celulósicos tais como pectinas, gomas e mucilagens e polifrutoses, grande parte dos quais sofrem degradação/fermentação no intestino grosso e

entre suas funções já bem estabelecidas estão o retardamento do esvaziamento gástrico e da absorção da glicose e a redução dos níveis séricos de colesterol. (Dreher, 2001, Lajolo et al., 2001; Filisetti e Lobo, 2007). O retardamento do esvaziamento gástrico parece se dar pelo fato de que as fibras solúveis, aumentando a viscosidade do quimo estomacal, aumentam a resistência do piloro à sua passagem, o que também contribui para o retardamento da digestão e conseqüentemente da absorção da glicose no intestino (Reyes e Areas, 2001). Entre os mecanismos propostos para o efeito das fibras solúveis sobre o colesterol sérico os mais aceitos são: o aumento da excreção dos ácidos biliares através das fezes, com conseqüente mobilização de colesterol para síntese hepática dos mesmos e a redução da síntese endógena do próprio colesterol por substâncias formadas a partir da fermentação das fibras, principalmente o propionato (Derivi e Mendez, 2001). A FAI é a principal fração de fibra da grande maioria dos alimentos, sendo que em muitos alimentos, é a única ou quase-única fração (Dreher, 2001; Lajolo et al., 2001). Conforme Dreher (2001), cerca de 75% da fibra presente nos alimentos se constitui em fibra insolúvel.

| Grupos | Constituintes |
|--|---|
| Polissacarídios não-amiláceos e oligossacarídios resistentes a digestão | Celulose Hemiceluloses Polifrutoses (inulinas e oligofrutanas) Galactooligosacarídios Gomas Mucilagens Pectinas |
| Carboidratos análogos ao primeiro grupo | Dextrinas indigeríveis Carboidratos sintetizados: (ex.: polidextrose, metilcelulose) Amidos resistentes a digestão |
| Lignina | Lignina |
| Substâncias associadas com os polissacarídios e lignina formadores da fibra nas plantas | Fitatos Cutina Saponinas Taninos |

Fonte: AACC (2001).

Quadro 1 - Constituintes da fibra alimentar

2.1.3. Efeitos biológicos

Entre os diferentes constituintes da dieta que são relacionados com prevenção e tratamento de doenças estão as fibras alimentares. Na década de 1970, baseados em observações de que determinadas doenças de alta incidência em populações de regiões mais industrializadas tinham incidência muito menor em comunidades mais primitivas e que estas últimas consumiam dietas muito mais ricas em alimentos fibrosos, estudiosos lançaram a chamada “hipótese da fibra alimentar”. Esta hipótese pressupunha que uma ingestão de dietas com alto teor de fibras estava diretamente relacionada com a menor incidência de enfermidades comuns ao estilo de vida ocidental como a doença intestinal crônica, o câncer de cólon, o diabetes e a doença cardíaca coronariana (Dreher, 2001; Eastwood e Kritchevsky, 2005).

Ao considerarmos a relação da dieta com a saúde, é fundamental termos em mente que as dietas compostas por alimentos ricos em fibra são diferentes em muitos aspectos, e não somente quanto ao seu conteúdo de fibras, das dietas pobres em fibra. Neste sentido, sobre os efeitos relacionados com as dietas ricas em fibra, as pesquisas têm procurado elucidar, quais deles são devidos a fibra propriamente. Além disso, a fibra, como colocado acima, é uma mescla de constituintes muito diversos. Estes constituintes têm propriedades físico-químicas e efeitos fisiológicos distintos como têm demonstrado as pesquisas ao longo das últimas décadas. Atualmente já está claro o papel da fibra alimentar, ou de parte de seus constituintes, na prevenção e/ou tratamento de alguns distúrbios ou enfermidades como hipercolesterolemia, diabetes e constipação intestinal. Com relação à prevenção/tratamento de outros distúrbios ou enfermidades, como obesidade e aterosclerose a associação comprovada é aquela com dietas ricas em alimentos fibrosos e não com fibra alimentar propriamente dita (LAJOLO et al., 2001; CHO e DREHER, 2001; Eastwood e Kritchevsky, 2005).

2.1.4. Recomendação nutricional

No Brasil, a recomendação de fibra está implícita na informação nutricional dos rótulos de alimentos embalados. Conforme a legislação pertinente, para um valor de referência de uma dieta diária de 2000 kcal, a recomendação de fibra é de 25 g.

Numa das últimas recomendações divulgadas, o valor sugerido para adultos foi de 15 gramas para cada 1000 kcal de dieta (Estados Unidos, 2005), o qual é um valor bem próximo da recomendação brasileira.

Para ratos, os animais mais utilizados em experimentação na área de alimentos visando aplicações em humanos, a recomendação de fibra é similar a de humanos (Reeves et

al., 1993). Esta recomendação, bem como a comparação entre as recomendações para ratos e para seres humanos em relação a outros nutrientes constam do Anexo .

2.2. Minerais

Embora não exista uma definição universal de minerais, na área da ciência de alimentos e nutrição, o termo “Mineral” é utilizado para referir-se a todos os elementos presentes nos alimentos, com exceção dos quatro principais elementos da matéria orgânica (C, H, O e N). Portanto, são designados como minerais os elementos essenciais e também os elementos não-essenciais. Entre os minerais, a maioria pertence ao grupo dos metais, isto é, possuem forte tendência a doar elétrons e, portanto, formar cátions. (Miller, 2000; Mahan & Escott-Stump, 2002)

Conforme as quantidades diárias requeridas no organismo humano, os minerais essenciais são classificados em dois grupos: a- macronutrientes essenciais (Ca, P, S, K, Cl, Na e Mg, necessários em quantidades maiores do que 100 mg diários); b- micronutrientes essenciais (Fe, F, Zn, Cu, I, Cr, Co, Se, Mn e Mo, necessários em alguns miligramas por dia e Si, V, Sn e Ni, necessários em quantidades mínimas e ainda não estimadas). O organismo humano pode conter ainda muitos outros elementos, alguns com função conhecida (embora não-essenciais) como o Li e outros sem função conhecida, entre os quais os metais tóxicos como o Pb, o Hg e o Cd (Miller, 2000; Mahan & Escott-Stump, 2002).

A obtenção dos elementos minerais essenciais, e também de muitos não-essenciais, pelo organismo animal se dá basicamente através da ingestão oral, principalmente através dos alimentos e, em alguns casos, também através da água. A maioria dos minerais é absorvida no intestino delgado, principalmente no duodeno, mas existem algumas particularidades. Segundo alguns estudos, o Cu e o Se são absorvidos parcialmente no estômago (Filisetti e Lobo, 2007). Os eletrólitos (Na, K e Cl) são permutados entre o lúmen intestinal e os tecidos ao longo de todo intestino e a maior parte desta troca ocorre no cólon (Mahan & Escott-Stump, 2002; Filisetti e Lobo, 2007). Nos últimos anos, vários estudos, a maioria em roedores, vêm mostrando a relevância da absorção de outros minerais além dos eletrólitos, principalmente Ca e Mg, no cólon (Younes et al., 2001; Coudray et al., 2003; Filisetti e Lobo, 2007).

2.2.1. Fatores que interferem na biodisponibilidade de minerais

Conforme Filisetti e Lobo (2007) não há uma definição universalmente aceita sobre biodisponibilidade, porém a mais utilizada a define como “a quantidade de um nutriente, ou outra substância, que está disponível para sua absorção na forma em que ele é fisiologicamente aproveitável”.

A absorção é considerada a etapa mais crítica na determinação da biodisponibilidade dos elementos minerais e é influenciada por fatores intrínsecos e fatores extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados com as mudanças fisiológicas que ocorrem no organismo, como idade, sexo e gravidez e também com as condições de saúde/doença. As crianças, como os animais em crescimento de modo geral, absorvem uma maior quantidade de minerais em proporção ao seu peso corporal, em relação aos adultos (Mahan & Escott-Stump, 2002). Fatores extrínsecos estão relacionados diretamente com a dieta do indivíduo. Entre os fatores da dieta que podem influenciar mais positivamente na absorção dos minerais em geral pode-se citar os ácidos orgânicos (como o ascórbico e o cítrico), os açúcares (como a frutose e a lactose) e a fibra alimentar solúvel. Por outro lado, entre os fatores que podem influenciar mais negativamente estão os oxalatos, os taninos, os fitatos e a fibra alimentar insolúvel. Além disso, mudanças nas quantidades e proporções de carboidratos, proteínas e gorduras da dieta também podem interferir na absorção de minerais. Outro fator de grande importância na absorção de um mineral específico é a presença de outros elementos minerais com os quais pode competir por substâncias ligantes e/ou por sítios de absorção. Sabe-se, por exemplo, que um excesso de Ca pode diminuir a absorção de minerais essenciais como Mg e também de metais tóxicos como o Cd (Ruiz-Roso et al., 2001; Mahan & Escott-Stump, 2002; Filisetti e Lobo, 2007). Por outro lado, dietas pobres em cálcio aumentam a absorção de metais como o Cd (WHO, 1992; ATSDR, 2008).

2.2.2. Fibra alimentar e biodisponibilidade de minerais

A interferência da fibra alimentar sobre a absorção de minerais vem sendo estudada ao longo de várias décadas, em animais e em seres humanos, sendo que a maioria dos estudos se deu com minerais essenciais (Harland, 1989; Torre et al., 1991; Harland e Narula, 2001; Ruiz-Roso et al., 2001; Filisetti e Lobo, 2007). Embora também se encontre na literatura estudos sobre fibra e minerais tóxicos eles são bem mais raros.

Estudos *in vitro* têm demonstrado a afinidade de fibras ou de seus constituintes por minerais, sendo que, muitas vezes, estes estudos dão uma importante indicação do potencial de ligação da fibra (Torre et al., 2001; Filisetti e Lobo, 2007). No entanto, considerando a

dificuldade de reproduzir a complexa fisiologia animal, para a confirmação e/ou a complementação dos resultados dos estudos *in vitro* são necessários estudos *in vivo* em animais e/ou humanos.

A idéia mais geral é que a fibra pode reduzir a biodisponibilidade de diversos minerais, principalmente metais bivalentes, devido à redução da absorção intestinal dos mesmos. Foram propostos os seguintes mecanismos para a redução da absorção intestinal de minerais por ação da fibra: a) diminuição do tempo de trânsito intestinal, o que provocaria tanto uma diminuição da absorção dos minerais da dieta quanto daqueles de origem endógena resultantes das secreções normais e da descamação de membranas no meio gastrintestinal; b) diluição do conteúdo intestinal e aumento do volume fecal; c) retenção de íons nos poros da estrutura gelatinosa de alguns tipos de fibra; d) ligação entre constituintes da fibra e minerais; e) troca iônica (Ruiz-Roso et al., 2001). Cada tipo de fibra exerce sua influência sobre a absorção dos minerais por um ou diversos destes mecanismos e sabe-se que os diferentes minerais são afetados desigualmente (Torre et al., 1991; Ruiz-Roso et al., 2001; Filisetti e Lobo, 2007). O quadro 2 apresenta quais frações da fibra alimentar ou substâncias associadas a fibra têm sido associadas a cada tipo de mecanismo.

Mais recentemente, estudos em animais e em seres humanos têm demonstrado que algumas fibras podem aumentar a absorção de minerais. Grande parte destes estudos diz respeito a fibras solúveis, as quais podem ser total ou parcialmente fermentadas no intestino grosso, aumentando a absorção devido à acidificação do conteúdo luminal no intestino grosso. O amido resistente à digestão também é bastante fermentado no intestino grosso e pode melhorar o aproveitamento de minerais da dieta (Ruiz-Roso et al., 2001; Coudray et al., 2003). O aumento do conteúdo de fibra na dieta também pode aumentar a disponibilidade de minerais para o organismo humano quando o produto rico em fibra adicionado a dieta também é rico em elementos minerais (Ruiz-Roso et al., 2001; Coudray et al., 2003). Este é o caso dos grãos de cereais, nos quais as estruturas mais ricas em fibra, os tegumentos externos e o gérmen, são também as mais ricas em minerais (Hoseney, 1990; Callegaro e Tirapegui, 1996; Estados Unidos, 2009). Portanto, a adição de cereais integrais ou de seus farelos à dieta aumenta concomitantemente os níveis de fibra e de alguns minerais, os quais são, em parte, biodisponíveis (Shah et al., 1990; Lopez et al., 2000; Filisetti e Lobo, 2007). O quadro 2 apresenta exemplos de constituintes da fibra e de produtos ricos em fibra que têm sido associados com o aumento da absorção de minerais.

| Mecanismo | Fibras e seu efeito |
|---|--|
| 1. Diminuição da absorção | |
| Diminuição do tempo de trânsito intestinal, com conseqüente diminuição da absorção dos minerais da dieta e daqueles de origem endógena | Todas as fibras; Aceleração do trânsito intestinal e, conseqüentemente, diminuição do tempo de contato dos minerais com os respectivos sítios de absorção. |
| Diluição do conteúdo intestinal | Principalmente as fibras solúveis; Retardamento e possível diminuição da absorção. |
| Retenção de íons nos poros da estrutura gelatinosa de alguns tipos de fibra | Fibras solúveis como pectinas e algumas hemiceluloses. |
| Ligação química entre constituintes da fibra e metais | Fibras que possuem grupos ionizáveis; Algumas hemiceluloses e pectinas formam quelatos fortes através de seus grupos carboxílicos. |
| Troca iônica – liberação de próton H ⁺ e captação de metal | Ligninas. |
| Efeitos de substâncias associadas a fibra alimentar | Fitatos: presentes nas estruturas fibrosas de sementes em geral – possuem grupos fosfatos, os quais ligam íons metálicos; Oxalatos- formação de complexos fibra-metal-oxalato, mais difícil de romper do que os complexos oxalato-mineral ou fibra-mineral; Substâncias polifenólicas, como taninos. |
| 2. Aumento da absorção | |
| Fermentação de carboidratos indigeridos e conseqüente produção de ácidos orgânicos como lactato e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e acidificação do conteúdo luminal no intestino grosso | Fibras solúveis como as frutanas (inulinas) e beta-glucanas, oligossacarídeos indigeríveis como os galacto e frutooligossacarídeos; amido resistente a digestão; A acidificação do meio aumenta a solubilidade dos minerais tornando-os mais passíveis de absorção; Hipertrofia do ceco aumentando a superfície absorptiva e o fluxo sanguíneo na área; Troca iônica nos AGCC e conseqüente absorção de minerais junto com os mesmos. |
| Produtos concomitantemente ricos em fibra e em elementos minerais | Sementes em geral, principalmente cereais integrais e farelos de cereais. |

Fonte: TORRE et al., 1991; Ruiz-Roso et al., 2001; Coudray et al, 2003; Filisetti e Lobo, 2007.

Quadro 2 - Mecanismos propostos para influência da fibra ou de produtos ricos em fibra na absorção de minerais

A partir de um grande número de estudos presentes na literatura, infere-se que os efeitos reais da fibra sobre a biodisponibilidade dos minerais dependem de diversos fatores. Um dos principais fatores é a quantidade, sendo que uma determinada proporção de fibra é essencial para o bom funcionamento do intestino e de outras funções orgânicas, como já foi citado, mas o seu excesso pode acelerar demais o trânsito intestinal, prejudicando a absorção não somente dos minerais, mas de vários nutrientes (Ruiz-Roso et al., 2001; Filisetti e Lobo, 2007). Por outro lado, estudos têm demonstrado que associação de diferentes tipos de fibra pode resultar em efeitos importantes. Younes et al. (2001) observaram, em ratos, que a associação de inulina e amido resistente provocaram um maior aumento da absorção de Ca e Mg do que o uso de cada um deles isoladamente. Lopez et al. (2000), também em ratos, demonstraram que a associação de farelo de cereais com amido resistente aumentou a biodisponibilidade de minerais da dieta.

Entre as substâncias associadas à fibra, os fitatos têm sido os mais estudados. Tendo em vista que podem apresentar até 6 grupos negativamente carregados, estas substâncias têm grande afinidade pelos metais (Reddy et al., 1989). Os penta e hexafosfatos são considerados responsáveis por grande parte da afinidade da fibra de grãos de cereais e leguminosas por minerais e os fitatos com menor número de grupos fosfatos parecem ter pouca ou nenhuma ação. Tem-se observado que a ação da fitase, intrínseca do alimento ou adicionada, diminui a ligação fitato-minerais (Plaami, 1997).

A concentração concomitante dos diversos elementos minerais na dieta, além de ser importante pela competição entre os mesmos pelos sítios de absorção no trato gastrintestinal, também é importante em relação à interferência da fibra na biodisponibilidade dos minerais. Esta importância decorre do fato dos minerais competirem também pelos sítios de ligação da fibra (Ruiz-Roso et al., 2001; Filisetti e Lobo, 2007).

Outro aspecto de grande relevância quanto à influência da fibra na biodisponibilidade dos minerais é a adaptação. Este fato foi evidenciado inicialmente através de estudos em indivíduos vegetarianos, os quais, apesar de alto consumo de alimentos fibrosos não apresentaram, em grande parte dos estudos, sinais de deficiência de minerais. Posteriormente, foi observado, tanto em animais quanto humanos, que a diminuição da absorção de minerais subsequente à adição de fibras (ou mais fibras) à dieta, pode ser revertida com a manutenção desta fibra por um período mais prolongado de tempo (Cho et al., 2001; Filisetti e Lobo, 2007). Com relação ao farelo de trigo, possivelmente o produto mais utilizado como suplemento alimentar de fibra na alimentação humana, o grande número de estudos existentes na literatura apresenta também uma grande diversidade de resultados quanto ao seu efeito

sobre a biodisponibilidade de minerais (efeito negativo, nulo ou positivo). Numa revisão sobre o assunto, Cho et al. (2001) concluíram que, enquanto os estudos a curto prazo apresentam a maior diversidade de resultados, a maior parte dos estudos a longo prazo indica um efeito positivo do farelo de trigo sobre a biodisponibilidade de minerais.

É interessante observar que, apesar do grande número de estudos sobre “fibra alimentar e biodisponibilidade de minerais”, ainda há controvérsias em relação a produtos já amplamente estudados, como o farelo de trigo, e ainda mais sobre produtos mais complexos como as multimisturas. Sobre outros produtos como a linhaça o conhecimento nesta área é quase inexistente. Portanto, este é um tema de interesse relevante. O interesse em relação aos minerais essenciais é ampliar o conhecimento sobre quantidades e formas de uso que possam melhorar a sua biodisponibilidade. Por outro lado, em relação aos elementos minerais tóxicos, busca-se conhecer o quanto os produtos ricos em fibra podem ou não ajudar a diminuir sua biodisponibilidade em situações em que a sua presença na cadeia alimentar ainda não foi evitada.

2.3. Multimisturas

As multimisturas (MM) são suplementos alimentares compostos por alimentos e subprodutos da produção de alimentos normalmente subutilizados na alimentação humana, tais como farelos de cereais (trigo e arroz), pó de folhas escuras, pó de sementes e pó de casca de ovo, podendo incluir também constituintes como farinhas amiláceas, açúcar, entre outros. As MM vêm sendo sistematicamente usadas como suplementos alimentares, difundidos no Brasil através do trabalho da Pastoral da Criança (Conferência Nacional dos Bispos do Brasil - CNBB), como uma estratégia no combate à desnutrição (Callegaro et al., 2004; Kaminski et al., 2008). Uma das controvérsias quanto ao uso das MM é justamente pelo fato de seus constituintes majoritários serem normalmente os farelos de cereais, com alto teor de fibra e também de fitatos. Tendo em vista que as fibras dos cereais estão entre aquelas que mais ligam minerais (Harrington et al., 2001, Filisetti e Lobo, 2007), uma das preocupações quanto à eficácia das MM é justamente a sua influência sobre o balanço mineral (Amaya-Farfan, 1998; Bittencourt, 1998). A legislação brasileira atual em relação a MMs estabelece apenas parâmetros de controle de qualidade em relação a sua conservação, mas não em relação a sua composição em nutrientes (Brasil, 2005).

2.3.1. Multimisturas e minerais

Comparando-se as MMs com os alimentos em geral, observa-se uma alta concentração de diversos minerais nas mesmas (Madruga e Camara, 2000; Vizeu et al., 2005; Kaminski et al., 2006). No entanto, Vizeu et al. (2005) e Kaminski et al. (2006) chamam a atenção para o fato de que as MM avaliadas em seus estudos não podem ser consideradas suplementos de minerais pelo fato de que, nas quantidades normalmente utilizadas, exceto com relação ao manganês, não chegam a contribuir com a quantidade de minerais que as qualifique como tal. Barbosa et al. (2006) fizeram observações semelhantes, no entanto consideraram que algumas das MM de seu estudo poderiam ser consideradas suplementos de magnésio, além do manganês. É importante observar que as MMs avaliadas nestes estudos ou não continham casca de ovos ou continham em quantidades muito reduzidas. Possivelmente as MMs com quantidade significativa de casca de ovos possam ser qualificadas como fonte de cálcio pelo fato de apresentarem alta concentração deste mineral (Schaafsma e Beelen, 1999).

Quanto à biodisponibilidade de minerais das MMs, ainda são poucos os estudos na literatura, sendo que a maioria deles foi conduzido em ratos. Ratos subnutridos que passaram a receber suplementação de MM (composta de farelos, folhas verdes e casca-de-ovos) apresentaram maior ganho de peso e maior conteúdo de cálcio e fósforo ósseo do que o grupo controle que recebeu a mesma dieta sem esta suplementação (Siqueira et al., 2001; Souza et al., 2002). Santos et al. (2004) observaram, em ratos previamente desnutridos que receberam dieta suplementada com MM (composta de farelos, farinhas, sementes e casca-de-ovos), um aumento dos níveis sanguíneos de Ca e Mg mas não nos níveis de P, em relação aos animais que não receberam a suplementação. Ferreira et al. (2005) fornecendo uma MM (composta de farelos, folhas verdes e casca-de-ovos) para ratos com dieta deficiente em minerais (20% das recomendações apenas), observaram que a suplementação preveniu parcialmente o déficit de crescimento observado no grupo de ratos sem suplementação de MM. Estes resultados indicam que pelo menos parte do cálcio e do fósforo de uma MM rica em farelo e casca de ovos pode ser biodisponível. Apesar da grande diversidade das MMs utilizadas, cada um destes estudos avaliou apenas um tipo de formulação destes suplementos.

2.4. Cádmio

2.4.1. Identificação e ocorrência

O cádmio (Cd) é um elemento natural na face terrestre, na qual ocorre em concentrações entre 0,1 e 0,5 ppm e está normalmente associado com minas de zinco, chumbo e cobre. É encontrado normalmente combinado com outros elementos como oxigênio (óxido de cádmio),

cloro (cloreto de cádmio) ou enxofre (sulfato de cádmio, sulfato de cádmio). Todos os solos e rochas, incluindo carvão e fertilizantes minerais, contêm Cd em alguma quantidade (ATSDR, 2008). Na água marinha o Cd pode estar presente em concentrações que variam desde <0,5 até 100 ng/l, sendo que entre as maiores concentrações estão aquelas encontradas na costa litorânea. A concentração nas águas terrestres naturais é normalmente menor que 1 µg/l. A ação do homem tem provocado a elevação do Cd no ambiente, sendo que as principais fontes são a mineração e o refinamento de zinco, chumbo e cobre, a fabricação e aplicação de fertilizantes a base de fosfato, o uso de combustíveis fósseis e o descarte e incineração de resíduos de materiais que contêm Cd. O Cd originado das referidas fontes está presente no ar, no solo e na água (WHO, 1992; Satarug et al., 2003; ATSDR, 2008).

Quando presente no ar o Cd (como óxido, cloreto e sulfato) se encontra na forma de partículas ou de vapor, resultantes de processos que envolvem o uso de temperaturas elevadas; nestas formas o Cd pode ser transportado na atmosfera, em longas distâncias, até se depositar no solo e nas águas. O Cd presente no solo pode ter mobilidade, na dependência de alguns fatores, mas considera-se que a maior parte se liga fortemente a matéria orgânica ficando assim imóvel até a incorporação nas plantas em crescimento. Na água, o Cd existe como íon hidratado ou como complexo iônico com outras substâncias inorgânicas e orgânicas, sendo que as formas solúveis migram na água e as formas insolúveis se depositam e se ligam aos sedimentos (Satarug et al., 2003; ATSDR, 2008).

No Brasil, o Cd tem sido encontrado em níveis preocupantes em algumas regiões, como em águas pluviais no Estado de Minas Gerais (Ambiente Brasil Centro de Estudos, 2006). Em São Paulo, em região próxima a usina de reciclagem de chumbo foram encontrados níveis elevados na atmosfera, nas águas e no solo (Borges et al. 2004) e no Estado do Paraná foram encontrados níveis acima do permitido em peixes de água doce (Marengoni et al., 2008).

Do ar, do solo e da água o Cd é incorporado pelos reinos vegetal e animal, entrando na cadeia alimentar. O Cd do solo é incorporado pelas plantas em maiores proporções em relação a outros metais tóxicos como o chumbo e o mercúrio. Pelo fato das plantas tolerarem altos teores de Cd, elas podem se tornar fonte significativa desse metal para o reino animal, quando se desenvolvem em locais contaminados (Satarug et al., 2003). Algumas espécies vegetais se caracterizam por acumular mais Cd, entre elas o trigo do tipo “*durum*”, o girassol e a linhaça (Grant et al., 2008).

2.4.2. Formas de exposição

Os animais em geral são expostos ao Cd principalmente através da alimentação e da água, enquanto a maior exposição do homem se dá através da fumaça do cigarro. No entanto, entre humanos não-fumantes e não-ocupacionalmente expostos, a ingestão de alimentos contaminados com Cd é a maior fonte de exposição ao metal (Cardoso & Chasin, 2001).

Os animais aquáticos são fonte importante de exposição humana ao Cd, quando provenientes de áreas contaminadas (Satarug et al., 2003). Ainda que diversos tipos de alimentos possam apresentar contaminação por Cd, no Brasil, a legislação de contaminantes inorgânicos em alimentos estabelece limite máximo para Cd apenas em peixes e produtos da pesca (1,0 mg/kg, Portaria 685 de 27 de agosto de 1998, SVS-MS).

Na água, o Cd está principalmente na forma de íons livres; nos alimentos o Cd está presente geralmente na forma de complexo com uma variedade de substâncias incluindo proteínas como as metalotioneínas (Groten et al. 1990; ATSDR, 2008).

A forma do Cd e a via de exposição podem influenciar grandemente a absorção e a distribuição do Cd aos tecidos-alvo (WHO, 1992; ARSDR, 2008).

2.4.3. Absorção por via oral

A absorção gastrintestinal do Cd parece ser um processo saturável, tendo em vista que a absorção relativa (% do total ingerido) decresce com o aumento das concentrações; no entanto, quando as doses são altas a ponto de causar danos na mucosa gastrintestinal a absorção relativa aumenta (ATSDR, 2008). Por outro lado, Groten et al. (1991) observaram uma menor absorção do Cd ligado a metalotioneína em comparação com o cloreto de Cd, mas o conteúdo renal de Cd foi apenas levemente menor nos animais expostos ao Cd ligado a metalotioneína. De modo geral, a absorção do Cd dos alimentos parece ser semelhante para a forma iônica e para o Cd ligado a proteínas (ATSDR, 2008).

Para cada indivíduo, a absorção de determinada dose oral de Cd depende do estado fisiológico (idade, estado nutricional em relação ao ferro, cálcio e zinco, histórico obstétrico, entre outros) e também da presença e concentrações de constituintes da dieta como minerais, proteínas e fibras. Em humanos a absorção gastrintestinal pode chegar até 37% em crianças, enquanto nos adultos é, em média, 5% (Crews et al., 2000). Animais jovens também absorvem mais Cd do que os adultos (ATSDR, 2008). Foi observado em animais que, em deficiência de Ca e/ou Fe e/ou Zn, a absorção do Cd é maior. Embora a deficiência de Zn por si só pareça não aumentar a absorção, ela pode potencializar o efeito da deficiência de Fe e/ou Ca (Reeves e Chaney, 2008). Por outro lado, uma ingestão adequada ou aumentada de Ca e de

Fe protege contra a absorção de Cd (Brzóska e Moniuszko-Jakoniuk, 1998). Dietas deficientes em proteínas aumentam a absorção do Cd (Omori e Muto, 1977; WHO, 1992).

2.4.3.1. Fibra alimentar e absorção de Cd

Estudos *in vitro* têm demonstrado que as fibras alimentares podem ligar Cd (Persson et al, 1991; Ou et al., 1999; Borycka e Stachowiak, 2008). No entanto, estudos *in vivo* relativo ao efeito de fibras sobre a acumulação de Cd, realizados a maioria em roedores, têm mostrado resultados diversos na dependência do tipo de fibra alimentar utilizado. Kiyozumi et al. (1982) compararam o efeito de lignina, celulose e carboximetilcelulose (uma forma solúvel da celulose) em ratos, encontrando uma redução da retenção tecidual de Cd (renal e hepática, inclusive) pela lignina e carboximetilcelulose e nenhum efeito por parte da celulose. Rose e Quarterman (1987) observaram, também em ratos, que alginatos, pectinas, ágar e carragenas, que são fibras solúveis, aumentaram a retenção tecidual de Cd, em relação à dieta sem adição de fibra, enquanto a celulose provocou efeito oposto. Estudos, conduzidos em roedores, avaliando o efeito do grão integral de trigo ou do farelo de trigo sobre a absorção de baixas concentrações de Cd dietético mostraram um efeito de redução da absorção e/ou da retenção tecidual de Cd na presença dos mesmos, em comparação com dietas contendo somente o endosperma do trigo, que é uma fração pobre em fibras (Moberg et al., 1987; Wing, 1993; Chan et al., 2000). Lind et al. (1998) também encontraram uma menor retenção tecidual do Cd em camundongos, na presença de fibra na forma de farelo de trigo em comparação com as mesmas dietas contendo fibra de beterraba e de cenoura. Estes estudos usaram dietas nutricionalmente completas. Já o estudo que comparou acumulação de Cd em ratos em diferentes condições nutricionais em relação ao ferro demonstrou que o farelo de trigo reduz a acumulação de Cd, quando comparado ao endosperma de trigo, nos ratos com bom estado nutricional em relação ao ferro, mas não nos ratos com desnutrição em relação a este elemento (Wing et al., 1992).

2.4.4. Distribuição, metabolismo e excreção

O Cd absorvido é distribuído através do organismo animal atingindo as maiores concentrações no fígado e rins. Pelo que se sabe, o Cd não sofre qualquer conversão metabólica direta, sendo inerte a reações de óxido-redução, quando comparado a metais como ferro e cobre. A forma iônica (Cd^{2+}) se liga a grupos aniônicos, especialmente grupos

sulfidrílicos de proteínas, tais como metalotioneínas (MTs) e albumina, e também de outras moléculas como glutatona (ATSDR, 2008; Klaassen et al, 2009). O Cd permanece por longo tempo no organismo animal, sendo que a meia-vida do metal pode ser de até 26 anos no homem e de alguns meses até diversos anos em animais experimentais como camundongos e ratos (WHO, 1992; ATSDR, 2008).

No plasma, o Cd circula principalmente ligado às proteínas albumina e MTs. Embora, nos tecidos em geral, o Cd possa se ligar a outras proteínas ricas em grupos sulfidrílicos, são as MTs que exercem um papel-chave na cinética e toxicidade do Cd no organismo (ATSDR, 2008; Klaassen et al., 2009). As MTs são um grupo de proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína, que podem ligar metais (essenciais ou não) através de seus grupos sulfidrílicos. Embora tenham pouca influência sobre a absorção do Cd, as MTs têm importante papel sobre a retenção do metal nos tecidos. No fígado, o Cd induz a síntese de MTs formando o complexo Cd-MTs. Este complexo, além de manter parte do Cd acumulado no fígado, diminuindo a excreção biliar do metal, é também, em grande parte, liberado na circulação sanguínea sendo, então, excretado pela urina e também captado pelos tecidos, principalmente pelos rins (Klaassen, 1999). Nos rins, a MT é degradada nos lisossomos; o Cd livre é liberado e estimula a síntese *de novo* da MT mantendo o Cd na forma de complexo. Quando a concentração de Cd se eleva demasiadamente no rim, parte do metal permanece livre, causando danos ao órgão. Considera-se que o complexo Cd-MT seja responsável pela longa permanência do Cd no organismo. No entanto, considera-se que as MTs exercem uma função protetora em relação à toxicidade do Cd, tendo em vista que o Cd ligado a MT é bastante inerte, não apresentando os efeitos tóxicos da forma iônica livre do metal (ATSDR, 2008; Klaassen et al., 2009).

O Cd recentemente ingerido é excretado em grande parte pelas fezes, tendo em vista que uma fração pequena do Cd presente no trato gastrintestinal é absorvida. Após a absorção, quando o Cd está distribuído no organismo (principalmente no fígado e rins), as quantidades de Cd fecal e urinário são aproximadamente iguais. O Cd excretado pelas fezes após a absorção representa aquele secretado no meio gastrintestinal, originado do sangue via parede intestinal e do fígado via bile. A excreção urinária depende das concentrações do metal no sangue e nos rins. De acordo com resultados de diferentes estudos, a excreção urinária do metal absorvido é inicialmente menor do que a excreção fecal, igualando-se após um certo tempo (ATSDR, 2008). Conforme Klaassen et al. (1999) pelo menos uma parte do Cd excretado pela urina pode estar na forma do complexo Cd-MT.

2.4.5. Toxicidade

Os efeitos tóxicos do Cd no organismo animal se dão por exposição aguda ou crônica e atingem muitos órgãos e tecidos, como rins, fígado, pulmões, testículos, cérebro, ossos e sangue. Quando a exposição aguda acontece pela inalação de altos teores de vapores de Cd, o principal órgão afetado é o pulmão, sendo que os sintomas variam com a concentração dos vapores tóxicos e o tempo de exposição, desde uma leve irritação, passando por diversos tipos e graus de sintomas, podendo chegar à letalidade. A ingestão de alimentos ou água com alta concentração de Cd irrita gravemente o trato gastrointestinal, levando a vômitos e diarreia. Exposições prolongadas a quantidades menores de Cd através do ar, alimentos ou água ocasionam principalmente acúmulo de Cd renal e, conseqüentemente, disfunções neste órgão, além de outros danos, como doença pulmonar e fragilidade óssea (WHO, 1992; ATSDR, 2008). A fragilização óssea aumenta do risco de fraturas, especialmente em indivíduos com fatores de risco como dietas nutricionalmente inadequadas (Aoshima et al, 2003; ATSDR, 2008). Este problema foi denominado “doença de Itai-Itai” em mulheres japonesas expostas a altos teores de Cd através da ingestão de arroz e de água e foi reproduzido experimentalmente em animais expostos ao Cd (Wang et al., 1994; Whelton et al., 1997).

Embora tenha sido observado que o Cd ligado à metalotioneína também causa algum dano renal (ATSDR, 2008), os efeitos tóxicos do Cd no organismo são atribuídos quase invariavelmente à sua forma iônica livre (ATSDR, 2008; Klaassen et al., 2009). A base da toxicidade do Cd é sua influência negativa no sistema enzimático das células, por substituir outros metais, como Zn^{2+} e Cu^{2+} em metaloenzimas e sua forte afinidade por estruturas biológicas contendo grupos $-SH$ (Stohs e Bagchi, 1995). As enzimas sulfidrílicas, especialmente a ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALA-D), são sensíveis à inibição por Cd (Peixoto et al, 2004; Santos et al, 2005). Além disto, estudos têm demonstrado que o Cd aumenta a peroxidação lipídica em diversos tecidos (Chater et al., 2008, ATSDR, 2008).

O fígado tem sido bastante estudado em ensaios de intoxicação aguda e subcrônica com animais pelo fato de que, nos períodos iniciais de exposição, este órgão acumula grande quantidade de Cd (WHO, 1992; Groten et al., 1994; Lind et al., 1998; ATSDR, 2008; Borges, 2008). Diversos parâmetros são utilizados para avaliar o dano hepático induzido pelo Cd em animais de experimentação, entre eles o peso relativo do órgão (Hwang, 2001; Asagba e Obi, 2005), atividades de enzimas no tecido hepático (Jurczuk et al., 2004, Borges, 2008) e a atividade das enzimas transaminases no plasma (Santos et al., 2005; Haouem et al., 2007; Hispard et al, 2008).

Na intoxicação crônica o rim é o órgão mais afetado pelo Cd, sendo o que acumula as maiores concentrações do metal, podendo ser, inclusive, utilizado, em animais, para estimar a absorção intestinal (WHO, 1992; ATSDR, 2008). De acordo com grande número de estudos, quando a concentração de Cd no rim atinge entre 50 e 300 µg/g tecido, a quantidade de Cd livre (não ligado à MT) torna-se suficiente para lesar os túbulos renais ocasionando proteinúria, glicosúria, aminoacidúria e poliúria, em humanos e em diversas espécies de animais de laboratório (ATSDR, 2008). Em estágios mais iniciais da intoxicação, entre os parâmetros mais utilizados para avaliar danos renais em animais de experimentação estão as atividades de enzimas na urina (lactato desidrogenase, alcalino fosfatase, entre outras; ATSDR, 2008). Também são utilizadas medidas de atividades enzimáticas, inclusive da ALA-D (Nogueira et al., 2003; Peixoto et al., 2004; Santos et al., 2005) e medidas de dano oxidativo (Jurczuk et al., 2004; Santos et al., 2005; Chater et al., 2008), no tecido renal. Outros parâmetros bioquímicos também têm sido usados para avaliar o dano renal induzido pelo Cd, entre eles a creatinina plasmática (El-Demerdash et al, 2004, Santos et al., 2005).

3. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de um artigo e dois manuscritos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Material e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos e manuscritos. A apresentação do artigo está baseada na versão final aceita para publicação (**Artigo 1**) e os manuscritos encontram-se na versão preparada para submissão (**Manuscritos 1 e 2**).

Os itens, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES desta tese representam interpretações e comentários gerais sobre o artigo e os manuscritos científicos contidos neste trabalho. O item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS contém somente as citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO.

Os manuscritos e artigo serão apresentados, a seguir, na seguinte ordem:

3.1. Manuscrito 1. Effect of multimixtures with different dietary fiber levels on the absorption of minerals in rats

Artigo em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Revista Nutrition Research.

3.2. Artigo 1. Influence of cereal bran supplement on cadmium effects in growing rats

Artigo aceito para publicação na Revista Human and Experimental Toxicology.

3.3. Manuscrito 2. Effect of wheat bran and flaxseed on cadmium effects and retention in rats

Artigo em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Revista Human and Experimental Toxicology.

Manuscrito 1

Effect of multimixtures with different dietary fiber levels on the absorption of minerals in rats

M.G.K. Callegaro^{1,2,*}; T. Diettrich²; B.G. Milbradt²; E. Alves²; C.C. Denardin²; L.P. Silva³;
T. Emanuelli²

¹Graduate Program on Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences,
Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

²Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of
Alimentary Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa
Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

³ Department of Animal Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa
Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353.

E-mail address: mariadagrakac@gmail.com (Maria da Graça Kolinski Callegaro).

Running title: Multimixtures and mineral absorption

ABSTRACT : Multimixtures (MMs) are dietary supplements prepared with low-cost ingredients and food by-products that are widely used in Brazil and also in other countries to counteract malnutrition. The objective of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation with MM containing increasing levels of dietary fiber on the apparent absorption of Ca, P, Mg, Mn, and Cu in growing rats. Animals received basic diet (BD, representative of a nutritionally deficient population diet) alone or supplemented with low (MM1), intermediate (MM2), or high fiber level (MM3) MMs. Relative apparent Ca absorption was slightly decreased by MM3 addition, with no change in the absolute apparent absorption. The absolute apparent absorption of P and Mg was increased by MM2 and MM3 addition, while Mn absorption was increased only by MM3. Cu apparent absorption was not affected by MM supplementation. The increased apparent absorption of minerals was always related to the increase in the mineral dietary concentration triggered by MM. Thus we conclude that the dietary fiber level of MM affects the apparent absorption of minerals and that MM with intermediate and high fiber level may be a strategy to improve the nutritional value of poor diets.

Keywords: dietary fiber, calcium, phosphorus, magnesium, manganese, copper

1. Introduction

The access to an adequate diet is still far from being reached by most inhabitants in several countries, among which Brazil, and this is a challenge for society in general. In addition, to optimize the use of food by-products normally thrown away is also a challenge for society and researchers. Within this context, multimixture was created to counteract malnutrition. This is a dietary supplement prepared with low-cost ingredients and food by-products that include cereal bran, green leaves powder, various kinds of seeds, and eggshell powder, among others, according to the local availability (Madruga and Camara, 2000; Souza et al, 2002; Kaminski et al., 2006). The use of multimixture has been stimulated mainly by the Child Pastoral Organization (Pastoral da Criança - CNBB), a non-government organization that is active in various countries, including Brazil. Among other actions, Child Pastoral Organization stimulates dietary enrichment with this supplement, principally geared towards children (Madruga and Camara, 2000; Souza et al 2002; Siqueira et al, 2003). Besides stimulating a better employment of local low-cost food by-products, MMs present other advantages, such as the fact of being used as an additional element to the everyday diet.

Even though MMs contain a high concentration of proteins, B vitamins, and minerals, among other nutrients (Madruga and Camara, 2000; Souza et al., 2002), their use have been contested by nutrition professionals in Brazil. One of the controversies regarding the use of MMs is the scanty information concerning the bioavailability of their nutrients and MMs effect on the bioavailability of nutrients from other foods, especially minerals (Souza et al., 2002).

The main ingredients of MM are different kinds of cereal bran that may reach a concentration of 70% or more (Souza et al 2002; Siqueira et al, 2003). Cereal bran contains high levels of minerals, but it also contains a high amount of dietary fiber and phytates, which bind minerals, and may impair their absorption (O'Dell et al., 1972; Plaami, 1997; Souza et

al., 2002). Although some *in vitro* and *in vivo* studies showed that cereal bran can bind essential minerals (Idouraine et al, 1996; Harrington et al., 2001), other studies did not find adverse effects of cereal bran on mineral absorption and utilization (Sandberg et al., 1982; Shah et al., 1990). Other MM ingredients, which have a high concentration of minerals are green leaves, which have a high level of Mg and Fe (Madruga and Camara, 2000; Souza et al 2002).

MMs were found to contain a high concentration of several minerals (Madruga and Camara, 2000; Vizeu et al., 2005; Kaminski et al., 2006). However, some authors postulate that the contribution of MM for the dietary minerals would be insignificant due to the low amount of MM that is generally employed, with the possible exception of Mn and Mg (Barbosa et al., 2006; Vizeu et al., 2005; Kaminski et al., 2006). Although the studies regarding MMs and mineral bioavailability are scarce, some studies in rats revealed that MMs can provide some minerals. Undernourished rats fed with a MM supplemented diet had greater weight gain and higher femur calcium and phosphorus contents than did rats fed a diet without MM (Siqueira et al., 2001; Souza et al., 2002), which suggests that calcium and phosphorus from MM are at least partially bio-available. In addition, in rats previously fed with a low-protein diet and then submitted to a diet similar to that used in a nursery school, MM supplementation increased Ca and Mg, but not P blood levels (Santos et al., 2004). However, when used as supplement for a mineral deficient diet (20% of the recommended mineral amount) MM partially prevented the growing deficits in rats, suggesting that it could supply only part of the minerals requirements (Ferreira et al., 2005).

Although MM composition varies in the amount and type of ingredients according to the local availability, these previous studies on minerals bioavailability evaluated the effect of only one MM formulation. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect

of dietary supplementation with different formulations of MM containing increasing levels of dietary fiber on the apparent absorption of Ca, P, Mg, Mn, and Cu in growing rats.

2. Materials and methods

This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee from Federal University of Santa Maria (UFSM).

2.1. Basic diet and multimixtures

Basic diet (BD): The diet used in this study was based on an average of foods taken by children that consume MM in the city of Santa Maria (RS, Brazil). A questionnaire was applied to parents who gave information regarding their children's diet. Data from 200 children were used to formulate the basic diet that contained 20.9% bread, 16.4% rice, 13.2% beans, 10.4% milk, 8.2% beef, 6.4% cookie, 7.2% sugar, 1.4% bologna, 5.3% chicken, 2.9% chips, 2.1% margarine, 1.9% chocolate powder, 1.9% macaroni, 1.8% of other ingredients (apple, banana, egg, potato, lettuce, tomato, cabbage and coffee – individual amounts lower than 0.5%). Food ingredients were bought at local stores, prepared as for human consumption, dried at 55°C, ground and mixed to form the BD.

Multimixtures (MM): The MMs employed were prepared according to formulae used in the central part of the State of Rio Grande do Sul (Brazil). The formulae of MMs employed in this experiment were chosen among 20 samples used by Child Pastoral Organization in this area (Kaminski et al., 2006; Table 1). We evaluated the effects of 3 MM formulae with distinct levels of dietary fiber, since this is the dietary constituent, which has presented more controversial results regarding mineral absorption (Filisetti and Lobo, 2007). MMs were prepared with low, medium, and high dietary fiber level, respectively MM1, MM2, and MM3

(Table 1). The proportion of MM employed in the diets (5%) was also selected in accordance to the average proportion taken by children that consume MM in the city of Santa Maria (RS, Brazil). The MMs' ingredients were obtained at local stores or prepared according to the Child Pastoral Organization recommendations (2004).

2.2. Animals and experimental protocols

Weaning male Wistar rats (3 weeks-old weighing 53 ± 10 g) were randomly divided into the experimental groups ($n=7$) and individually housed in metabolic cages, under controlled conventional conditions ($21 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 h/12 h light-dark cycle) with free access to drinking water and experimental diets during acclimatization period (5 days) and experimental period (30 days). Experimental groups were fed BD (100% basic diet - control) or BD supplemented with three different MMs that had increasing levels of dietary fiber (DM1, DM2 and DM3) (95% BD + 5% MM) . Also, for reference purposes we included another group (AIN group) that received diet prepared according to the American Institute of Nutrition rodent diet (Reeves et al., 1993). All diets were prepared immediately before the experiment start and stored at 4°C until they were used. The feed intake was recorded daily and the body weight of animals was obtained every three days; these data were used to determine the feed intake, the body weight gain, and the feed efficiency ratio. Feces were quantitatively and separately collected for each animal along two distinct periods (from the 1st to the 7th and from the 22nd to the 29th experimental day) in order to evaluate whether there was any change on the mineral absorption because of adaptability to diet. At the end of each collecting period, feces were weighed before and after being dried, ground, and stored for mineral determination. At the end of experiment, the animals were weighed, anesthetized and killed by cardiac puncture.

2.3. Analytical procedures

Diets and MM were analyzed as described by AOAC (1995) for moisture (method 925.10), ash (method 923.03), fat (method 945.39), and crude protein (method 960.52, N x 6.25, microkjeldahl method). Total and insoluble dietary fiber contents were determined by enzymic-gravimetric methods n°. 985.29 and n°. 991.42 (AOAC, 1995), and soluble dietary fiber content was calculated by difference. All the enzymes used in chemical analysis, Termamyl 120L[®] (amylase), AMG 200[®] (amylglycosidase) and Alcalase 2.4L[®] (protease), were provided by Novozymes Latin America Ltd. Available carbohydrates (Nitrogen-free extract, NFE fraction) were calculated by difference, as follows: [NFE fraction % = 100 – (moisture% + crude ash% + crude fat% + crude protein% + dietary fiber%)]. The energetic value was calculated using the factor 9.0 kcal/g for lipids and 4.0 kcal/g for protein and NFE fraction.

For determining essential minerals, MMs, diet, and feces samples were wet-digested with nitric and perchloric acids (5:1, v/v). Ca, Mg, Mn and Cu concentrations were measured at 422.7, 202.6, 279.5, and 324.8 nm, respectively, using a flame Atomic Absorption Spectrophotometer model AA12/1475, Varian (Australia). P concentrations were measured spectrophotometrically after reaction with ammonium-molybdate and ammonium-metavanadate (Quinlan and DeSesa, 1955).

2.4. Calculations and statistical analysis

Feed intake, body weight gain, and feed efficiency ratio were calculated throughout the whole experimental period. The minerals parameters (ingestion, feces excretion and apparent absorption) were obtained from their content in the diets and in the feces and were determined for each period of feces collection. The mineral absorption was calculated using the following equations:

$$\text{Absolute apparent absorption (net abs; mg/day)} = \text{intake} - \text{fecal excretion}$$

$$\text{Relative apparent absorption (\%)} = (\text{intake} - \text{fecal excretion}) / \text{intake} \times 100$$

Results are presented as the mean \pm standard error of the mean. The paired Student's *t*-test ($P < 0.05$) was used to determine differences in apparent mineral absorption between the two periods of feces collection in each diet group. Differences among the test-groups (BD and BD+MMs groups) were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) and post-hoc analysis was carried out using Duncan's test ($P < 0.05$). The AIN group was presented only as a reference and was not included in this statistical analysis, since in most measures the AIN group presented results greatly different from the other groups. This was done because the inclusion of these results would make it difficult to detect differences among the experimental groups. The software used for the analysis was Statistica 6.0 for Windows.

3. Results

3.1. Composition of diets

The composition of multimixtures and diets is summarized in Table 2. The MMs, which were chosen based on their dietary fiber concentration, also presented different levels of other constituents. The MM with lower dietary fiber level (MM1) presented the highest level of digestible carbohydrates (NFE) and Ca and the lowest levels of ash (total minerals) crude fat, crude protein, P, Mg, Mn, and Cu. The MM with intermediate dietary fiber level (MM2) presented also intermediate crude fat, ash and minerals, but the lowest level of Ca and the highest level of crude protein. The MM with higher dietary fiber level (MM3) presented the highest levels of ash, crude fat, P, Mg, Mn and Cu and the lowest level of digestible carbohydrates. The MM3 also presented a higher proportion of soluble dietary fiber (SDF, 27%) in relation to the other MMs (about 12%).

Concerning the diets composition, MM addition to the BD changed the levels of some constituents, but this alteration was minor because just a small amount of MM was added

(5%). Experimental diets were isocaloric and presented similar levels of most constituents. Comparing with rat's recommendations (AIN diet), it was observed that the experimental diets presented higher crude ash, crude fat and soluble dietary fiber, but lower crude protein and NFE levels, while the total dietary fiber levels were similar..

3.2. Feed intake, body weight gain, and feed efficiency ratio

The growing parameters are presented in Figure 1. The MMs with different fiber levels caused distinct effects on the biological parameters evaluated. While supplementation with the intermediate-fiber level MM (DM2 group) increased animals' feed intake, body weight gain, and feed efficiency ratio in comparison to the BD group, the other MMs (low and high fiber level) had no such effect.

3.3. Apparent mineral absorption

Tables 3-7 present data for calcium, phosphorus, magnesium, manganese and copper ingestion, excretion, and absorption, besides mineral dietary concentration. It has to be pointed out that all the groups presented ingestion, fecal excretion and absolute apparent absorption (mg/day) higher for all minerals in the second period of feces collection as compared to the first one. However, when absorption was calculated as relative absorption (%), no differences were observed within each group between the first and the second periods ($p>0.05$).

Concerning calcium, the experimental diets presented a very low concentration (around 25%) as compared to the standard diet (AIN, Table 2). , All experimental groups presented similar Ca ingestion and apparent net absorption, but the fecal excretion was higher in the groups fed MMs with intermediate and higher fiber level (DM2 and DM3) as compared to the BD and DM1 groups (Table 3). The relative absorption was very high (above 90%) in all experimental groups and all of them presented similar relative Ca absorption in the first

period of feces collection, but in the second period the group fed the MM with the higher fiber level (DM3) had lower relative apparent absorption than the BD and DM1 groups.

Regarding phosphorus, experimental diets presented P concentration similar or higher than the diet recommended for rats (AIN diet, Table 2). P concentration was higher in the diets with MMs containing the intermediate and higher fiber level (DM2 and DM3) as compared to the BD and DM1 ones. As a result, both in the first and in the second feces collection period, the rats fed DM2 and DM3 had higher P ingestion and net absorption despite presenting a higher fecal excretion (Table 4). When apparent P absorption was calculated as relative absorption (%), all experimental groups had similar values.

Concerning Mg, it was observed that all experimental diets had higher dietary concentration than the rat's recommendations (AIN diet, Table 2). Data relative to Mg absorption are in Table 5. It was observed that, diets containing MMs with the intermediate and higher fiber level had higher Mg content than the BD and DM1 ones. Because of higher Mg dietary concentration, both in the first and in the second feces collection period, rats fed with DM2 and DM3 diets presented higher Mg ingestion and absolute absorption (mg/day) than the BD and DM1 groups, even though they also presented higher fecal excretion.

Mn concentration in the BD diet was remarkably lower than the recommendations for rats (AIN diet, Table 2). Although dietary concentration of Mn increased linearly with the increase in the fiber level of MM added to the diet, this increase was insufficient to attain the dietary recommendation for rats. It was observed that, both in the first and in the second feces collection period, rats fed diet with MM containing the higher fiber level (DM3) had higher Mn ingestion and absolute absorption even though presenting a higher fecal excretion than the other experimental groups, especially the BD and DM1 groups (Table 6). However, the DM2 group, although presenting higher Mn ingestion, showed a similar absolute absorption in

relation to the BD and DM1 groups, which was related to the lower relative absorption (Table 6).

The Cu concentration in the BD was only half of that recommended for rats (AIN diet, Table 2), and the MM supplementation did not change the Cu dietary concentration. Although some differences were observed among experimental groups regarding ingestion and fecal excretion, concerning Cu absolute and relative absorption there were no statistical differences in both observation periods (Table 7).

4. Discussion

The problems of dietary malnutrition are usually addressed through supplementation, food fortification or dietary diversification. The use of MMs may be an important strategy to improve nutritional value of diets, since the major MM ingredients contain high concentration of nutrients at a low cost (Madruga and Camara, 2000, Souza et al., 2002). Nevertheless, since the MMs composition and also the diets employed by possible consumers of MMs can greatly vary, there is still a great deal of studies to be developed in order to verify the efficiency of these supplements.

Diets composition and animal's growing

We studied three MMs with increasing levels of dietary fiber as supplement to a diet representative of the foods taken by children that consume MMs. Although the BD used in our experiment had a good balance of energetic nutrients considering human recommendations (lipids, protein and carbohydrates gave about 24, 20 and 56% of dietary caloric value, respectively), more than 50% of the BD was composed of foods with low nutritional value (refined cereals and sugars). Studies suggest that the increase of consumption

of refined products is associated with the marginal deficiency of vitamins (Batifoulrier et al., 2006). Moreover, the BD diet was poor in protein (79%), calcium (25%), Mn (55%) and Cu (50%) when compared to the recommendation for rats (AIN, Reeves et al., 1993).

Even though the addition of 5% MMs caused few changes in the composition of diets, diet with the intermediate dietary fiber level MM (DM2) increased feed intake, body weight gain, and feed efficiency ratio of the animals when compared to the BD group. These findings could be explained by some ingredients like oat flakes and wheat germ, that were found in MM2 but not in the other two MMs, which had no effect on the growing parameters of rats. Considering that the addition of MM2 to the BD caused minor changes in the analyzed constituents, we propose that this MM improved the dietary concentration of other nutrients, probably B vitamins. It is known that the concentration of most B vitamins in wheat germ is similar to that of bran cereal, but wheat germ has a higher concentration of thiamin and folate (USDA, 2009). Thiamin is essential for carbohydrates metabolism and also plays a role in growth (Mahan & Escott-Stump, 2002). The fact that refined carbohydrates were not added, and B vitamins levels were increased a little may have caused the differences of the MM2 results in relation to those obtained in the DM1 and DM3 groups. Some studies employing MMs as supplements did not find any positive nutritional results (Boaventura et al., 2000; Madruga et al., 2004; Santos et al., 2004). However, these studies evaluated the effect of MM on rats fed a good nutritional quality diet. In contrast, other studies that used a very poor nutritional value diet found a positive result after MM addition (Souza et al., 2002, Ferreira et al., 2005). Our results are relevant because they reveal that some kinds of MMs may have a beneficial effect even on populations that have a slightly deficient diet, like those that consume the BD.

Mineral absorption

The major MM ingredient, cereal bran, has high minerals concentrations, but has also high dietary fiber and phytates concentrations, which can interfere in mineral bioavailability. For this reason, the bioavailability of MM minerals and MM effects on minerals of other foods is still a controversial aspect. In our study, we evaluated the influence of MMs with different dietary fiber level on the apparent absorption of dietary Ca, P, Mg, Mn, and Cu. These minerals can be divided into two groups, according to the results obtained: those present in MMs at levels that did not cause alterations in their concentration on the experimental diets (Ca and Cu) and those present in MMs so that there was a significant increase of their concentration in diets (P, Mg, and Mn). The evaluation was performed during two distinct periods of experimental period, in order to determine whether there was any change in the mineral absorption because of adaptability to the diet. No differences were observed in the relative apparent absorption (%) between the first and the second periods for any of the minerals or any of the MM treatments. It is known that the intestinal absorption of some minerals, as calcium, decrease with age (Coudray et al., 2006), but this did not occur in our study, probably because the interval between the two periods of feces collection was small. However, the absolute data, that is, ingestion, fecal excretion and absolute apparent absorption, were higher in the second period of feces collection than in the first one. This fact occurred because the animals grew along the experiment and, as a consequence, increased their food ingestion.

Concerning Ca and Cu data, whose dietary concentration was not altered by MMs addition, it was observed that, despite of some minor numerical differences related to ingestion and excretion, the relative and absolute apparent absorption were, in general, similar among the different groups. The relative apparent Ca absorption (%) in the experimental groups was almost twice that observed in the AIN group. This probably occurred because of the low Ca concentration in the experimental diets, which is known to increase the relative

absorption (Broner & Pansu, 1999; Walter et al., 2000). Even though the relative Ca absorption was very similar among all experimental groups, it is important to point out that it was reduced by the MM with the higher dietary fiber level in the second period of feces collection. We propose that this decrease may have occurred because of the higher cereal bran level of MM3, since cereal bran has been shown to bind Ca (Idouraine et al, 1996; Harrington et al., 2001). Thus, our results indicate that in the high dietary fiber level MMs (bran-rich) part of the Ca is not bioavailable. This finding emphasizes the importance of adding a rich-Ca source, like egg-shell powder, to bran-rich MMs. This practice is already used in some MM formulae. In addition, this finding is in agreement with the recommendation that diets with bran addition (high fiber level) should also have a high level of Ca (Zittermann et al., 1999; Chen et al., 2004). However, it is important to point out that the absolute apparent Ca absorption was not reduced by feeding diets with the high fiber level MM, as compared to the basic diet. Thus, DM3 diet did not impair net Ca absorption in these conditions.

In contrast to that observed for Ca, the apparent absorption of Cu was not changed by any MM containing diet. This finding is related to the low Cu concentration found in MM containing diets, which was similar to that found in the BD. Besides, this result suggests that MM constituents did not decrease the bioavailability of Cu from other dietary sources.

On the contrary to what happened to Ca, the dietary P levels of the experimental diets were similar to or higher than those recommended for rats (AIN group). The increase of P concentration in the diets containing MMs with intermediate and higher fiber level was due to phytate, since about 80% of cereal bran phosphorus is phytate-phosphorus (Reddy et al., 1989). Our results indicate that this phytate-phosphorus is bioavailable for rats (higher absolute apparent P absorption), which is in agreement with previous data on the absorption of P from cereal bran (Shah et al., 1990; Lopez et al., 2000; Souza et al., 2002) and data indicating that rats have phytase activity in the small intestine (Rao & Ramakrishnan, 1986;

Iqbal et al., 1994). Although our results indicate that bran-rich MMs may be a source of P for rats, these data cannot be directly transposed to humans since phytase intestinal activity is very limited in humans (Iqbal et al., 1994).

Experimental diets presented higher Mg concentration than recommendations for rats (AIN diet). The absolute Mg absorption of rats fed diets containing MMs with intermediate and higher fiber level was higher than that of the ones fed the BD. Shah et al. (1990) and Toba et al. (1999) also observed an increase of net absorption when Mg dietary levels were increased. Studies in rats (Lopez et al., 2000) and in humans (Reinhold et al., 1976; Sandberg et al., 1982) have shown that Mg of whole cereals (or cereal bran), despite having less bioavailability than other sources, contributes to the increase of total Mg absorption. Barbosa et al (2006) pointed out that some MMs present high Mg concentration and our data give evidence that rich-bran MMs may be an important source of Mg.

Concerning manganese, it is important to point out that the amount of this element in the experimental diets increased linearly with the increase in the amount of dietary fiber. In fact, this was expected since dietary fiber from the tested MMs came from cereal bran, which is known to have high Mn concentration (O'Dell et al., 1972). However, only the diets containing MMs with intermediate and higher fiber levels increased the absolute apparent Mn absorption. Our results indicate that bran-rich MM may be a Mn source, which confirms a previous suggestion of other studies that evaluated the composition of various MMs (Vizeu et al., 2005; Kaminski et al., 2006).

As found in other studies (Siqueira et al., 2001; Souza et al, 2002; Ferreira et al., 2005), our results indicate that some MMs may be a source of minerals, since they increased the dietary levels and the absolute apparent absorption of P, Mg, and Mn, without changes in the apparent absorption of Ca and Cu. In addition, we demonstrated for the first time that the

increase of mineral dietary concentration and absorption was directly related to the fiber levels of MMs. Although part of the Ca from the high-fiber level MMs (bran-rich) may not be available for absorption (lower relative absorption of DM3), this kind of MM did not reduced the net Ca. However, caution should be taken when transposing these experimental data to humans, because of some biological differences between humans and rats, like the mineral requirements and the phytase intestinal activity. Nevertheless, our results are important because they reveal that the dietary fiber level of MMs affects the apparent absorption of minerals and suggest that these low-cost supplements, especially those with high fiber level may be a strategy to improve the nutritional value of poor diets. However, since constituents other than dietary fiber may also vary in the different MM formulae used, further studies are required to elucidate the influence of these changes in the nutritional efficiency of MMs.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflicts of interest.

Acknowledgements

Authors acknowledge fellowships and financial support from CNPq (503104/2003-5). T. Emanuelli is the recipient of CNPq research Fellowship (proc. 306432/2007-2), B.G. Milbradt and E. Alves were the recipients of CNPq scientific initiation fellowships.

References

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analysis Chemists, 16. ed. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, 1995.

- Barbosa CO, Lopes IBM, Morgano MA, Araújo MAM, Moreira-Araújo, RSR. Conteúdo de minerais de ingredientes e da multimistura. *Ciencia Tecnol Alime* 2006; 26: 916-20.
- Batifoulier F, Verny MA, Chanliaud E, Rémésy C, Demigné C. Variability of B vitamin concentrations in wheat grain, milling fractions and Bread products. *Eur J Agron* 2006; 25; 163-9.
- Boaventura GT, Lima e Silva RH, Tostes LF, Azeredo, VB. Weight gain, hemoglobin and hematocrit of rats receiving the Quissamã's diet with or without an alternative food supplement. *Rev Nutr* 2003; 16: 321-31.
- Broner F, Pansu D. Nutritional aspects of calcium absorption. *Br J Nutr* 1999, 129: 9-12.
- Claye SS, Idouraine A, Weber CW. *In-vitro* mineral binding capacity of five fiber sources and their insoluble components for magnesium and calcium. *Food Chem* 1998; 61:333-8.
- Chen Z, Stini WA, Marshall JR, Martínez ME, Guillén-Rodríguez JM, Roe D, Alberts DS. Wheat bran fiber supplementation and bone loss among older people. *Nutrition* 2004; 20: 747-51.
- Coudray C, Coudray CF, Rambeau M, Tressol EG, Mazur A, Rayssinguier Y. The effect of aging on intestinal absorption and status of calcium, magnesium, zinc, and copper in rats: A stable isotope study. *J Trace Elem Med Bio* 2006; 20: 73-81.
- Ferreira HS, Assunção ML, França AOS, Cardoso EPC, Moura FA. The effectiveness of the “multimixture” as supplement to mineral and/or vitamin deficient diets, promoting weight gain in rats submitted to post-natal under-nourishment. *Rev Nutr* 2005; 18: 63-64.
- Filisetti TMCC, Lobo AR. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais, cap. 7, p. 175-215. In: Cozzolino, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. Barueri: Manole, 2007.
- Harrington ME, Flynn A, Cashman KD. Effects of dietary fibers extracts on calcium absorption in the rat. *Food Chem* 2001; 73:263-9.
- Iqbal TH, Lewis KO, Cooper BT. Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut* 1994; 35: 1233-6.
- Idouraine A, Khan MJ, Weber CW. *In-vitro* binding capacity of wheat bran, rice bran, and oat fiber for Ca, Mg, Cu, and Zn alone and in different combinations. *J Agric Food Chem* 1996; 44:2067-72.

- Kaminski TA, Silva LP, Bagetti M. Composição centesimal e mineral de diferentes formulações de multimisturas provenientes da região central do Rio Grande do Sul. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 2006; 65:186-93.
- Kaminski TA, Silva LP, Bagetti M, Monego MA, Moura GB. Diferentes formulações de multimisturas sobre a resposta biológica em ratos. *Cienc Rural* 2008; 38:2327-33.
- Lopez HW, Coudray C, Bellanger J, Levrat-Verny M, Demigne C, Rayssinguer Y, Remesy C. Resistant starch improves mineral assimilation in rats adapted to a wheat bran diet. *Nutr Res* 2000; 20:141-55.
- Madruga MS, Camara FS. The chemical composition of “multimistura” as a food supplement. *Food Chem* 2000; 68:41-4.
- Madruga MS, Santos HB, Bion FM, Antunes NLM. Nutritional evaluation of a diet supplement with “multimistura”: study with rats. *Ciencia Tecnol Alime* 2004; 24: 129-33.
- Mahan, LK, Escott-Stump, S. Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia. São Paulo: Roca, 2002.
- O’Dell, BL, Boland, AR, Koirtiyohann, SR. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J Agr Food Chem* 1972; 20: 718-21.
- PASTORAL DA CRIANÇA. Cuidados na preparação de multimisturas. Internet: <http://www.pastoraldacrianca.org.br>. (accessed August 12 2009).
- Plaami S. Myoinositol phosphates: analysis, content in foods and effects in nutrition. *Technology* 1997; 30: 633–47.
- Quinlan KP, De Sesa MA. Spectrophotometric determination of phosphorus as molybdovanadophosphoric acid. *Anal Chem* 1955; 27: 1626-9
- Rao RK, Ramakrishnan CV. Inositol phosphatase in developing rat duodenum, jejunum and ileum. *Biol Neonate* 1986; 50: 165–70.
- Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytates in cereals and legumes. Florida: Boca Raton, 1989.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-51.

- Reinhold JG, Faradji B, Abadi P, Ismail-Beigi F. Decreased absorption of calcium, magnesium, zinc and phosphorus by humans due to increased fiber and phosphorus consumption as wheat bread. *J Nutr* 1976; 106: 493-503.
- Sandberg AS, Hasselblad C, Hasselblad K. The effect of wheat bran on the absorption of minerals in the small intestine. *Br J Nutr* 1982; 48:185-91.
- Santos HB, Madruga MS, Bion FM, Antunes NLM, Mendes K, Àguida R. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. *Ciencia Tecnol Alime* 2004; 24: 613-8.
- Schaafsma A, Beelen GM. Eggshell powder, a comparable or better source of calcium than purified calcium carbonate: piglet studies. *J Sc Food Agric* 1999; 79: 1596-600.
- Shah BG, Malcolm S, Belonje B, Trick K, Brassard R, Mongeau R. Effect of dietary cereal brans on the metabolism of calcium, phosphorous and magnesium in a long term rat study. *Nutr Res* 1990; 10: 1015-28.
- Siqueira EMA, Arruda SF, Sousa LM, Souza EMT. Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats. *Arch Latinoam Nutr* 2001; 51: 250-7.
- Siqueira EMA, Azevedo IT, Arruda SF, Lima SMD, Gonçalves CA, Souza EMT. Regional low-cost diet supplement improves the nutritional status of school children in a semi-arid region of Brazil. *Nutr Res* 2003; 23: 703-12.
- Souza EMT, Sousa LM, Arruda SF, Siqueira EMA. Protein improves the bioavailability of calcium and phosphorus from an alternative dietary supplement in rats. *Nutr Res* 2002; 22: 945-55.
- Toba Y, Masuyama R, Kato K, Takada Y, Aoe S, Suzuki K. Effects of dietary magnesium level on calcium absorption in growing male rats. *Nutr Res* 1999; 19: 783-93.
- United States Department of Agriculture, USDA. Agricultural Research Service. USDA Nutrient databases for standard reference, Release 22. Nutrient data laboratory. 2009. Internet: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp> (accessed August 12 2009).
- Vizeu VE, Feijó MBS, Campos RC. Determinação da composição mineral de diferentes formulações de multimisturas. *Ciencia Tecnol Alime* 2005; 2: 254-8.

Walter A, Rimbach G, Mos E, Pallauf J. Effect of calcium supplements to a maize-soya diet on the bioavailability of minerals and trace elements and the accumulation of heavy metals in growing rats. *J Vet Med A*, 2000; 47: 367-77.

Zittermann A, Scheld K, Danz A, Stehle P. Wheat bran supplementation does not affect biochemical markers of bone turnover in young adult women with recommended calcium intake. *Br J Nutr* 1999; 82: 431-35.

Table 1 Ingredients of the different multimixtures evaluated

| Ingredients | MM1 | MM2 | MM3 |
|----------------------------|------|------|------|
| Wheat bran | 17.6 | 26.3 | 37.5 |
| Rice bran | 7.7 | 13.2 | 22.5 |
| Oat flakes | --- | 13.2 | --- |
| Wheat flour | 28.7 | --- | --- |
| Corn flour | 30.5 | 26.3 | 14.0 |
| Cassava meal | 12.1 | --- | 15.4 |
| Wheat germ | --- | 13.2 | --- |
| Soybean fiber | --- | 6.5 | --- |
| Sesame seed powder | --- | 1.3 | --- |
| Seeds powder ¹ | 1.7 | --- | 5.1 |
| Leaves powder ² | 1.7 | --- | 5.5 |

MM1, MM2, MM3: Multimixture 1, 2, 3.

¹pumpkin and watermelon seeds; ²cassava and sweet potato green leaves powder.

Table 2 Composition of multimixtures and experimental diets (wet weight basis)

| | Multimixtures | | | Experimental diets | | | | AIN |
|---------------------------|---------------|-------|--------|--------------------|-------|-------|-------|--------------|
| | MM1 | MM2 | MM3 | BD | DM1 | DM2 | DM3 | Diet |
| Energy (kcal%) | 322.5 | 313.5 | 280.9 | 378.9 | 377.3 | 379.1 | 378.5 | 377.1 |
| Moisture | 9.3 | 5.7 | 3.8 | 11.5 | 11.5 | 11.0 | 10.9 | 7.1 |
| Crude ash (%) | 2.3 | 3.9 | 5.6 | 3.6 | 3.5 | 3.6 | 3.7 | 2.8 |
| Crude fat (%) | 2.9 | 6.3 | 9.3 | 11.7 | 11.3 | 11.5 | 11.7 | 7.1 |
| Crude protein (%) | 9.6 | 18.0 | 12.2 | 13.8 | 13.1 | 14.1 | 13.9 | 17.4 |
| Dietary fiber | | | | | | | | |
| TDF (%) | 11.4 | 19.9 | 32.0 | 4.8 | 4.8 | 5.0 | 5.4 | 4.9 |
| IDF (%) | 10.2 | 17.1 | 23.5 | 4.0 | 4.0 | 4.1 | 4.3 | 4.8 |
| SDF (%) | 1.2 | 2.8 | 8.5 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 1.1 | 0.1 |
| Nitrogen-free extract (%) | 64.5 | 46.2 | 37.1 | 54.6 | 55.8 | 54.8 | 54.4 | 60.7 |
| Ca (mg%) | 435.2 | 175.0 | 230.0 | 129.2 | 145.3 | 131.8 | 133.5 | 512.6 |
| P (mg%) | 217.0 | 849.8 | 1162.2 | 317.0 | 312.4 | 346.2 | 359.4 | 315.3 |
| Mg (mg%) | 120.3 | 332.0 | 660.1 | 86.9 | 88.9 | 98.6 | 115.0 | 47.0 |
| Mn (mg%) | 4.05 | 7.98 | 14.10 | 1.04 | 1.21 | 1.39 | 1.68 | 1.89 |
| Cu (mg%) | 0.19 | 0.52 | 0.73 | 0.30 | 0.29 | 0.31 | 0.32 | 0.60 |

MM1, MM2, MM3: Multimixture 1, 2, 3; BD= basic diet; DM1= 95% basic diet + 5% MM1; DM2= 95% basic diet + 5% MM2; DM3= 95% basic diet + 5% MM3; AIN= diet elaborated based on American Institute of Nutrition recommendations for experimental growing rats (Reeves et al., 1993); TDF= total dietary fiber ; IDF= insoluble dietary fiber ; SDF= soluble dietary fiber.

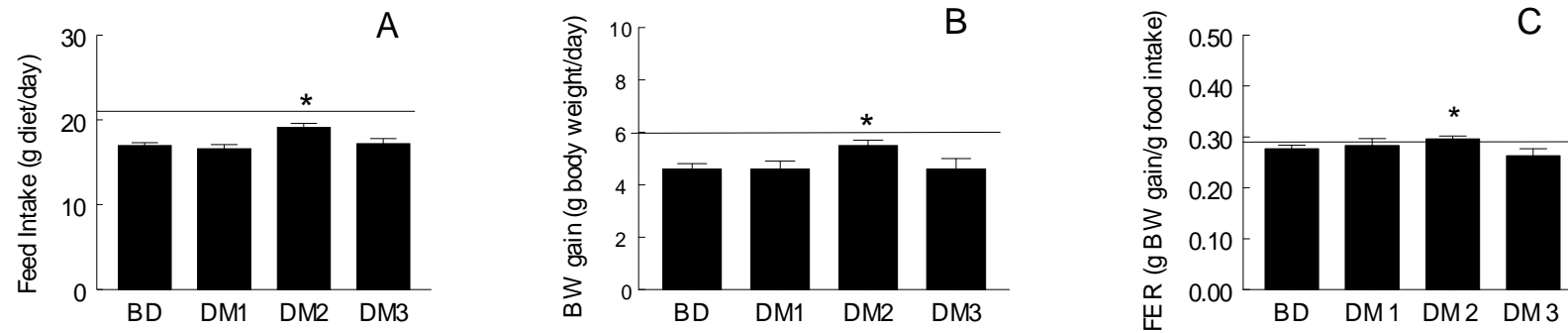


Fig. 1 Feed intake (A), body weight gain (B), and feed efficiency ratio (C) of growing rats fed diets without or with multimixtures. BD= basic diet; DM1= 95% basic diet + 5% MM1; DM2= 95% basic diet + 5% MM2; DM3= 95% basic diet + 5% MM3; BW= body weight; FER= feed efficiency ratio. Results are mean values \pm standard error of the mean (n=7). * Different from the BD group ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by Duncan's test). Horizontal lines represent values of animals fed AIN diet.

Table 3 Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of calcium in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods

| Parameters | BD | DM1 | DM2 | DM3 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| Dietary concentration (mg %) | 129.2 ± 1.1 a | 145.3 ± 5.5 a | 131.8 ± 8.8a | 133.5 ± 4.7a |
| Ingestion (mg/day) | | | | |
| 1 st period | 17.7 ± 0.4 a | 19.2 ± 0.4 a | 18.7 ± 0.5 a | 19.1 ± 0.8a |
| 2 nd period | 21.7 ± 0.5 a | 23.9 ± 1.5 a | 25.5 ± 1.1 a | 22.8 ± 1.3 a |
| Fecal excretion (mg/day) | | | | |
| 1 st period | 1.3 ± 0.1 a | 1.3 ± 0.1 a | 1.4 ± 0.1 a | 1.4 ± 0.1a |
| 2 nd period | 1.6 ± 0.1 b | 1.6 ± 0.1 b | 2.0 ± 0.1 a | 2.1 ± 0.2 a |
| Absolute apparent absorption (mg/day) | | | | |
| 1 st period | 16.4 ± 0.4 a | 17.8 ± 0.4 a | 17.3 ± 0.5 a | 17.9 ± 1.1a |
| 2 nd period | 20.1 ± 0.4 a | 22.4 ± 1.3 a | 23.5 ± 1.0 a | 20.8 ± 1.2 a |
| Relative apparent absorption (%) | | | | |
| 1 st period | 92.8 ± 0.5 a | 93.6 ± 0.7 a | 92.4 ± 0.5 a | 92.6 ± 0.9 a |
| 2 nd period | 92.8 ± 0.5 a | 93.6 ± 0.5 a | 92.1 ± 0.4ab | 90.9 ± 0.5 b |

BD= basic diet; DM1= 95% basic diet + 5% MM1; DM2= 95% basic diet + 5% MM2; DM3= 95% basic diet + 5% MM3. Results are expressed as mean values ± standard error of the mean (n=7). Values followed by different letters within the same line are significantly different ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by Duncan's test). Animals fed AIN diet ingested 80.9 ± 3.0 and 120.9 ± 4.3 , excreted 36.4 ± 1.3 and 60.9 ± 2.2 , and absorbed 44.5 ± 1.4 and 60.0 ± 2.2 mg Ca/day, with a relative apparent calcium absorption of 55.0 ± 2.5 and 52.2 ± 1.4 %, respectively in the first and in the second period.

Table 4 Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of phosphorus in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods

| Parameters | BD | DM1 | DM2 | DM3 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Dietary concentration (mg %) | 317.0 ± 2.5 b | 312.4 ± 3.1 b | 346.2 ± 3.8 a | 359.4 ± 4.0 a |
| Ingestion (mg/day) | | | | |
| 1 st period | 43.3 ± 1.0b | 41.4 ± 0.8b | 49.1 ± 1.3 a | 51.4 ± 2.3a |
| 2 nd period | 53.1 ± 1.1 b | 51.5 ± 3.2b | 67.1 ± 2.8 a | 61.5 ± 3.6 a |
| Fecal excretion (mg/day) | | | | |
| 1 st period | 5.3 ± 0.3 b | 5.4 ± 0.1 b | 5.9 ± 0.3 ab | 6.6 ± 0.3 a |
| 2 nd period | 5.9 ± 0.5 b | 6.2 ± 0.6 b | 8.2 ± 0.9 a | 7.8 ± 0.4 ab |
| Absolute apparent absorption (mg/day) | | | | |
| 1 st period | 38.1 ± 0.8 b | 35.9 ± 0.9b | 43.2 ± 1.1 a | 45.3 ± 2.9a |
| 2 nd period | 47.2 ± 0.8 b | 45.2 ± 2.7 b | 58.9 ± 2.0 a | 53.8 ± 3.3a |
| Relative apparent absorption (%) | | | | |
| 1 st period | 87.7 ± 0.6 a | 87.7 ± 0.8 a | 88.0 ± 0.3 a | 87.0 ± 1.0 a |
| 2 nd period | 88.9 ± 0.7 a | 88.3 ± 0.6 a | 88.0 ± 1.0 a | 87.3 ± 0.6 a |

BD= basic diet; DM1= 95% basic diet + 5% MM1; DM2= 95% basic diet + 5% MM2; DM3= 95% basic diet + 5% MM3. Results are expressed as mean values ± standard error of the mean (n=7). Values followed by different letters within the same line are significantly different ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by Duncan's test). Animals fed AIN diet ingested 49.8 ± 1.8 and 74.4 ± 2.7 , excreted 15.3 ± 0.6 and 23.8 ± 0.9 , and absorbed 34.4 ± 1.3 and 50.6 ± 1.8 mg P/day, with a relative apparent phosphorus absorption of 69.2 ± 1.6 and 68.0 ± 1.5 %, respectively in the first and in the second period.

Table 5 Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of magnesium in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods

| Parameters | BD | DM1 | DM2 | DM3 |
|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Dietary concentration (mg %) | 86.9 ± 1.1 c | 88.9 ± 1.4 c | 98.6 ± 1.3 b | 115 ± 1.3 a |
| Ingestion (mg/day) | | | | |
| 1 st period | 11.9 ± 0.3 b | 11.8 ± 0.2b | 14.2 ± 0.3a | 16.4 ± 0.7 a |
| 2 nd period | 14.7 ± 0.4 b | 14.6 ± 0.9 b | 19.1 ± 0.8 a | 19.7 ± 1.1 a |
| Fecal excretion (mg/day) | | | | |
| 1 st period | 2.9 ± 0.1 b | 3.1 ± 0.2 b | 4.1 ± 0.2 ab | 4.6 ± 0.3 a |
| 2 nd period | 3.9 ± 0.4 b | 3.7 ± 0.3 b | 5.9 ± 0.4 a | 5.2 ± 0.3 a |
| Absolute apparent absorption (mg/day) | | | | |
| 1 st period | 8.9 ± 0.2b | 8.6 ± 0.2b | 10.2 ± 0.2 a | 12.0 ± 0.9 a |
| 2 nd period | 10.8 ± 0.2b | 10.9 ± 0.7 b | 13.2 ± 0.4 a | 14.5 ± 0.9 a |
| Relative apparent absorption (%) | | | | |
| 1 st period | 75.2 ± 0.8 a | 75.0 ± 2.0 a | 70.9 ± 1.1 a | 71.9 ± 2.1 a |
| 2 nd period | 73.6 ± 2.6 a | 74.7 ± 0.8 a | 69.2 ± 0.9 b | 73.5 ± 0.8 a |

BD= basic diet; DM1= 95% basic diet + 5% MM1; DM2= 95% basic diet + 5% MM2; DM3= 95% basic diet + 5% MM3. Results are expressed as mean values ± standard error of the mean (n=7). Values followed by different letters within the same line are significantly different ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by Duncan's test). Animals fed AIN diet ingested 7.4 ± 0.3 and 11.1 ± 0.4 , excreted 1.8 ± 0.1 and 2.9 ± 0.1 , and absorbed 5.6 ± 0.2 and 8.2 ± 0.3 mg Mg/day, with a relative apparent magnesium absorption of 75.2 ± 2.2 and 74.1 ± 2.7 %, respectively in the first and in the second period.

Table 6 Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of manganese in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods

| Parameters | BD | DM1 | DM2 | DM3 |
|--|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Dietary concentration ($\mu\text{g } \%$) | 1037.2 \pm 89.2 c | 1207.3 \pm 7.5 bc | 1389.3 \pm 53.0 ab | 1679.1 \pm 125.0 a |
| Ingestion ($\mu\text{g } / \text{day}$) | | | | |
| 1 st period | 142.2 \pm 3.2 c | 159.6 \pm 3.7 c | 197.2 \pm 5.3 b | 242.6 \pm 12.6 a |
| 2 nd period | 174.3 \pm 3.8 b | 199.4 \pm 12.5 b | 269.4 \pm 11.2 a | 287.5 \pm 16.8 a |
| Fecal excretion ($\mu\text{g } / \text{day}$) | | | | |
| 1 st period | 89.0 \pm 3.0 c | 116.2 \pm 3.6 b | 144.9 \pm 4.7 a | 152.0 \pm 7.7 a |
| 2 nd period | 105.0 \pm 3.2 b | 120.4 \pm 10.1b | 171.5 \pm 7.7 a | 170.4 \pm 11.9 a |
| Absolute apparent absorption ($\mu\text{g } / \text{day}$) | | | | |
| 1 st period | 53.3 \pm 2.5 b | 43.4 \pm 2.7 b | 52.2 \pm 5.8 b | 90.5 \pm 7.0 a |
| 2 nd period | 69.3 \pm 1.5 c | 79.0 \pm 5.7 bc | 92.1 \pm 5.3 b | 113.4 \pm 8.8 a |
| Relative apparent absorption (%) | | | | |
| 1 st period | 37.5 \pm 1.5 a | 27.2 \pm 1.5 b | 27.8 \pm 2.5 b | 37.1 \pm 1.6 a |
| 2 nd period | 39.8 \pm 0.8 a | 39.9 \pm 2.3 a | 34.5 \pm 0.9 b | 39.9 \pm 1.4 a |

BD= basic diet; DM1= 95% basic diet + 5% MM1; DM2= 95% basic diet + 5% MM2; DM3= 95% basic diet + 5% MM3. Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (n=7). Values followed by different letters within the same line are significantly different ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by Duncan's test). Animals fed AIN diet ingested 291.7 ± 11.5 and 432.1 ± 20.1 , excreted 218.0 ± 12.1 and 279.6 ± 14.4 , and absorbed 90.8 ± 7.2 and 151.4 ± 9.1 $\mu\text{g Mn/day}$, with a relative apparent magnesium absorption of 30.9 ± 1.6 and 35.1 ± 1.4 %, respectively in the first and in the second period.

Table 7 Dietary concentration and ingestion, excretion, and absorption of copper in rats fed diets without or with multimixtures in two experimental periods

| Parameters | BD | DM1 | DM2 | DM3 |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Dietary concentration ($\mu\text{g } \%$) | 301.2 ± 3.9 a | 287.7 ± 11.5 a | 307.8 ± 8.5 a | 316.6 ± 11.1 a |
| Ingestion ($\mu\text{g}/\text{day}$) | | | | |
| 1 st period | 41.2 ± 0.9 bc | 37.9 ± 0.9 c | 43.7 ± 1.2 ab | 45.7 ± 2.4 a |
| 2 nd period | 50.5 ± 1.1 b | 49.4 ± 2.7 b | 60.0 ± 2.5 a | 52.4 ± 3.1 b |
| Fecal excretion ($\mu\text{g } / \text{day}$) | | | | |
| 1 st period | 30.9 ± 0.7 b | 30.3 ± 1.0 b | 33.6 ± 1.0 ab | 35.1 ± 1.6 a |
| 2 nd period | 36.9 ± 1.2 b | 39.1 ± 2.3 b | 48.4 ± 3.1 a | 42.4 ± 1.9 ab |
| Absolute apparent absorption ($\mu\text{g}/\text{day}$) | | | | |
| 1 st period | 10.3 ± 1.0 a | 8.0 ± 1.4 a | 10.1 ± 0.4 a | 10.6 ± 1.4 a |
| 2 nd period | 13.1 ± 1.1 a | 10.3 ± 0.9 a | 11.0 ± 0.4 a | 10.0 ± 2.0 a |
| Relative apparent absorption (%) | | | | |
| 1 st period | 24.5 ± 2.3 a | 23.5 ± 2.0 a | 23.1 ± 0.9 a | 22.9 ± 2.4 a |
| 2 nd period | 23.5 ± 2.0 a | 20.8 ± 1.5 a | 18.6 ± 1.3 a | 21.0 ± 2.2 a |

BD= basic diet; DM1= 95% basic diet + 5% MM1; DM2= 95% basic diet + 5% MM2; DM3= 95% basic diet + 5% MM3. Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (n=7). Values followed by different letters within the same line are significantly different ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by Duncan's test). Animals fed AIN diet ingested 101.1 ± 3.8 and 136.8 ± 6.4 , excreted 82.5 ± 3.0 and 113.2 ± 6.8 , and absorbed 18.5 ± 1.2 and 21.5 ± 1.0 $\mu\text{g Cu}/\text{day}$, with a relative apparent copper absorption of 18.2 ± 0.8 and 16.1 ± 0.8 %, respectively in the first and in the second period.

Footnote to page 1

Abbreviations: AIN, American Institute of Nutrition ; ANOVA, analysis of variance; BD, basic diet; IDF, insoluble dietary fiber; MM, “multimistura” or multimixture; NET ABS, absolute apparent absorption. NFE, Nitrogen-free extract; SDF, soluble dietary fiber; TDF, total dietary fiber; % ABS, relative apparent absorption.



Human and Experimental Toxicology
000(00) 1-10
© The Author(s) 2009
Reprints and permission: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>
DOI: 10.1177/0960327109357777
het.sagepub.com



Influence of cereal bran supplement on cadmium effects in growing rats

MGK Callegaro^{1,2}, BG Milbradt², T Diettrich², E Alves², FA Duarte³, EMM Flores³, VL Dressler³, LP Silva⁴ and T Emanuelli²

Abstract

Strategies to diminish cadmium (Cd) absorption are highly desirable especially where Cd exposure due to environmental contamination is still inevitable. Cd toxicity may be influenced by dietary components, such as fiber and minerals. Multimixtures are low-cost cereal bran supplements used in Brazil and in other countries to counteract malnutrition in low-income populations. This study was aimed at evaluating whether multimixture would reduce Cd effects in young rats. Animals received a diet with or without the multimixture plus 0, 5, or 25 mg Cd/kg (control, Cd-5, and Cd-25 groups) during 30 days. The Cd-5 groups were similar to control groups in all parameters analyzed, except in the higher renal Cd concentration. However, the Cd-25 groups had lower biological growth parameters and renal δ -aminolevulinatase activity, besides higher renal Cd concentration and plasma alanine aminotransferase activity compared to the controls. The multimixture did not prevent Cd effects in the Cd-25 group, but caused a small reduction in renal Cd concentration in the Cd-5 group. Although this multimixture was ineffective to prevent Cd effects at the higher concentration, it seemed to reduce Cd accumulation at the lower Cd dietary concentration, which is similar to levels of human exposure in some polluted areas.

Keywords

alanine aminotransferase, δ -aminolevulinatase, aspartate aminotransferase, cadmium, dietary fiber, multimixture

Introduction

Cadmium (Cd) is one of the most worrisome heavy metals due to its toxicity and increasing environmental levels. It occurs abundantly in nature in zinc and lead ores and in phosphate fertilizers. Agricultural use of phosphate fertilizers and sewage sludge, as well as industrial uses of cadmium, have been identified as the major causes of widespread dispersion of this metal at trace levels into the general environment.¹ Cd enters the food chain and accumulates in animal organisms due to its long biological half-life.² Cd toxicity mainly affects the kidneys, liver, and bone,^{1,2} where it inhibits various enzymatic systems. δ -Aminolevulinatase dehydratase (ALA-D), a sulfhydryl-containing enzyme of heme biosynthesis, is used as a biomarker of Cd exposure, since it has high affinity for divalent metals.^{3,4} Plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase

(AST) activities have also been used as indicators of Cd hepatic injury.^{5,6}

¹ Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Department of Animal Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Corresponding author:

MGK Callegaro, Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Email address: mariaadagraco@gmail.com

The major route of exposure to cadmium for the non-smoking general population is via food.^{1,2} The bioavailability of cadmium from food is an important determinant of its potential risk. It is well known that the rate of cadmium absorption from various food sources depends on the nutritional status of minerals, especially zinc, iron, and calcium.⁷ In addition, protein malnutrition enhances susceptibility to cadmium intoxication.^{2,8} Malnutrition is a common problem in many countries, which has been counteracted by government and non-government institutions. The Child Pastoral Organization (Pastoral da Criança – CNBB) is a non-government organization active in Brazil and other countries, which, among other actions, stimulates dietary enrichment with non-conventional supplements to treat malnutrition.⁹ These supplements are prepared using low-cost ingredients (agricultural by-products) that include cereal bran, green leaf powder, various kinds of seeds, and eggshell powder, among others, and are commonly known as ‘multimixtures’ (MM).⁹ Due to its low cost, MM are used all over Brazil and in other countries to counteract malnutrition in low-income populations. The amount and type of ingredients used to prepare MM vary according to local availability. Even though MM contain a high concentration of proteins, B vitamins, and minerals, among other nutrients,^{9,10} their use has been contested by nutrition professionals in Brazil. One of the controversies regarding the use of MM is the scanty information concerning the bioavailability of their nutrients and its effect on the bioavailability of nutrients from other foods, especially minerals.¹⁰

The main ingredient of MM is cereal bran, which may reach a concentration of 70% or more. Cereal brans contain high levels of minerals, but they also contain a high amount of dietary fiber and phytate, which bind minerals, and may impair their absorption.¹⁰ Although some *in vitro* and *in vivo* studies have shown that cereal brans can bind essential minerals,^{11,12} other studies did not find adverse effects of cereal brans on mineral absorption and utilization.^{13,14} Besides brans, MM contain other ingredients such as egg shell powder. Egg shell has high calcium content that is absorbed in the gastrointestinal tract.¹⁵ Although studies regarding MM and mineral bioavailability are scarce, a few studies in rats have revealed that MM may provide some minerals.^{10,16}

In contrast to essential minerals, a reduction of the gastrointestinal absorption of heavy metals is desirable. It has been demonstrated that cereal brans can also bind toxic metal ions such as lead and cadmium

in vitro.^{11,17} Moreover, the addition of dietary fibers, including lignin, cellulose, and carboxymethylcellulose, reduced Cd retention in rat tissues.^{8,18} The main concern in the prevention of human exposure to heavy metals such as Cd is to reduce environmental contamination and to avoid its entrance into the food chain. However, the high cost of cleaning up contaminated areas limits remediation measures, especially in developing countries, where funds are scarce. In this context, low-cost strategies to diminish heavy metal absorption are highly desirable. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of dietary supplementation with a fiber and mineral-rich MM on Cd accumulation and toxicity in growing rats. This approach is important because both fiber and essential minerals have the potential to prevent Cd toxicity, but most previous studies have focused on the effects of isolated minerals or dietary fiber sources on Cd toxicity, rather than on the effects of complex cereal bran mixtures like MM.

Materials and methods

This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee from the Universidade Federal de Santa Maria (23081.005772/2006-84).

Animals and experimental protocol

A total of 48 male Wistar rats (3 weeks old weighing 64 ± 10 g) were used in this study. The animals were individually housed in metabolic cages, under controlled conventional conditions ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 h/12 h light-dark cycle), and had free access to drinking water and diet, during the whole experimental period (30 days). The animals were allocated randomly to one of the following six experimental groups of eight rats each:

- Cd 0 group – the animals received a basic diet (BD) without Cd;
- Cd 0 + MM group – received BD with multimixture without Cd;
- Cd 5 group – received BD with 5 mg Cd/kg diet;
- Cd 5 + MM group – received BD with multimixture and 5 mg Cd/kg diet;
- Cd 25 group – received BD with 25 mg Cd/kg diet; and
- Cd 25 + MM group – received BD with multimixture and 25 mg Cd/kg diet.

Table 1. Ingredient composition of basic diet (BD)

| Ingredients | Amount (g/100g dry weight) |
|---------------------|----------------------------|
| Bread | 20.92 |
| Rice | 16.38 |
| Beans | 13.18 |
| Milk | 10.38 |
| Beef | 8.21 |
| Cookie | 6.35 |
| Sugar | 7.17 |
| Bologna | 1.38 |
| Chicken | 5.34 |
| Chips | 2.89 |
| Margarine | 2.12 |
| Chocolate powder | 1.94 |
| Macaroni | 1.92 |
| Others ^a | 1.82 |

^a Apple, banana, egg, potato, lettuce, tomato, cabbage, and coffee; all amounts lower than 0.5%.

Since nutritional deficiencies may affect Cd absorption, the diet used in this study was based on the average foods consumed by children that receive MM in the city of Santa Maria (RS, Brazil), which are children considered to be at nutritional risk. A questionnaire was applied to parents who gave information regarding their children's diet. Data from 200 children were used to formulate the BD (Table 1). Food ingredients were bought at the local market, prepared as for human consumption, dried at 55°C, ground, and mixed to form the BD. Cadmium was added to the diets as monohydrated CdCl₂ (analytical grade, Merck, Germany) to obtain the 5 and 25 mg Cd/kg diet. Dietary cadmium at 5 mg/kg was chosen to provide an exposure similar to that observed in some polluted areas^{19,20} and dietary cadmium at 25 mg/kg was chosen to compare the MM effect at a higher exposure level. The experimental model was based on a previous study in growing Wistar rats that used similar dietary Cd levels and exposure period.²¹ Considering that MM are mainly used for children, this study was conducted in growing rats.

The MM used in the present research was prepared according to one of the predominant formulae used by the Child Pastoral Organization in the central part of the State of Rio Grande do Sul (Brazil), because it has a high amount of fiber. The ingredients of the MM (wheat bran, 37%; rice bran, 23%; cassava meal, 15%; maize corn meal, 14%; cassava and kale green leaf powder, 5%; pumpkin and sunflower seed powder, 5%; and egg-shell powder, 1%) were finely ground, toasted, and mixed. Groups exposed to the

MM were given a diet containing 10% MM and 90% BD, while the other groups were given a diet containing 100% BD. This MM level was chosen because it is an intermediate level in relation to previous studies of this supplement in rats (1.2% to 25%).^{10,16}

The feed intake was recorded daily and the body weight of animals was obtained every 5 days. These data were used to determine the feed efficiency ratio. At the end of the experiment (30th day) the animals were weighed, anesthetized, and killed by cardiac puncture. The blood was collected in heparinized tubes for subsequent quantification of plasma aminotransferases (ALT and AST) and creatinine. The liver and kidneys were removed and weighed for evaluation of relative weight. The right kidney was immediately homogenized with saline solution (1:3, w/v) and centrifuged at 3000g at 4°C for 10 min to yield a low-speed supernatant that was used for determination of ALA-D activity, while the left kidney was frozen for subsequent determination of the Cd concentration.

Analytical procedures

Diets and MM analysis. Diets and MM were analyzed as described by AOAC²² for moisture (method 925.10), ash (method 923.03), fat (method 945.39), and crude protein (method 960.52, N × 6.25, micro-Kjeldahl method). Total and insoluble dietary fiber contents were determined by enzymatic-gravimetric methods n. 985.29 and n. 991.42 and soluble dietary fiber content was calculated by difference.²² All the enzymes used in chemical analysis, Termamyl 1201.[®] (amylase), AMG 200[®] (amylglycosidase), and Alcalase 2.4L[®] (protease), were provided by Novozymes Latin America Ltd. Available carbohydrates (NFE fraction) were calculated by difference, as follows: [NFE fraction % = 100 - (moisture% + crude ash% + crude fat% + crude protein% + dietary fiber%)]. The energetic value was calculated using the factor 9.0 kcal/g for lipids and 4.0 kcal/g for protein and NFE fraction. For determining essential minerals, diet samples were wet-digested with nitric and perchloric acids. Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, and Zn concentrations were measured by atomic absorption spectrometry using an Atomic Absorption Spectrophotometer model AA12/1475, Varian, (Australia). P concentrations were measured spectrophotometrically after reaction with ammonium-molybdate and ammonium-metavanadate.²³

Cd determination. Samples (diets and whole kidney) were digested with analytical grade nitric acid using a closed digestion system with heating at 140°C for 2

hours. Measurements by ICP OES were carried out using a Model Spectro Ciros CCD (Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germany). The operational parameters used were radiofrequency power of 1400 W and flow-rates for plasma gas, auxiliary gas, and nebulizer gas of 12, 1.0, and 0.9 L min⁻¹, respectively. A cross-flow (Spectro) nebulizer coupled to a double-pass glass spray chamber (Spectro) was used. The wavelength 214.438 nm was monitored for cadmium determination.

Aqueous calibration standards were prepared by sequential dilution of a stock solution of Cd (10 mg L⁻¹, Spex CertiPrep, Metuchen, NJ, USA). Standards were prepared daily using 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, and 100.0 µg L⁻¹ Cd. Sample digests were diluted when necessary. Accuracy was evaluated by analysis of one biological certified reference material NIST SRM 1577b (bovine liver, 0.50 ± 0.03 µg g⁻¹). Recovery tests were also performed for sample digests and water samples. After every ten measurements, two standard Cd solutions were analyzed to check the slope of the calibration curve. In the case of a slope difference higher than 6%, the calibration curve was prepared again using all standards. Precision of ICP OES measurements was considered acceptable at up to 3%.

Cadmium content in diets was expressed as mg/kg, while in the kidneys data were expressed as renal Cd concentration (µg/g) and Cd retained in kidney (% of total Cd intake during entire experimental period).

Plasma creatinine and aminotransferases

Plasma creatinine and aminotransferases (ALT and AST) were measured using routine laboratory kits (Doles reagents, Goiânia, GO, Brazil).

ALA-D activity. ALA-D was assayed in renal homogenate by measuring the rate of product (porphobilinogen) formation as described by Sassa.²⁴ The reaction was started 10 min after the addition of the enzyme preparation by adding the substrate. Incubation was carried out for 180 minutes at 39°C. The reaction product was determined using Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of 6.1 × 10⁴ for the Ehrlich-porphobilinogen salt. Results were expressed as nmol porphobilinogen/hour/mg protein. Protein was measured in renal homogenate according to Lowry et al.²⁵ using bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

Results are presented as the mean ± standard error of the mean. Data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA): 3 cadmium doses × 2 MM levels for all results. Post hoc analysis was carried out using Duncan's test ($p < .05$) and was used only when ANOVA indicated a significant main effect or interaction. Data on renal Cd concentration was log transformed before ANOVA. The software used for the analysis was Statistica 6.0 for Windows.

Results

The composition of experimental diets and MM are summarized in Table 2. Diets had similar levels for most analyzed constituents. The main difference among diets was in the dietary fiber and mineral content. The BD-10% MM diet had higher total dietary fiber content (1.4-fold) than the BD diet. This increase was due to the 1.2-fold increase in SDF and 1.5-fold increase in the IDF content of BD-10% MM diet when compared to the BD diet. Moreover, the addition of MM increased the concentrations of all minerals analyzed. The most expressive increases were those of Mg and Mn (1.8- and 2.4-fold, respectively), but the concentrations of other minerals were also increased in the MM diets. Cd levels in the MM and in the BD diets without Cd were below the detection limit of the ICP OES assay (0.03 mg/kg, data not shown). For the purpose of clarity, Cd concentrations in the contaminated diets are presented as the amount of cadmium added to the diets (5 and 25 mg/kg), since Cd levels detected by ICP OES in these diets did not deviate more than 10% from the added amount (data not shown).

At the beginning of the experiment, all rats had similar starting body weights (data not shown). All the animals survived the experimental period regardless of the treatment. However, some samples were lost during the assays, yielding an experimental number of 7 to 8 animals per group depending on the measurement. ANOVA revealed a significant main effect of Cd, but no effect of MM on feed intake, body weight gain, and feed efficiency ratio. Post hoc analysis revealed that animals that received 5 mg/kg Cd had no change in feed intake, body weight gain, or feed efficiency ratio when compared to the control group (Cd 0; Table 3). However, animals that received 25 mg/kg Cd had lower feed intake, body weight gain, and feed efficiency ratio when compared to control (Cd 0) and to 5 mg/kg Cd groups ($p < .05$;

Table 2. Energy and chemical composition of MM and the experimental diets

| | MM | BD | BD (90%) + MM (10%) |
|---------------------------|--------|--------|---------------------|
| Energy (kcal %) | 266.7 | 382.4 | 370.4 |
| Moisture (%) | 6.37 | 6.69 | 6.72 |
| Crude ash (%) | 4.42 | 3.39 | 3.51 |
| Crude fat (%) | 8.15 | 9.96 | 9.79 |
| Crude protein (%) | 13.28 | 19.30 | 18.68 |
| Dietary fiber | | | |
| TDF (%) | 32.72 | 6.80 | 9.40 |
| IDF (%) | 23.92 | 3.73 | 5.74 |
| SDF (%) | 8.80 | 3.07 | 3.66 |
| Nitrogen-free extract (%) | 35.06 | 53.86 | 51.90 |
| Ca (mg %) | 467.56 | 139.95 | 186.15 |
| P (mg %) | 711.81 | 312.02 | 383.22 |
| Mg (mg %) | 374.57 | 71.89 | 133.29 |
| Cu (mg %) | 1.08 | 0.39 | 0.46 |
| Fe (mg%) | 9.06 | 4.21 | 4.59 |
| Mn (mg%) | 10.57 | 0.79 | 1.90 |
| Zn (mg%) | 7.81 | 3.49 | 3.96 |

BD, basic diet; MM, multimixture.

Table 3. Feed intake, body weight gain, and feed efficiency ratio of rats exposed to a Cd-containing diet (0, 5, or 25 mg/kg) without or with multimixture (+MM) during 30 days

| Group (n) | Feed intake (g) | Body weight gain (g) | Feed efficiency ratio ^a (g/g) |
|----------------|---------------------------|--------------------------|--|
| Cd 0 (7) | 444.8 ± 14.6 ^a | 161.4 ± 6.6 ^a | 0.362 ± 0.006 ^a |
| Cd 0 + MM (8) | 437.8 ± 11.3 ^a | 154.6 ± 4.6 ^a | 0.354 ± 0.010 ^a |
| Cd 5 (8) | 437.4 ± 13.7 ^a | 153.3 ± 6.5 ^a | 0.350 ± 0.010 ^a |
| Cd 5 + MM (8) | 457.6 ± 16.1 ^a | 156.7 ± 6.6 ^a | 0.343 ± 0.008 ^a |
| Cd 25 (8) | 360.3 ± 15.7 ^b | 112.3 ± 5.4 ^b | 0.312 ± 0.008 ^b |
| Cd 25 + MM (8) | 357.0 ± 16.0 ^b | 106.1 ± 7.5 ^b | 0.296 ± 0.010 ^b |

Cd, cadmium; MM, multimixture.

NOTE: Results are expressed as mean values ± standard error of the mean. Mean values followed by different letters within the same column are significantly different ($p < .05$; two-way ANOVA followed by Duncan's test).

^a g Body weight gain/g feed consumed.

Table 3). The differences in feed intake between Cd-25 groups and their control groups were similar along the four experimental weeks, while differences in body weight gain increased slightly from the first to the last experimental week (data not shown). No significant Cd × MM interaction was observed, indicating that the addition of MM did not prevent Cd effects on feed intake, body weight gain, or feed efficiency ratio (Table 3).

Cd had a significant main effect on liver relative weight and ALT activity, but no effect on AST activity. Post hoc analysis revealed that animals that received diets with 5 mg/kg Cd showed no changes in indicators of liver toxicity (Table 4). However, animals that received 25 mg/kg Cd had lower liver relative weight and increased ALT activity when

compared to control and to 5 mg/kg Cd groups ($p < .05$; Table 4). AST activity was similar among all experimental groups (Table 4). MM did not alter indicators of liver toxicity per se or prevent Cd effects (Table 4).

No significant effect of Cd or MM was observed on kidney relative weight (Table 5) or on plasma creatinine levels. Plasma creatinine levels were 0.74 ± 0.03 , 0.77 ± 0.05 , 0.73 ± 0.02 , 0.72 ± 0.04 , 0.74 ± 0.05 , and 0.74 ± 0.04 mg/dL, respectively, for the Cd 0, Cd 0 + MM, Cd 5, Cd 5 + MM, Cd 25, and Cd 25 + MM groups. However, there was a significant Cd × MM interaction on the renal Cd concentration. Post hoc analysis revealed that the renal Cd concentration significantly increased with the increase of Cd content in the diets, with the highest concentration

Table 4. Liver parameters of rats exposed to a Cd-containing diet (0, 5 or 25 mg/kg) without or with multimixture (+ MM) during 30 days

| Group (n) | Relative weight (mg/g body weight) | ALT (IU/L) | AST (IU/L) |
|----------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Cd 0 (7) | 44.05 ± 0.60 ^a | 9.90 ± 0.99 ^b | 26.41 ± 1.09 ^a |
| Cd 0 + MM (7) | 44.16 ± 0.67 ^a | 12.42 ± 0.60 ^{ab} | 27.12 ± 0.28 ^a |
| Cd 5 (8) | 44.89 ± 0.70 ^a | 11.77 ± 1.43 ^{ab} | 27.45 ± 1.39 ^a |
| Cd 5 + MM (8) | 44.69 ± 1.09 ^a | 12.53 ± 1.37 ^{ab} | 28.50 ± 2.15 ^a |
| Cd 25 (7) | 41.29 ± 0.57 ^b | 14.60 ± 1.36 ^a | 29.70 ± 1.11 ^a |
| Cd 25 + MM (8) | 39.38 ± 0.75 ^b | 14.86 ± 1.77 ^a | 27.14 ± 1.33 ^a |

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; Cd, cadmium; IU, international units; MM, multimixture.

NOTE: Results are expressed as mean values ± standard error of the mean. Mean values within the same column that are not followed by a common letter are significantly different ($p < .05$; two-way ANOVA followed by Duncan's test).

Table 5. Renal parameters of rats exposed to a Cd-containing diet (0, 5, or 25 mg/kg) without or with multimixture (+MM) during 30 days

| Group (n) | Relative weight (mg/g b.w.) | Cd concentration (µg/g) | Cd retained (% of total intake) | ALA-D activity (nmol PBG/h/mg protein) |
|----------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------|--|
| Cd 0 (7) | 3.67 ± 0.10 ^a | 0.10 ± 0.01 ^d | n.d. | 2.09 ± 0.14 ^a |
| Cd 0 + MM (7) | 3.50 ± 0.04 ^a | 0.08 ± 0.01 ^d | n.d. | 2.21 ± 0.12 ^a |
| Cd 5 (8) | 3.73 ± 0.03 ^a | 5.31 ± 0.43 ^b | 0.222 ± 0.017 ^a | 2.06 ± 0.13 ^a |
| Cd 5 + MM (8) | 3.67 ± 0.08 ^a | 4.12 ± 0.34 ^b | 0.172 ± 0.013 ^b | 2.07 ± 0.12 ^a |
| Cd 25 (7) | 3.71 ± 0.10 ^a | 13.85 ± 0.82 ^a | 0.112 ± 0.008 ^c | 1.68 ± 0.14 ^b |
| Cd 25 + MM (8) | 3.53 ± 0.08 ^a | 13.48 ± 0.38 ^a | 0.102 ± 0.004 ^c | 1.60 ± 0.06 ^b |

b.w., body weight ALA-D, δ-aminolevulinic acid dehydratase; MM, multimixture; n.d., not determined since the Cd concentration in Cd 0 diets was lower than the detection limit (0.03 µg/g); PBG, porphobilinogen.

NOTE: Results are expressed as mean values ± standard error of the mean. Mean values followed by different letters within the same column are significantly different ($p < .05$; two-way ANOVA followed by Duncan's test).

being observed in animals that received 25 mg/kg Cd ($p < .05$; Table 5). In addition, MM reduced the renal Cd concentration only in animals that received 5 mg/kg Cd ($p < .05$; Table 5). ANOVA also revealed a significant Cd × MM interaction on the fraction of Cd retained (percent of intake) in the kidney. The fraction of Cd that was retained in the kidney decreased with the increase of Cd in the diet ($p < .05$, Table 5). Moreover, MM reduced the fraction of Cd retained in the kidney only in the animals that received 5 mg/kg Cd ($p < .05$; Table 5). Dietary Cd (25 mg/kg) inhibited renal ALA-D ($p < .05$), but no effect of MM was observed on ALA-D activity (Table 5).

Discussion

Strategies to diminish Cd absorption are highly desirable, especially where Cd exposure due to environmental contamination is still inevitable. MM are dietary supplements widely used in Brazil to improve the nutritional status of low-income populations,

especially children.^{9,10} Due to their high dietary fiber and mineral content, it is possible that MM reduces the absorption of heavy metals.

The inclusion of MM mainly increased the content of dietary fiber and minerals of diets and caused little reduction in the caloric value. This finding was expected, since previous studies reported high levels of these constituents in MM.^{9,10} The high level of Ca in MM is due to egg-shell powder,¹⁵ while the high levels of dietary fiber, phosphorus, and magnesium are mainly due to cereal brans,¹⁰ which amounted to 60% of the MM used.

Although the BD used in our experiment represents the average dietary intake of children at nutritional risk, it presented a good balance of energetic nutrients (lipids, protein, and carbohydrates made up about 24%, 20%, and 56% of dietary caloric value, respectively) in accordance with dietary recommendations from the American Institute of Nutrition for growing rodents.²⁶ The levels of phosphorus, magnesium, iron, and zinc in the BD also met the

recommendations for growing rats.²⁶ However, more than 50% of the BD was composed of foods with low nutritional value (refined cereals and sugars). Moreover, the BD was poor in calcium (28%), copper (78%), and manganese (79%) as compared to the recommendation for rats.²⁶ MM supplementation increased copper and manganese contents of diets to levels recommended for rats. However, it increased 1.33-fold the calcium level of diets, which was still far from the recommended Ca level. Specific studies regarding MM and mineral bioavailability are scarce and have revealed that MM may function as a dietary source of minerals when given as a supplement in a nutritionally deficient diet.^{10,27,28} Thus, in our study, MM could possibly have improved the copper, manganese, and calcium balance. The BD was used to simulate the same nutritional conditions of populations that use MM, which are known to have dietary deficiencies.¹⁰ A recent paper demonstrated that the use of the BD in growing Wistar rats caused a reduction in weight gain (25% lower) when compared to control rats fed the American Institute of Nutrition diet for growing rodents.²⁹ Nutritional deficiencies may increase Cd absorption and toxicity, which would render low-nutritional status populations particularly at risk for Cd exposure.^{2,7}

The reduction of feed intake, body weight gain, and feed efficiency ratio after exposure to 25 mg/kg Cd contrasts with previous studies,^{18,20} where a similar Cd dose had no such effect. This discrepancy probably occurred because the previous studies used adult rats and/or employed more nutritionally balanced diets.^{18,20} Younger animals are known to be more susceptible to Cd toxicity, and poorer nutritional diets increase Cd toxicity.² Although MM increased dietary fiber and mineral content of the diet, it did not prevent Cd effects on feed intake, body weight gain, or feed efficiency ratio.

The liver is highly affected by Cd.² In the present study, liver relative weight and plasma ALT and AST activities were used as indicators of hepatic effects of Cd. It is known that plasma ALT activity is a more representative parameter of hepatic toxicity than AST.³⁰ Accordingly, we found an increase in plasma ALT activity after exposure to 25 mg/kg Cd. Studies in rats using dietary Cd also found an increase in ALT activity after long exposure⁵ or exposure to high Cd concentrations.⁶ Along with this increase in ALT, the lower liver relative weight of rats exposed to 25 mg/kg Cd also suggests liver injury. However, these alterations were only observed in rats exposed

to 25 mg/kg Cd, a dose higher than that observed in some polluted areas.^{19,20} As observed in the feed intake and growth parameters, MM did not prevent Cd-induced effects on the liver.

It is known that the kidney is one of the organs that accumulates the highest levels of Cd and Cd accumulation in the kidneys can be used as an estimate of the intestinal absorption of Cd.^{2,31} Accordingly, the renal Cd concentration increased with the increase of the Cd concentration in the diet. After gastrointestinal absorption, Cd can induce and bind to cysteine-rich low-molecular-weight protein metallothionein in the liver; metallothionein/Cd complexes are slowly released over time from the liver and circulate to the kidneys, where they contribute to increase Cd levels.^{32,33} Assuming the high cysteine content in the metallothionein molecule, it is possible that this protein can sequester a high percentage of this toxic metal in inert complexes, making it less available to interact with sensitive organelles and enzyme systems. In contrast to the renal Cd concentration, the fractional (%) Cd retention in the kidneys decreased with the increase of Cd in the diet. This is in agreement with previous studies in mice¹⁹ and rats²⁰ and could be related to a saturation of metal absorption at the higher dietary level as previously reported for Ca and Zn.³⁴ The values of renal Cd concentration and fractional Cd retention found in the present study are higher than values previously reported after exposure to a 5 mg/kg diet under similar conditions (2 µg/g and 0.13%, respectively).³⁵ This discrepancy probably occurred because the previous study used a more balanced diet. In addition, other authors found a lower renal Cd concentration after exposure to 5 and 20 mg/kg diet (2 and 6 µg/g, respectively),³⁶ which may be related to the younger age of rats used in the present study. MM caused a small reduction in the Cd concentration and fractional Cd accumulation in the kidney of rats fed 5 mg/kg Cd.

The reduction of renal Cd deposition in rats fed 5 mg/kg Cd plus MM probably occurred because MM contains a high level of cereal brans that may diminish intestinal absorption of Cd. The affinity of cereal brans or their fractions to Cd has already been demonstrated *in vitro*.^{11,17} In addition, a lower Cd retention was observed when other dietary fibers, such as cellulose and lignin, were added to the diet of rats.^{8,18} It is known that the dietary fiber of wheat and rice brans (major MM constituents) contains cellulose and lignin,³⁷ which probably contributed to the protective effect of MM. Accordingly, some studies

demonstrated that diets containing wheat bran reduce the bioavailability or the accumulation of dietary Cd in rodents exposed to low Cd concentrations.³⁸⁻⁴⁰ These Cd levels are similar or lower than the lowest Cd dose used in the present study. On the other hand, addition of MM increased the Ca content of diets. It is known that an increased Ca, Fe, or Zn intake reduces Cd absorption and retention in mammals.^{2,7} Nutritional deficiencies of Zn, Fe and/or Ca seem to correlate with a slower intestinal transit time in rats, increasing Cd absorption. It was also found that Cd turnover rate is decreased with these nutritional deficiencies, leading to an increase in the Cd retained by various rat organs.⁷ Although the increase of dietary Ca concentration triggered by MM was small (33%), it could have contributed to reduce the renal Cd accumulation in rats exposed to 5 mg/kg Cd. On the other hand, the increase of Fe and Zn in the MM diet was much lower (around 10%). Furthermore, different from that observed for Ca, the Fe and Zn levels in the BD met the dietary recommendation for rats, which makes it unlikely that these metals contributed to reduce the renal Cd accumulation in MM-treated rats. It is also important to mention that an exposure to high levels of Zn or Cu may induce the synthesis of metallothionein,⁴¹ which is known to detoxify Cd.³³ However, in our study, the increase of Zn and Cu levels triggered by MM is unlikely to induce an increase in the synthesis of metallothionein.

In contrast to that observed in rats exposed to 5 mg/kg, MM did not change renal Cd accumulation after exposure to 25 mg/kg. To explain this result, we propose that the MM fiber sites available to bind Cd are limited and may have been saturated at the lowest Cd concentration. Thus, when the Cd concentration was increased, no further binding was possible and therefore accumulation was not prevented at the higher metal dose.

Although the kidneys accumulate Cd, the Cd exposure scheme used apparently did not induce gross changes in renal function, since we did not find changes in the relative weight or in plasma creatinine levels. In fact, various studies have indicated that renal injury occurs only after longer periods or higher levels of exposure to Cd than those used in the present study.^{6,8} However, we found an inhibition of renal ALA-D activity after exposure to 25 mg/kg Cd. ALA-D is a sulfhydryl-containing enzyme of heme biosynthesis.⁴² It is extremely sensitive to situations associated to oxidative stress in the liver, kidney, blood, and brain of rats^{43,44} and has been demonstrated to be inhibited after Cd exposure both *in vitro*³

and *in vivo*.⁴ ALA-D inhibition by this higher dose may be related to the incapacity of the liver and kidney in inducing metallothionein synthesis in the quantity necessary to prevent renal toxic effects. Thus, the free metal would be available to cause kidney damage.^{32,33} MM had no protective effect against the Cd-mediated ALA-D inhibition, which is in congruence with its absence of effect on renal Cd accumulation at the highest dietary Cd level.

The BD used in this study had higher dietary fiber content than recommended by the American Institute of Nutrition for growing rodents,²⁶ which could have contributed to the low effect of MM on Cd accumulation. Therefore, it would be important to conduct other studies on the effect of MM on Cd toxicity in animals that are receiving a low-fiber diet.

In conclusion, the complex cereal bran mixture (MM) did not reduce Cd retention or effects after exposure to a high Cd concentration (25 mg/kg diet). Although we did not detect any biological damage after exposure to 5 mg/kg Cd, the finding that MM decreased renal Cd accumulation after exposure to this low Cd dose (5 mg/kg diet) is interesting since this dose is similar to levels of human exposure in some polluted areas. Considering that the half-life of Cd in the organism is elevated (up to 26 years in humans),² a long period of exposure to low Cd levels may pose a risk, especially for populations with nutritional deficiencies. In this context, the inclusion of MM as a supplement in a nutritionally deficient diet could help to reduce Cd accumulation. However, it is important to emphasize that the MM effect on Cd renal accumulation was minor. Furthermore, the composition of MM may vary according to the region of the country and in this study we evaluated the effect of a fiber-rich MM that is used in the southern region of Brazil. It would also be important to conduct other studies using MM with different compositions and longer exposure times to low levels of Cd in order to determine whether MM could prevent Cd toxicity.

Acknowledgements

Authors acknowledge fellowships and financial support from CNPq (503104/2003-5). T Emamehli is the recipient of CNPq research Fellowship (proc. 306432/2007-2), BG Milbradt and E Alves were the recipients of CNPq scientific initiation fellowships.

References

1. Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-

- occupationally exposed population. *Toxicol Lett* 2003; 137: 65–83.
2. WHO. Environmental Health Criteria. 134. Cadmium. World Health Organization: Geneva, 1992.
 3. Peixoto NC, Roza T, Pereira ME. Sensitivity of β -ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of rats to metals *in vitro* depends on the stage of postnatal growth and tissue. *Toxicol In Vitro* 2004; 18: 805–809.
 4. Santos FW, Zeni G, Rocha JBT, et al. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interact* 2005; 151: 159–165.
 5. Haouem S, Hmad N, Najjar MF, El Hani A, Sakly R. Accumulation of cadmium and its effects on liver and kidney functions in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Exper Toxicol Pathol* 2007; 59: 77–88.
 6. Hispard F, Vaufléury A, Martin H, et al. Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicol Environ Safety* 2008; 70: 490–498.
 7. Reeves PG, Chaney RL. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: a review. *Sci Total Environ* 2008; 398: 13–19.
 8. Omori M, Muto Y. Effects of dietary protein, calcium, phosphorus and fiber on renal accumulation of exogenous cadmium in young rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1977; 23: 361–373.
 9. Madruga MS, Camara FS. The chemical composition of “multimistura” as a food supplement. *Food Chem* 2000; 68: 41–44.
 10. Souza EMT, Sousa LM, Arruda SF, Siqueira EMA. Protein improves the bioavailability of calcium and phosphorus from an alternative dietary supplement in rats. *Nutr Res* 2002; 22: 945–955.
 11. Persson H, Nyman M, Önning HLG, Frølich W. Binding of mineral elements by dietary fiber components in cereals – *In vitro* (III). *Food Chem* 1991; 40: 169–183.
 12. Harrington ME, Flynn A, Cashman KD. Effects of dietary fibers extracts on calcium absorption in the rat. *Food Chem* 2001; 73: 263–269.
 13. Sandberg AS, Hasselblad C, Hasselblad K. The effect of wheat bran on the absorption of minerals in the small intestine. *Br J Nutr* 1982; 48: 185–191.
 14. Shah BG, Malcolm S, Belonje B, Trick K, Brassard R, Mongeau R. Effect of dietary cereal brans on the metabolism of calcium, phosphorous and magnesium in a long term rat study. *Nutr Res* 1999; 10: 1015–1028.
 15. Schaafsma A, Beelen GM. Eggshell powder, a comparable or better source of calcium than purified calcium carbonate: piglet studies. *J Sci Food Agri* 1999; 79: 1596–1600.
 16. Santos HB, Madruga MS, Bion FM, Antunes NLM, Mendes K, Águida R. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2004; 24: 613–618.
 17. Ou S, Gao K, Li Y. An *in vitro* study of wheat bran binding capacity for Hg, Cd, and Pb. *J Agri Food Chem* 1999; 47: 4714–4717.
 18. Kiyozumi M, Mishima M, Noda S, et al. Studies on poisonous metals IX. Effects of dietary fibers on absorptions of cadmium in rats. *Chem Pharm Bull* 1982; 30: 4494–4499.
 19. Whelton BD, Peterson DP, Moretti ES, Mauser RW, Bhattacharyya MH. Kidney changes in multiparous, nulliparous and ovariectomized mice fed either a nutrient-sufficient or -deficient diet containing cadmium. *Toxicology* 1997; 119: 123–140.
 20. Noël L, Guérin T, Kolf-Clauw M. Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 1203–1210.
 21. Walter A, Rimbach G, Mos E, Pallauf J. Effect of calcium supplements to a maize-soya diet on the bioavailability of minerals and trace elements and the accumulation of heavy metals in growing rats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2000; 47: 367–377.
 22. AOAC. *Official methods of analysis of the association of the official analysis chemists*. 16th ed. Association of Arlington, VA: Official Analytical Chemists, 1995.
 23. Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. (Boletim no 5) 2nd ed. Porto Alegre, Brazil: Departamento de solos, 199.
 24. Sassa S. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982; 28: 133–145.
 25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.
 26. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutri* 1993; 123: 1939–1951.
 27. Ferreira HS, Assunção ML, França AOS, Cardoso EPC, Moun FA. The effectiveness of the “multimistura” as supplement to mineral and/or vitamin deficient diets, promoting weight gain in rats submitted to post-natal under-nourishment. *Revista de Nutrição* 2005; 18: 63–64.
 28. Siqueira EMA, Arruda SF, Sousa LM, Souza EMT. Phytate from an alternative dietary supplement has

- no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2001; 51: 250–257.
29. Kaminski TA, Silva LP, Bagetti M, Monego MA, Moura GB. Diferentes formulações de multimisturas sobre a resposta biológica em ratos. *Ciência Rural* 2008; 38: 2327–2333.
 30. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of liver function. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscaizo J (eds.) *Harrison's principles of internal medicine*, 17. New York, NY: McGraw-Hill, 2008.
 31. Lind Y, Engman J, Jorhem L, Glynn AW. Cadmium accumulation in liver and kidney of mice exposed to the same weekly cadmium dose continuously or once a week. *Food Chem Toxicol* 1997; 3: 891–895.
 32. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for cadmium (draft for public comment). Atlanta, GA: U.S. Public Health Service, 2008.
 33. Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238: 215–220.
 34. Bertolo RFP, Bettger WJ, Adkinson SA. Calcium competes with zinc for a channel mechanism on the brush border membrane of piglet intestine. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 66–72.
 35. Rimbach G, Walter A, Most E, Pallauf J. Effect on microbial phytase on zinc bioavailability and lead accumulation in growing rats. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 7–12.
 36. Hiratsuka H, Satoh S, Satoh M, et al. Tissue distribution of cadmium in rats given minimum amounts of cadmium polluted rice or cadmium chloride for 8 months. *Toxicol Applied Pharmacol* 1999; 160: 183–191.
 37. Claye SS, Idouraine A, Weber CW. *In-vitro* mineral binding capacity of five fiber sources and their insoluble components for magnesium and calcium. *Food Chem* 1998; 61: 333–338.
 38. Moberg A, Hallmans G, Sjöström R, Wing KR. The effect of wheat bran on the absorption and accumulation of cadmium in rats. *Br J Nutr* 1987; 58: 383–391.
 39. Lind Y, Engman J, Jorhem L, Glynn AW. Accumulation of cadmium from wheat bran, sugar-beet fibre, carrots and cadmium chloride in the liver and kidneys of mice. *Br J Nutr* 1998; 80: 205–211.
 40. House WA, Hart JJ, Norvell WA, Welch RM. Cadmium absorption and retention by rats fed durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) grain. *British Journal of Nutrition* 2003; 89: 499–508.
 41. Davis SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr* 2000; 130: 1085–1088.
 42. Jaffe EK. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J Bioenergetics Biomembranes* 1995; 27: 169–179.
 43. Folmer V, Soares JCM, Rocha JBT. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1279–1285.
 44. Perottoni J, Lobato LP, Silveira A, Rocha JBT, Emanuelli T. Effects of mercury and selenite on ALA-D activity and selected oxidative stress parameters in rats. *Environ Res* 2004; 95: 166–173.

Manuscrito 2:**Effect of wheat bran and flaxseed on cadmium effects and retention in rats**

MGK Callegaro^{1,2,*}, BG Milbradt², E Alves², T Diettrich², DM Kemerich², BS Hausen², FA Duarte³, EMM Flores³, VL Dressler³, T Emanuelli²

¹Graduate Program on Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

²Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

³Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Maria da Graça Kolinski Callegaro

Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL)

Department of Alimentary Technology and Science

Center of Rural Sciences

Federal University of Santa Maria

Campus – Camobi, 97105-900

Santa Maria, RS - Brazil

Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353.

E-mail address: mariadagrakc@gmail.com (M.G.K. Callegaro).

Running title: Wheat bran and flaxseed on cadmium effects

Summary: Dietary fiber can affect Cd absorption and toxicity, but the effect appears to depend on the type of dietary fiber. The aim of the present study was to compare the effect of dietary sources containing distinct amounts of soluble and insoluble fiber on Cd absorption, accumulation and toxicity in growing rats. The absorption of essential macrominerals (Ca, P and Mg) was also evaluated. Animals received a nutritionally balanced diet with cellulose (cel – control), wheat bran or flaxseed as the fiber source with 0 or 50 mg Cd kg⁻¹ diet, during 30 days. Cd exposure reduced body weight gain, feed efficiency ratio, epididymal fat relative weight and liver relative weight, and increased plasma alanine aminotransferase activity in all fiber groups. The apparent Cd absorption was similar among Cd-groups, but the flax-Cd group had a higher hepatic and renal Cd concentration. Cd decreased the absorption of Ca and P, and increased Mg absorption in the wheat bran and flaxseed groups, but not in the cel group. Although the different fiber sources investigated had no effect on Cd toxicity, the major soluble fiber source, flaxseed, increased Cd retention. Thus, caution should be taken in the intake of flaxseed by Cd-exposed populations.

Keywords: Cadmium, dietary fiber, phytates, macrominerals absorption

Introduction

Cadmium (Cd) is a potentially toxic metal that is very dangerous because of its long half life in the environment and in animal tissues. Although natural activities such as forest fires, fossil fuel combustion and volcanic activity contribute to increase Cd in the environment, its industrial applications (Ni-Cd batteries, paint stabilizer, phosphate fertilizer, among others) have the highest contribution to this process.^{1,2}

Many organs are affected by Cd toxicity, such as the kidney, liver, lung, testis, brain, bone, and blood system.^{3,4} The kidneys and liver have received the most scrutiny in this area, because they are the major sites for Cd accumulation.^{3,5-8} Plasma alanine aminotransferase (ALT) activity is frequently used as an indicator of Cd hepatic injury.^{8,9} In addition, as Cd induces oxidative stress,¹⁰ some endogenous antioxidant molecules, such as non-protein thiol groups (NPSH), are measured to estimate Cd effects.^{11,12}

The diet is the main source for Cd exposure in non-smoking and non-occupationally exposed populations.^{3,4} Gastrointestinal uptake of Cd may be as high as 37% in children, compared to about 5% for adults.¹³ The absorption of cadmium in rats also depends on age, being higher in younger animals.⁴ In addition, the rate of cadmium absorption depends on the nutritional status of the individual and on the constituents of the diet, such as essential minerals and fibers. When the nutritional status of Ca is low, Cd absorption will be enhanced.¹⁴ Conversely, the large intake of Ca protects against the absorption, accumulation and toxicity of Cd.¹⁵ Cd also affects the biological function of minerals as has been shown for Ca among others.¹⁶ Besides minerals, dietary fibers also appears to affect Cd absorption and toxicity. In vitro studies have demonstrated that dietary fibers are able to bind Cd.¹⁷⁻¹⁹ However, in vivo studies on Cd accumulation are scarce and have shown diverse results depending on the type of dietary fiber used.^{7,20,21}

Most studies involving the effect of dietary fiber on the absorption of minerals concern essential minerals. In these studies, results are varied and fibers have been shown to have negative effects or no effect and even to increase the absorption of essential minerals, depending on the experimental conditions and on the fiber source evaluated. Insoluble dietary fiber (IDF) fractions usually decrease mineral absorption, while soluble dietary fibers (SDF) have a more variable effect and have been shown to increase absorption.^{22,23} However, due to the complex composition of the food dietary fiber fraction, generalizations should be avoided, making it important to evaluate the effects of each source of dietary fiber.

Because most of people consume large amounts of refined foods, which usually have low levels of fibers, they sometimes make use of dietary fiber supplements. Wheat bran and flaxseed are among the most used dietary fiber supplements nowadays. Wheat bran contains around 45% total fiber and most of it (approximately 85%) is insoluble fiber.²⁴ As other brans, wheat bran is rich in phytates, which have high affinity for many metals.²⁵ In vitro and in vivo studies have demonstrated that wheat bran has higher affinity for metals compared to other fiber-rich products.^{23,24} Flaxseed has been used as an edible grain in different parts of the world since ancient times. Lately, there has been a resurgence of flaxseed use, because it is a valuable source of ω -3 fatty acids, fiber and lignans with beneficial health effects.²⁶ Its content of dietary fiber is high, generally above 30% total fiber, of which approximately one-third consists of soluble dietary fiber.^{26,27} Despite the high fiber content of flaxseed, studies about its effects on the absorption or accumulation of metals are scarce and only concern some essential minerals.^{28,29}

The aim of the present study was to compare the effect of dietary sources of distinct amounts of soluble and insoluble fiber (wheat bran or flaxseed) on Cd absorption, accumulation and toxicity in growing rats. The absorption of essential macrominerals (Ca, P and Mg) was also evaluated in order to elucidate the observed effects.

Materials and methods

Diets and treatments

The diets were prepared according to the rodent diet from the American Institute of Nutrition (AIN),³⁰ by whole substitution of the standard fiber (microcrystalline cellulose, Labsynth, Brazil) with wheat bran (bran groups) or flaxseed (flax groups); the control group, which used cellulose as the fiber source, was denominated “cel group” (Table 1). Food grade wheat bran and flaxseed were obtained at the local market. Wheat bran was sieved (20 mesh) and toasted. Flaxseed was ground and partially defatted with n-hexane. These ingredients were finely ground until the particles were smaller than 30 mesh. The proximate composition and dietary fiber content of wheat bran and flaxseed were evaluated as described below. The amount of bran and flax used in each diet was calculated to yield the same content of total dietary fiber as that found in the Cel-diet (5%). Protein, oil and starch content were balanced, according to the levels of these constituents in wheat bran and flaxseed, to ensure the same levels in all diets, in order to obtain isocaloric diets. The amount of sucrose, mineral mix, vitamin mix, choline and methionine were the same in all diets according to AIN-93 (Table 1).

Each of the three diets was formulated both as Cd-free and with 50 mg Cd/kg diet, yielding six experimental groups (Table 2). For the contamination of the diets, cornstarch was mixed with an aqueous solution of CdCl₂ (analytical grade, Merck, Germany), dried at 40°C, ground and used as an ingredient. The Cd-free diets received non-contaminated cornstarch and the Cd diets received a mixture of non-contaminated and contaminated cornstarch to ensure 50 mg Cd/kg diet. The amount of Cd in the diets was checked by ICP OES (Table 2).

Animals and experimental protocol

This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal

University of Santa Maria (23081.005772/2006-84). A total of 42 male Wistar rats (3 week-old, weighing, 62.4 ± 0.2 g body weight) were randomly distributed among the six experimental groups and fed with the different diets (Table 2) during 30 days.

The animals were individually housed in metabolic cages and kept under controlled conventional conditions (temperature $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 12/12h light-dark cycle) and had free access to drinking water and diet during the experimental period.

The feed intake was checked daily and the body weight of animals was obtained every five days. These data were used to determine the feed efficiency ratio. Feces were quantitatively collected in the last days of the experimental period (from the 18th to the 29th day), when the animals were well adapted to the diets. Feces were dried, ground and stored for mineral determination.

At the end of the experiment the animals were weighed, anesthetized with ethyl ether and killed by cardiac puncture, and the blood was collected for subsequent quantification of plasma alanine aminotransferase and creatinine. The liver and kidneys were removed and weighed. Part of the liver and the right kidney were homogenized with saline solution and centrifuged at $3,000 \times g$. The resulting supernatants were used for determination of non-protein thiol group levels. The left kidney and the other part of the liver were frozen for subsequent determination of the Cd concentration.

Analytical procedures

Chemical composition of wheat bran, flaxseed and diets

Wheat bran, flaxseed, and diets were analyzed as described by AOAC³¹ for moisture (method 925.10), ash (method 923.03), fat (method 945.39), and crude protein (method 960.52, N x 6.25, microkjeldahl method). Total and insoluble dietary fiber contents were determined by the enzymic-gravimetric methods 985.29 and 991.42 and soluble dietary fiber content was calculated by difference.³¹ All the enzymes used in chemical analysis, Termamyl 120L[®] (amylase), AMG 200[®] (amyloglycosidase) and Alcalase 2.4L[®] (protease), were provided by

Novozymes Latin America Ltda. Available carbohydrates (nitrogen-free extract, NFE fraction) were calculated by difference, as follows: [NFE fraction % = 100 – (moisture% + crude ash% + crude fat% + crude protein% + dietary fiber%)]. The energetic value was calculated using the factor 9.0 kcal/g for lipids and 4.0 kcal/g for protein and NFE fractions.

Phytate determination

The samples of microcrystalline cellulose, wheat bran and flaxseed used to prepare diets were totally defatted and duplicates were used for phytate determination according to Latta and Eskin.³² Phytate content in each diet was calculated from the results obtained for fiber sources.

Determination of minerals

Essential minerals were determined in the diets and feces, while cadmium was determined in the diets, feces, liver, and kidney after digestion using a system with concentrated HNO₃, at 140°C for 2 h. Measurements by ICP OES were carried out using a Model Spectro Ciros CCD (Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germany). A cross-flow (Spectro) nebulizer coupled to a double-pass glass spray chamber (Spectro) was used. The wavelengths monitored for cadmium, calcium, magnesium and phosphorus determination were 214.438, 317.933, 285.213, and 178.287 nm, respectively. Analytical determinations were made directly in sample digests or after adequate dilutions when necessary.

Results of renal or hepatic Cd were expressed as Cd concentration (µg/g) and Cd retained in the organ (% of total Cd intake during all experimental period). Apparent absorption coefficients were calculated as the difference between the dietary intake and the fecal output divided by the dietary intake in the feces collection period. The results were expressed as the relative mineral absorption (% of total intake) and the absolute apparent absorption (net absorption), which was measured as mg absorbed per g of the average body weight during the feces collection period.

Plasma creatinine and alanine aminotransferase

Plasma creatinine and alanine aminotransferase (ALT) were measured using routine laboratory kits (Doles reagents, Goiânia, GO, Brazil).

Non-protein thiol groups

Low-speed supernatant fraction of liver or kidney was mixed with 10% trichloroacetic acid (1:1, v/v), followed by centrifugation and neutralization of the supernatant (at pH 7.5) with 1 M Tris. Non-protein thiol groups (NPSH) were immediately determined as described by Ellman³³ using a standard curve of cysteine.

Statistical analysis

Results are presented as the mean±standard error of the mean. Data were analyzed by two-way analysis of variance. Post-hoc analysis was carried out using Duncan's test ($P<0.05$). The software used for the analysis was Statistica 6.0 for Windows.

Results

Composition of diets

The composition of fiber sources and experimental diets are presented in Table 1. The experimental diets were isocaloric and had similar levels of crude fat, crude protein and total dietary fiber. However, the diets presented different IDF/SDF ratios, due to the different composition of the fiber sources used; while the cel diet presented almost 100% IDF, the IDF/SDF ratio of wheat bran and flaxseed diets were 11 and 2.6, respectively. The level of phytates was approximately 2-fold higher in the bran diet than in the flaxseed diet, due to the higher content of this constituent in wheat bran. In contrast, the cellulose diet had a very small amount of phytates. Experimental diets had a similar calcium content, but wheat bran and flaxseed diets had higher P (1.4 and 1.2-fold, respectively) and Mg (2.2 and 2.0-fold, respectively) content as compared to the control diet (cellulose).

Growth parameters in rats

Table 3 presents results concerning growth parameters in rats. At the beginning of the experiment, all rats had similar body weight (data not shown). All the animals survived the experimental period regardless of the treatment. Wheat bran and flaxseed diets per se had no significant effect on the growth parameters of rats as compared to the control diet (cellulose). The feed intake was reduced by Cd in the control diet and in the flaxseed diet ($p < 0.05$). However, when wheat bran was used as the fiber source, Cd had no significant effect on feed intake. Cd exposure reduced the body weight gain of rats ($p < 0.05$), but this reduction was less accentuated when wheat bran was used as the fiber source as compared to cellulose (control) and flaxseed. Cd exposure also reduced the feed efficiency ratio of the animals ($p < 0.05$), but no effect of fibers was observed on this parameter. Cd exposure decreased the epididymal fat relative weight, and this decrease was higher in the flaxseed diet ($p < 0.05$).

Hepatic parameters

Hepatic parameters are shown in Table 4. Wheat bran and flaxseed diets had no significant effect per se on the hepatic parameters of rats as compared to the control diet (cellulose). Cd exposure decreased the relative weight of liver ($p < 0.05$), regardless of the dietary fiber source. The hepatic Cd concentration was lower than the detection limit ($0.1 \mu\text{g/g}$ tissue) in the liver of rats fed the Cd-free diets, and ranged from 10.9 to $13.7 \mu\text{g/g}$ in the rats fed the Cd diets. The flax-Cd group had higher liver Cd concentration when compared to the bran-Cd group ($p < 0.05$). Cd retained in the liver (percent of total intake) was also higher in the flax-Cd group, being statistically different from the cel-Cd and the bran-Cd groups. Cd exposure increased plasma alanine aminotransferase activity ($p < 0.05$), but no effect of dietary fiber was observed on this parameter. The hepatic content of non-protein thiol groups was similar among all experimental groups.

Renal parameters

Table 5 shows results concerning renal parameters. Wheat bran and flaxseed diets had no significant per se effect on the renal parameters of rats as compared to the control diet (cellulose). Cd exposure did not affect the relative weight of kidneys. Renal Cd concentration was lower than the detection limit (0.1 µg/g tissue) in the kidneys of rats fed the Cd-free diets, and ranged from 16.2 to 20.9 µg/g in the Cd-groups. The renal Cd concentration and the fraction of Cd that was retained in the kidneys (percent of total intake) were significantly higher in the flax-Cd group as compared to the other Cd groups. All experimental groups had similar plasma creatinine levels and renal non-protein thiol groups.

Mineral absorption

Results relative to mineral absorption are presented in Figure 1. Wheat bran and flaxseed diets had no significant per se effect on the relative or net apparent absorption of Ca as compared to the control diet (cellulose). However, Cd decreased the relative (percent of total intake) and net Ca absorption in rats fed with wheat bran and flaxseed, but not in rats fed with the control diet. P absorption, when expressed as the percent of total intake, was reduced by the wheat bran diet ($p < 0.05$), but not by the flaxseed diet, as compared to the control diet. In contrast, the net P absorption increased significantly in the flaxseed and wheat bran diets when compared to the control diet, with the wheat bran diet having the highest values. Cd exposure decreased both the relative and the net P absorption in rats fed with wheat bran and flaxseed, but not in rats fed with the control diet. Comparing the different fiber sources, we observed that the relative Mg absorption was lower in the wheat bran and flaxseed diets than in the control diet ($p < 0.05$). However, when Mg absorption was expressed as net absorption, wheat bran and flaxseed diets had higher values as compared to the control diet ($p < 0.05$). Cd treatment did not affect Mg absorption in the control diet, but increased the relative absorption of Mg in the wheat bran and flaxseed diets ($p < 0.05$) and the net Mg absorption in the wheat bran diet ($p < 0.05$). Cd absorption was calculated only for the Cd groups, because Cd levels in

the Cd-free diets were lower than the detection limit (0.1 µg/g). The relative absorption of Cd ranged from 11 to 13% and the net absorption from 6.3 to 8.1 µg/g body weight in the period and no significant differences were observed among the diets with different fiber sources.

Discussion

Since the diet is the main source of Cd exposure in non-smoking and non-occupationally exposed populations,^{3,4} it is important to identify foods or food constituents that could reduce or increase Cd absorption and toxicity. In the present study, we investigated the effect of wheat bran and flaxseed, food sources with a high content of fibers and phytates, which potentially bind metals.

Although some wheat varieties and flaxseed have been identified as Cd-accumulating plants,² the Cd concentration in the wheat bran and flaxseed used in experimental diets of the present study was lower than the detection limit (0.1 µg/g). Therefore, in the present study wheat bran and flaxseed did not contribute to the Cd levels of diets.

In this study, a 30-day treatment with a balanced diet containing 50 mg Cd/kg reduced feed intake, body weight gain, feed efficiency ratio and epididymal fat relative weight. In previous studies with somewhat higher dietary Cd levels a reduction in body weight and feed intake was also observed.^{9,34} Epididymal fat weight is used to measure adiposity in rodents³⁵ and its decrease is in agreement with the lower body weight gain of Cd-exposed rats. The wheat bran diet prevented Cd effects on the feed intake and on the body weight gain, but did not prevent the reduction in the feed efficiency ratio and epididymal fat relative weight. Since the wheat bran diet was unable to prevent other effects of Cd, we propose that its protection against Cd-induced body weight loss is related to its ability to prevent the reduction of feed

intake induced by Cd. Wheat bran may have masked the metallic flavour leading to increased palatability of the Cd diet.

We observed lower liver relative weight after Cd exposure, which is in accordance with other studies.^{36,37} Liver Cd accumulation ranged from 12 to 14 µg/g tissue, which is in agreement with previous findings.^{5,6} Furthermore, we observed that liver Cd concentration and Cd retained was higher in the flax-Cd group than in the other Cd-groups. A previous study showed that dietary supplementation with soluble fibers, such as alginic acid, pectin, agar and carageenan, increased deposition of dietary Cd in the liver and kidneys of rats.²¹ Similarly, sugar-beet fiber, which is rich in soluble fiber, increased Cd retention in liver and kidneys as compared to wheat bran fiber.⁷ In our study, the higher accumulation of Cd in groups that received flaxseed as the fiber source may be attributed to its higher level of soluble fiber when compared to cellulose and wheat bran. It is known that some carbohydrates, such as soluble fiber, may ferment in the large intestine leading to an increase in the absorption of essential minerals either due to acidification, ionic exchange or phytate hydrolysis.^{38,39} A similar mechanism may have contributed to the effects of flax soluble fibers on Cd retention, since previous studies demonstrated that flaxseed is a highly fermentable fiber source.⁴⁰ Despite the higher Cd retention in the flax-Cd group, we did not find a higher apparent Cd absorption in this group. However, feces collection for evaluation of Cd absorption occurred only between the 18th and the 29th day of the experiment. There is evidence that an expressive amount of endogenous Cd is excreted into the gastrointestinal tract, mainly via bile.^{3,41} Thus, it is possible that the higher Cd accumulation in the flax-Cd group could lead to higher gastrointestinal excretion of endogenous Cd, which could have masked flaxseed enhancement of Cd absorption.

On the other hand, the bran-Cd group showed liver Cd retention similar to that of the cel-Cd group. Many studies have demonstrated that diets containing wheat bran reduce the

bioavailability or the accumulation of dietary Cd in rodents, but all of these diets had lower Cd levels than those of the present study.^{7,42,43} Thus, it is possible that the inefficiency of dietary wheat bran to prevent Cd effects in our study was due to the fact that the Cd level exceeded the binding capacity of the wheat bran.

It is known that plasma ALT activity is a representative parameter of hepatic toxicity. We found an increase in ALT activity in all Cd-groups, as found in previous studies on Cd exposure.^{9,36,44} Therefore, wheat bran and flaxseed had no protective effect on liver relative weight or ALT activity. Although Cd is known to have high affinity for endogenous thiol molecules,⁴⁵ in this study, we found no change in hepatic NPSH levels after Cd exposure. Other authors also found no change in NPSH levels after oral Cd exposure during 30 days.¹² The fiber sources had no per se effect on hepatic NPSH levels.

The Cd concentration (16 to 21 $\mu\text{g/g}$ tissue) and Cd retained (0.05 to 0.07%) in kidneys is in agreement with previous results in rats.^{5,44} Although the kidneys accumulate Cd, the Cd exposure scheme used apparently did not affect their functioning, since we did not find changes in the relative weight or NPSH levels in this organ or in the plasma creatinine levels. In fact, various studies have indicated that renal injury occurs only after longer periods or higher levels of exposure to Cd than those used in the present study.^{6,8} This finding may be related to the protective role of renal metallothionein against Cd nephrotoxicity.⁴⁶ As observed in the liver, the flax diet also increased renal Cd concentration and retention, which may be related to the higher amount of soluble fiber, as discussed above.

It is well known that Cd may reduce calcium absorption and utilization in humans and other mammals.^{3,4} In addition, the utilization of other minerals such as P is also affected by Cd.¹⁶ In our study, dietary Cd reduced the relative and the net apparent absorption of Ca and P in the bran and flax groups, but not in the cel group. In contrast to cellulose, wheat bran and flaxseed contain expressive amounts of phytate. Each phytate molecule has up to 6 P atoms,

which yielded a higher P content and is probably responsible for the higher net P absorption in the wheat bran and flaxseed diets. Phytate is known to form a complex with Ca, reducing its absorption.^{24,25} This mechanism could be involved in the interaction of Cd with the wheat bran and the flaxseed diets to reduce Ca and P absorption.

As observed for Ca, Cd affected Mg absorption in the wheat bran and flaxseed diets, but not in the control diet. However, contrary to that which occurred for Ca, the apparent Mg absorption (relative and net) was increased by Cd in these groups. Therefore, we propose that Cd effects on Ca and Mg absorption have common mechanisms. Phytate can bind to both Ca and Mg, but Mg absorption seems to be less affected by phytates.³⁹ Rats given Cd and phytate-containing diets (wheat bran and flaxseed) had lower Ca apparent absorption, probably due to its binding to phytate. Thus, less phytate sites would be available to bind Mg, allowing more free Mg for absorption.

Cd toxicity has been related to disturbances in the utilization of minerals and bone metabolism.^{3,4,16} Our results indicate an interaction between Cd and diets with different fiber sources on Ca, P and Mg absorption and phytates were probably responsible for this effect. We found no previous study on the effect of phytates on Cd absorption and toxicity. Results of the present study do not allow us to accurately identify the dietary component that interacted with Cd to affect mineral absorption. However, they are of great practical importance, since they reveal the effects of dietary supplements that are widely consumed. The observed interaction between Cd and dietary constituents, probably phytates, would be important for Cd exposure in endemic areas, since it could aggravate Cd effects on mineral metabolism. Although in the present study the different fiber sources had no distinct effect on Cd toxicity parameters, results suggest that flaxseed, which has a major amount of soluble fiber as compared to the other sources, increased Cd retention. This finding highlights the concern about flaxseed intake in endemic contaminated regions, since flaxseed is also known to accumulate large levels of Cd during its growth, compared to other plants.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

T. Emanuelli is the recipient of CNPq research Fellowship (proc. 306432/2007-2), B.G. Milbradt and E. Alves were the recipients of CNPq scientific initiation fellowships.

References

- 1 Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-Elkins M, Reilly PEB, Williams DJ, Moore MR. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters* 2003; **137**: 65-83.
- 2 Grant CA, Clarke JM, Duguid S, Chaney RL. Selecting and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Science Total Environmental* 2008; **390**: 301-310.
- 3 WHO. Environmental Health Criteria. 134. Cadmium. World Health Organization: Geneva, 1992.
- 4 ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for cadmium (draft for public comment). Atlanta, GA: U.S. Public Health Service, 2008.
- 5 Groten JP, Sinkeldam EJ, Luten JB, Bladeren, PJ. Cadmium accumulation and metallothionein concentrations after 4-week dietary exposure to cadmium chloride or cadmium-metallothionein. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1991; **111**: 504-513.
- 6 Groten JP, Koeman JH, Nesselrooij JHJ, Luten JB, Fentener van Vlissingen JM, Stenhuis WS, Bladeren PJ. Comparison of renal toxicity after long-term oral administration of

- cadmium chloride or cadmium-metallothionein in rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 1994; **23**: 544-552.
- 7 Lind Y, Engman J, Jorhem L, Glynn AW. Accumulation of cadmium from wheat bran, sugar-beet fibre, carrots and cadmium chloride in the liver and kidneys of mice. *British Journal of Nutrition* 1998; **80**: 205-211.
- 8 Haouem S, Hmad N, Najjar MF, El Hani A, Sakly R. Accumulation of cadmium and its effects on liver and kidney functions in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Experimental and Toxicology Pathology* 2007; **59**: 77-88.
- 9 Hispard F, Vaufleury A, Martin H, Devaux S, Cosson RP, Scheifler R, Richert L, Berthelot A, Badot PM. Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2008; **70**: 490-498.
- 10 Bertin G, Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 2006; **88**: 1549–1559.
- 11 Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, Tunalı S. Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2006; **21**: 235–240.
- 12 Borges LP, Brandão R, Godoi B, Nogueira CW, Zeni G. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. *Chemico-Biological Interactions* 2008; **171**: 15-25.
- 13 Crews HM, Owen LM, Langford N, Fairweather-Tait SJ, Fox TE, Hubbard L, Phillips D. Use of the stable isotope (¹⁰⁶Cd) for studying dietary cadmium absorption in humans. *Toxicology Letters* 2000; **112/113**: 201–207.

- 14 Reeves PG, Chaney RL. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Science of the Total Environment* 2008; **398**: 13-19.
- 15 Brzóška MM, Moniuszko-Jakoniuk J. The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism. *Arquives of Toxicology* 1998; **72**: 63–73.
- 16 Brzóška MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Effect of chronic exposure to cadmium on the mineral status and mechanical properties of lumbar spine of males rats. *Toxicology Letters* 2005; **157**: 161-172.
- 17 Persson H, Nyman M, Önning HLG, Frolich W. Binding of mineral elements by dietary fiber components in cereals – In vitro (III). *Food Chemistry* 1991; **40**: 169-183.
- 18 Ou S, Gao K, Li Y. An in vitro study of wheat bran binding capacity for Hg, Cd, and Pb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999; **47**: 4714-4717.
- 19 Borycka B, Stachowiak J. Relations between cadmium and magnesium and aronia fractional dietary fibre. *Food Chemistry* 2008; **107**: 44–48.
- 20 Kiyozumi M, Mishima M, Noda S, Miyata K, Takahashi Y, Mizunaga F, Nakagawa M, Kojima S. Studies on poisonous metals IX. Effects of dietary fibers on absorption of cadmium in rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1982; **30**: 4494-4499.
- 21 Rose HE, Quarterman J. Dietary fibers and heavy metal retention in the rat. *Environmental Research* 1987; **42**: 166-175.
- 22 Ruiz-Roso B, Péres-Olleros L, García-Cuevas M. Influencia de la fibra dietaria (FD) en la biodisponibilidad de los nutrientes. In: Lajolo, FM, Saura-Calixto F, Penna EW, Menezes, EW (Eds) *Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud*. Varela: São Paulo, 2001. p. 345-370.

- 23 Filisetti TMCC, Lobo AR. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais. In: Cozzolino SMF (Ed), Biodisponibilidade de nutrientes. Manole: Barueri, 2007. p. 175-215.
- 24 Harrington ME, Flynn A, Cashman KD. Effects of dietary fibers extracts on calcium absorption in the rat. *Food Chemistry* 2001; **73**: 263-269.
- 25 Plaami S. Myoinositol phosphates: Analysis, content in foods and effects in nutrition. *Lebensm.-Wiss Technology* 1997; **30**: 633-647.
- 26 Oomah BD, Mazza G. Flaxseed products for disease prevention. In: Mazza, G (Ed) *Functional Foods Biochemical and Processing Aspects*. Technomic Publishing: Lancaster, 1998. p. 91-138.
- 27 Tarpila S, Tarpila A, Grohn P, Silvennoinen T, Lindberg L. Efficacy of ground flaxseed on constipation in patients with irritable bowel syndrome. *Nutritional Genomics & Functional Foods* 2003; **1**: 1-7.
- 28 Ratnayake WMN, Behrens WA, Fischer PWF, L'Abbé MR, Mongeau R, Beare-Rogers JL. Chemical and nutritional studies of flaxseed (variety Linott) in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 1992; **3**: 232-240.
- 29 Babu US, Mitchell GV, Wiesenfeld P, Jenkins MY, Gowda H. Nutritional and hematological impact of dietary flaxseed and defatted flaxseed meal in rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2000; **51**: 109-117.
- 30 Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* 1993; **123**: 1939-1951.
- 31 AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analysis Chemists*, 16. ed. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, 1995.

- 32 Latta M, Eskin M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1980; **28**: 1313-1315.
- 33 Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry* 1959; **82**: 70-77.
- 34 Noël L, Guérin T, Kolf-Clauw M. Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health. *Food and Chemical Toxicology* 2004; **42**: 1203-1210.
- 35 Donovan MJ, Paulino G, Raybould HE. Activation of hindbrain neurons in response to gastrointestinal lipid is attenuated by high fat, high energy diets in mice prone to diet-induced obesity. *Brain Research* 2009; **1248**: 136–140.
- 36 Hwang DF, Wang LC. Effect of taurine on toxicity of cadmium in rats. *Toxicology* 2001; **167**: 173–180.
- 37 Asagba SO, Obi FOA. A comparative evaluation of the biological effects of environmental cadmium-contaminated control diet and laboratory-cadmium supplemented test diet. *Biomaterials* 2005; **18**: 155–161.
- 38 Lopez HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigné C, Remesy C. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2000; **11**: 500-508.
- 39 Coudray C, Demigné C, Rayssiguier Y. Effects of dietary fibers on magnesium absorption in animals and humans. *Journal of Nutrition* 2003; **133**: 1-4.
- 40 Swanson KS, Grieshop CM, Clapper GM, Shields RG, Belay T, Merchen NR, Fahey GC. Fruit and vegetable fiber fermentation by gut microflora from canines. *Journal of Animal Science* 2001; **79**: 919-726.

- 41 Klaassen CD, Kotsonis FN. Biliary excretion of cadmium in the rat, rabbit, and dog. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1977; **41**: 101-112.
- 42 Moberg A, Hallmans G, Sjöström R, Wing KR. The effect of wheat bran on the absorption and accumulation of cadmium in rats. *British Journal Nutrition* 1987; **58**: 383-391.
- 43 House WA, Hart JJ, Norvell WA, Welch RM. Cadmium absorption and retention by rats fed durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) grain. *British Journal of Nutrition* 2003; **89**: 499-508.
- 44 Callegaro MGK, Milbradt BG, Diettrich T, Alves E, Duarte FA, Flores EMM, Dressler VL, Silva LP, Emanuelli T. Influence of cereal bran supplement on cadmium effects in growing rats. *Human & Experimental Toxicology* first published on December 17, 2009 as doi:10.1177/0960327109357777.
- 45 Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; **37**: 1511-1526.
- 46 Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009; **238**: 215–220.

Table 1

Energy and chemical composition of sources of dietary fiber and the experimental diets

| | Dietary fiber sources | | | Diets | | |
|-------------------------------|-----------------------|------------|----------|--------------------|------------------|------------------|
| | Cellulose | Wheat bran | Flaxseed | Cel-D | Bran-D | Flax-D |
| Cornstarch (%) | - | - | - | 52.9 | 50.6 | 52.4 |
| Casein (%) | - | - | - | 20.0 | 18.4 | 17.3 |
| Sucrose (%) | - | - | - | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Soybean oil (%) | - | - | - | 7.0 | 6.6 | 6.4 |
| Cellulose (%) | - | - | - | 5.0 | - | - |
| Wheat bran (%) | - | - | - | - | 10.1 | - |
| Flaxseed (%) | - | - | - | - | - | 9.6 |
| Mineral mix ^a (%) | - | - | - | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Vitamin mix ^b (%) | - | - | - | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| L-Cystine (%) | - | - | - | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline bitartrate (%) | - | - | - | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| TBHQ ^c (%) | - | - | - | 0.0014 | 0.0014 | 0.0014 |
| Energy (kcal%) | - | 161.1 | 184.5 | 374.6 | 372.0 | 371.7 |
| Moisture (%) | 3.8 | 1.5 | 1.6 | 7.4 | 7.4 | 7.3 |
| Crude ash (%) | 0.0 | 6.1 | 5.5 | 2.8 | 3.5 | 3.5 |
| Crude fat (%) | - | 4.3 | 6.7 | 6.8 | 7.0 | 7.0 |
| Crude protein (%) | - | 15.9 | 28.7 | 17.4 | 17.4 | 17.2 |
| Dietary fiber ^d | | | | | | |
| TDF (%) | | 49.3 | 52.2 | 4.7 | 4.8 | 5.0 |
| IDF (%) | 93.9 | 45.6 | 38.18 | 4.6 | 4.4 | 3.6 |
| SDF (%) | 1.9 | 3.7 | 14.02 | 0.1 | 0.4 | 1.4 |
| Phytate (%) | 0.1 | 8.3 | 4.4 | 0.005 ^e | 0.8 ^e | 0.4 ^e |
| NFE fraction ^f (%) | - | 14.7 | 2.4 | 60.9 | 59.2 | 59.6 |
| Ca (mg%) | < 20 | 95.0 | 310.0 | 545.1 | 555.0 | 574.2 |
| P (mg%) | < 30 | 1378.0 | 928.0 | 334.6 | 460.4 | 416.7 |
| Mg (mg%) | < 5 | 504.0 | 482.0 | 45.8 | 100.4 | 93.2 |
| Cd (µg g ⁻¹) | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 |

^a Mineral mix (g or mg/kg mix): Ca 142.94 g; P 44.61 g; K 102.81 g; Na 29.11 g; Cl 44,89 g;

S 8.57 g; Mg 14.48 g; Fe 1.00 g; Zn 0.86 g ; Si 0.14 g; Mn 0.30 g; Cu 0.17 g; Cr 0.03 g; B

14.26 mg; F 28.73 mg; Ni 14.31 mg; Li 2.85 mg; Se 4.28 mg; I 5.93 mg; Mo 4.32 mg; V 2.87 mg.

^b Vitamin mix (g or mg/kg mix): nicotinic acid 3.00 g; Ca pantothenate 1.60 g; pyridoxine-HCl 0.70 g; thiamin-HCl 0.60 g; riboflavin 0.60 g; folic acid 0.20 g; biotin 0.02 g; vitamin B12 2.50 mg; vitamin E 15.00 g; vitamin A 0.80 g; vitamin D3 0.25 g; vitamin K 0.075 g.

^c TBHQ – tertiary-butylhydroquinone.

^d Dietary fiber: TDF (total dietary fiber); IDF (insoluble dietary fiber); SDF (soluble dietary fiber).

^e Values calculated from the results obtained for cellulose, wheat bran and flaxseed samples.

^f NFE = nitrogen-free extract.

Table 2

Experimental groups, diets and the concentration of Cd found in diets

| Groups | Diets | Cd concentration* (mg kg ⁻¹ diet) |
|---------|---|---|
| Cel | AIN diet with cellulose | < 0.1 |
| Cel-Cd | AIN diet with cellulose + CdCl ₂ | 49.3 ± 3.6 |
| Bran | AIN diet with wheat bran | < 0.1 |
| Bran-Cd | AIN diet with wheat bran+ CdCl ₂ | 51.2 ± 4.1 |
| Flax | AIN diet with flaxseed | < 0.1 |
| Flax-Cd | AIN diet with flaxseed + CdCl ₂ | 49.0 ± 3.5 |

*Measured by ICP OES.

Table 3

Feed intake, body weight gain, feed efficiency ratio and epididymal fat relative weight of rats fed with different fiber sources exposed or not to 50 mg Cd/kg diet during 30 days.

| Group | Feed intake (g) | Body weight gain (g) | Feed efficiency ratio* (g /g) | Epididymal fat RW (mg/g body weight) |
|---------|--------------------|-------------------------|----------------------------------|---|
| Cel | 455.2 ± 14.4 a | 157.5 ± 5.6 a | 0.334 ± 0.005 a | 16.0 ± 1.2 a |
| Cel-Cd | 372.9 ± 10.0 b | 114.3 ± 5.5 c | 0.303 ± 0.006 b | 12.7 ± 0.4 b |
| Bran | 476.0 ± 11.9 a | 158.3 ± 4.1 a | 0.327 ± 0.008 a | 15.7 ± 0.8 a |
| Bran-Cd | 443.6 ± 10.2 a | 135.3 ± 4.8 b | 0.305 ± 0.007 b | 12.6 ± 0.4 b |
| Flax | 480.1 ± 28.6 a | 163.3 ± 4.3 a | 0.343 ± 0.006 a | 14.5 ± 0.3 a |
| Flax-Cd | 393.0 ± 8.9 b | 115.8 ± 6.2 c | 0.285 ± 0.009 b | 10.7 ± 0.3 c |

Results are expressed as mean values ± standard error of the mean (n=7).

* g body weight gain/g feed consumed.

RW= relative weight.

Values followed by different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's test).

Table 4

Liver parameters of rats fed with different fiber sources exposed or not to 50 mg Cd/kg diet during 30 days

| Group | RW (mg/g bw) | Cd concentration ($\mu\text{g/g}$) | Cd retained (% of total intake) | Plasma ALT (IU/L) | NPSH ($\mu\text{mol/g}$) |
|---------|------------------|---|------------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| Cel | 50.1 \pm 0.4 a | < 0.1 | n.d. | 8.2 \pm 1.4 b | 8.8 \pm 0.4 |
| Cel-Cd | 46.2 \pm 1.5 b | 11.8 \pm 1.0 ab | 0.478 \pm 0.018 b | 21.2 \pm 2.3 a | 9.1 \pm 0.4 |
| Bran | 52.4 \pm 1.4 a | < 0.1 | n.d. | 10.5 \pm 1.2 b | 8.9 \pm 0.4 |
| Bran-Cd | 46.5 \pm 0.8 b | 10.9 \pm 0.4 b | 0.450 \pm 0.007 b | 18.2 \pm 0.8 a | 8.7 \pm 0.3 |
| Flax | 52.3 \pm 0.4 a | < 0.1 | n.d. | 8.1 \pm 1.2 b | 8.5 \pm 0.4 |
| Flax-Cd | 45.1 \pm 1.3 b | 13.7 \pm 0.7 a | 0.536 \pm 0.019 a | 17.3 \pm 2.1 a | 8.8 \pm 0.3 |

RW = relative weight; bw= body weight; ALT= Alanine aminotransferase; IU= International Units; n.d. = not determined since the Cd concentration in Cd 0 diets was lower than the detection limit (0.1 $\mu\text{g/g}$ tissue).

Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (n=7).

Values followed by different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's test).

NPSH=non protein thiol groups.

Table 5

Renal parameters of rats fed with different fiber sources exposed or not to 50 mg Cd/kg diet during 30 days

| Group | RW (mg/g bw) | Cd concentration ($\mu\text{g/g}$) | Cd retained (% of total intake) | Plasma creatinine (mg/dL) | NPSH ($\mu\text{mol/g}$) |
|---------|-----------------|---|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Cel | 3.7 ± 0.1 | < 0.1 | n.d. | 0.78 ± 0.10 | 4.1 ± 0.2 |
| Cel-Cd | 3.6 ± 0.1 | 16.2 ± 0.8 b | 0.052 ± 0.003 b | 0.77 ± 0.05 | 4.4 ± 0.2 |
| Bran | 3.6 ± 0.1 | < 0.1 | n.d. | 0.78 ± 0.11 | 4.3 ± 0.2 |
| Bran-Cd | 3.7 ± 0.1 | 17.4 ± 0.5 b | 0.052 ± 0.002 b | 0.76 ± 0.07 | 4.4 ± 0.2 |
| Flax | 3.6 ± 0.1 | < 0.1 | n.d. | 0.66 ± 0.12 | 4.0 ± 0.3 |
| Flax-Cd | 3.7 ± 0.1 | 20.9 ± 0.6 a | 0.067 ± 0.001 a | 0.66 ± 0.11 | 4.2 ± 0.3 |

RW= relative weight; bw= body weight; n.d. = not determined since the Cd concentration in Cd 0 diets was lower than the detection limit (0.1 $\mu\text{g/g}$ tissue); NPSH = non-protein thiol groups.

Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (n=7).

Values followed by different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's test).

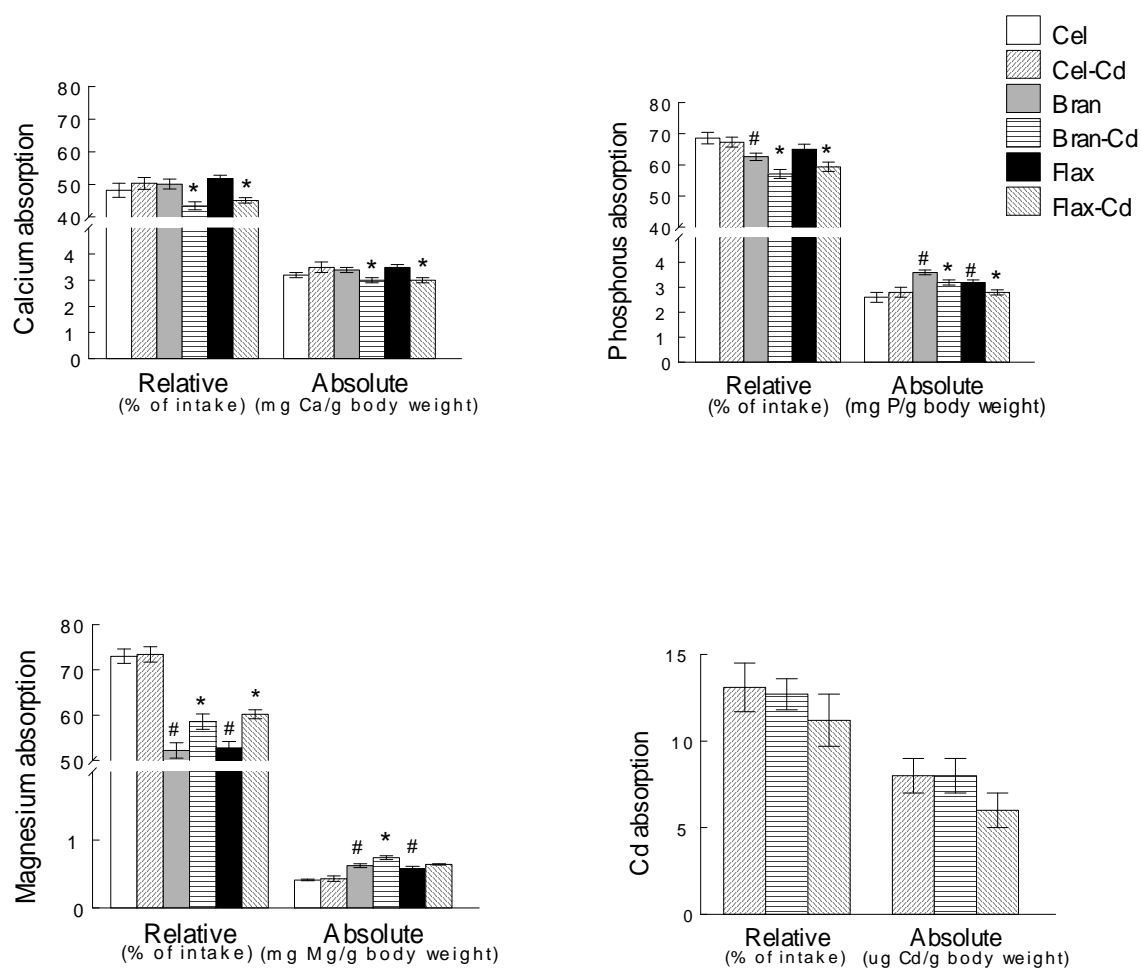


Figure 1

Apparent mineral absorption (relative and absolute) of rats fed with different fiber sources exposed or not to 50 mg Cd/kg diet. Results are mean values \pm standard error of the mean ($n=7$). Marked values differ significantly ($P<0.05$; two-way ANOVA followed by Duncan's test): * from the respective control group (same diet without Cd); # from the cel group. Cd absorption of rats fed Cd-free diets was not determined, because the Cd concentration of these diets was lower than the detection limit ($0.1 \mu\text{g/g}$ diet).

Footnote to page 1

Abbreviations: AIN, American Institute of Nutrition; ANOVA, analysis of variance; ALT, alanine aminotransferase; bw, body weight; IDF, Insoluble dietary fiber; NFE, nitrogen-free extract; NPSH, non-protein thiol groups; RW, relative weight; SDF, soluble dietary fiber, TDF, Total dietary fiber.

4. DISCUSSÃO

4.1. Efeitos de Produtos Ricos em Fibra sobre Absorção de Minerais Essenciais

As MMs podem ser suplementos dietéticos importantes tendo em vista o seu baixo custo e a possibilidade de sua incorporação à dieta habitual. Embora comprovadamente os ingredientes utilizados nas MMs contenham grande concentração de nutrientes, há dúvidas sobre o quanto estes suplementos possam realmente contribuir para o valor nutricional de dietas (Boaventura et al., 2003; Kaminski et al., 2006). Um aspecto de grande interesse em relação as MMs são os elementos minerais tendo em vista que estes suplementos normalmente têm concentrações mais altas de vários minerais em comparação com outros alimentos, mas também contêm maiores teores de fibra e de fitato, os quais podem diminuir a absorção dos minerais (Souza et al., 2002; Ferreira et al., 2005). Assim, os questionamentos em relação a MMs e minerais envolvem as quantidades e a biodisponibilidade dos minerais das próprias MMs e também o efeito da adição destes suplementos sobre a absorção dos minerais da dieta como um todo.

Tendo em vista que as MMs podem diferir bastante quanto a sua composição, nosso estudo avaliou a influência de três formulações selecionadas pelos seus diferentes teores de FA. O estudo foi em ratos, sendo que os animais receberam uma dieta básica (DB, representativa da dieta média de grupos de crianças usuárias da MM), pura ou adicionada de uma MM, de teor baixo, intermediário ou alto de FA. Também foi constituído um grupo de animais para servir de referência, o grupo AIN, que recebeu uma dieta formulada conforme as recomendações para ratos em crescimento (Reeves et al., 1993). O grupo AIN não foi comparado estatisticamente com os demais, em face das grandes diferenças de resultados, encontradas em diversas avaliações, entre este e os demais grupos, o que impediria de detectar possíveis diferenças menos pronunciadas ocasionadas pela adição das MMs à DB, objetivo de nosso estudo. Portanto, a expressão “grupos experimentais” na discussão dos resultados deste estudo refere-se somente aos grupos alimentados com a DB, acrescentada ou não de MM.

A adição das MMs no teor de 5% das dietas causou poucas alterações nas concentrações dos nutrientes analisados. Assim, o maior consumo alimentar e ganho de peso apresentados pelos animais alimentados com a MM de teor intermediário de fibra poderiam estar relacionados a uma maior palatabilidade desta dieta. No entanto, esta hipótese não explica o aumento na eficácia

alimentar apresentado pelos animais deste grupo experimental. Em função disto, presume-se que os aumentos de consumo alimentar, crescimento corporal e eficácia alimentar apresentados pelo grupo que recebeu a MM de teor intermediário de fibra na dieta sejam devido a constituintes não-analisados em nosso estudo, como vitaminas do complexo B. A DB continha grande concentração de carboidratos refinados (cereais refinados e açúcares) e, portanto, um aumento da concentração de vitaminas, especialmente a tiamina, a qual é essencial para o metabolismo dos carboidratos e também atua no crescimento (Mahan & Escott-Stump, 2002), pode ter melhorado o valor nutricional da DB.

Embora a absorção de minerais tenha sido avaliada em dois períodos, para avaliar se haveria diferença de absorção em função da maior adaptação à dieta, não foram observadas alterações relevantes nas absorções relativas entre os dois períodos, sendo que a maior absorção absoluta no segundo período pode ser atribuída somente ao maior consumo de alimentos em função do crescimento natural dos animais. Observando-se a concentração de mineral nas MMs, observa-se que a MM com baixa concentração de fibra, também apresentou a menor concentração de minerais. Além disso, a alta concentração de carboidratos refinados (farinhas) nesta MM, a descaracteriza em relação às MMs em geral, mais ricas em fibra e minerais e com menor quantidade de carboidratos digeríveis (Callegaro et al., 2004; Kaminski et al., 2006). Portanto, a adição de minerais à DB ocorreu quase que unicamente pela adição das outras duas MMs, a de intermediário e a de alto teor de fibra. Quanto aos minerais avaliados neste trabalho, pode-se dividi-los em dois grupos: aqueles presentes nas MMs em teores que não chegaram a causar alterações em suas concentrações nas respectivas dietas (Ca e Cu) e aqueles presentes nas MMs em teores mais elevados, que resultaram em elevação significativa de suas concentrações nas dietas (P, Mg e Mn).

Observando-se os dados de absorção do Ca e do Cu, cuja concentração nas dietas não foi alterada pela suplementação com qualquer MM, percebe-se que, de modo geral, a absorção (tanto relativa quanto absoluta) foi semelhante para todos os grupos experimentais, indicando que quase não houve interferência das MMs na absorção destes minerais. Com relação ao Ca, no entanto, observou-se uma pequena diminuição na absorção relativa (%) causada pela MM de alto teor de fibra no segundo período de coleta de fezes. Presume-se que esta diminuição na absorção se deu por alguma ligação do Ca com farelos da MM, tendo em vista que alguns estudos já demonstraram a ligação de Ca pelos farelos de cereais (Idouraine et al., 1996; Harrington et al.,

2001). No entanto, a pequena diferença na absorção relativa (%) não chegou a se refletir em diferença na absorção absoluta, o que indica que, em nossas condições experimentais, a MM rica em fibra não chegou a interferir significativamente na absorção do Ca total. Ainda assim, tendo em vista que MMs ricas em fibra podem ser utilizadas em maiores concentrações nas dietas, considera-se importante que MMs deste tipo também incluam uma fonte adicional de Ca, o que já é praticado pela Pastoral da Criança em algumas formulações, as quais incluem pó de casca de ovo.

Em relação ao P, Mg e Mn, para os quais observou-se um aumento significativo das concentrações nas dietas pela adição das MMs de intermediário e alto teor de fibra, observou-se um aumento da absorção absoluta dos animais, embora tenha havido variações quanto aos dados de absorção relativa entre estes três elementos. Com relação ao P, sabe-se que seu aumento nas dietas se deu principalmente na forma de fitato, tendo em vista que os farelos (principais fontes do P das MMs de intermediário e alto teor de fibra) contêm cerca de 80% de seu fósforo na forma de fitato (Reddy et al., 1989). Nossos resultados demonstram que parte deste fósforo-fítico pode ser biodisponível para ratos, o que está de acordo com dados de estudos anteriores sobre absorção de fósforo de farelo de cereais (Shah et al., 1990; Lopez et al., 2000; Souza et al., 2002). No entanto, estes resultados não podem ser transpostos para humanos porque, enquanto os ratos contêm fitase no intestino, a qual hidrolisa o ácido fítico liberando fósforo para absorção, a atividade intestinal da fitase em humanos é muito limitada (Rao & Ramakrishnan, 1986; Iqbal et al., 1994). A maior absorção absoluta do Mg pelos ratos que receberam a adição das MMs com intermediário e alto teor de fibra está de acordo com estudos anteriores que demonstraram a biodisponibilidade do Mg de farelo de cereais em ratos (Lopez et al., 2000) e também em humanos (Reinhold et al., 1976; Sandberg et al., 1982). Além disso, Barbosa et al. (2006) destacaram a relevante concentração de Mg em algumas MMs e nossos dados evidenciam que MMs ricas em farelo podem ser fonte importante de Mg. Da mesma forma como observado para o Mg, nossos dados também indicam que as MMs de intermediário e alto teor de fibra, podem representar fontes relevantes de Mn. Este resultado confirma observações prévias de outros estudos, os quais, avaliando composição de diversas MMs, consideraram grande parte delas fontes potenciais de Mn (Vizeu et al., 2005; Kaminski et al., 2006).

Concluindo, como observado anteriormente por outros autores (Siqueira et al., 2001; Souza et al., 2002; Ferreira et al., 2005), nossos resultados indicam que MMs podem representar

uma fonte de minerais tendo em vista que as MMs com maior teor de fibras aumentaram as concentrações de P, Mg e Mn nas dietas com conseqüente aumento da absorção absoluta aparente destes minerais, sem interferência na absorção absoluta aparente do Ca e do Cu. Observou-se também, com relação ao P, Mg e Mn, que o aumento de suas concentrações nas MMs – e conseqüentemente nas dietas- foi diretamente relacionado com os teores de fibra das MMs, o qual foi relacionado com a quantidade de farelo de cereais nas formulações. No entanto, deve-se ter cautela em transpor estes resultados para humanos, tendo em vista algumas diferenças biológicas entre ratos e humanos, como os níveis de requerimentos de minerais e a atividade da fitase intestinal. Apesar disto, os resultados deste estudo são indicativos de que estes suplementos de baixo custo podem ser utilizados como fonte de elementos minerais. Há necessidade de mais estudos, com diferentes dietas e diferentes formulações de MMs com o fim de elucidar melhor quais dietas requerem suplementação deste tipo, bem como as formulações e quantidades de MMs que melhor podem contribuir para a melhoria nutricional de cada padrão de dieta.

No Manuscrito 2 apresentamos os resultados relativos ao ensaio biológico no qual comparamos três diferentes fontes de fibra quanto ao seu efeito sobre a retenção e toxicidade do Cd e também quanto à absorção dos macrominerais Ca, P e Mg. No presente item discutiremos, separadamente, o efeito das fontes de fibras sobre a absorção dos macrominerais. Portanto, nos deteremos aos resultados dos grupos não-expostos ao Cd.

O objetivo do estudo foi comparar fontes de fibra com diferentes proporções de fibra insolúvel e solúvel. A celulose microcristalina (recomendada para dieta padrão de ratos) foi substituída pelo farelo de trigo ou pela linhaça como fontes de fibra, sempre visando obter a mesma concentração de fibra nas dietas (5% de fibra alimentar total - FAT). As dietas foram nutricionalmente equilibradas para ratos em crescimento (Reeves et al., 1993), inclusive em minerais. A dieta com celulose apresentou fibra quase totalmente insolúvel, enquanto as dietas com farelo de trigo e linhaça apresentaram relação fibra alimentar insolúvel/fibra alimentar solúvel (FAI/FAS), respectivamente de 11 e 2,6.

As diferentes fontes de fibras não alteraram expressivamente a concentração de Ca das dietas, nem absorção aparente do Ca (relativa ou absoluta). Embora alguns autores tenham observado redução da absorção de Ca pela substituição de celulose por farelo de trigo em ratos (Harrington et al., 2001), nossos resultados estão de acordo com outros autores, que em modelo

experimental semelhante ao nosso, não encontraram tal efeito (Shah et al., 1990). Ainda, embora já tenha sido observado aumento da absorção de Ca pela adição de fibras solúveis na dieta (Younes et al., 2001; Coudray et al., 2003), neste caso, a fibra solúvel da linhaça não chegou a influenciar na absorção aparente do Ca. Como destacam Filisetti e Lobo (2007) a absorção de minerais, como o Ca, torna-se importante no intestino grosso (onde FS podem aumentar absorção de minerais) quando a sua absorção é mais limitada no intestino delgado, o que não parece ter acontecido neste ensaio, já que as dietas continham quantidades adequadas de Ca para os animais.

A substituição de celulose por farelo ou linhaça, aumentou a concentração de fósforo nas dietas, proporcionalmente a concentração de P destes produtos, isto é o aumento foi maior pela adição do farelo de trigo. Observou-se uma diminuição na absorção relativa (%) nos grupos que receberam as dietas com maior concentração de P, mas, assim mesmo, um aumento da absorção absoluta nestes grupos, denotando que parte do P do farelo de trigo e da linhaça foi absorvida pelos ratos. Resultados semelhantes, isto é, redução da absorção relativa acompanhado de aumento da absorção absoluta, foram obtidos por Shah et al. (1990) e Lopez et al. (2000), utilizando farelos de cereais em dietas de ratos. A concentração de Mg aumentou significativamente nas dietas pela substituição da celulose pelo farelo de trigo e pela linhaça. De forma semelhante ao que ocorreu para o P, o aumento da concentração de Mg nas dietas refletiu em diminuição da absorção relativa, mas, mesmo assim, um aumento na absorção absoluta deste mineral. Outros autores também observaram diminuição da absorção relativa e aumento da absorção absoluta do Mg pela adição, em dietas de ratos, de produtos ricos neste mineral (Shah et al., 1990; Toba et al., 1999).

O aumento da absorção absoluta de P e Mg nos animais que receberam linhaça como fonte de fibra, não parece relacionado com a maior proporção de fibra solúvel da linhaça, tendo em vista que ocorreu semelhantemente nos animais que receberam farelo como fonte de fibra. Este aumento parece relacionado com o aumento luminal da concentração dos minerais do mesmo modo que parece ter ocorrido no caso das MMs para estes minerais e também para o Mn.

Concluindo, os produtos alimentícios ricos em fibra avaliados em nossos estudos estão entre aqueles que, ao adicionar fibra, também adicionam minerais às dietas. No entanto, considera-se importante chamar atenção para o fato de que estes produtos adicionam apenas alguns minerais entre aqueles avaliados em nosso trabalho.

4.2. Efeito de produtos ricos em fibra sobre a acumulação e toxicidade do Cd

Tendo em vista que a dieta é a principal fonte de Cd para populações não-fumantes e não expostas ocupacionalmente (WHO, 1992; ATSDR, 2008), e que a meia-vida do mesmo é bastante longa no organismo humano (até 26 anos; WHO, 1992; ATSDR, 2008) é importante identificar alimentos ou constituintes alimentares que possam reduzir a absorção e toxicidade deste metal. Neste estudo, investigou-se o efeito de produtos alimentares ricos em fibra, as quais potencialmente ligam metais.

No primeiro estudo (Artigo 1) utilizou-se uma MM rica em fibra e também em minerais essenciais visando avaliar seu efeito em ratos alimentados com uma dieta com algumas deficiências nutricionais (DB, a qual simulava a dieta média de um grupo de crianças consumidoras de MMs). Os ratos foram submetidos a dois níveis de exposição ao Cd. Considerando as necessidades nutricionais dos ratos (Reeves et al., 1993), a adição da MM melhorou a dieta quanto ao teor dos minerais Cu, Mn e Ca, sendo que o teor de fibra da DB já era um pouco elevado e a adição da MM causou um aumento adicional deste constituinte. A MM não foi eficaz no maior nível de exposição ao Cd (25 mg/kg dieta), tendo em vista que não reverteu qualquer dos efeitos causados pelo metal nesta dose (diminuição da ingestão e eficácia alimentar e do crescimento, dano hepático ou renal) e não interferiu na retenção de Cd no rim. No entanto, a MM diminuiu a retenção de Cd no rim dos animais expostos a 5 mg Cd/kg de dieta, resultado relevante, tendo em vista que a retenção de Cd renal é representativa da absorção intestinal do metal (WHO, 1992; Lind et al., 1997). Não tendo sido detectados efeitos tóxicos do Cd nesta dose (provavelmente pelo período relativamente pequeno de exposição – 30 dias), não foi possível avaliar a eficácia da MM neste sentido. Apesar disto, considera-se de relevância o resultado obtido, tendo em vista que o menor nível de exposição utilizado no estudo se aproxima de níveis de exposição em algumas áreas contaminadas (Whelton et al., 1997; Noël et al., 2004). Postula-se que o efeito da MM na diminuição da acumulação renal de Cd tenha sido proporcionado pelo fato que a mesma adicionou fibras e minerais à dieta dos animais. A fibra adicionada pela MM se constitui principalmente de fibra de farelo de cereais (trigo e arroz) os quais podem ter diminuído a absorção intestinal do Cd. Estudos *in vitro* já demonstraram a afinidade de farelos pelo Cd (Persson et al., 1991; Ou et al., 1999). Além disso, alguns estudos

demonstraram que dietas contendo farelo de trigo reduziram a biodisponibilidade de Cd (da dieta) em roedores expostos a baixos teores de Cd (Moberg et al., 1997; Lind et al., 1998; House et al., 2003). Por outro lado, tendo em vista que estudos já demonstraram biodisponibilidade de minerais essenciais de MMs semelhantes (Siqueira et al., 2001; Souza et al., 2002; Ferreira et al., 2005), presume-se que a MM usada tenha melhorado o balanço de minerais da dieta. Sabe-se que deficiências de Ca, Fe e Zn podem aumentar a absorção e retenção de Cd e que o aumento destes minerais na dieta reduz a absorção e retenção de Cd em mamíferos (WHO, 1992; Reeves e Chaney, 2008). Neste estudo, provavelmente não houve ação da adição de Fe e Zn, tendo em vista que o aumento das concentrações destes minerais na dieta, pela adição da MM, foi pequeno, além do fato de que, de acordo com as recomendações para ratos (Reeves et al., 1993), os mesmos já estavam em níveis satisfatórios na DB. A adição de Ca pela MM, no entanto, embora pequena (33%), pode ter ajudado na menor retenção renal de Cd.

Para explicar a falta de eficácia da MM em prevenir a acumulação renal do Cd e os danos produzidos pelo metal na dose mais alta (25 mg/kg dieta), propõem-se que as concentrações intestinais de Cd produzidas por esta dose tenham ficado acima do ponto de saturação dos sítios de ligação da fibra da MM, ocultando o efeito da mesma. Além disso, o Ca adicional do suplemento que pode ter feito diferença na absorção de Cd no nível de 5 mg/kg de dieta, pode não ter sido capaz de competir com o metal pelos sítios de absorção intestinal, quando este foi ingerido em concentração maior.

Considera-se importante enfatizar ainda o fato de que a DB usada no estudo apresentou maior teor de FA (6,8%) do que o recomendado para ratos (5%) (Reeves et al., 1993), o que pode ter contribuído para o pequeno efeito da MM na acumulação de Cd. Neste sentido, considera-se importante realizar outros estudos para avaliar o efeito de MMs contra a toxicidade do Cd em animais submetidos a dietas com baixos teores de fibra. Além disto, como as MMs são formuladas com composição variável, os resultados obtidos neste estudo não podem ser extrapolados para as MMs em geral. Portanto, consideram-se necessários estudos com diferentes MMs, por períodos de tempo mais longos, com níveis de Cd nas dietas compatíveis aqueles encontrados em contaminações ambientais, para uma melhor avaliação da efetividade destes suplementos na prevenção da toxicidade do Cd em exposições crônicas.

Foi realizado um segundo estudo com ratos em crescimento para avaliar o efeito de produtos ricos em fibra em relação à exposição ao Cd (Manuscrito 2). Considerando as

diferenças de ação já conhecidas entre constituintes solúveis e insolúveis da fibra em relação à absorção de minerais (Ruiz-Roso et al., 2001; Filisetti e Lobo, 2007), comparou-se produtos com diferentes proporções de fibra insolúvel:fibra solúvel (farelo de trigo= 11 e linhaça= 2.6). Neste estudo, objetivando evidenciar melhor o efeito da fonte de fibra em si, trabalhou-se com dietas nutricionalmente balanceadas conforme as recomendações para ratos em crescimento (dieta AIN - Reeves et al., 1993), substituindo-se apenas a fonte de fibra padrão (celulose purificada, quase totalmente insolúvel) pelas fontes de fibra testadas, mantendo-se similares as concentrações de fibras nas dietas. Tendo em vista que a absorção oral de Cd diminui consideravelmente quando a dieta é nutricionalmente balanceada (WHO, 1992; ATSDR, 2008), decidiu-se usar uma concentração maior de Cd (50 mg/kg dieta), visando provocar efeitos tóxicos detectáveis pelos parâmetros disponíveis em nossas condições de trabalho e, conseqüentemente, comparar as diferentes fontes de fibra quanto aos seus potenciais em revertê-los. O período experimental foi o mesmo do ensaio anterior, 30 dias. Realmente, os ratos expostos a 50 mg/kg de Cd neste estudo apresentaram menores ingestão de alimentos, ganho de peso corporal e coeficiente de eficácia alimentar, além de menor peso relativo de gordura epididimal (medida de adiposidade em roedores, Donovan et al., 2009) em relação aos ratos dos respectivos grupos-controle. A dieta com farelo de trigo preveniu os efeitos do Cd com relação ao consumo de alimentos e ganho de peso corporal, mas, tendo em vista, que não preveniu os efeitos sobre a eficácia alimentar e gordura epididimal, presumiu-se que o efeito do farelo em prevenir a perda de peso induzida pelo Cd deveu-se a sua característica sensorial. Provavelmente o sabor de tostado mais agradável do farelo mascarou o sabor do Cd e, assim, preveniu a redução do consumo com a conseqüente prevenção da perda de peso.

A concentração hepática de Cd foi estatisticamente maior no grupo linhaça em relação aos grupos celulose e farelo. Tendo em vista resultados de estudos anteriores, deduz-se que esta concentração hepática de Cd se deva a maior proporção de fibra solúvel na linhaça em relação ao farelo e a celulose. Rose e Quarterman (1987) observaram que as suplementações de dietas com fibras solúveis (alginatos, pectinas, agar e carragenas) aumentaram as concentrações hepáticas e renais de Cd em ratos, em comparação com os animais que receberam celulose como fonte de fibra. Similarmente, num outro estudo (Lind et al., 1998), a fibra de beterraba, a qual tem relevante concentração de fibra solúvel, aumentou a concentração de Cd no fígado e rins de ratos em comparação a animais que receberam farelo de trigo como fonte de fibra. O aumento da

retenção tecidual de Cd pela linhaça, em nosso estudo, provavelmente se deu pela fermentação da porção solúvel da fibra no intestino grosso, já que estudo anterior demonstrou que a fibra da linhaça é bastante fermentada (Swanson et al., 2001). Sabe-se que a absorção de minerais essenciais, principalmente Ca e Mg, pode aumentar pela adição de fibras solúveis na dieta. Tendo em vista as evidências da fermentação destas fibras no intestino grosso, os mecanismos propostos para o aumento da absorção dos minerais têm sido aqueles decorrentes da acidificação do meio intestinal, quais sejam: solubilização dos minerais, troca iônica nos ácidos graxos de cadeia curta (formados pela fermentação da fibra), os quais carreariam minerais durante sua absorção e, ainda, a hidrólise do fitato diminuindo sua capacidade de complexação de minerais (Lopez et al., 2000; Coudray et al., 2003). Propõe-se que mecanismos similares possam estar envolvidos numa maior absorção do Cd provocada pela linhaça, com conseqüente aumento da retenção tecidual. Curiosamente, a absorção do Cd pelo grupo linhaça foi semelhante àquela encontrada para os grupos celulose e farelo de trigo. No entanto, é importante considerar que a medida de absorção aparente utilizada neste estudo é calculada pela diferença entre a quantidade de metal ingerido e a quantidade de metal excretado pelas fezes. Esta técnica, portanto, não distingue o metal da dieta do metal endógeno, isto é, aquele que foi anteriormente absorvido e, no período de coleta das fezes, possa estar sendo secretado no meio intestinal. Tendo em vista que relevante quantidade de Cd já absorvida pode ser secretada no meio intestinal por via biliar e via descamação de células intestinais (Klaassen e Kotsonis, 1977; ATSDR, 2008), presume-se que a maior secreção de Cd endógeno, resultante de uma maior absorção anterior do metal pelos animais do grupo linhaça, possa ter mascarado a medida de absorção aparente, que foi realizada por coleta de fezes no período final do experimento (entre o 18º e o 29º dias).

Por outro lado, o grupo-farelo de trigo apresentou retenção de Cd similar ao grupo-celulose. Diversos estudos anteriores evidenciaram uma diminuição da biodisponibilidade ou da acumulação de Cd pela adição de farelo a dietas de roedores (Moberg et al., 1997; Lind et al., 1998; House et al., 2003). No entanto, estes estudos utilizaram dietas com concentrações de Cd bem menores do que a utilizada neste trabalho. Tendo em vista o resultado observado no artigo 1, em que a MM rica em farelos reduziu a retenção renal de Cd quando este foi fornecido na concentração de 5 mg/kg de dieta e não teve tal efeito nos animais que receberam 25 mg Cd/kg de dieta, presume-se, como colocado anteriormente, que no caso da maior concentração de Cd intestinal, o efeito da fibra do farelo seja ocultado.

Com relação aos demais parâmetros hepáticos, observou-se que nenhuma fonte de fibra reverteu o dano hepático evidenciado pelo aumento da atividade da enzima Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP) no plasma e nem alterou *per se* os níveis de grupos sulfidrílicos não-proteicos hepáticos, os quais também não foram alterados pelo Cd, apesar de ser conhecida a afinidade do metal por grupos sulfidrílicos.

O Cd acumulado no rim (de 16 a 21 $\mu\text{g/g}$ tecido) não chegou a causar dano renal evidenciável pelos parâmetros utilizados, ou seja, o Cd não causou alteração no peso relativo do rim ou na concentração de NPSH tecidual, nem nos níveis plasmáticos de creatinina, em qualquer dos grupos. De fato, estudos anteriores têm indicado que o dano renal ocorre somente após períodos de exposição mais longos e/ou maiores concentrações de Cd na dieta do que aqueles utilizados neste estudo (Groten et al., 1994; Haouem et al., 2007). A ausência de grandes danos renais na presença de Cd em concentrações relativamente altas está relacionada ao papel protetor das metalotioneínas, tendo em vista que, o rim pode, ao fazer a síntese de novo destas proteínas, manter grande parte do Cd ligado em forma inerte (Klaassen et al., 2009). Como foi observado para o fígado, a linhaça também ocasionou um aumento da retenção de Cd no rim, o que se considera relacionado com o maior teor de fibra solúvel desta fonte de fibra, conforme discutido acima.

No que diz respeito aos macrominerais essenciais, observou-se efeito do Cd em relação a sua absorção aparente. O efeito do Cd reduzindo a absorção e utilização do Ca já foi devidamente evidenciado em mamíferos (WHO, 1992; ATSDR, 2008) e sabe-se que a utilização de outros minerais, como o P, também pode ser diminuída por ação do metal (Brzóska e Moniuszko-Jakoniuk, 2005). Neste estudo (Manuscrito 2), o Cd reduziu a absorção aparente do Ca e do P e aumentou a do Mg nos grupos farelo e linhaça, mas não no grupo celulose. Nossa hipótese para explicar tais alterações está baseada na ação do fitato. Esta substância, que pode apresentar até seis grupos fosfato, provavelmente é responsável pela maior absorção absoluta de P nos grupos farelo de trigo e linhaça sem Cd, tendo em vista que está presente nas fontes de fibra daqueles grupos e não na celulose, e que ratos apresentam fitase intestinal ativa (Rao & Ramakrishnan, 1986). Sabe-se que o fitato pode formar complexo com o Ca, reduzindo sua absorção (Plaami, 1997; Harrington, 2001). Provavelmente a fração não-hidrolisada do fitato ligou Ca, cuja absorção foi em parte impedida pela presença de Cd, e o complexo fitato-Ca, não sendo absorvido, aumentou a quantidade de P e de Ca nas fezes. Sabe-se que o fitato também é

capaz de ligar Mg, mas parece ter menor afinidade por este elemento do que pelo Ca (Coudray et al., 2003). Portanto, propõem-se que, nos grupos linhaça-Cd e farelo-Cd, o fitato, formando complexo com o Ca, ficou menos disponível para interagir com o Mg e, conseqüentemente, mais Mg foi mantido livre para absorção.

Os resultados deste estudo indicam um efeito conjunto do Cd e das fontes de fibra linhaça e farelo de trigo na absorção de Ca, P e Mg e presume-se que este efeito tenha relação com o fitato. Embora o nosso modelo experimental não permita identificar quais substâncias do farelo de trigo e da linhaça realmente interajam com o Cd, alterando a absorção mineral, considera-se que os resultados tenham importância prática porque indicam efeitos de suplementos dietéticos bastante consumidos como fonte de fibra. É importante que a possível interação Cd-fitato seja estudada, tendo em vista, que a sua confirmação pode trazer mais subsídios para a escolha da dieta em áreas de contaminação endêmica de Cd, visando diminuir o comprometimento ósseo causado pelo metal. Além disso, tendo em vista que a linhaça é uma das plantas identificadas como acumuladoras de Cd (Grant et al., 2008) e que nosso estudo indicou um potencial de suas sementes em aumentar a retenção do metal no organismo animal, considera-se necessária a realização de mais estudos sobre os efeitos da ingestão da linhaça sobre a acumulação e toxicidade do Cd.

5. CONCLUSÕES

- As multimisturas, usadas como suplementos na proporção de 5% da dieta, aumentaram a absorção absoluta aparente de fósforo, magnésio e manganês, proporcionalmente ao seu teor de fibra alimentar, não chegando a interferir na absorção de cálcio e cobre em ratos em crescimento, o que sugere que estes suplementos podem ser fonte de minerais na dieta e, pelo menos em baixas proporções, não reduziram a sua absorção.

- Uma multimistura a base de farelo de cereais, rica em fibra e em minerais essenciais, reduziu a acumulação de Cd renal em ratos, apenas após a exposição a menor dose de Cd estudada (5 mg/kg de dieta), sem apresentar efeito sobre a toxicidade do Cd utilizado em dose maior (25 mg/kg de dieta). No entanto, a dose de 5 mg/kg dieta é compatível com os níveis de exposição humana em algumas áreas contaminadas, sugerindo que a multimistura poderia contribuir para reduzir a exposição oral ao Cd em regiões poluídas.

- A linhaça parcialmente desengordurada usada como fonte de fibra aumentou a quantidade de Cd retido no fígado e rins de ratos em crescimento em comparação com a celulose purificada e o farelo de trigo, indicando que fontes alimentares com maior proporção de fibra solúvel podem aumentar deposição corporal de Cd e sugerindo que deve haver cuidado na ingestão destas fontes em regiões contaminadas com Cd;

- A linhaça e o farelo de trigo, usados como fonte de fibra alimentar para ratos expostos ao Cd, reduziram a absorção aparente do cálcio e do fósforo e aumentaram a absorção aparente de magnésio em comparação a celulose purificada, o que pode ser atribuído a uma interação do Cd com o fitato presente naquelas fontes de fibra.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service, 2008.

AMBIENTE BRASIL CENTRO DE ESTUDOS. PLANO DE MANEJO DO PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO BRIGADEIRO. Avaliação Limnológica e Qualidade da Água do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. Relatório parcial. Minas Gerais, 2006. Disponível em www.iracambi.com

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS (AACC). The definition of dietary fiber. Cereal Foods World, v. 46, p. 112-126, 2001.

AOSHIMA, K.; FAN, J.; CAI, Y.; KATOH, T. TERANISH, H.; KASUYA, M. Assessment of bone metabolism in cadmium-induced renal tubular dysfunction by measurements of biochemical markers. Toxicology Letters, v. 136, p. 183-192, 2003.

ASAGBA, S.O.; OBI, F.O.A. A comparative evaluation of the biological effects of environmental cadmium-contaminated control diet and laboratory-cadmium supplemented test diet. Biometals, v. 18, p. 155-161, 2005.

ASP, N.G.; JOHANSSON, C.G. Dietary fibre analysis. Nutrition Abstracts and Reviews. Reviews in clinical nutrition, v. 54, p 735-752, 1984.

BARBOSA, C.O., LOPES, I.B.M., MORGANO, M.A., ARAÚJO, M.A.M., MOREIRA-ARAÚJO, R.S.R. Conteúdo de minerais de ingredientes e da multimistura. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26 p. 916-920, 2006.

BATIFOULIER, F.; VERNY, M.-A.; CHANLIAUD, E.; RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C. Variability of B vitamin concentrations in wheat grain, milling fractions and Bread products. European Journal of Agronomy, v.25, p. 163-169, 2006.

BITTENCOURT, S.A. Uma alternativa para a política nutricional brasileira. Cadernos de Saúde Pública, v. 14, p. 629-636, 1998.

BOAVENTURA, G.T.; LIMA E SILVA, R.H.; TOSTES, L.F.; AZEREDO, V.B. Ganho de peso, hemoglobina e hematócrito de ratos recebendo dieta de Quissamã, RJ, com ou sem suplemento alimentar alternativo. Revista de Nutrição, v. 16, p. 321-331, 2003.

BORGES, L.P.; BRANDÃO, R.; GODOI, B.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. Chemico-Biological Interactions, v. 171, p. 15-25, 2008.

BORGES, R.C.; COSTA, M.C.R.; SANTOS, G.A.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; OLIVEIRA, C.; MAZUR, N. Concentrações de cádmio no solo, água, plantas e sedimentos em

áreas rurais próximas a uma indústria de reciclagem de chumbo no vale do rio Paraíba do Sul – SP. Revista da Universidade Rural, Série Ciência Vida. EDUR, v. 24, p. 45-50, 2004.

BORYCKA, B.; STACHOWIAK, J. Relations between cadmium and magnesium and aronia fractional dietary fibre. Food Chemistry, v. 107, p 44–48, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 360 de 23 de Dezembro de 2003. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 12 de Novembro de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.263 de 22 de Setembro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 12 de Novembro de 2009.

BRONER, F.; PANSU, D. Nutritional aspects of calcium absorption. The British Journal of Nutrition, v. 129, p. 9-12, 1999.

BRZÓSKA, M. M.; JAKONIUK, J. M. Effect of chronic exposure to cadmium on the mineral status and mechanical properties of lumbar spine of males rats. Toxicology Letters, v. 157, p. 161-172, 2005.

BRZÓSKA, M.M.; MAJEWSKA, K.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Bone mineral density, chemical composition and biomechanical properties of the tibia of female rats exposed to cadmium since weaning up to skeletal maturity. Food and Chemical Toxicology, v. 43, p. 1507-1519, 2005.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S. Composição polissacarídica: estrutura da parede celular e fibra alimentar. cap. 3, p. 43-60. In: Lajolo, F. M. et al. Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud. São Paulo: Varela, 472 pp., 2001.

CALLEGARO, M. G. K.; SOARES, I. H.; KAMINSKI, T. A.; BOLZAN, A. A., FELL, E. R. Composição de "Multimisturas" utilizadas na região central do Rio Grande do Sul. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Recife, 07-10 de Setembro de 2004. CD-Rom.

CALLEGARO, M. G.; TIRAPÉGUI, J. Comparação do Valor Nutricional Entre Arroz Integral e Polido. Arquivos de Gastroenterologia, v. 33, p. 225-232, 1996.

CARDOSO, L.; CHASIN, A.; Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos. Série Cadernos de Referência Ambiental. Centro De Recursos Ambientais. Salvador, BA, v. 6, 2001.

CHAN, D. Y. ; BLACK, W.; HALE, B. Bioaccumulation of Cadmium from Durum Wheat Diets in the Livers and Kidneys of Mice Bull. Environ. Contam. Toxicol. v. 64, p. 526-533, 2000.

CHATER, S.; DOUKI, T.; GARREL, C.; FAVIER, A.; SAKLY, M.; ABDELMELEK, H. Cadmium-induced oxidative stress and DNA damage in kidney of pregnant female rats. *C. R. Biologies*, v. 331 p. 426–432, 2008.

CHO, S.; CLARK, C.; JENAB, MAZDA J. The influence of wheat fiber and bran on mineral nutriture. IN: CHO, S.S.; DREHER, M.L. *Handbook of dietary fiber*. New York: Marcel Dekker, 2001. 896 pg.

CHO, S.S.; DREHER, M.L. *Handbook of dietary fiber*. New York: Marcel Dekker, 2001. 896 pg.

COUDRAY, C.; COUDRAY, C. F.; RAMBEAU, M.; TRESSOL, E. G.; MAZUR, A.; RAYSSINGUIER, Y. The effect of aging on intestinal absorption and status of calcium, magnesium, zinc, and copper in rats: A stable isotope study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 20, p. 73-81, 2006.

COUDRAY, C.; TRESSOL, J. C.; GUEUX, E.; RAYSSINGUIER, Y. Effects of inulin-type fructans of different chain length type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *European Journal of Nutrition*, v. 42, n. 2, p. 91-98, 2003.

CREWS, H.M.; OWEN, L.M.; LANGFORD, N.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; FOX, T.E.; HUBBARD, L.; PHILLIPS, D. Use of the stable isotope (¹⁰⁶Cd) for studying dietary cadmium absorption in humans. *Toxicology Letters*, v. 112/113, p. 201–207, 2000.

DERIVI, S.C.N.; MENDEZ, M.H.M. Uma visão retrospectiva da fibra e doenças cardiovasculares, cap 30, p. 411-430. In: Lajolo, F. M. et al. *Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud*. São Paulo: Varela, 472 pp., 2001.

DREHER, M.L. Dietary fiber overview. IN: CHO, S.S.; DREHER, M.L. *Handbook of dietary fiber*. New York: Marcel Dekker, 2001. 896 pg.

EASTWOOD, M.; KRITCHEVSKY, D. Dietary fiber: how did we get where we are? *Annual Reviews of Nutrition*, v. 25, p. 1-8, 2005

EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; KEDWANY, F.S.; BAGHDADI, H.H. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role vitamin E and β -carotene. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p.1563-1571, 2004.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Agriculture Research Service, 2009, USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Release 22. Nutrient Data Laboratory Home Page. Disponível em URL: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>

ESTADOS UNIDOS. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients). Washington, D.C., National Academies Press, 2005. Disponível em URL: <http://www.nap.edu>.

FARFAN, J. A.; Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 14, p. 205-212, 1998.

FERREIRA, H. S.; ASSUNÇÃO, M. L.; FRANÇA, A. O. S.; CARDOSO, E. P. C.; MOURA, F. A. The effectiveness of the “multimixture” as supplement to mineral and/or vitamin deficient diets, promoting weight gain in rats submitted to post-natal under-nourishment. Revista de Nutrição, v.18, p. 63-67 2005.

FILISSETTI, T. M. C. C.; LOBO, A. R. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais, cap. 7, p. 175-215. In: Cozzolino, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. Barueri: Manole, 2007.

GRANT, C.A.; CLARKE, J.M.; DUGUID, S.; CHANEY, R.L. Selecting and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. Science Total Environmental, v. 390, p. 301-310, 2008.

GROTEN, J.P.; KOEMAN, J.H.; NESSELROOIJ, J.H.J.; LUTEN, J.B.; VLISSINGEN, J.M.F.; STENHUIS, W.S.; BLADEREN, J.P. Comparison of renal toxicity after long-term oral administration of cadmium chloride and cadmium-metlothionein in rats. Fundamental and applied toxicology, v. 23, p. 544-552, 1994.

GROTEN, J.P.; SINKELDAM, E.J.; LUTEN, J.B.; BLADEREN, J.P. Cadmium accumulation and metallothionein concentrations after 4-week dietary exposure to cadmium chloride or cadmium-metallotionein in rats. Toxicology and Applied Pharmacology, v.111, p. 504-513, 1991.

HAOUEM, S.; HMAD, N.; NAJJAR, M. F.; EL HANI, A.; SAKLY, R. Accumulation of cadmium and its effects on liver and kidney functions in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. Experimental and Toxicology Pathology, v. 59, p. 77-88, 2007.

HARLAND, B. F.; Dietary fibre and mineral bioavailability. Nutrition Research Reviews, v. 2, p. 133-147, 1989.

HARLAND, B.F.; NARULA, G. Dietary fiber and mineral interaction. IN: CHO, S.S.; DREHER, M.L. Handbook of dietary fiber. New York: Marcel Dekker, 2001. 896 pg.

HARRINGTON, M. E.; FLYNN, A.; CASHMAN, K. D. Effects of dietary fibres extracts on calcium absorption in the rat. Food Chemistry, v. 73, p.263-269, 2001.

HISPARD, F.; VAUFLEURY, A.; MARTIN, H.; DEVAUX, S.; COSSON, R.P.; SCHEIFLER, R.; RICHERT, L.; BERTHELOT, A.; BADOT, P.M. Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 70, p. 490-498, 2008.

HOSENEY, R. C. Principles of cereal science and technology. 2. ed. St. Paul: American Assoc. of Cereal Chem, 1990, 327p.

HOUSE, W.A.; HART, J.J.; NORVELL W.A.; WELCH, R.M. Cadmium absorption and retention by rats fed durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) grain. *British Journal of Nutrition*, v. 89, p. 499-508, 2003.

HWANG, D.F.; WANG, L.C. Effect of taurine on toxicity of cadmium in rats. *Toxicology*, v. 167, p. 173–180, 2001.

IDOURAINE, A. KHAN, M.J.; WEBER, C.W. *In-vitro* binding capacity of wheat bran, rice bran, and oat fiber for Ca, Mg, Cu, and Zn alone and in different combinations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 2067-2072, 1996.

IQBAL, T.H.; LEWIS, K.O.; COOPER, B.T. Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut*, v. 35, p. 1233-1236, 1994.

JURCZUK, M.; BRZÓSKA, M. M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J.; GALAZIN-SIDORCZUK, M.; KULIKOWSKA-KARPINSKA, E. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 429-438, 2004.

KAMINSKI, T.A.; SILVA, L.P.; BAGETTI, M. Composição centesimal e mineral de diferentes formulações de multimisturas provenientes da região central do Rio Grande do Sul. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 65, p. 186-193, 2006.

KAMINSKI, T.A.; SILVA, L.P.; BAGETTI, M.; MONEGO, M.A.; MOURA, G.B. Diferentes formulações de multimisturas sobre a resposta biológica em ratos. *Ciência Rural*, v. 38, p. 2327-2333, 2008.

KIYOZUMI, M.; MISHIMA, M.; NODA, S.; MIYATA, K.; TAKAHASHI, Y.; MIZUNAGA, F.; NAKAGAWA, M.; KOJIMA, S. Studies on poisonous metals IX. Effects of dietary fibers on absorptions of cadmium in rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, p. 4494-4499, 1982.

KLAASSEN, C.D.; LIU, J.; CHOUDHORI, S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* v. 39, p. 267–294, 1999.

KLAASSEN, C.D.; LIU, J.; DIWAN, B.A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* v. 238, p. 215–220, 2009.

LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. *Fibra dietética em iberoamérica: tecnologia y salud*. São Paulo: Varela, 472 pp., 2001.

LIND, Y.; ENGMAN, J.; JORHEM, L.; GLYNN, A.W. Cadmium accumulation in liver and kidney of mice exposed to the same weekly cadmium dose continuously or once a week. *Food and Chemical Toxicology*, v. 35, p. 891-895, 1997.

LIND, Y.; ENGMAN, J.; JORHEM, L.; GLYNN, A.W. Accumulation of cadmium from wheat bran, sugar-beet fibre, carrots and cadmium chloride in the liver and kidneys of mice. *British Journal of Nutrition*, v. 80, p. 205-211, 1998.

LOPEZ, H. W.; COUDRAY, C.; BELLANGER, J.; LEVRAT-VERNY, M.; DEMIGNE, C.; RAYSSINGUER, Y.; REMESY, C. Resistant starch improves mineral assimilation in rats adapted to a wheat bran diet. *Nutrition Research*, v. 20, p.141-155, 2000.

MADRUGA, M. S.; CAMARA, F. S. The chemical composition of “multimistura” as a food supplement. *Food Chemistry*, v. 68, p. 41-44, 2000.

MADRUGA, M. S.; SANTOS, H. B.; BION, F. M.; ANTUNES, N. L. M. Nutritional evaluation of a diet supplement with “multimistura”: study with rats. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 24, p. 129-133. 2004.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. *Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia*. São Paulo: Roca, São Paulo, 2002.

MARENGONI, N.G.; POSSAMAI, M.; GONÇALVEZ JUNIOR, A.C.; OLIVEIRA, A.A.M.A. Performance e retenção de metais pesados em três linhagens de juvenis de tilapia tilapia-do-Nilo em hapas. Universidade estadual de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, 2008. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 30 (3) 2008.

MILLER, D.D. Minerales In: FENNEMA, O.R. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 2000.

MOBERG, A.; HALLMANS, G.; SJÖSTRÖM, R.; WING, K.R. The effect of wheat bran on the absorption and accumulation of cadmium in rats. *British Journal Nutrition*, v. 58, p. 383-391, 1987.

PEIXOTO, N.C.; ROZA, T.; PEREIRA, M.E. Sensitivity of δ -ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of rats to metals *in vitro* depends on the stage of postnatal growth and tissue. *Toxicology in Vitro*, v. 18, p. 805–809, 2004.

NOËL, L.; GUÉRIN, T.; KOLF-CLAUW, M. Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 1203-1210, 2004.

NOGUEIRA, C. W.; SOARES, F. A.; NASCIMENTO, P. C.; MULLER, D. ROCHA, J. B. T. 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3,-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology*, v. 184, p. 85-95, 2003.

O'DELL, BL, BOLAND, AR, KOIRTYOHANN, SR. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 20, 718-721, 1972.

OMORI, M.; MUTO, Y. Effects of dietary protein, calcium, phosphorus and fiber on renal accumulation of exogenous cadmium in young rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 23, p. 361-373, 1977.

OU, S.; GAO, K.; LI, Y. An in vitro study of wheat bran binding capacity for Hg, Cd, and Pb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 4714-4717, 1999.

PERSSON, H.; NYMAN, M.; ÖNNING, H. L. G.; FROLICH, W. Binding of mineral elements by dietary fiber components in cereals – In vitro (III). *Food Chemistry*, v. 40, p. 169-183, 1991.

PLAAMI, S. Myoinositol phosphates: Analysis, content in foods and effects in nutrition. *TECHNOLOGY*, v. 30, p. 633-647, 1997.

RAO, R.K.; RAMAKRISHNAN, C.V. Inositol phosphatase in developing rat duodenum, jejunum and ileum. *Biol. Neonate*, v. 50, p. 165-170, 1986.

REDDY, N. R.; PIERSON, M. D.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Phytates in cereals and legumes. Florida: Boca Raton, 1989, 152p.

REEVES, P. G.; CHANEY, R. L. Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets. *Environmental Research*, v. 96, p. 311-322, 2004.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY Jr., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal Nutrition*, v. 23, p. 1939-1951, 1993.

REINHOLD, J.G.; FARADJI, B.; ABADI, P.; ISMAIL-BEIGI, F. Decreased absorption of calcium, magnesium, zinc and phosphorus by humans due to increased fiber and phosphorus consumption as wheat bread. *Journal of Nutrition*, v. 106, p. 493-503, 1976.

REYES, F.G.R.; AREAS, M.A. Fibras alimentares e metabolismo de carboidratos, cap. 29, p. 399-409. In: Lajolo, F. M. et al. *Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud*. São Paulo: Varela, 472 pp., 2001.

ROSE, H.E.; QUARTERMAN, J. Dietary fibers and heavy metal retention in the rat. *Environmental Research*, v. 42, p. 166-175, 1987.

RUIZ-ROSO, B.; PÉRES-OLLEROS, L.; GARCÍA-CUEVAS, M. Influencia de la fibra dietaria (FD) em la biodisponibilidad de los nutrientes, cap. 26, p. 345-370. In: Lajolo, F. M. et al. *Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud*. São Paulo: Varela, 472 pp., 2001.

SANDBERG, A.-S.; HASSELBLAD, C.; HASSELBLAD, K. The effect of wheat bran on the absorption of minerals in the small intestine. *British Journal of Nutrition*, v. 48, p. 185-191, 1982.

SANTOS, F. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; WEIS, S. N.; FACHINETTO, J. M.; FAVERO, A. M.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chemico-Biological Interactions*, v. 151, p.159-165, 2005.

SANTOS, H. B.; MADRUGA, M. S.; BION, F. M.; ANTUNES, N. L. M.; MENDES, K.; ÀGUIDA, R. Biochemical and hematological studies in rats involving mineral bioavailability in a diet supplemented with "multimistura". *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 613-618, 2004.

SATARUG, S.; BAKER, J.R.; URBENJAPOL, S.; HASWELL-ELKINS, M.; REILLY, P.E.B.; WILLIAMS, D.J.; MOORE, M.R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters*, v. 137, p. 65-83, 2003.

SHAAFSMA, A.; BEELEN, G. M. Eggshell powder, a comparable or better source of calcium than purified calcium carbonate: piglet studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, p. 1596-1600, 1999.

SHAH, B. G., MALCOLM, S.; BELONJE, B.; TRICK, K.; BRASSARD, R.; MONGEAU, R. Effect of dietary cereal brans on the metabolism of calcium, phosphorous and magnesium in a long term rat study. *Nutrition Research*, v. 10, p. 1015-1028, 1990.

SIQUEIRA, E.M.A.; ARRUDA, S.F.; SOUSA, L.M.; SOUZA, E.M.T. Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 51, p. 250-257, 2001.

SOUZA, E. M. T., SOUSA, L. M.; ARRUDA, S. F.; SIQUEIRA, E. M. A. Protein improves the bioavailability of calcium and phosphorus from an alternative dietary supplement in rats. *Nutrition Research*, v. 22, p. 945-955, 2002.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative Mechanisms In The Toxicity Of Metal-Ions. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 18, p. 321-336, 1995.

SWANSON, K.S.; GRIESHOP, C.M.; CLAPPER, G.M.; SHIELDS, R.G.; BELAY, T.; MERCHEN, N.R.; FAHEY, G.C. Fruit and vegetable fiber fermentation by gut microflora from canines. *Journal of Animal Science*, v. 79, p. 919-726, 2001.

TOBA, Y.; MASUYAMA, R.; KATO, K.; TAKADA, Y.; AOE, S.; SUZUKI, K. Effects of dietary magnesium level on calcium absorption in growing male rats. *Nutrition Research*, v. 19, p. 783-793, 1999.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *CRC Critical Review Food Science Nutrition*, v.1, p. 01-22, 1991.

VIZEU, V. E.; FEIJÓ, M. B. S.; CAMPOS, R. C. Determinação da composição mineral de diferentes formulações de multimisturas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 254-258, 2005.

WANG, C.; BROWN, S.; BHATTACHARYYA, M. H. Effect of cadmium on bone calcium and ⁴⁵Ca in mouse dams on a calcium-deficient diet: evidence of Itai-Itai-like syndrome. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v 127, p.320-330, 1994.

WHELTON, B. D.; PETERSON, D. P.; MORETTI, E. S.; DARE, H.; BHATTACHARYYA, M.H. Skeletal changes in multiparous, nulliparous and ovariectomized mice fed either a nutrient-sufficient or -deficient diet containing cadmium. *Toxicology*, v 119, p.103-121, 1997.

WING, A.M.; WING, K.; TIDEHAG, P.; HALLMANS, M.D.; SJÖSTRÖM, B.S. Cadmium accumulation from diets with and without wheat bran in rats with different iron status. *Nutrition Research*, v. 12, p. 1205-1215, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cadmium. Geneva, (Environmental Health Criteria 134), 1992.

YOUNES, H.; COUDRAY, C.; BELLANGER, J.; DEMIGNÉ, C.; RAYSSIGUIER, Y.; RÉMÉSY, C. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*, v. 86, p 479-485, 2001.

ZITTERMANN, A.; SCHELD, K.; DANZ, A.; STEHLE, P. Wheat bran supplementation does not affect biochemical markers of bone turnover in young adult women with recommended calcium intake. *The British Journal of Nutrition*, v. 82, p. 431-435, 1999.

ANEXO

ANEXO A – Comparação entre recomendações nutricionais para seres humanos e para ratos, em fase de crescimento, considerando a ingestão energética de 1000 kcal

| | Humanos (1) | Ratos (2) |
|---------------------|---------------|-----------|
| Lipídios (g) | 43,0 – 58,0 | 17,7 |
| Proteínas (g) | 16,0 – 65,0 | 40,5 |
| Fibra alimentar (g) | 19,0 | 12,7 |
| Carboidratos (g) | 146,0 – 211,0 | 169,6 |
| Ca (mg) | 384,6 | 1265,0 |
| P (mg) | 353,9 | 759,0 |
| Mg (mg) | 61,5 | 126,5 |
| Cu (mg) | 0,26 | 1,26 |
| Fe (mg) | 5,38 | 8,85 |
| Mn (mg) | 0,92 | 2,53 |
| Zn (mg) | 2,31 | 3,04 |

(1) Calculado de acordo com as recomendações médias para crianças de 1-3 anos de acordo com o Instituto de Medicina dos Estados Unidos, considerando a ingestão energética média total de 1300 kcal/dia (Estados Unidos, 2005);

(2) AIN-93G= calculado de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para ratos em crescimento rápido (Reeves et al., 1993).