UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ÁGATHA CRISTINA DE PINHO CARÃO

Determinação de biomarcadores de aflatoxina B_1 e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte

Pirassununga
2016

ÁGATHA CRISTINA DE PINHO CARÃO

Determinação de biomarcadores de aflatoxina B_1 e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte

Tese de apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:
Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:
Nutrição e Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque

Pirassununga
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3275
FMVZ

Carão, Ágatha Cristina de Pinho
Determinação de biomarcadores de aflatoxina B_1 e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte / Ágatha Cristina de Pinho Carão. -- 2016.
145 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque.

1. Avicultura. 2. Aflatoxina B1-lisina. 3. Cromatografia. 4. Micotoxina. 5. Resíduos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação de biomarcadores de aflatoxina B1 e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte", protocolado sob o nº 3022/2013, utilizando 240 (duzentos e quarenta) aves, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, foi aprovado em reunião de 16/10/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Determination of aflatoxin B1 biomarkers and its aplicability on efficience avaliation of adsorbents in broiler chickens", protocol number 3022/2013, utilizing 240 (two hundred and forty) birds, under the responsibility Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, was approved in the meeting of day 16/10/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 27 de março de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CARÃO, Ágatha Cristina de Pinho

Título: Determinação de biomarcadores de aflatoxina B_1 e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte.

Tese de apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, que me dá a serenidade necessária para enfrentar todos os meus medos e os desafios que se apresentam a mim, necessários à minha evolução como homem e espírito. E também por seu filho ser meu exemplo de amor, caridade e fraternidade.

Aos meus queridos pais, João e Sônia, por terem aceitado sua missão, me acolhendo tão maravilhosamente como filha, me educando, me dando amor e me ajudando a lapidar meu caráter e dirigí-lo sempre no caminho do bem; hoje e sempre. E por estarem tão presentes todos os dias em minha vida, me auxiliando e intuindo na tomada de decisões.

Aos meus irmãos, Samantha e Allan, pelo companheirismo, pelo privilégio de sermos irmãos, por termos a certeza de que fomos preparados para cuidar uns dos outros. Aos meus irmão e minha irmã por escolha, Rogers e Camila, pelo exemplo, coleguismo e risadas. Aos meus sobrinhos, Ana, Gabriela e Guilherme, pelos momentos de sorrisos e aprendizados.

Ao meu amado esposo Thiago, pela compreensão, pelo apoio, pela confiança, pelo cuidado que tem para comigo e, acima de tudo, pelo amor incondicional. Agradeço por tornar os meus dias mais felizes, pela escolha para formarmos uma família e para dividirmos esta vida.

Aos meus mestres, Profs. Drs. Ricardo de Albuquerque, Carlos Augusto Fernandes de Oliveira e Carlos Humberto Corassin, pela imensa amizade e por serem minhas bússolas e exemplos, me conduzindo no caminho da ciência e da vida.

Aos meus grandes e queridos amigos: Diane, Maria Fernanda, Cadú, Gustavo, Bruna, Keliane, Pollyana, Sarah, Tânia, Roice, Paulo César, Ester, Edinho. Pelos momentos de auxílio, de risadas e de problemas resolvidos. Sem eles não haveria a possibilidade de ter feito meu trabalho e continuado até agora.

Aos estagiários tantos que passaram pelos laboratórios: Gabi, Samuel, Aline; pelos excelentes momentos.

À minha pequena Fifi, minha companheirinha peluda que esteve comigo quase todas as muitas horas dedicadas ao estudo e elaboração deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, pelo ensino e pela estrutura. À FAPESP, pelo fornecimento da bolsa de doutorado e financiamento do projeto de pesquisa (Projeto n° 2012/07726-4).

EPÍGRAFE

Minha favorita:

"Assim como o ferro enferruja com o tempo,
a inação arruina o intelecto".
(Leonardo Da Vinci)

RESUMO

CARÃO, A. C. P. Determinação de biomarcadores de aflatoxina B_1 e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte. [Determination of Aflatoxin B_1 biomarkers and its aplicability on efficience avaliation of adsorbents in broiler chickens]. 2016. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos das espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius.* São amplamente encontradas em matérias-primas de rações animais, em especial o milho, e têm a capacidade de levar a quadros clínicos agudos ou crônicos de aflatoxicose, caracterizados por, desde a morte por hepatite aguda até a diminuição do desempenho zootécnico por diminuição de peso ou consumo de ração. A aflatoxina B_1 tem sido considerada o metabólito mais perigoso, uma vez que possui alto poder hepatotóxico, além de ser mutagênica e carcinogênica. Atualmente a ciência trabalha rumo à descoberta de substâncias que sejam indicadoras confiáveis de contaminação por componentes tóxicos em homens e em animais, os chamados biomarcadores, que medem uma mudança celular, biológica ou molecular em um meio biológico (tecidos humanos, células ou fluídos) que fornecem informação a respeito de uma doença ou exposição a uma determinada substância. Sua detecção pode auxiliar na identificação, no diagnóstico e no tratamento de indivíduos afetados que podem estar sob risco, mas ainda não exibem os sintomas. Sendo assim, com o auxílio de análises que confirmem a patogenicidade da aflatoxina B_1 (determinação da atividade de enzimas hepáticas, da avaliação da função renal, de hematologia, da dosagem de minerais séricos e da avaliação de desempenho zootécnico), o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade da determinação de resíduos hepáticos de aflatoxinas e do aduto sérico AFB_1-lisina na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte. Utilizou-se 240 pintos de 1 dia, machos, de linhagem Cobb 500®, distribuídos aleatoriamente em 4 dietas experimentais: Controle Negativo: Ração Basal (RB); RB + 0,5% de adsorvente ((aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado/HSCAS); RB + 0,5% de adsorvente + 500 µg de AFB_1/kg de ração e; RB + 500 µg de AFB_1/kg de ração.Os resultados experimentais mostram que o efeito deletério da AFB_1, na concentração utilizada, é mais pronunciado que os efeitos protetores do HSCAS sobre os parâmetros de saúde dos animais. Não houve ação efetiva do adsorvente utilizado sobre quase nenhuma variável estudada, apenas para a redução das lesões histopatológicas em fígado, na redução da concentração de gama-glutamiltransferase (GGT), fósforo e aumento da contagem

de hemáceas aos 21 dias de idade. Porém, influenciou positivamente a redução de resíduos hepáticos de aflatoxina G_1 aos 21 dias e as concentrações de AFB_1-lisina sérica aos 21 e aos 42 dias de idade. Estes dados são importantes porque permite concluir que, embora sintomatologicamente o HSCAS não tenha exercido função efetiva, molecularmente foi capaz de mostrar de eficácia sobre os alguns biomarcadores de aflatoxinas no organismo das aves.

Palavras Chave: Avicultura, Aflatoxina B_1-lisina, Cromatografia, Micotoxina, Resíduos.

ABSTRACT

CARÃO, A. C. P. Determination of Aflatoxin B_1 biomarkers and its aplicability on efficience avaliation of adsorbents in broiler chickens. [Determinação de biomarcadores de aflatoxina B_1 e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte]. 2016. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Aflatoxins are secondary metabolites produced by toxigenic fungi of the species *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*. They are widely found in raw materials of animal feed, in particular corn, and have the ability to lead to clinical cases of acute or chronic aflatoxicosis, characterized by acute hepatites leading to death until lower performance by decreased weight or feed intake. Aflatoxin B_1 has been considered the most dangerous metabolite, since it has high hepatotoxic power, besides being mutagenic and carcinogenic. Nowadays science works toward the discovery of substances that are reliable indicators of contamination by toxic components in humans and animals, called biomarkers, which measure a cell change, biological or molecular in a biological medium (human tissues, cells or fluids) that provide information regarding a disease or exposure to a particular substance. Its detection can assist in the identification, diagnosis and treatment of affected individuals who may be at risk, but still do not exhibit symptoms. Thus, with the help of analysis that confirm aflatoxin B_1 pathogenicity(determination of liver enzymes activity, assessment of renal function, hematology, dosage of serum minerals and evaluation of animal performance), the objective of this work was to evaluate the applicability of the determination of aflatoxin liver residues and serum AFB_1-lysine adduct in the evaluation of the adsorbents efficiency in broiler chickens. Two hundred and fourty day-old male chicks, Cobb 500® lineage, were randomly distributed into 4 experimental diets: Negative Control: Basal Feed (BF); BF + 0.5% adsorbent (hydrated sodium calcium aluminosilicate/HSCAS); RB + 0.5% adsorbent + 500 µg AFB_1/kg of feed; and RB +500 µg AFB_1/kg of feed. The experimental results show that the deleterious effect of AFB_1, at the concentration used, is more pronounced that the protective effects of HSCAS on animal health parameters. There was no effective action of the adsorbent used on almost any variable studied, only for the reduction of the histopathological lesions in the liver, reduction of gamma-glutamyltransferase (GGT) and phosphorus concentration, and increased count of red blood cells at 21 days. However, influenced positively the reduction of aflatoxin G_1 liver residues at 21 days and the

concentrations of serum AFB_1-lysine at 21 and 42 days. These are important data because they allow to conclude that, although symptomatically the HSCAS has not exercised effective function, molecularly was able to show some efficacy on aflatoxin biomarkers in the birds body.

Keywords: Aviculture; Aflatoxin B_1-lysine; Chromatography; Mycotoxin; Residues.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química das principais aflatoxinas..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2. Esquema de Metabolização da AFB_1 (Adaptada de SANTURIO, 2000)..... 22

Figura 3. Vias de biotransformação e excreção de AFB_1 em humanos (JAGER et al., 2011). a. Evidências experimentais e em humanos da excreção deste metabólito. b. Evidência escassa ou nenhuma evidência disponível. c. Somente evidências experimentais disponíveis (não há evidências em humanos). 23

Figura 4. Vias de Biotransformação da AFB_1 (Adaptada de WHO, 1979)..... 59

Figura 5. Comportamento da Aflatoxina B_1-lisina (AFB_1-lisina) ao longo do tempo para frangos de corte alimentados com AFB_1 e HSCAS (Aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado)..... 82

Figura 6. Índice de Correlação de Pearson entre AFB_1-lisina e Albumina séricas para frangos de corte de 21 dias submetidos a dieta contaminada com AFB1 (Aflatoxina B_1 – 500 µg/kg de ração) e suplementada com HSCAS (Aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado –0,5%..... 83

Figura 7. Índice de Correlação de Pearson entre AFB_1-lisina e Albumina séricas para frangos de corte de 21 dias submetidos a dieta contaminada com AFB1 (Aflatoxina B_1 – 500 µg/kg de ração)..... 83

Figura 8. Índice de Correlação de Pearson entre AFB_1-lisina e Albumina séricas para frangos de corte de 42 dias submetidos a dieta contaminada com AFB_1 (Aflatoxina B_1 – 500 µg/kg de ração) e suplementada com HSCAS (Aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado – 0,5%). 84

Figura 9. Índice de Correlação de Pearson entre AFB_1-lisina e Albumina séricas para frangos de corte de 42 dias submetidos a dieta contaminada com AFB1 (Aflatoxina B_1 – 500 µg/kg de ração)..... 84

Figura 10. Vias de biomarcadores moleculares (Adaptado de GROOPMAN; KENSLER (1999)). 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração (mg) total de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 nos diferentes lotes de cultivo de *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 utilizados para preparo das dietas experimentais. 37

Tabela 2. Análise micotoxicológica dos grãos presentes nas dietas experimentais. 38

Tabela 3. Composição nutricional das dietas experimentais. 40

Tabela 4. Composição geral das dietas experimentais. 41

Tabela 5. Metodologias e kits comerciais empregados nas determinações dos parâmetros bioquímicos séricos de frangos de corte. 43

Tabela 6. Porcentagem de recuperação (%) oriunda de *Spiking* seguido de Teste de recuperação de amostras negativas fortificadas com aflatoxinas. 47

Tabela 7. Relação massa/carga (m/z) dos íons precursores e produtos, *dwell time*, voltagem do cone e energia de colisão para os resíduos hepáticos de aflatoxina. 48

Tabela 8. Gradiente entre a solução de água:ácido fórmico 0,1% (Solvente A) e a de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (Solvente B) ao longo da corrida cromatográfica de 2,5 minutos para determinação de resíduos hepáticos de aflatoxinas. 49

Tabela 9. Tempo de retenção na corrida cromatográfica das aflatoxinas usadas no mix de preparo da curva de calibração. 49

Tabela 10. Gradiente entre a solução de água:ácido fórmico 0,1% (Solvente A) e a de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (Solvente B) ao longo da corrida cromatográfica de 6 minutos para determinação sérica de AFB_1-lisina. 52

Tabela 11. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros de desempenho zootécnico[1] de frangos de corte na fase inicial (1-21 dias) e no período total de criação (1-42 dias) submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1. 57

Tabela 12. Efeito do HSCAS sobre o peso relativo de fígado e rins de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade alimentados com dieta contaminada com AFB_1. 58

Tabela 13. Estudo histopatológico de fígado e rim de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade alimentados com dieta com AFB1[1] e HSCAS[2]. 61

Tabela 14. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros bioquímicos séricos[1] de frangos de corte com 21 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1. 63

Tabela 15. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros bioquímicos séricos[1] de frangos de corte com 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1. 64

Tabela 16. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre o hemograma completo[1] de frangos de corte com 21 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1. 72

Tabela 17. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre o hemograma completo[1] de frangos de corte com 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1. 73

Tabela 18. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros bioquímicos séricos1 de frangos de corte com 21 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B1. 74

Tabela 19. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros bioquímicos séricos[1] de frangos de corte com 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1. 75

Tabela 20. Incidência de resíduos de micotoxinas em amostras[1] de fígado de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxinas e suplementada com adsorvente. 77

Tabela 21. Efeito do HSCAS sobre os resíduos hepáticos[1] de aflatoxinas em amostras de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com AFB_1. 78

Tabela 22. Efeito do HSCAS sobre os resíduos hepáticos[1] de aflatoxinas em amostras de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com AFB_1. 78

Tabela 23. Efeito do HSCAS sobre a concentração de AFB_1-lisina em frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade sob dieta contaminada com AFB_1. 80

Tabela 24. Efeito do HSCAS sobre a concentração AFB_1-lisina:Albumina sérica[1] de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade alimentados com dieta contaminada com AFB_1. 82

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO…….. 16
2. OBJETIVOS…… 18
2.1. Objetivos Específicos..... 18
2.2. Objetivos Específicos..... 18
3. REVISÃO DE LITERATURA..... 19
3.1. O que são micotoxinas e quais os efeitos das aflatoxinas sobre o desempenho zootécnico..... 19
3.2. Biotransformação das aflatoxinas..... 20
3.3. Aflatoxinas e proteínas séricas..... 24
3.4. Aflatoxinas e função hepática..... 24
3.5. Aflatoxinas e função renal..... 26
3.6. Aflatoxinas e hematologia completa..... 27
3.7. Aflatoxinas e minerais séricos..... 28
3.8. Aflatoxinas e uso de adsorvente..... 29
3.9. Cromatografia líquida de alta eficiência..... 30
3.10. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. 32
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 35
4.1. Preparação para o experimento..... 35
4.1.1. Cultivo de fungos para obtenção de aflatoxinas 35
4.1.2. Análise micotoxicológica do material produzido por meio do cultivo de fungos (Item 4.1.1)..... 36
4.1.3. Análise micotoxicológica das matérias-primas das dietas experimentais.... 37
4.2. Parte experimental..... 39
4.2.1. Animais e Instalações 39
4.2.2. Adsorvente Experimental..... 41
4.2.3. Preparo das dietas experimentais..... 41
4.3. Variáveis sob estudo..... 42
4.3.1. Desempenho zootécnico..... 42
4.3.2. Biometria de órgãos e estudo histopatológico..... 42
4.3.3. Bioquímica sérica..... 43
4.3.4. Hemograma completo..... 43
4.3.5. Análise de minerais séricos..... 44
4.3.6. Análise de biomarcadores de aflatoxinas..... 45

4.3.6.1. Determinação de resíduos de aflatoxinas em tecido hepático..... 45
4.3.6.2. Determinação de AFB_1-lisina em soro..... 50
4.4. Forma de análise de resultados..... 53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 54
5.1. Desempenho zootécnico..... 54
5.2. Biometria de órgãos e estudo histopatológico..... 58
5.3. Bioquímica sérica..... 62
5.4. Hemograma completo..... 68
5.5. Análise de minerais séricos..... 74
5.6. Análise de biomarcadores de aflatoxinas..... 76
5.6.1. Resíduos hepáticos de aflatoxinas..... 76
5.6.2. Análise de aduto Aflatoxina B_1-lisina (AFB_1-lisina)..... 80
6. CONCLUSÕES..... 86
7. REFERÊNCIAS..... 88
ANEXO..... 97
ANEXO A. Artigos e capítulo de livro publicados..... 98
APÊNDICE A. Imagens ilustrativas de lesões histopatológicas de fígado e rim..... 142
APÊNDICE B. Prêmio recebido pela melhor apresentação de pôster em simpósio nacional..... 144
APÊNDICE C. Menção honrosa recebida por apresentação oral de trabalho em simpósio nacional..... 145

1. INTRODUÇÃO

A avicultura é uma atividade pecuária muito importante para o Brasil, uma vez que é grande geradora de empregos à população e renda para a indústria nacional. Em destaque encontra-se a avicultura de corte, responsável pela maior parte das divisas geradas pela criação de aves industriais. O Brasil encontra-se na terceira posição no ranking mundial de produção de carne de frangos, situando-se na liderança da exportação de cortes para o globo.

A situação sanitária das aves é um ponto crucial para o sucesso da atividade, uma vez que um animal saudável pode expressar todo o seu potencial genético para crescimento. Colaborando enormemente para o *status* sanitário dos animais está a nutrição, ferramenta que, quando bem utilizada, auxilia os frangos a produzirem carne por meio do aproveitamento máximo dos nutrientes constituintes das rações.

As dietas das aves compõem-se basicamente de grãos, como o milho e soja. Para que não haja perda financeira devido ao mal aproveitamento da ração, é preciso que ela tenha alto grau de inocuidade. As micotoxinas (toxinas produzidas por fungos) constituem problema corriqueiro para a produção animal, uma vez que os grãos são extremamente susceptíveis à contaminação fúngica, levando à produção de compostos toxigênicos. As aflatoxinas estão entre as micotoxinas que levam a quadros de maior perda financeira, com destaque ao grande poder deletério da aflatoxina B_1 (AFB_1). Embora raramente encontrada isoladamente em dietas naturalmente contaminadas, quando ingerida em pequenas doses leva a quadros de intoxicação crônica, com conseqüente queda de desempenho zootécnico e bem-estar devido diminuição na qualidade de vida.

A remoção de aflatoxinas de alimentos permanece ainda como um dos grandes problemas em produção animal, havendo a necessidade de tecnologias efetivas para os procedimentos de descontaminação. Neste contexto, a adição de substâncias não nutritivas, ou adsorventes, que se ligam à aflatoxina reduzindo sua absorção no trato gastrointestinal apresenta-se como uma alternativa eficiente para evitar seus efeitos deletérios ao animal. Assim, minerais como zeolitos, bentonita, aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado e carvão ativado têm sido utilizados para reduzir a toxicidade de aflatoxinas. Entretanto, os adsorventes apresentam grande variabilidade quanto a sua eficácia, gerando a necessidade de confirmar suas propriedades anti-micotoxinas através de estudos *in vivo*, os quais são geralmente caros, pois envolvem a administração de níveis

da toxina com e sem o adsorvente para avaliar diversos tipos efeitos sobre a produtividade dos animais, além de dados histopatológicos e clínicos, entre outros.

Algumas substâncias provenientes do metabolismo de toxinas, e até mesmo a própria toxina, podem ser utilizadas como biomarcadores. Estes biomarcadores podem ser as próprias toxinas ou seus metabólitos residuais em órgãos ou fluidos biológicos, ou então, fração destes metabólitos que foram ligados a moléculas circulantes ou ao próprio material genético. Este procedimento já é usado pela Medicina Humana, como em situações de marcadores de exposição a metais pesados ou predisposição e/ou presença de cânceres, por exemplo.

Na tentativa de estabelecer compostos que possam fornecer informação a respeito da exposição à AFB_1, o objetivo geral deste estudo é verificar a aplicabilidade da determinação de resíduos hepáticos de aflatoxinas e AFB_1-lisina sérica na avaliação da eficiência de adsorvente comercial em frangos de corte.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a aplicabilidade da determinação de resíduos hepáticos de aflatoxinas e AFB_1-lisina sérica na avaliação da eficiência de adsorvente comercial em frangos de corte.

2.2. Objetivos Específicos

a) Verificar os efeitos da ingestão da AFB_1, administrada na ração com ou sem adsorvente, sobre os parâmetros de desempenho zootécnico;

b) Avaliar a biometria de órgãos (fígado e rins), bem como as alterações histopatológicas nos referidos órgãos, decorrentes da exposição das aves às toxinas através da ração;

c) Avaliar os parâmetros hematológicos (valores de eritrograma, valores de leucograma e contagem diferencial de leucócitos), a bioquímica sérica (dosagem de proteínas, da atividade de enzimas hepáticas, da avaliação da função renal e de minerais séricos);

d) Determinar a concentração de resíduos hepáticos de aflatoxinas e do aduto AFB_1-lisina sérica com vistas à sua aplicação na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O que são micotoxinas e quais os efeitos das aflatoxinas sobre o desempenho zootécnico

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que podem entrar na dieta de seres humanos e animais através da contaminação direta ou indireta de cereais e grãos. Uma vez ingeridas, as micotoxinas são difícies de diagnosticar, induzindo, em muitos casos, síndromes brandas que podem facilmente ser confundidas com doenças causadas por outros microorganismos (PIER et al., 1973). De acordo com suas propriedades físico-químicas e a espécie animal envolvida, cada micotoxina pode afetar especificamente um órgão ou sistema, levando a manifestações clínicas específicas de natureza aguda ou crônica (PIER et al., 1973).

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*, descobertas em 1960, após provocarem um surto tóxico em perus na Inglaterra (Turkey-X-disease). Neste surto, milhares de aves morreram após consumirem torta de amendoim na ração, e as aves doentes apresentaram necrose do tecido hepático (ASAO et al.; 1963; LEESON et al., 1995). A produção de aflatoxinas é favorecida por vários fatores, especialmente umidade relativa do ar (superior a 80%), temperatura ambiental e condições de integridade e teor de umidade do substrato. O *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus* proliferam em temperaturas entre 32°C e 33°C. As aflatoxinas geralmente são produzidas entre 13°C e 42°C, embora entre 25°C a 30°C seja considerada temperatura ótima para sua síntese (BATATINHA; SIMAS; GÓRNIAK, 2008).

São conhecidos, atualmente, 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B_1, G_1, B_2 e G_2; sendo que a aflatoxina B_1 (AFB_1), além de ser a mais frequentemente encontrada em cereais, é que apresenta maior poder toxigênico (LEESON et al., 1995). A toxicidade das aflatoxinas depende de diferentes fatores, incluindo sua concentração, a duração da exposição, a espécie, o sexo, a idade e a condição de saúde dos animais (JEWERS, 1990). Os animais jovens são mais susceptíveis aos efeitos das aflatoxinas, uma vez que seus sistemas enzimáticos hepáticos ainda não estão completamente desenvolvidos. De maneira geral, as aves são mais susceptíveis que os mamíferos, sendo animais adultos os mais resistentes (BATATINHA; SIMAS; GÓRNIAK, 2008). Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento de animais jovens (LEESON et al., 1995). A

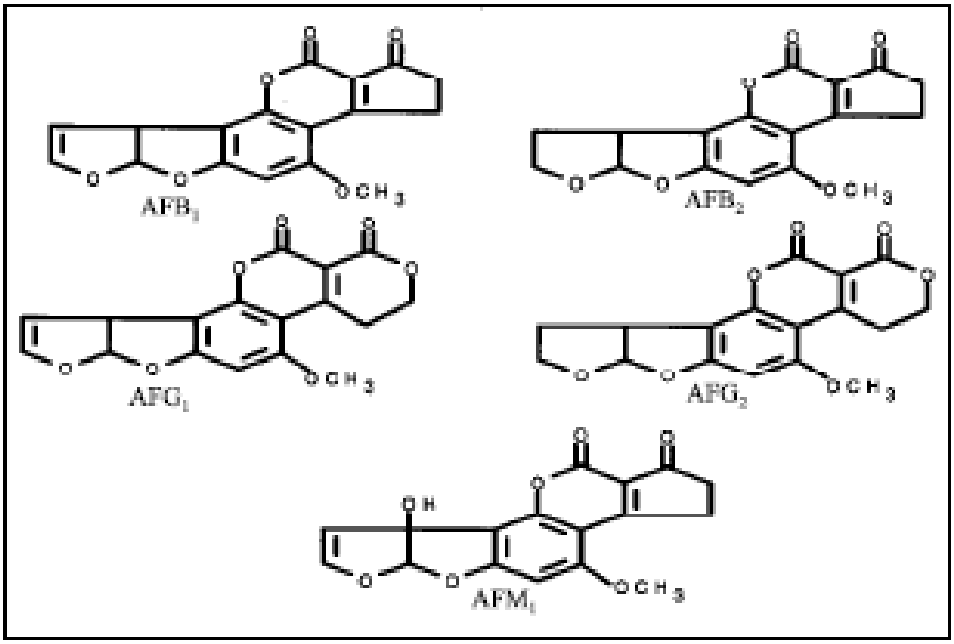
síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxina, sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo. Caracteriza-se principalmente pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (OSWEILLER, 1990). As aflatoxinas induzem a vários efeitos biológicos, tais como doenças hepáticas, alterações na taxa de crescimento, mudanças nos mecanismos imunogênicos, e efeitos carcinogênicos e mutagênicos em espécies animais diferentes, especialmente em aves domésticas (PIER et al., 1973). A aflatoxicose, envenenamento que ocorre da ingestão de aflatoxinas, é caracterizada em frangos pelo decréscimo de consumo de ração e de taxa de crescimento, pobre utilização de alimentos e mortalidade (TEDESCO et al., 2004). Denli et al. (2009), trabalhando com rações experimentalmente contaminadas com aflatoxina B_1 também relataram haver redução do consumo de ração, do ganho de peso e aumento da conversão alimentar em aves ingerindo 1mg de AFB_1/kg de ração, quando comparadas a aves do grupo controle negativo. Resultados semelhantes foram encontrados por Aravind et al. (2003), que observaram diminuição no consumo de ração, no ganho de peso, além de piora na conversão alimentar de frangos alimentados com dieta naturalmente contaminada com micotoxinas (168 µg de AFB_1/kg de ração).

Em decorrência da sua lipossolubilidade, as aflatoxinas são facilmente absorvidas no trato gastrintestinal, sendo então, distribuídas aos diferentes órgãos como músculos, rins tecido adiposo e, principalmente, fígado, em que as maiores concentrações podem ser encontradas. Nesse órgão, tais toxinas são biotransformadas pelo sistema enzimático das oxidases de função mista (BATATINHA; SIMAS; GÓRNIAK, 2008).

3.2. Biotransformação das aflatoxinas

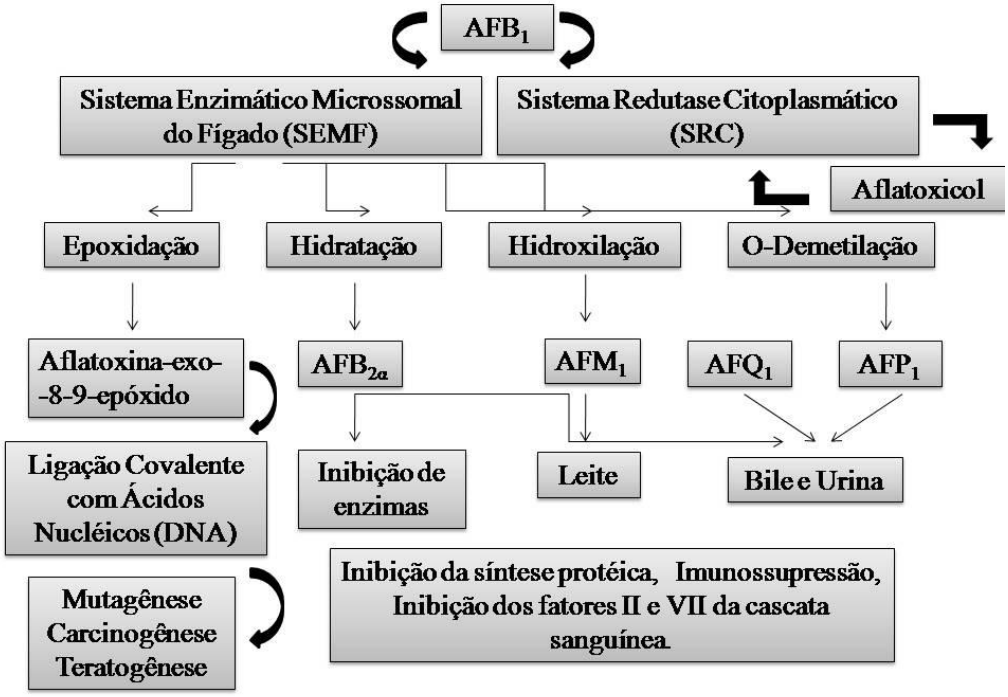
As aflatoxinas são compostos classificados como difuranociclopentanocumarinas/difuranociclopentanolidocumarinas, que contêm um anel de dihidrofurano ou um anel de tetrahidrofurano (MOSS, 1989).

Figura 1. Estrutura química das principais aflatoxinas.



A biotransformação das aflatoxinas constitui um processo complexo, com múltiplas vias, tais como epoxidação, hidroxilação, desmetilação e redução. Nas reações de primeira fase, as moléculas tornam-se mais hidrofílicas; na segunda fase, os compostos produzidos inicialmente são conjugados a substâncias endógenas (sulfatos, glutationa, grupos metil e acil) e, em seguida, excretados. Produtos resultantes do metabolismo das aflatoxinas são considerados responsáveis pelos seus efeitos tóxicos (BATATINHA; SIMAS; GÓRNIAK, 2008). Um esquema geral das vias de metabolização da AFB_1 é exibido a seguir:

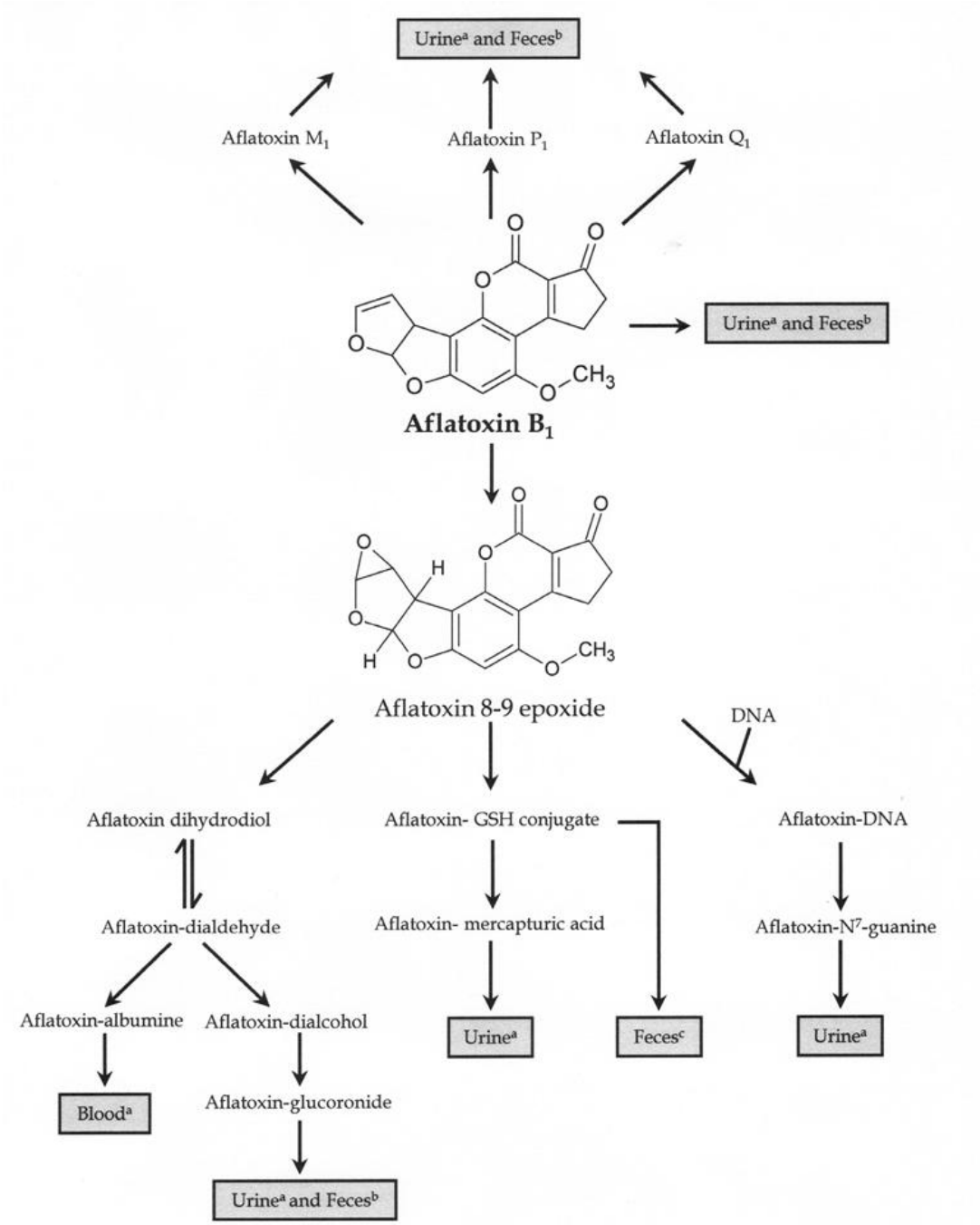
Figura 2. Esquema de Metabolização da AFB_1 (Adaptada de SANTURIO, 2000).



Recentemente, para o conhecimento mais específico do mecanismo das doenças tem-se aplicado como medida auxiliar a determinação de biomarcadores. Os biomarcadores medem uma mudança celular, biológica ou molecular em um meio biológico (tecidos humanos, células ou fluídos) que fornece informação a respeito de uma doença ou exposição a uma determinada substância. Biomarcadores são utilizados para medir ou indicar um processo biológico, e, portanto, a detecção de biomarcadores específicos pode auxiliar na identificação, no diagnóstico e no tratamento de indivíduos afetados que podem estar sob risco, mas ainda não exibem os sintomas. O desenvolvimento de biomarcadores para agentes ambientais deve ser baseado no conhecimento específico do metabolismo, formação de produtos e mecanismo geral de ação (GROOPMAN; KENSLER, 1999). Biomarcadores de exposição e efeito para as aflatoxinas têm sido validados em estudos detalhados em animais e humanos. Em estudo realizado na província de Guangxi (República Popular da China), o aduto AFB_1-lisina foi determinado em amostras de soro de 42 habitantes e comparado com a ingestão de AFB_1 e excreção de AFM_1 na urina (GAN et al., 1988). Coeficientes de correlação significativos foram encontrados entre a concentração de AFB_1-lisina no soro e AFM_1 na urina e também entre AFB_1-lisina no soro e a exposição à AFB_1 através da dieta. Estimou-se que de 1,4 a 2,3 % da AFB_1 ingerida é covalentemente ligada à albumina.

Na figura abaixo estão representadas as vias metabólicas responsáveis pela formação dos adutos em humanos, mas que podem ser extrapolados para os frangos de corte. É importante salientar que a dosagem de AFN_7-guanina em aves é quase impossível devido à junção da urina com as fezes no canal cloacal.

Figura 3. Vias de biotransformação e excreção de AFB_1 em humanos (JAGER et al., 2011). a. Evidências experimentais e em humanos da excreção deste metabólito. b. Evidência escassa ou nenhuma evidência disponível. c. Somente evidências experimentais disponíveis (não há evidências em humanos).



No Brasil, os estudos relacionados à determinação de aflatoxinas e metabólitos em fluidos biológicos são escassos, e não existem estudos semelhantes que testem a eficácia deste método em animais de produção, o que torna necessária a realização de estudos como este.

3.3. Aflatoxinas e proteínas séricas

A determinação dos efeitos bioquímicos da aflatoxina é importante para o diagnóstico de aflatoxicose em frangos de corte (ROSA et al., 2001). Um dos principais efeitos da aflatoxina B_1 é a inibição da síntese protéica, uma vez que a maioria das proteínas plasmáticas (albumina e globulinas) é sintetizada pelos hepatócitos (STOCKHAM; SCOTT, 2011), causando assim uma queda em seus níveis (SANTIN, 2000). Este efeito da aflatoxicose é devido a uma marcante inibição da enzima RNA-polimerase. Após a toxina entrar no núcleo do hepatócito, une-se ao DNA e desse modo inibe a RNA-polimerase, reduzindo a síntese de RNA-mensageiro; consequentemente observa-se uma acentuada redução na produção de proteínas (CLIFORD; REES, 1966). A aflatoxina B_1 é biotransformada no fígado por monoxigenases, e então transformada pela citocromo P450 em aflatoxina 8,9-epóxido, um composto eletrofílico altamente ativo que é inativado por conjugação com a glutationa e excretado através da urina e da bile (EMEROLE et al., 1979). Tessari et al. (2005) afirmam que 200 mg de AFB_1/kg de ração, com ou sem associação com fumonisina B_1, determinam uma redução nos níveis séricos de proteínas totais após 20 dias de exposição contínua através da ração. Ghosh et al. (1990) observaram que 300 µg de AFB_1/kg de ração de frangos de corte levou a diminuição significativa de linfócitos T, albuminas e globulinas nos animas intoxicados.

3.4. Aflatoxinas e função hepática

A lesão hepática causada pelas micotoxinas leva a alteração das enzimas existentes nas células do fígado. A Alanina Aminotransferase (ALT) é uma enzima presente em grande quantidade no citoplasma do hepatócito e dos miócitos esqueléticos. É uma enzima de liberação, que catalisa uma reação reversível envolvida na desaminação de alanina para formar piruvato, que pode entrar na via da gliconeogênese ou no ciclo de Krebs (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Uma lesão de hepatócito, reversível ou irreversível, ocorrendo por variadas causas (inflamação, hipóxia, substâncias tóxicas, traumatismo...), além

de casos de regeneração de doença hepática, liberam AST para o sangue (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Aravind et al. (2003) observaram diminuição precoce da atividade da ALT em frangos de corte submetidos a dieta naturalmente contaminada com micotoxinas (168 µg de AFB_1/kg de ração). Diminuição significativa da atividade da ALT foi encontrada em frangos de corte submetidos a 0,8 mg de AFB_1/kg de ração durante 35 dias de tratamento (TEDESCO et al., 2004).

A Aspartato Aminotransferase (AST) é uma enzima encontrada em altas concentrações no citoplasma do hepatócito e em suas mitocôndrias, além de outros tecidos como os músculos cardíaco e esquelético, além dos eritrócitos (STOCKHAM; SCOTT, 2011). É uma enzima de liberação, que catalisa uma reação reversível envolvida na desaminação de aspartato para formar oxaloacetato, que pode entrar no ciclo de Krebs (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Baseado em estudos em humanos, aproximadamente 60 a 80% da AST do interior do hepatócito está associado às mitocôndrias, e o restante em forma solúvel no citosol (MEYER et al., 1995). Da mesma forma, uma lesão de hepatócito, reversível ou irreversível, ocorrendo por variadas causas (inflamação, hipóxia, substâncias tóxicas, traumatismo...), além de casos de regeneração de doença hepática, liberam AST para o sangue (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Porém, é necessário um insulto mais severo do que aquele que altera a permeabilidade da membrana celular para provocar a liberação da forma mitocondrial de AST (MEYER et al., 1995). Uma lesão à membrana, por toxina ou hipóxia, por exemplo, resulta num aumento da ALT sérica, e nas doenças hepáticas crônicas, principalmente em estado final (cirrose), o valor da ALT e do AST séricos podem estar normais ou somente um pouco aumentados (MEYER et al., 1990). Uma diminuição significativa da concentração sérica da AST foi constatada por Franciscato (2006) em frangos de corte submetidos a dieta contendo 3 mg de AFB_1/kg de ração, quando em comparação a aves não contaminadas. Um aumento significativo da ação da AST em frangos de 41 dias de idade foi constatada por Tessari et al. (2005) em intoxicação experimental por 50 e 200µg de AFB_1/kg de ração.

A lactato desidrogenase (LD ou LDH) é uma enzima citosólica localizada em diversos tecidos, incluindo os hepatócitos e a musculatura esquelética e cardíaca; além de eritrócitos; a qual catalisa uma reação reversível que converte piruvato em lactato no final da glicólise anaeróbica (MEYER et al., 1995; STOCKHAM; SCOTT, 2011). Sendo assim, a atividade sérica total da LD não traz vantagens diagnósticas sobre os AST. Porém, a LD é composta de 5 isoenzimas, das quais a LD_5 pode ser mensurada por espectrofotometria e está localizada

primariamente nos hepatócitos e musculatura esquelética (MEYER et al, 1995). Devido ao seu grande tamanho e a meia-vida longa, a atividade de LD fica elevada por algum tempo após a lesão inicial e, às vezes, pode ser útil no diagnóstico retrospectivo (KERR, 2003). Aos 21 dias de idade, 5 mg de AF/kg de ração (60,69% de AFB_1) foi capaz de reduzir a média de ação da enzima LD em frangos de corte com aflatoxicose aguda experimental (BORSA et al., 1998).

A Gama-Glutamiltransferase (GGT) é uma enzima associada à colestase e membranas celulares (MEYER et al, 1995; STOCKHAM; SCOTT, 2011). Ela catalisa a transferência de grupos glutamil entre peptídeos e está envolvida em reações da glutationa. Muitas células têm atividade de GGT, mas as células epiteliais biliares, as células acinares pancreáticas e as células epiteliais tubulares renais são consideradas classicamente as de maior atividade (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Concentrações elevadas de ácidos biliares no fígado e no plasma são esperadas na ocorrência de colestase. O aumento dos ácidos biliares ou de outros constituintes da bile pode estimular a síntese e a liberação de GGT (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Aravind et al.(2003) relataram aumento na concentração de GGT no soro de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade submetidos a dieta naturalmente contaminada com aflatoxinas (169 µg de AF/kg de ração). Resultados semelhantes foram encontrados por Borsa et al. (1998) em frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dieta com 5mg de AF/kg de ração de aflatoxinas (69,9% de AFB_1).

3.5. Aflatoxinas e função renal

A intoxicação por micotoxinas também afeta a função renal das aves. Sendo assim, a avaliação desta pode ser feita tomando-se parâmetros sanguíneos clássicos, como a determinação das concentrações de ácido úrico e de uréia. O ácido úrico é um metabólito que pode ser usado como parâmetro importante da função renal, além da função hepática. Ele é o maior produto final do metabolismo de nitrogênio, constituindo cerca de 60 a 80% do nitrogênio total excretado na urina das aves. É sintetizado no fígado e nos rins, e 90% são excretados via secreção tubular, independentemente da taxa de formação de urina (SKADHAUGE, 1983). Concentrações sanguíneas acima de 15 mg/dL sugerem alterações da função renal, que podem ser causadas por diversos fatores, como nefrotoxinas (SCHIMIDT et al., 2007). Batina (2004) mostrou haver diminuição significativa na concentração de ácido

úrico sanguíneo de frangos de corte aos 42 dias de idade submetidos a dieta contendo 5 mg de AF/kg de ração.

A uréia é resultante do metabolismo do nitrogênio. É produzida pelo fígado e excretada pelos rins. Sua concentração sanguínea é influenciada pela ingestão de proteínas, pela taxa de excreção renal (que podem aumentar a concentração sanguínea da uréia) e pelo estado do fígado, que é o órgão responsável pela sua síntese. Como as aves são uricotélicas, pequenas quantidades de uréia estão presentes no plasma. A concentração normal de uréia de aves não-carnívoras é de 0 a 5 mg/dL (CAMPBELL, 2004). Diminuição na concentração sérica de uréia foi encontrada por Batina (2004) em frangos de corte com 42 dias intoxicados com 5 mg de AF/kg de ração. Resultados semelhantes foram apontados por Aravind et al. (2003) para frangos de corte com 21 e 35 dias alimentados com dieta naturalmente contaminada com micotoxinas (168 µg de AF/kg de ração).

3.6. Aflatoxinas e hematologia completa

As micotoxinas afetam diretamente os parâmetros hematológicos das aves contaminadas, mesmo em pequenas doses, que levam a micotoxicoses sub-clínicas. Tessari et al. (2006), trabalhando com 0,5 e 200 µg de AFB_1/kg de ração, em associação ou não com 0,5 ou 200 mg de fumonisina B_1, não observaram alteração no estado geral dos frangos durante o período experimental (característica de doença sub-clínica). Porém constataram que em todos os tratamentos houve redução nos valores de hematócrito, hemoglobina e número de hemácias, caracterizando um quadro de anemia, sendo que os grupos mais afetados foram os que receberam as maiores concentrações das toxinas em associação. Também observou-se um menor número de leucócitos em todos os tratamentos, porém esta redução foi mais intensa nos grupos tratados com 200 µg de AFB_1/kg de ração, com ou sem fumonisina. Aravind et al. (2003) trabalhando com dieta naturalmente contaminada com várias micotoxinas observaram diminuição no hematócrito das aves intoxicadas aos 21 e aos 35 dias de idade. Aos 35 dias de idade, houve uma aparente redução na concentração de hemoglobina e na contagem de hemácias em relação ao grupo controle. Diminuição na porcentagem de heterófilos em aves se alimentando de 2450 µg de AFB_1/kg de ração, além de aumento na porcentagem de linfócitos no plasma de aves ingerindo 350 e 2450 µg de AFB_1/kg de ração foram encontradas por Del Bianchi et al. (2005). Tung et al. (1975) alimentaram frangos com 5,0 e 10,0 µg de AFB_1/kg

de ração e observaram que os efeitos sobre os parâmetros hematológicos foram mais pronunciados quanto maior o nível de aflatoxina.

3.7. Aflatoxinas e minerais séricos

Estudos também têm demonstrado que as aflatoxinas afetam direta ou indiretamente o metabolismo do cálcio e do fósforo nas aves (GLAHN et al, 1991). O cálcio é o mineral mais abundante no organismo da ave. É considerado um dos principais constituintes dos ossos e tem ainda um papel fundamental no controle das funções celulares dos tecidos nervoso e muscular, bem como de atividades hormonais e de coagulação sanguínea (MAIORKA; MACARI, 2002). Cerca de metade do cálcio plasmático está livre e esta é a porção ativa do cálcio, enquanto a outra metade encontra-se inativa, ligada à albumina (KERR, 2003), e também à cátions não-protéicos. O cálcio sérico ou plasmático está distribuído em três frações principais. Todo o cálcio nos líquidos corporais está ionizado (Ca^{+2}), mas parte (cerca de 50%) encontra-se livre e parte está ligada a moléculas aniônicas (proteínas (80% albumina e 20% globulina) – 40-45%; e ânions não-protéicos (citrato, fosfato, lactato e outros ânions pequenos e difusíveis) – 5-10%). A porção do cálcio livre no plasma é regulada por hormônios e contribui para estados patológicos (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Os distúrbios renais causam diminuição do cálcio sérico pela perda de proteínas, que leva a hipoalbuminemia ou pela diminuição da reabsorção do cálcio (LEWANDOSWIK et al, 1986). Como as concentrações séricas de Ca^{+2} em perfis bioquímicos comuns representam a concentração total de Ca^{+2}, uma diminuição na concentração sérica de proteínas (especialmente hipoalbuminemia) diminui o Ca^{+2} ligado às mesmas, e, portanto pode causar hipocalcemia, chamada de pseudo-hipocalcemia (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Diminuição da concentração de cálcio sérico total foi observada em frangos de corte de 42 dias de idade submetidos a dieta contendo aflatoxinas (80% AFB_1, 12% AFB_2, 5% AFG_1 e 3% AFG_2) e clinoptilonita (MACIEL et al., 2007).

O fósforo está presente predominantemente na forma de hidroxiapatita (90%) na matriz mineralizada dos ossos, e os 10% restantes estão nos tecidos moles intracelularmente, sendo o principal ânion intracelular e faz parte de vários processos metabólicos como metabolismo de energia, contração muscular e integridade do esqueleto (DENNIS, 1996). O fósforo inorgânico, maneira pela qual é referido o fósforo nos organismos vivos, também encontra-se no líquido extracelular. O fosfato inorgânico encontra-se na circulação como

monohidrogeniofosfato (HPO_4^{-2}), que é divalente, e como dihidrogeniofosfato ($H_2PO_4^-$), que é monovalente (MAIORKA; MACARI, 2002). 55% do fósforo inorgânico encontra-se livre no plasma, enquanto os outros 45% estão ligados a ânions (10% a proteínas catiônicas e 35% a cátions não-protéicos). Assim como ocorre com o cálcio, a parte livre no plasma é que é regulada por hormônios (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Fernandez et al. (1994) trabalhando com intoxicação experimental de poedeiras comerciais com 2,5 mg de AFB_1/kg de ração relataram presença de hipofosfatemia quando em comparação ao grupo controle negativo.

Ambos minerais são regulados pela função do hormônio paratireóideo (PTH), produzido pelas glândulas paratireóides e inativado ou degradado pelo fígado e pelos rins. O PTH é um hormônio polipeptídico (84% aminoácidos) secretado em resposta a uma diminuição na concentração sérica de cálcio livre, enquanto a vitamina D ativa e aumento na concentração sérica de cálcio livre inibem sua síntese. O PTH promove aumento na absorção de cálcio pelo intestino (na presença de vitamina D ativa) e maior reabsorção nos túbulos renais; mobilização de cálcio e fósforo inorgânico dos ossos; e excreção renal de fósforo inorgânico por inibir a reabsorção do mesmo pelos túbulos (ação fosfatúrica potente). Glahn et al. (1991) explicam que os efeitos das aflatoxinas sobre os minerais citados podem estar relacionados com alterações no metabolismo da vitamina D e do PTH, pois estas micotoxinas podem diminuir a síntese de PTH endógeno ou alterar a sensibilidade renal a este hormônio, podendo ainda, reduzir a síntese de vitamina D ativa, causando assim, diminuição da excreção de fósforo e aumento na excreção de cálcio. Estes efeitos resultariam em hipocalcemia verdadeira (por diminuição na concentração de cálcio sérico livre) associada a pesudo-hipocalcemia (por hipoalbuminemia); além de hipofosfatemia devido à baixa na concentração de vitamina D ativa, que estimula a absorção de fósforo no intestino e a mobilização de fósforo dos ossos.

3.8. Aflatoxinas e uso de adsorventes

É sabido que a indústria avícola se utiliza de vários métodos que objetivam a redução de prejuízos causados à saúde e ao desempenho devidos às micotoxinas. Os métodos que objetivam eliminar ou reduzir os níveis de contaminação por micotoxinas nos alimentos levam em consideração estratégias de descontaminação e detoxificação. Isto inclui métodos químicos, físicos e biológicos, desde que estes métodos apresentem efetividade na remoção, destruição e inativação das micotoxinas; ausência de efeitos tóxicos ou carcinogênicos; não

alterem as propriedades nutritivas nem a palatabilidade dos alimentos e sejam econômica e tecnologicamente viáveis, não alterando o preço final do produto (DIAZ; SMITH, 2005). Um caminho para o problema tem sido usar materiais absortivos não-nutritivos na alimentação objetivando-se redução na absorção de aflatoxina B1 ou aflatoxina pelo trato gastrointestinal (KUBENA et al., 1990b). Dentre todos os meios, o mais comumente utilizado é a ligação irreversível da micotoxina a um adsorvente (DIAZ; SMITH, 2005). A utilização de aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado, um tipo de zeólita comercial, em dietas de aves domésticas tem mostrado resultados satisfatórios, pela sua capacidade em adsorver toxinas (KUBENA et al, 1990a), tornando-as menos disponíveis para adsorção pelo trato gastrointestinal (KUBENA et al, 1990b). O aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado na concentração de 0,5% na dieta diminuiu significativamente os efeitos adversos no peso corporal e nas mudanças hepáticas principais causados por 7,5 mg de AFB_1/kg de dieta em poedeiras Leghorn e frangos de corte (KUBENA et al., 1987; PHILLIPS et al., 1988). Neeff et al. (2013) também relatam redução dos efeitos deletérios sobre o peso relativo de fígado e rim e redução dos resíduos de AFB_1 e também de produtos de biotransformação de AFB_1 (AFB_2, Aflatoxicol, e AFG_1) em fígado de frangos de corte ao final da fase inicial de criação (21 dias), com uso de 0,5% de HSCAS e administração de 2,5 mg de AFB_1/kg de ração).

3.9. Cromatografia líquida de alta Eficiência

Para a detecção das aflatoxinas presentes nas matérias-primas e nas rações, e para a determinação dos biomarcadores hepáticos e aduto sérico são utilizadas metodologias que têm por base o uso de equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Estes métodos são os mais amplamente usados para a detecção de aflatoxinas em alimentos ou materiais biológicos.

Vários nomes têm sido utilizados para denominar esta técnica de cromatografia líquida: alta velocidade, alto desempenho, alta resolução e alta eficiência. O nome mais aceito e utilizado em português é “cromatografia líquida de alta eficiência” (GUIMARÃES; COLLINS, 1988).

A cromatografia líquida de alta eficiência consiste em método separação de compostos em solução. A história da cromatografia líquida passa por uso de coluna de carbonato de cálcio, camada fina de sílica, camada delgada (cromatografia de camada delgada) e finalmente o uso de colunas líquido-líquido até a chegada da moderna cromatografia líquida

de alta eficiência, com auxílio de colunas cromatográficas (MILLER, 2005). A cromatografia tem como princípio básico a separação de misturas, no qual os componentes a serem separados estão em uma das duas fases: fase móvel e fase estacionária. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, cheias de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (GUIMARÃES; COLLINS, 1988).

A cromatografia de adsorção (líquido-sólido) é utilizada para separar espécies não polares, isômeros estruturais e compostos alifáticos. As fases estacionárias utilizadas para este tipo de técnica compreendem somente sílica ou alumina, sendo o componente menos polar aquele que elui primeiro. Diminuindo-se a polaridade da fase móvel aumenta-se a retenção dos componentes. A cromatografia de adsorção não admite solventes aquosos (COLLINS; BRAGA. 1990).

Atualmente se faz uso da cromatografia líquida de fase reversa. A CLAE de fase reversa (FR-CLAE) consiste em uma fase imóvel apolar e uma fase móvel de polaridade moderada. Uma das fases estacionárias mais comuns deste tipo de cromatografía é a silica tratada com RMe_2SiCl, em que o R é uma corrente alquil tal como $C_{18}H_{37}$ou C_8H_{17}. O tempo de retenção é maior para as moléculas de natureza apolar, enquanto as moléculas de caráter polar sofrem eluição mais rapidamente. Variando a natureza dos grupos funcionais da fase estacionária é possível obter diferentes tipos de seletividade. Tais grupos podem ser de natureza polar como o grupo amino ($-NH_2$) e o grupo nitrilo (-CN), que funcionando similarmente às fases polares da cromatografia líquido-sólido, são chamados de fase "normal"; ou de natureza apolar, como os grupos octil ($-C_8H_{17}$), octadecil ($-C_{18}H_{37}$), fenil ($-C_6H_5$), etc., que são de fase "reversa" (GUIMARÃES; COLLINS, 1989).

Existem diversos tipos de detectores utilizados em CLAE. A classe mais usada é a de detectores fotométricos, baseados na absorbância no ultravioleta e no visível; depois são os refratométricos e, finalmente, as classes especiais, que de uma maneira geral são mais específicos e menos utilizados (por fluorescência, eletroquímicos, de radioatividade...) (GUIMARÃES; COLLINS, 1989).

Para a detecção e quantificação de aflatoxinas, é muito comum o uso de detectores por fluorescência. A espectroscopia por fluorescência pode ser usada como método de detecção específico e é um dos mais sensíveis da para compostos que fluorescem (GUIMARÃES;

COLLINS, 1989). Os detectores mais usados consistem de detectores de fluorescência multi-comprimento de onda. Este tipo de detector é mais caro e complicado, e usualmente consiste de dois monocromatores. Um dos monocromatores provê o comprimento de onda selecionado para a excitação e o outro, o comprimento de onda selecionado para emissão (SCOTT, 1999).

A partir da intensidade dos sinais identificados nos detectores, aliado com outras informações, como o tempo de retenção, são elaborados os cromatogramas utilizados para as análises finais.

3.10. Cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massa

Os princípios fundamentais da espectrometria de massa (EM) datam do fim dos anos 1890, quando J. J. Thomson determinou a razão massa/carga do elétron, e Wien estudou a deflexão magnética de raios anódicos e determinou que os raios eram carregados positivamente. Cada estudioso recebeu um Prêmio Nobel (Thomson em 1906 e Wien em 1911) por seus trabalhos. Contudo, a espectrometria de massa não se popularizou até mais ou menos 50 anos atrás, quando foram disponibilizados instrumentos baratos e confiáveis (PAVIA et al., 2010).

Nas décadas de 1980 e 1990, o desenvolvimento de técnicas de ionização para compostos com pesos moleculares altos e amostras biológicas introduziu a espectrometria de massa para uma nova comunidade de pesquisadores. Em clínicas de saúde de todo o mundo, por exemplo, a EM é usada em testes de sangue e urina para tudo, desde registro da presença e do nível de certos compostos que são marcadores de estados patológicos, incluindo muitos cânceres, até detecção de presença e análise de drogas ilícitas ou anabolizantes (PAVIA et al., 2010).

Para o acoplamento da técnica de CLAE com a EM, é necessária a ionização das moléculas de interesse. Basicamente, o primeiro componente do espectrômetro de massa é a unidade de entrada de amostra, que traz a amostra do ambiente laboratorial (1 atm de pressão) para a pressão mais baixa do espectrômetro de massa, que podem ir de poucos milímetros de mercúrio em uma fonte de ionização química até alguns micrômetros de mercúrio nas regiões do analisador de massa e do detector do instrumento. A unidade de entrada de amostras leva até a fonte de íons, onde as moléculas da amostra são transformadas em íons em fase gasosa. Os íons são, então, acelerados por um campo eletromagnéticos. A seguir, o analisador de massa separa os íons da amostra baseado em sua razão massa/carga (*m/z*). Os íons são, então,

contados pelo detector, e o sinal é registrado e processado pelo sistema de dados, em geral um computador pessoal. O produto do sistema de dados é o espectro de massa – um gráfico de número de íons detectados como uma função de sua razão *m/z* (PAVIA et al, 2010).

Os compostos que são separados por CLAE são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, de maneira que não é possível ionizá- los utilizando as técnicas de ionização mais comumente aplicadas na espectrometria de massa (ARDREY, 2002). Desta forma, para o acoplamento da CLAE à EM foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas. Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no interfaceamento do sistema CLAE com EM foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais, muitas vezes, também é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis (ARDREY, 2002). Por esse motivo muitos autores referem-se a algumas dessas interfaces simplesmente como fontes de ionização.

A técnica de ionização por eletrospray (*ESY*) é útil para estudar biomoléculas com peso molecular baixo ou alto e outros compostos lábeis e não voláteis. Nesta técnica, uma solução contendo as moléculas da amostra é borrifada na ponta de um tubo capilar fino para dentro de uma câmara aquecida, isto é, em pressão quase atmosférica. O tubo capilar pelo qual a solução da amostra passa tem um potencial de alta voltagem em sua superfície, e pequenas gotículas carregadas são expulsas para dentro da câmara de ionização. As gotículas carregadas enfrentam um contrafluxo de um gás de secagem (geralmente o nitrogênio) que evapora as moléculas de solvente das gotículas. Assim, a densidade de carga de cada gotícula aumenta até que as forças repulsivas eletrostáticas excedam a tensão superficial da gotícula (o limite de Rayleigh), quando então a gotícula divide-se em gotículas menores. O processo continua até que os íons da amostra, livres de solvente, sejam deixados na fase gasosa (PAVIA et al., 2010).

Quanto aos analisadores de massa, que recebe o feixe de íons acelerado por um campo elétrico, este é responsável pela separação dos íons de acordo com suas razões *m/z*, podendo ser de vários tipos, como de setor magnético, de foco duplo, quadruopolar, duplo quadruopolar, ou por tempo de vôo. O detector de um típico espectrômetro de massas é composto de um contador que produz uma corrente proporcional ao número de íons que o atingem (PAVIA et al., 2010).

Na micotoxicologia, as metodologias desenvolvidas para detecção de micotoxinas são amplamente usadas. É relatado seu uso na detecção de aflatoxinas em alimentos como cevada,

trigo, soja, milho, amendoim e manteiga de amendoim (SIRHAN et al., 2013), em leite (HUANG et al., 2015), sorvetes (OSSA et al., 2015), bebidas de café e malte (KHAYOON et al., 2014), trigo, milho, flocos e *snacks* de milho (LATTANZIO et al., 2014). Atualmente, os sistemas de CLAE-EM são bastante utilizados para determinação de resíduos ou biomarcadores de micotoxinas em materiais biológicos (GROOPMAN et al., 2014; JAGER et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PREPARAÇÃO PARA O EXPERIMENTO

4.1.1. Cultivo de fungos para obtenção de aflatoxinas.

Esta etapa consistiu no cultivo de fungos *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 objetivando-se a produção de aflatoxinas para uso no preparo das dietas experimentais. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP/Pirassununga.

O cultivo de *Aspergillus parasiticus* visando a produção laboratorial de aflatoxinas foi feito seguindo metodologia descrita por Shotwell et al. (1966), descrita a seguir.

1. Semear o fungo em placas de Petri grandes contendo o meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*) e deixar crescer por 1 semana no escuro ou até a placa estar coberta de fungos;
2. Pesar 76 gramas de arroz em *erlenmeyers* e adicionar 30 mL de água destilada. Tampar e deixá-los por, no mínimo, 2 horas em temperatura ambiente para embeber os grãos;
3. Autoclavar os erlenmeyers com arroz sob temperatura de 121ºC durante 15 minutos (tempo de esterilização); aguardar atingir temperatura ambiente.
4. Ligar o fluxo laminar com, no mínimo, 30 minutos de antecedência. Soltar o arroz autoclavado que está aderido às paredes dos erlenmeyers, batendo-os cuidadosamente sobre uma esponja na bancada até soltar os grãos;
5. Colocar os erlenmeyers autoclavados e uma placa de Petri com a cultura de *Aspergillus* no fluxo laminar. Ligar a chama, esterilizar uma espátula e cortar uma pequena porção do material de cultura e transferir para o erlenmeyer. Tampar o erlenmeyer e agitar;
6. Após a semeadura, deixar os erlenmeyers em repouso por 24 horas a 27ºC no escuro. Colocá-los na mesa agitadora a 250 rpm, em temperatura ambiente e no escuro por 1 semana. Após este período, os grãos tornam-se marrom-dourado;
7. Interromper o crescimento do fungo adicionando 40 mL de clorofórmio, molhando os tampões de algodão e as paredes do erlenmeyer. Agitar cada erlenmeyer

vigorosamente por alguns segundos para distribuir o clorofórmio e deixar a mistura repousando uma noite para inativar o fungo. Evaporar o clorofórmio dos frascos em capela de exaustão;

8. Colocar o material à base de arroz em estufa de ar forçado a 40ºC por uma noite para secar. Depois de seco, o material de cultura deve ser moído, homogeneizado e examinado por sistema de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação das concentrações das aflatoxinas.
9. O material de cultura seco deve ser estocado em recipientes plásticos sob refrigeração.

4.1.2. Análise micotoxicológica do material produzido por meio do cultivo de fungos (Item 4.1.1).

Diversos lotes foram obtidos a partir do cultivo de fungos *Apergillus parasiticus*. As análises de quantificação de aflatoxinas foram feitas de acordo com a metodologia descrita a seguir (VICAM (1999), modificada por OLIVEIRA (2013)).

1. Pesar o lote produzido e coletar amostras de 10 regiões diferentes do material, transferindo para um béquer;
2. Homogeneizar bem a amostra com auxílio de bastão de vidro;
3. Pesar 1 grama da amostra homogeneizada e devolver o restante ao lote inicial;
4. Realizar a extração das micotoxinas adicionando 20 mL de solução de metanol:água (v:v; 70:30) com auxílio de mesa agitadora por 30 minutos a 240 rpm;
5. Filtrar o extrato em papel filtro e recolher 1mL em balão volumétrico de 100 mL;
6. Completar o balão volumétrico com solução de metanol:água (v:v; 50:50);
7. Homogeneizar bem a solução, invertendo o balão volumétrico repetidas vezes;
8. Tomar 500 µL da solução em um *vial* de 2,0 mL. Evaporar totalmente o extrato e acrescentar 200 µL de n-hexano e 100 µL de ácido trifluoroacético Fechar o *vial*, agitar a mistura em vortex e colocar em estufa a 35°C por 10 minutos. Evaporar totalmente com auxílio de concentrador de amostras;
9. Ressuspender em 500 µL de solução de metanol:água (v:v; 50:50);
10. Preparar a injeção no aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com as instruções para corrida cromatográfica[1].

[1]Condições para a corrida cromatográfica: Detector de fluorescência (excitação: 360 nm e emissão: 440 nm); coluna Phenomenex® ODS (5 µm) 4,6x150 mm; pré-coluna Shem-pack® (5 µm) 4x10 mm; loop de 20 µL; fase móvel: água:acetronitrila:metanol (60:20:20); fluxo de 1,0 mL/minuto.

Os resultados parciais obtidos dos lotes utilizados na preparação das dietas experimentais encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração (mg) total de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 nos diferentes lotes de cultivo de *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 utilizados para preparo das dietas experimentais.

Lote	AFG_1(mg)	AFB_1(mg)	AFG_2(mg)	AFB_2(mg)
4	13,40	38,34	0,57	1,35
5	19,72	48,89	0,87	1,71
6	19,89	54,34	0,50	2,13
7	20,65	65,89	2,10	3,57
8	23,14	70,76	1,00	5,04
9	5,60	11,12	0,08	0,24
12	6,54	19,14	0,16	0,62
14	6,64	15,11	0,11	0,20

Observando-se os resultados de concentrações de AFB_1 obtidas por intermédio do cultivo fúngico é possível notar que as quantidades produzidas variam muito de um lote para o outro. A produção de aflatoxinas é favorecida especialmente pela umidade relativa do ar (superior a 80%), alta temperatura ambiental e condições de integridade e teor de umidade do substrato. O *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus* proliferam em temperaturas entre 32°C e 33°C. As aflatoxinas geralmente são produzidas na faixa entre 13°C e 42°C, embora entre 25°C a 30°C seja considerada temperatura ótima para sua síntese (BATATINHA; SIMAS; GÓRNIAK, 2008).

4.1.3. Análise micotoxicológica das matérias-primas das dietas experimentais.

As matérias-primas constituídas de grãos que foram utilizadas no preparo da alimentação dos animais passaram por análise para verificar a presença de aflatoxinas (Tabela

2). As análises foram realizadas de acordo com a metodologia de Vicam (1999), apresentada a seguir.

1. Triturar todo o produto em moinho (~14 mesh);
2. Colocar 25 gramas em um erlenmeyer, juntamente com 5 gramas de NaCl e 125 mL de solução de metanol:água (v:v; 70:30);
3. Agitar o material em mesa agitadora a 240 rpm por 50 minutos;
4. Filtrar o extrato em papel filtro, recolhendo 15 mL em um béquer;
5. Adicionar ao extrato 30 mL de água ultrapura, homogeneizar e filtrar em filtro de microfibra (1,5 μm), recolhendo em um béquer;
6. Passar 15 mL do filtrado (~1,0 grama da amostra) por coluna de imunoafinidade (fluxo de 1-2 gotas/segundo);
7. Lavar a coluna através da passagem de 10 mL de água ultrapura (2 gotas/segundo);
8. Eluir as toxinas passando 1 mL de metanol (grau CLAE) (2 gotas/segundo) e recolher em *vial*;
9. Evaporar totalmente o extrato e acrescentar 100 μL de ácido trifluoroacético e 200 μL de n-hexano. Agitar a mistura em vórtex e colocar em concentrador de amostras a 35°C por até completa secagem;
10. Ressuspender o extrato em 500 μL de solução de metanol:água (v:v; 50:50) e reservar para a corrida cromatográfica[1].

[1]Condições para a corrida cromatográfica: Detector de fluorescência (excitação: 360 nm e emissão: 440 nm); coluna Phenomenex® ODS (5 μm) 4,6x150 mm; pré-coluna Shempack® (5 μm) 4x10 mm; loop de 20 μL; fase móvel: água:acetronitrila:metanol (60:20:20); fluxo de 1,0 mL/minuto. O resultado da análise encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Análise micotoxicológica dos grãos presentes nas dietas experimentais.

Ingrediente	AFB_1(μg/kg)	AFB_2(μg/kg)	AFG_1(μg/kg)	AFG_2(μg/kg)
Milho	0,845	0,065	0,655	0,07
Soja	0,48	0	0,095	0

Conforme os resultados apresentados é possível observar que as quantidades de aflatoxinas presentes nas matérias-primas são muito baixas (<0,2%), o que levou à sua desconsideração na preparação das dietas experimentais fornecidas aos animais.

4.2. PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1. Animais e instalações

Foram utilizados 240 pintos (BRASIL, 2006) de 1 dia de idade provenientes de matrizes comerciais de frango de corte, da linhagem comercial Cobb®, machos e vacinados no incubatório contra as doenças de Marek e Gumboro. As aves foram mantidas em boxes, em um único galpão, recebendo água e ração *ad libitum*. As mesmas foram distribuídas aleatoriamente em 24 boxes experimentais com 10 aves cada (4 dietas experimentais, 6 repetições de 10 aves cada), e mantidas sob experimento durante 42 dias, sendo que a intoxicação dos animais foi iniciada a partir do 8º dia. As dietas basais (inicial, crescimento e terminação) foram formuladas para estar em acordo com os requerimentos nutricionais para frangos de corte, recomendados por Rostagno (2011).

As aves estiveram alojadas em um mesmo galpão do Setor de Avicultura do *campus* da USP, em Pirassununga/SP. Foi tomada a precaução de os boxes no galpão estarem arranjados de acordo com o vento predominante, sendo que os boxes da dieta controle negativo estiveram diametralmente opostos aos da dieta controle positivo, com o vento fluindo da fileira da dieta não contaminada em direção à da fileira contaminada.

Tabela 3. Composição nutricional das dietas experimentais.

	Ração Inicial[1]	Ração de Crescimento[2]	Ração de Terminação[3]
Ingrediente	**1-21 dias**	**22 - 35 dias**	**36-42 dias**
Macro Ingredientes			
Farelo de Soja 45%	35,974	31,823	27,627
Milho 7,88%	57,107	60,995	65,747
Óleo de Soja	2,538	3,431	3,241
Sal Comum	0,350	0,350	0,350
Bicarbonato de Sódio	0,204	0,157	0,138
Fosfato Bicálcico	1,620	1,337	1,071
Calcário Calcítico	1,014	0,822	0,768
L-Lisina	0,175	0,145	0,175
DL-Metionina	0,301	0,253	0,236
Treonina	0,068	0,037	0,046
Adsorvente/Arroz/Caulim	0,500	0,500	0,500
Micro Ingredientes			
Premix Vitamínico-Mineral	0,400	0,400	0,400
Caulim	0,200	0,200	0,200
Níveis Nutricionais			
Matéria Seca (%)	88,7069	88,6887	88,6200
Proteína Bruta (%)	21,1500	19,5000	18,0000
Gordura (%)	5,2199	6,1816	6,0950
Fibra Bruta (%)	2,8946	2,7418	2,6016
Cinzas (%)	6,1296	5,4159	5,0930
Cálcio (%)	0,8825	0,7320	0,6380
Fósforo Digestível Verdadeiro (%)	0,3560	0,3130	0,2730
Energia Metabolizável Aves (kcal/kg)	2988	3100	3150
Lisina Digestível Aves (%)	1,2080	1,0780	1,0100
Metionina + Cistina Digestível (%)	0,8705	0,7870	0,7370
Treonina Digestível Aves (%)	0,7860	0,7010	0,6560
Triptofano Digestível Aves (%)	0,2372	0,2151	0,1931
Sódio (%)	0,2125	0,2000	0,1950
Cloro (%)	0,2609	0,2611	0,2619
Potássio (%)	0,8239	0,7592	0,6962
Acido Linoléico (%)	2,7450	3,2520	3,2056

[1]Composição do Premix Vitamínico-Mineral da ração inicial (níveis/kg de ração): vitamina A 7000 U.I., vitamina D3 2200 U.I., vitamina E 11000 U.I., vitamina K3 1600mg, vitamina B1 2000mg, vitamina B2 5000mg, vitamina B6 3000mg, vitamina B12 12000mcg, niacina 35000mg, ácido pantotênico 13000mg, ácido fólico 0,800mg, cobre 0,100g, ferro 0,050g, manganês 0,070g, zinco 0,050g, iodo 1200mg, selênio 0,200mg, hidróxido de cloro 30000mg. [2]Composição do Premix Vitamínico-Mineral da ração de crescimento (níveis/kg de ração): vitamina A 6000,000 U.I., vitamina D3 2000,000 U.I., vitamina E 10000 U.I., vitamina K3 1600mg, vitamina B1 1400mg, vitamina B2 4000mg, vitamina B6 2000mg, vitamina B12 10000 mcg, niacina 30000mg, ácido pantotênico 11000mg, ácido fólico 0,600mg, cobre 0,100g, ferro 0,050 g, manganês 0,070g, zinco 0,050g, iodo 1200mg, selênio 0,200mg, hidróxido de sódio 30000mg.[3]Composição do Premix Vitamínico-Mineral da ração de terminação (níveis/kg de ração): vitamina A 5000,000 U.I., vitamina D3 1000,000 U.I., vitamina E 8000 U.I.,

vitamina K3 1600mg, vitamina B2 2000mg, vitamina B12 5000 mcg, niacina 20000mg, ácido pantotênico 9000mg, cobre 8000mg, ferro 0,050 g, manganês 0,070g, zinco 0,050 g, iodo 1200mg, selênio 0,200mg.

4.2.2. Adsorvente experimental

Como adsorvente experimental foi utilizado produto disponível no mercado à base de aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS). O HSCAS é uma classificação geral que inclui diferentes adsorventes, não sendo uma substância específica. Pode ser definido como todo material de aluminosilicato puro, que contenha mistura de água zeolítica e menores quantidades de cálcio e sódio na forma de cátions ou seus sais solúveis. O aluminosilicato de cálcio e sódio é geralmente reconhecido como seguro para uso em níveis que não excedam 2% da dieta.

4.2.3. Preparo das dietas experimentais

O arroz contaminado com AFB_1 e o HSCAS foram adicionados à ração basal em proporções adequadas, de maneira a obter, na ração final, os seguintes níveis: Dieta 1 (dieta basal, sem a adição de adsorvente nem de micotoxina); Dieta 2 (dieta basal suplementada com 0,5% de adsorvente); Dieta 3 (dieta basal suplementada com 0,5% de adsorvente e contaminada com 500 µg de AFB_1/kg de ração); Dieta 4 (dieta basal contaminada com 500 µg de AFB_1/kg de ração).

Tabela 4. Composição geral das dietas experimentais.

Dieta Experimental	**AFB_1(µg/kg de ração)**	**HSCAS (% na ração)**
Dieta 1	0	0
Dieta 2	0	0,5
Dieta 3	500	0,5
Dieta 4	500	0

As rações, assim preparadas, foram homogeneizadas por cerca de 15 minutos em misturador horizontal/helicoidal, e armazenadas em local apropriado até a sua utilização.

A preparação das rações contaminadas foi realizada em etapas, no decorrer do experimento. Nestas ocasiões, foram comprovados os níveis de AFB_1 nas rações prontas, retirando-se 1 amostra de 1 kg de cada ração preparada contendo toxina. A confirmação da concentração de aflatoxinas nas amostras de ração foi efetuada através de CLAE, conforme

Oliveira et al. (2008). Todas as dietas apresentaram o nível esperado de AFB_1 preconizado de 500µg/kg.

4.3. Variáveis sob estudo

4.3.1. Desempenho zootécnico

As características avaliadas para a determinação do desempenho zootécnico foram: Consumo de Ração (CR) = Sobra de Ração ao final do período (g) – Quantidade de Ração fornecida no início do período (g); Ganho de Peso (GP) = Peso médio das aves ao final do período (g) – Peso médio das aves no início do período (g); Conversão Alimentar (CA) = CR no período (g)/GP no período (g) e Índice de Eficiência Produtiva (IEP) = [(GP (g)/Número de dias do período) x VC]/(CA do período x 10). Também será avaliada a Viabilidade Criatória (VC) em % = (Número de aves ao final do período x 100)/Número de aves no início do período. Os cálculos destes parâmetros estão de acordo com Sakomura e Rostagno (2007), e o CR, o GP e a CA foram corrigidos para a mortalidade.

Para a avaliação do GP, do CR e da CA, as aves e as sobras de ração foram pesadas semanalmente. Para a determinação da Viabilidade Criatória, as aves foram contadas toda semana.

4.3.2. Biometria de órgãos e estudo histopatológico

Aos 21 e aos 42 dias de idade, 6 aves por tratamento, 1 ave por repetição (as mesmas que tiveram sangue coletado para realização de análise de bioquímica sérica (Item 4.3.3), hemograma completo (Item 4.3.4) e de minerais séricos (Item 4.3.5)) foram pesadas individualmente e sacrificadas por deslocamento cervical, tendo o fígado e os rins coletados para pesagem e análise histopatológica após confecção de lâminas, além de porção de fígado também ser armazenada para análise resíduos hepáticos de aflatoxinas (Item 4.3.6). Para a biometria, os órgãos foram pesados individualmente e determinada a porcentagem de peso correspondente ao peso do animal vivo. Para a análise histopatológica, os fragmentos de órgãos foram acondicionados em solução de formalina 10% até a confecção das lâminas e análise pelo Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

4.3.3. Bioquímica sérica

Os exames de bioquímica sérica foram feitos com amostras de soro de 12 aves por tratamento, aos 21 e aos 42 dias de idade dos frangos. Foram analisadas as enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama-glutamil transferase, lactato-desidrogenase, além da concentração de proteína total, albumina, ácido úrico e uréia. Os resultados das concentrações de globulinas foram obtidos por meio das diferenças entre as concentrações de proteína total e as de albumina ([GBL] = [PT] – [ALB]). As metodologias utilizadas para as análises estiveram de acordo com as indicações do fabricante dos *kits* comerciais empregados, e podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5. Metodologias e kits comerciais empregados nas determinações dos parâmetros bioquímicos séricos de frangos de corte.

Parâmetro Bioquímico	**Metodologia**	***Kit* comercial***
Albumina	Verde de Bromocresol	Albumina monoreagente K040®
Proteína Total	Método de Biureto	Proteínas totais monoreagente K031®
Gama-glutamiltransferase (GGT)	Método de Szaiz (1969) modificado	Gama GT cinético K080®
Aspartato aminotransferase (AST)	Método de cinética UV	Transaminase AST (TGO) cinética K048®
Alanina aminotransferase (ALT)	Método de cinética UV	Transaminase ALT (TGP) cinética K049®
Lactose Desidrogenase (LDH)	Método de cinética UV	Desidrogenase lática LDH UV K014®
Ácido Úrico	Método enzimático colorimétrico (UOD-PAP)	Ácido úrico monoreagente K139®
Uréia	Método cinética UV	Uréia UV K056®

*Bioclin® (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil).

4.3.4. Hemograma completo

Aos 21 e aos 42 dias de idade, 12 aves por tratamento (2 aves por repetição) tiveram sangue coletado com anticoagulante (EDTA – etileno diaminotetraacético de sódio ou potássio) por meio da punção da veia da asa para realização de hemograma, o qual constou de:

a) Hematócrito ou Volume Globular (%): com auxílio de capilar, como definido por Noriega (2000);

b) Contagem de Eritrócitos ($x10^6/mm^3$ de sangue): com auxílio de câmara de Neubauer e solução para coloração de Natt-Herrik, de acordo com Natt e Herrik (1952);
c) Dosagem de Hemoglobina (g/dL): com auxílio de aparelho espectrofotômetro pela Metodologia da Cianometahemoglobina (Hemoglobina K023® - Bioclin® - Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil);
d) Contagem Total de Leucócitos ($x10^3/mm^3$ de sangue): com auxílio de câmara de Neubauer e diluente para contagem de Natt-Herrik, de acordo com Natt e Herrik (1952);
e) Contagem Diferencial de Leucócitos (%): linfócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos, com auxílio da Técnica de Coloração de Rosenfeld (1947), de acordo com Noriega (2000);
f) VCM (Volume Corpuscular Médio) (fentolitros): os valores são obtidos de acordo com a seguinte equação: VCM = (Hematócrito em % x 10)/ Número de Eritrócitos/mm^3;
g) HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) (picogramas): os valores são determinados com auxílio da equação: HCM = ([Concentração de hemoglobina em g/dL] / [Número de Eritrócitos/mm^3]) x 10;
h) CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) (%): são estabelecidas por meio do uso da equação: CHCM = (Concentração de hemoglobina em g/dL / Hematócrito em %) x 100.

4.3.5. Análise de minerais séricos

Aos 21 e aos 42 dias de idade, 12 aves por tratamento (2 aves por repetição) tiveram sangue coletado sem anticoagulante por meio da punção da veia da asa para realização de dosagem da concentração de cálcio total e fósforo inorgânico séricos. A metodologia aplicada foi a do *kit* comercial utilizado: Método colorimétrico de ponto final Arzenazo III – Cálcio arzenazo III K051® para cálcio e Método UV de ponto final – Fósforo UV K068® para fósforo. Ambos *kits* são Bioclin® (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil).

4.3.6. Análises de Biomarcadores de Aflatoxinas

Foram determinados resíduos de AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2, Aflatoxicol, $AFB_{2\alpha}$, AFM_1, AFP_1 e AFQ_1 no fígado de 6 aves por tratamento (1 ave por repetição), bem como AFB_1-lisina no soro destas mesmas aves por meio das metodologias descritas a seguir.

4.3.6.1. *Determinação de resíduos de aflatoxinas em tecido hepático*

a) Preparação da amostra:

A amostra foi preparada e submetida ao processo de extração, com purificação com auxílio de coluna de imunoafinidade, de acordo com o protocolo descrito no fluxograma a seguir:

Primeira Etapa da Dupla Extração

Pesar 1 g da amostra previamente triturada em um Falcon de 15 mL

↓

Adicionar 4 mL de solução de metanol 80% (v/v) e deixar extraindo *overnight*

↓

Agitar a mistura em vórtex durante 5 minutos

↓

Submeter a mistura a aparelho de ultrassom durante 5 minutos

↓

Centrifugar a mistura a 5000 rpm durante 5 minutos

↓

Retirar o sobrenadante da mistura centrifugada e reservar o *pellet* formado*; transferir para um Falcon de 50 mL e adicionar 25 mL de solução tampão, homogeneizando

↓

Submeter a nova mistura à centrifugação sob alta velocidade para remoção da gordura

↓

Passar o volume total da mistura por coluna de imunoafinidade AflaTest® wb (Vicam®)

***Segunda Etapa da Dupla Extração**

Acrescentar 4 mL de solução de metanol 80% (v/v) ao *pellet* oriundo da centrifugação afim de se realizar uma segunda extração

↓

Agitar a mistura em vórtex durante 5 minutos

↓

Submeter a mistura a aparelho de ultrassom durante 5 minutos

↓

Centrifugar a mistura a 5000 rpm durante 5 minutos

↓

Retirar o sobrenadante da mistura centrifugada, transferir para um Falcon de 50 mL e adicionar 25 mL de solução tampão, homogeneizando

↓

Submeter a nova mistura a centrifugação a alta velocidade para remoção da gordura

↓

Passar a mistura pela mesma coluna de imunoafinidade da Primeira Etapa da Dupla Extração (AflaTest® wb (Vicam®))

↓

Lavar a coluna com 10 mL de solução tampão

↓

Lavar a coluna com 1 mL de água ultrapura

↓

Eluir os resíduos de aflatoxinas com 2 mL de metanol puro (grau CLAE), esperar pingar a primeira gota e fechar a saída da coluna de imunoafinidade

↓

Aguardar 5 minutos

↓

Recolher o eluato em um *vial* de 2 mL

↓

Submeter à secagem em condensador de amostras

↓

Ressuspender em 500 µL de solução de metanol 50% (v/v)

↓

Filtrar a solução em filtro de membrana PTFE (Politetrafluoretileno)

↓

Transferir a ressuspensão para um *vial* de 1 mL com *insert* e submeter a corrida cromatográfica previamente determinada em Item 3.3.6.1.b.

Os resultados do *Spiking* seguido do Teste de Recuperação se encontram na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6. Porcentagem de recuperação (%) oriunda de *Spiking* seguido de Teste de recuperação de amostras negativas fortificadas com aflatoxinas.

	Concentração
Aflatoxina	**1,0 ng/g**
Aflatoxina B_1	155,60%
Aflatoxina B_2	78,83%
Aflatoxina G_1	60,37%
Aflatoxina G_2	54,23%
Aflatoxina M_1	72,03%
Aflatoxicol	68,81%
Aflatoxina $B_2\alpha$	63,79%
Aflatoxina P_1	87,73%
Aflatoxina Q_1	41,32%

b) Condições do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massa com analisador tipo triplo quadruopolo (CLAE-EM/EM) e da corrida cromatográfica

As análises foram conduzidas em um sistema de UPLC Acquity I-Class (Waters Corp®.; Milford, MA, EUA) com sistema de bomba binária e injetor automático acoplado a um espectrômetro de massas Xevo TQ-S com fonte de ionização por eletrospray (*ESY*) equipado com Z-*spray* ortogonal (Waters Corp®, Milford, MA, EUA). O gás de nebulização e dessolvatação utilizado foi o nitrogênio, o qual tinha temperaturas de 150°C e 500°C, respectivamente, para cada função. Os fluxos dos gases usados para o cone e a dessolvatação foram de 150 e 500 l/h, respectivamente. A voltagem do capilar foi de 0,75 kV. A separação cromatográfica foi feita com auxílio de coluna Acquity® UPLC BEH C18 com 2,1 mm x 50 mm (diâmetro x comprimento) para partículas de até 1,7µm, a qual foi associada a uma pré-coluna Van Guard® 3/Pk, ambas da Waters® (Waters Corp®., Milford, MA, EUA). A obtenção dos dados foi feita com uso do Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) com ionização positiva por *electrospray* (ES^+). Foram acompanhados dois canais afim de se determinar o composto correto e sua confirmação (íon pai e íon filho). Os dados referentes ao íon precursor (pai), íon produto (filho), o *dwell time*, a voltagem do cone e a energia de colisão para cada composto encontram-se na Tabela 7. A aquisição de dados e seu processamento foram feitos com auxílio do software Masslynx versão 4.1 (Waters Corp.®

Milford, MA, EUA, 2005). A fase móvel da corrida cromatográfica foi um gradiente entre uma solução de água:ácido fórmico 0,1% (Solvente A) e outra de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (Solvente B). O gradiente está descrito na Tabela 8. O fluxo foi de 0,6mL/min. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 2,5 minutos, porém apenas o intervalo compreendido entre 1 e 2 minutos teve íons analisados pelo espectrômetro de massas, sendo os fluxos anterior e posterior a este tempo destinados a descarte. A temperatura da coluna foi de 40°C. Alíquotas de 10 µL de amostra foram usadas para injeção.

Tabela 7. Relação massa/carga (m/z) dos íons precursores e produtos, *dwell time*, voltagem do cone e energia de colisão para os resíduos hepáticos de aflatoxina.

Composto	**Íon Precursor (*m/z*)**	**Íon Produto (*m/z*)**	***Dwell Time* (seg.)**	**Voltagem do Cone (V)**	**Energia de Colisão (eV)**
Aflatoxina B_1	312,71	284,90 (Q)*	0,023	94,0	22,0
Aflatoxina B_1	312,71	241,07 (C)**	0,023	94,0	36,0
Aflatoxina B_2	314,79	287,04 (Q)	0,023	2,0	26,0
Aflatoxina B_2	314,79	259,02 (C)	0,023	2,0	28,0
Aflatoxina G_1	328,90	243,02 (Q)	0,023	2,0	26,0
Aflatoxina G_1	328,90	199,85 (C)	0,023	2,0	38,0
Aflatoxina G_2	330,91	245,03 (Q)	0,023	56,0	28,0
Aflatoxina G_2	330,91	188,98 (C)	0,023	56,0	40,0
Aflatoxina M_1	328,90	229,04 (Q)	0,023	52,0	38,0
Aflatoxina M_1	328,90	273,06 (C)	0,023	52,0	24,0
Aflatoxicol	296,91	114,99 (Q)	0,023	40,0	58,0
Aflatoxicol	296,91	268,65 (C)	0,023	40,0	20,0
Aflatoxina $B_{2\alpha}$	331,30	285,03 (Q)	0,023	6,0	24,0
Aflatoxina $B_{2\alpha}$	331,30	241,23 (C)	0,023	6,0	38,0
Aflatoxina P_1	299,27	271,01 (Q)	0,023	56,0	22,0
Aflatoxina P_1	299,27	215,12 (C)	0,023	56,0	30,0
Aflatoxina Q_1	329,28	177,22 (Q)	0,023	60,0	24,0
Aflatoxina Q_1	329,28	206,08 (C)	0,023	60,0	34,0

**Canal de Quantificação; **Canal de Confirmação.*

Tabela 8. Gradiente entre a solução de água:ácido fórmico 0,1% (Solvente A) e a de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (Solvente B) ao longo da corrida cromatográfica de 2,5 minutos para determinação de resíduos hepáticos de aflatoxinas.

Tempo (min.)	Fluxo da Fase Móvel (mL/min)	% Solvente A	% Solvente B
Início	0,6	90	10
0,20	0,6	90	10
1,30	0,6	40	60
1,35	0,6	10	90
1,60	0,6	10	90
1,70	0,6	90	10
2,50	0,6	90	10

Os padrões de aflatoxinas (Sigma-Aldrich®) encontram-se dissolvidos em metanol, etanol ou acetonitrila puros (todos grau CLAE), conforme o tipo, e foram calibrados espectrofotometricamente (γ = 200-360 nm) através da técnica preconizada por Scott (1990), para obtenção da concentração exata das toxinas. Após a calibração, foram transferidos volumes apropriados de cada padrão para um *vial*, evaporados até a secura com auxílio de concentrador de amostras e ressuspendidos em volumes convenientes de solução de água: metanol grau CLAE (v:v; 50:50), de maneira a obter soluções de trabalho contendo aproximadamente 1,0 μg AF/mL. Após, foi confeccionado um mix das 9 aflatoxinas na concentração 100ng/mL de cada toxina. Estas soluções foram utilizadas no preparo dos padrões da curva de calibração. Os tempos de retenção de cada aflatoxina encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Tempo de retenção na corrida cromatográfica das aflatoxinas usadas no mix de preparo da curva de calibração.

Aflatoxina	Tempo de Retenção (min.)
Aflatoxina B_1	1,22
Aflatoxina B_2	1,17
Aflatoxina G_1	1,16
Aflatoxina G_2	1,12
Aflatoxina M_1	1,12
Aflatoxicol	1,27
Aflatoxina $B_{2\alpha}$	1,13
Aflatoxina P_1	1,14
Aflatoxina Q_1	1,12

A curva de calibração foi feita utilizando as seguintes concentrações de aflatoxinas como pontos: 1 ng/mL, 0,75 ng/mL, 0,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,2 ng/mL, 0,15 ng/mL, 0,1 ng/mL e 0,05 ng/mL, com Coeficiente de Correlação igual a 0,99.

4.3.6.2. *Determinação de AFB_1-lisina em soro:*

a) Preparação da amostra

A uma alíquota de 250 µL de sobrenadante de amostra de soro foram adicionados 250 µL de solução de protease (13 mg de Pronase® - Merck Millipore®/1 mL de água ultrapura). A mistura é mantida a 40 °C por 10 horas. A extração SPE é realizada em cartuchos Waters Oasis MAX (Waters Corp.®, Milford, MA, EUA). O eluato foi submetido a evaporação até a secura, sendo reconstituído com solução de metanol:água (v:v; 25:75) e analisado por sistema CLAE-EM/EM (MCCOY et al., 2005). A sequência de etapas do processo de extração e preparação da amostra é descrita abaixo:

Centrifugar a amostra de soro a 14000 rpm durante 5 minutos

↓

Aliquotar 250 µL de soro sobrenadante

↓

Adicionar a cada amostra 250 µL de solução de protease

↓

Colocar a mistura em banho-maria por 10 horas para digestão enzimática

↓

Após as 10 horas, retirar a mistura do banho-maria e acrescentar 500 µL de água ultrapura

Após as etapas de preparação da mistura, deve-se seguir à etapa de condicionamento do cartucho Waters® Oasis MAX, conforme segue-se:

Passar 1 mL de metanol puro (grau CLAE) pelo cartucho

↓

Passar 1 mL de água ultrapura pelo cartucho

Após o condicionamento do cartucho, este está pronto para receber a mistura da amostra, seguindo-se as etapas de lavagem e eluição, conforme descrito a seguir:

Passar o volume total de mistura da amostra (±1 mL) pelo cartucho

↓

Lavar o cartucho com 1 mL de água ultrapura

↓

Lavar o cartucho com 1 mL de água ultrapura novamente

↓

Passar 1 mL de solução de metanol:água (v:v; 70:30) pelo cartucho

↓

Passar 1 mL de solução de metanol:hidróxido de amônia (v/v; 99:1) pelo cartucho

↓

Passar 0,5 mL de metanol puro (grau CLAE) pelo cartucho

↓

Eluir a AFB_1-lisina do cartucho com 1 mL de solução de metanol:ácido fórmico (v/v; 98:2) e recolher em um eppendorfe

↓

Submeter o eluato a secagem

↓

Ressuspender em 200 µL de solução de metanol:água (v/v; 25:75)

↓

Acondicionar a solução ressupendida em *vial* de 1 mL com *insert* de 350 µL

↓

Submeter a corrida cromatográfica

b) Condições do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas com analisador tipo triplo quadruopolo (CLAE-EM/EM) e da corrida cromatográfica

As análises foram conduzidas em um sistema de UPLC Acquity I-Class (Waters Corp.®; Milford, MA, EUA) com sistema de bomba binária e injetor automático acoplado a um espectrômetro de massas Xevo TQ-S com fonte de ionização por eletrospray (*ESY*) equipado com Z-*spray* ortogonal (Waters Corp.®, Milford, MA, EUA). O gás de nebulização e dessolvatação utilizado foi o nitrogênio, o qual tinha temperaturas de 150°C e 400°C, respectivamente, para cada função. Os fluxos dos gases usados para o cone e a dessolvatação foram de 150 e 800 l/h, respectivamente. A voltagem do capilar foi de 0,75 kV e a pressão do gás de nebulização foi de 5 Bar. A separação cromatográfica foi feita com auxílio de coluna Acquity® UPLC BEH C18 com 2,1 mm x 50 mm (diâmetro x comprimento) para partículas de até 1,7 µm, a qual foi associada a uma pré-coluna Van Guard® 3/Pk, ambas da Waters® (Waters Corp.®, Milford, MA, EUA). A obtenção dos dados foi feita com uso do Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) com ionização positiva por *electrospray* (ES^+).

Foram acompanhados dois canais afim de se determinar o composto correto e sua confirmação (íon pai e íons filhos). O valor da relação massa/carga (*m/z*) do íon precursor (pai) é de 457,16 e dos íons produtos (filhos) de 328,0; 348,0; 376,0 e 394,0. O canal de quantificação foi de *m/z* equivalente a 394,0 e os demais foram usados para confirmação. O *dwell time* foi de 0,147 segundos, a voltagem do cone de 30V e a energia de colisão para todos os compostos de 38eV. A aquisição de dados e seu processamento foram feitos com auxílio do software Masslynx versão 4.1 (Waters Corp.®, Milford, MA, EUA, 2005). A fase móvel da corrida cromatográfica foi um gradiente entre uma solução de água:ácido fórmico 0,1% (Solvente A) e outra de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (Solvente B). O gradiente está descrito na Tabela 10. O fluxo foi de 0,5 mL/min. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 6,0 minutos. A temperatura da coluna foi de 40ºC. Alíquotas de 10 µL de amostra foram usadas para injeção. O tempo de retenção da AFB_1-lisina é de 3,16 minutos.

Tabela 10. Gradiente entre a solução de água:ácido fórmico 0,1% (Solvente A) e a de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (Solvente B) ao longo da corrida cromatográfica de 6 minutos para determinação sérica de AFB_1-lisina.

Tempo (min.)	Fluxo da Fase Móvel (mL/min)	% Solvente A	% Solvente B
Início	0,5	95	5
0,50	0,5	95	5
5,00	0,5	75	25
5,50	0,5	10	90
6,00	0,5	95	5

Os padrões de AFB_1-lisina foram produzidos por meio da metodologia de Sass et al. (2014) encontra-se dissolvido em solução de metanol:água (v/v; 25:75) e tiveram suas concentrações pré-determinada por CLAE-EM/EM. Após a determinação da concentração exata do padrão, foi confeccionada uma solução de trabalho com concentração de 1 µg/mL em solvente metanol:água (v/v; 25:75).

Esta solução foi utilizada no preparo dos pontos da curva de calibração, que foram: 100 ng/mL, 80 ng/mL, 50 ng/mL, 40 ng/mL, 25 ng/mL, 20 ng/mL, 12,5 ng/mL e 10 ng/mL. O coeficiente de correlação foi de 0,99.

4.4. Forma de análise dos resultados

A forma de distribuição dos tratamentos foi em esquema fatorial 2x2. Os resultados do experimento foram submetidos à análise de variância, de acordo com os procedimentos estabelecidos no *General Linear Model* do SAS® (SAS INSTITUTE, 2002) para a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre as médias das variáveis estudadas nos diferentes tratamentos. Quando houve efeito de interação entre os fatores, aplicou-se o Teste de Tukey 5% de probabilidade. Quando os dados não se apresentaram paramétricos, foram submetidos a transformação e aplicou-se o teste de Kruskal Walis 5% de probabilidade. Quando os dados não paramétricos não atenderam os requisitos para aplicação do teste de Kruskal Walis, procedeu-se ao contraste ortogonal ($P<0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desempenho zootécnico

Conforme é possível observar na Tabela 11, para o estudo feito para a fase inicial de criação, é notável que não houve efeito de interação entre os fatores estudados (AFB_1 e HSCAS) para nenhuma variável de desempenho zootécnico avaliada. Sendo assim, nota-se que a AFB_1 não foi capaz de promover um prejuízo global à saúde das aves, porém o adsorvente não foi capaz de melhorar o desempenho dos frangos em nenhum quesito abordado, uma vez que não foi possível detectar efeito isolado de HSCAS sobre parâmetro algum. A micotoxina, isoladamente, exerceu efeito negativo sobre o Peso Médio e o Ganho de Peso dos animais, o que acaba se tornando importante economicamente a longo prazo, uma vez que o consumo de ração não diminuiu, mas o crescimento das aves foi menor.

Analisando-se os dados referentes ao período total de criação, bem como ocorreu na fase inicial, os fatores não sofreram interação para qualquer uma das variáveis avaliadas. Porém, a concentração usada de aflatoxina teve a capacidade de exercer influência negativa sobre a quase totalidade dos quesitos estudados, nos mostrando sua capacidade de prejudicar a saúde dos animais, refletindo em piora no desempenho zootécnico.

Houve efeito isolado de AFB_1 sobre o Consumo de Ração, o Peso Médio, o Ganho de Peso e o Índice de Eficiência Produtiva das aves. Em todos os casos, o micotoxina foi capaz de reduzir os índices, refletindo em prejuízo financeiro aos 42 dias.

A presença de adsorvente comercial na dieta aumentou o Consumo de Ração de aves, bem como elevou a Conversão Alimentar, o que é indesejável, uma vez que esta variável reflete a relação entre a quantidade de ração ingerida pelos animais e seu ganho de peso, nos mostrando que os frangos necessitaram se alimentar mais para produzir a mesma quantidade de carne.

É importante salientar que os dados mais representativos da criação industrial brasileira são os que abrangem a análise do período total de criação, que em nosso país situa-se em torno de 42 dias.

Como é possível observar, o peso corporal médio e o ganho de peso médio foram afetados negativamente pela ingestão de alimento contaminado pelas aves, uma vez que grande parte da energia e dos nutrientes absorvidos é recrutada para reparar os danos causados pelas aflatoxinas. Além disso, a diminuição no consumo de ração culmina com um menor

aporte nutricional, o que colabora para queda no crescimento dos animais e aumento na taxa de refugos. As concentrações de HSCAS e AFB_1 utilizadas neste experimento não foram suficientes para exercer influência sobre a viabilidade criatória, mas bastaram para que, ao exame necroscópico, fossem observados fígados lipêmicos e edemaciados, além de dificuldade no processo de coagulação do sangue por parte das aves, visto por meio de punções venosas que não estancavam e leves hemorragias, além de influência negativa observada por meio do estudo histopatológico hepático. Quanto ao IEP, também se observa piora nos resultados de aves ingerindo aflatoxinas.

A literatura fornece inúmeros resultados para comparação de variáveis de desempenho zootécnico. Aravind et al. (2003), administrando 0,168 mg de AF/kg de ração a frangos de corte, aos 35 dias de idade as aves apresentaram redução do ganho de peso, do peso médio e piora na conversão alimentar. Da mesma maneira, Denli et al. (2009), avaliando os mesmos parâmetros em aves de 42 dias alimentadas com dietas contaminadas com 1 mg AFB_1/kg de ração, apontam as mesmas alterações. Bintvihok & Kositcharoenkul (2005), usando 50 e 100 µg AFB_1/kg de ração, apresentam dados de redução de ganho de peso e consumo de ração de aves aos 28 e aos 42 dias de idade. Porém há uma melhora da conversão alimentar, tanto para os dados de 4 e 6 semanas. Aves com 4 semanas e na fase de terminação (35-42 dias) alimentadas com dieta contaminada com 100 µg de AF/kg de ração tiveram piora no ganho de peso, no consumo de ração e na conversão alimentar. Os aluminosilicatos comerciais utilizados nas concentrações de 0,5 e 0,2% na ração exibiram resultados tão ruins quanto os do grupo alimentado com aflatoxinas, não validando seus usos como adsorventes de micotoxinas, nas respectivas doses (PASHA et al, 2007). Efeitos de altas concentrações de AFB_1 são classicamente conhecidas na literatura. Rosa et al. (2001) mostram que 5 mg AFB_1/kg de ração administradas a aves no intervalo de 22 a 52 dias de idade foram capazes de promover queda acentuada no peso médio e aumento na conversão alimentar dos animais. Kubena et al. (1990a, 1990b) também estudaram os efeitos negativos de altas concentrações de AFB_1 (5 e 3,5 mg AF/kg de ração, respectivamente) e a possível melhora de desempenho por meio de auxílio de 0,5% de HSCAS na dieta. O ganho de peso nos intervalos de 1 a 7 dias, 8 a 14 dias, 15 a 21 dias e 1 a 21 dias sofreu diminuição nos valores e foi melhorado com uso do adsorvente comercial. A conversão alimentar não sofreu influências. Neeff et al. (2013), estudando os efeitos das de 2,5 mg AFB_1/kg de ração e 0,5% de adsorvente HSCAS, também encontraram redução do peso corporal e do ganho de peso de aves aos 21 dias de

idade. Igualmente, a conversão alimentar não foi afetada pela AFB_1, e o adsorvente comercial não foi efetivo.

A redução na taxa de crescimento, em aves, é o efeito da aflatoxicose mais significante economicamente (DENLI et al., 2009). Os efeitos adversos da AFB_1 no desempenho têm sido relatados com uma diminuição da utilização de energia e de proteína (DALVI; ADEMOYERO, 1984; VERMA et al, 2002), provavelmente como conseqüência da deterioração da eficiência digestiva e metabólica das aves (DENLI et al., 2009).

Tabela 11. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros de desempenho zootécnico[1] de frangos de corte na fase inicial (1-21 dias) e no período total de criação (1-42 dias) submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1.

Dieta Experimental		**1-21 dias**						**1-42 dias**					
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**VB (%)**	**CR (kg)**	**PM (kg)**	**GP (kg)**	**CA (kg/kg)**	**IEP**	**VB (%)**	**CR (kg)**	**PM (kg)**	**GP (kg)**	**CA (kg/kg)**	**IEP**
0	0	96,67	0,703	0,754	0,706	1,00	329,56	96,67	3,661	2,993	2,946	1,2415	546,01
0	0,5	100,00	0,793	0,794	0,752	1,05	344,85	100,00	3,947	3,079	3,037	1,2988	556,90
500	0,5	100,00	0,705	0,723	0,680	1,04	312,88	100,00	3,438	2,665	2,622	1,3113	476,54
500	0	100,00	0,702	0,740	0,697	1,01	331,04	100,00	3,176	2,602	2,509	1,2672	471,99
	EPM	0,57	0,017	0,010	0,010	0,020	8,016	0,57	0,007	0,049	0,051	0,01	9,60
	CV (%)	2,85	11,59	6,200	6,65	9,43	11,92	2,85	10,14	8,48	9,02	4,07	9,17
Fonte de Variação (Valor de P)													
AFB_1		0,1347	0,1920	0,0229	0,0305	0,9699	0,3681	0,1347	<0,0001	<0,001	<0,001	0,3372	<0,001
HSCAS		0,1347	0,1738	0,5016	0,4058	0,3383	0,9314	0,1347	0,0106	0,1706	0,0560	0,0187	0,4849
AFB_1 X HSCAS		0,1347	0,2032	0,103	0,0806	0,7885	0,3248	0,1347	0,9001	0,8247	0,8280	0,7371	0,7730
Efeitos Principais													
AFB_1	0	98,33	0,748	0,774a	0,728a	1,02	337,20	98,33	3,804a	3,036a	2,991a	1,2702	551,46a
	500	100,000	0,703	0,732b	0,689b	1,02	321,96	100,00	3,307b	2,633b	2,565b	1,2893	474,27b
HSCAS	0	98,33	0,702	0,747	0,702	1,00	330,30	98,33	3,418b	2,798	2,727	1,2543b	509,00
	0,5	100,000	0,749	0,759	0,716	1,04	328,86	100,00	3,693a	2,872	2,829	1,3051a	516,72

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey (efeito de interação) ou pela fonte de efeito principal (P<0,05).
[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 10 aves cada (60 aves).

5.2. Biometria de órgãos e estudo histopatológico

Os dados resultantes da biometria de órgãos das amostras coletadas aos 21 e aos 42 dias de idade estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Efeito do HSCAS sobre o peso relativo de fígado e rins de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade alimentados com dieta contaminada com AFB_1.

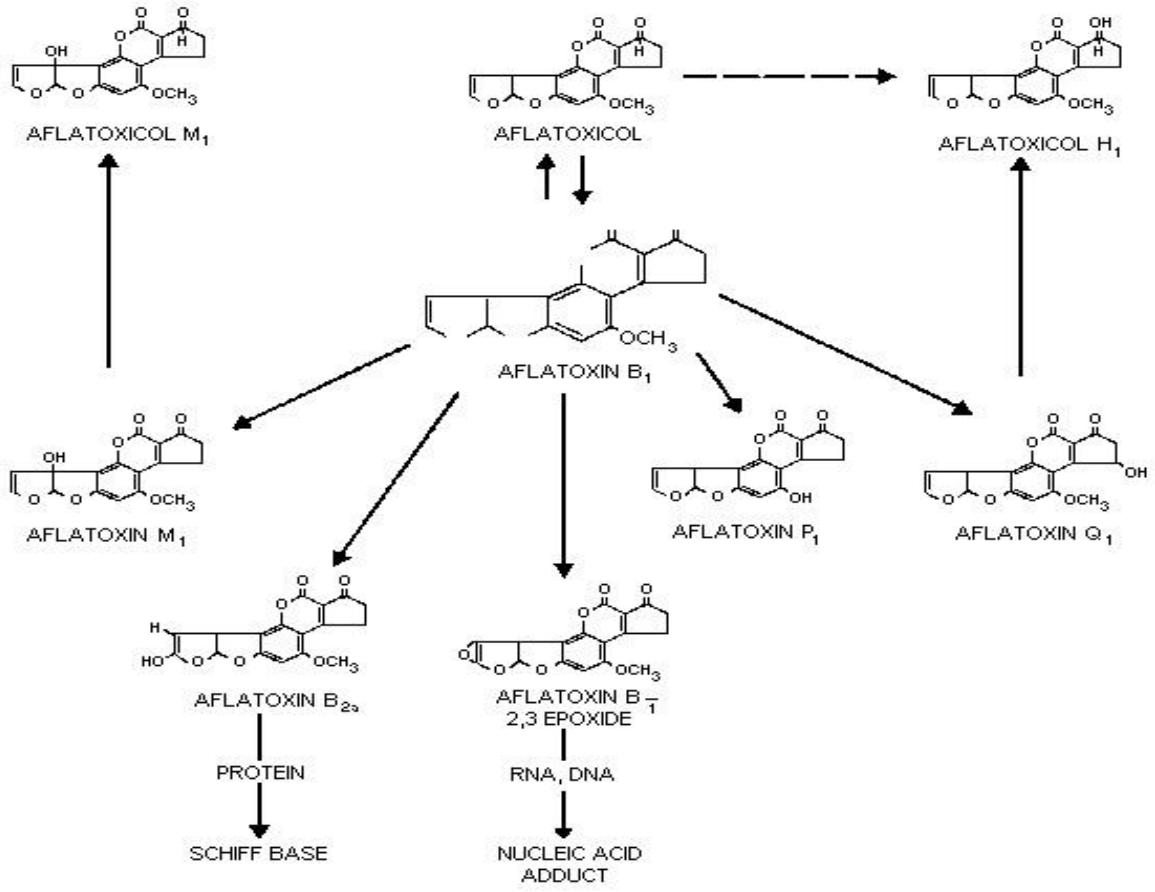
		Peso Relativo (g/100g)[1]			
Dieta Experimental		**21 dias**		**42 dias**	
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**Rins**	**Fígado**	**Rins**	**Fígado**
0	0	0,086	0,361	0,009	0,484
0	0,5	0,077	0,324	0,008	0,490
500	0,5	0,091	0,373	0,013	0,681
500	0	0,096	0,429	0,014	0,935
	EPM	0,004	0,015	0,001	0,050
	CV (%)	25,74	19,74	37,62	38,29
Fonte de Variação (Valor de P)					
AFB_1		0,2185	0,0460	0,0029	0,0002
HSCAS		0,4589	0,1064	0,2266	0,0935
AFB_1 X HSCAS		0,8539	0,7352	0,7695	0,0805
Efeitos Principais					
AFB_1	0	0,065	0,343b	0,009b	0,488b
	500	0,041	0,401a	0,013a	0,820a
HSCAS	0	0,091	0,395	0,011	0,709
	0,5	0,084	0,349	0,010	0,576

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey (efeito de interação) ou pela fonte de efeito principal (P<0,05).
[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 1 aves cada (6 aves). AFB_1 = aflatoxina B_1, HSCAS = aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado.

Conforme é possível notar, não houve efeito de interação entre os fatores estudados para nenhuma variável, em nenhuma data de colheita de material. Houve apenas o efeito isolado de AFB_1 para o tamanho de fígado aos 21 dias e para rins e fígado aos 42 dias de idade dos animais.

A presença de micotoxina nas dietas experimentais foi capaz de causar efeito deletério sobre o tamanho dos órgãos, condizente com a toxicidade hepática e renal causada pela AFB_1. A hepatotoxocidade das aflatoxinas é devido à metabolização destas substâncias ser feita neste órgão, com o objetivo de torná-las menos tóxicas e mais excretáveis, tanto pela urina, quanto pela bile ou até mesmo pelo leite. Um esquema das vias de metabolização da aflatoxina B_1 é apresentado abaixo (Figura 4).

Figura 4. Vias de Biotransformação da AFB_1 (Adaptada de WHO, 1979).



Corroborando os resultados apresentados neste trabalho, Pasha et al. (2007) também relatam aumento do peso relativo do fígado em aves se alimentando com dieta contaminada com 100 µg de AF/kg de ração. Os aluminosilicatos testados pelos autores nas concentrações de 0,5 e 0,2% foram eficientes na redução do tamanho dos fígados das aves intoxicadas. A absorção das aflatoxinas ocorre principalmente no trato intestinal, pela passagem do meio exterior para o interior do organismo através das membranas celulares, alcançando a corrente sanguínea. Devido ao seu baixo peso molecular, estas moléculas são rapidamente absorvidas através das membranas. A composição lipídica das membranas facilita este transporte devido à lipossolubilidade da molécula de aflatoxina (MASOERO et al., 2007). A biotransformação das aflatoxinas ocorre em sua maior parte no fígado, pela ação das enzimas microssomais do citocromo P450, localizadas no retículo endoplasmático liso e no citoplasma (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). Desta maneira, é possível entender porque o tecido hepático é lesado em exposições crônicas ou agudas à aflatoxinas. Em frangos, é muito comum observar-se esteatose hepática (acúmulo de gordura no fígado) visível a olho nu, que deixa o órgão amarelado, com bordos arredondados e com textura “emborrachada”.

Quezada et al. (2000) também relataram haver aumento no peso de fígados e de rins de aves submetidas a dieta contaminada com 2 µg/g de ração aos 21 e aos 28 dias de idade. Rosa et al. (2001), trabalhando com alta concentração de AFB_1 na ração (5 mg AFB_1/kg de ração) também mostra haver severo aumento nos pesos de fígado e rins das aves intoxicadas. Dados semelhantes foram apresentados por Kubena et al. (1990a, 1990b, 1993b), em que aves alimentadas com 5, 3,5 e 5 mg de AF/ kg de ração exibiram maiores pesos de fígado e rins em aves de 28, 21 e 21 dias de idade, respectivamente. Aves de 42 e 21 dias de idade também exibiram aumento nos pesos relativos de fígado e rins quando alimentadas com dietas contaminadas com 0,1 mg de AF e 2,5 mg AFB_1/kg de ração, respectivamente (SHI et al., 2006; NEEFF et al, 2013).

Quanto ao estudo histopatológico, para os rins, tanto aos 21 quanto aos 42 dias de idade praticamente não apresentaram lesão, apenas raros grupamentos inflamatórios. Já as amostras de fígado apresentaram lesões 2 e 3 cruzes, correspondentes a esteatose e degeneração baloniforme dos hepatócitos (Tabela 13).

Kubena et al. (1990a, 1990b) relatam haver proteção de 0,5% de HSCAS contra os efeitos histopatológicos deletérios em fígado para aves de 28 dias alimentadas com 5 mg de AF/kg de ração. Já Kubena et al. (1990a) e Neeff et al. (2013) mostraram não haver efeito protetivo do HSCAS contra lesões histopatológicas em aves alimentadas com 3,5 mg AF e 2,5 mg AFB_1/kg de ração aos 21 dias de idade. Rosa et al. (2001) também mostram haver lesão hepática ao exame histopatológico de fígados de aves ingerindo 5 mg AFB_1/kg de ração. Esteatose hepática moderada foi encontrada.

Tabela 13. Estudo histopatológico de fígado e rim de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade alimentados com dieta com AFB1[1] e HSCAS[2].

Estudo Histopatológico									
Dieta Experimental		**21 dias**				**42 dias**			
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**Valor individual da lesão[3] em Rim**	**Valor média da lesão em Rim**	**Valor individual da lesão em Fígado**	**Valor média da lesão em Fígado**	**Valor individual da lesão em Rim**	**Valor média da lesão em Rim**	**Valor individual da lesão em Fígado**	**Valor média da lesão em Fígado**
0	0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0
0	0,5	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0
500	0,5	1, 0, 0, 0, 0, 0	0,16	2, 0, 0, 0, 0, 1	0,50	0, 0, 1, 0, 0, 0	0,16	2, 1, 3, 2, 0, 1	1,5
500	0	0, 0, 0, 1, 0, 0	0,16	0,2, 1, 3, 1, 0	1,17	0, 1, 0, 0, 0, 0	0,16	3, 3, 0, 3, 1, 2	2

[3]Lesões baseadas em classificação por cruzes (0, 1, 2 ou 3 cruzes). Para fígado: 0 = Fígado com arquitetura preservada, sem proliferação/ativação de linfócitose sem degeneração hepatocelular; 1 = Fígado com arquitetura preservada, com proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração hepatocelular; 2 = Fígado com arquitetura pouco distorcida, com proliferação/ativação de linfócitos e degeneração hepatocelular; 3 = Fígado com arquitetura distorcida, moderada proliferação/ativação de linfócitos e intensa degeneração hepatocelular. Para rim: 0 = Rim com glomérulos preservados, sem proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração tubular; 1 = Rimcom glomérulos preservados, com proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração tubular; 2 = Rim com glomérulos preservados, com proliferação/ativação de linfócitos e degeneração tubular; 3 = Rim com glomérulos preservados, intensa proliferação/ativação de linfócitos e degeneração tubular (Imagens ilustrativas em Apêndice A).

5. 3. Bioquímica sérica

O exame de bioquímica sérica foi feito com amostras de soro de 12 aves por tratamento, aos 21 e aos 42 dias de idade dos frangos. Foram analisadas as enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama-glutamiltransferase, lactato-desidrogenase, além da concentração de proteína total, albumina, ácido úrico e uréia. Os dados podem ser observados nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros bioquímicos séricos[1] de frangos de corte com 21 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1.

Dieta Experimental		AST	ALT	GGT	LDH	PT	ALB	GLOB	AU	UR
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**(U/L)**	**(U/L)**	**(U/L)**	**(U/L)**	**(g/dL)**	**(g/dL)**	**(g/dL)**	**(g/dL)**	**(g/dL)**
0	0	252,66	9,00ab	11,41	2581,00	2,52	1,82	0,700	12,6	3,41
0	0,5	257,58	14,58a	9,75	2236,17	2,71	1,95	0,769	9,54	2,41
500	0,5	317,41	8,16b	9,08	2835,00	1,36	0,93	0,435	10,85	3,75
500	0	438,09	9,20ab	14,45	2980,00	1,35	0,92	0,435	12,14	4,18
	EPM	20,57	0,81	0,77	247,9	0,10	0,08	0,020	0,64	0,30
	CV (%)	44,9	52,3	47,7	64,1	35,1	37,6	32,4	38,7	60,2
Fonte de Variação (Valor de P)										
AFB_1		0,0005	0,041	0,425	0,3296	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7373	0,08
HSCAS		0,2113	0,1318	0,021	0,6308	0,274	0,3229	0,3377	0,0924	0,2317
AFB_1 X HSCAS		0,1303	0,0309	0,215	0,8444	0,34	0,424	0,3377	0,4895	0,6327
Efeitos Principais										
AFB_1	0	255,12b	12,04	10,58	2408,0	2,62a	1,88a	0,735a	11,07	2,91
	500	375,13a	8,36	11,65	2904,0	1,36b	0,92b	0,435b	11,46	3,95
HSCAS	0	341,30	9,10	11,65a	2904,0	1,36	0,92	0,435	11,46	3,95
	0,5	287,50	11,37	9,41b	2535,5	2,04	1,44	0,600	10,19	3,08

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey (efeito de interação) ou pela fonte de efeito principal (P<0,05).

[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 2 aves cada (12 aves). AST = aspartato aminotransferase, ALT = alanina aminotransferase, GGT = gama-glutamiltransferase, LDH = lactato-desidrogenase, PT = proteína total, ALB = albumina, GLOB = globulinas, AU = ácido úrico, UR = uréia.

Tabela 15. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros bioquímicos séricos[1] de frangos de corte com 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1.

Dieta Experimental		**AST**	**ALT**	**GGT**	**LDH**	**PT**	**ALB**	**GLOB**	**AU**	**UR**
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**(U/L)**	**(U/L)**	**(U/L)**	**(U/L)**	**(g/dL)**	**(g/dL)**	**(g/dL)**	**(g/dL)**	**(g/dL)**
0	0	111,7	8,20	13,3	1364,00	3,31	1,66	1,650	4,65	2,80
0	0,5	96,00	6,91	12,75	1109,00	3,44	1,69	1,75	5,52	3,08
500	0,5	79,45	6,45	25,81	868,36	2,67	1,34	1,32	4,33	3,27
500	0	99,63	7,72	26,45	1008,27	2,56	1,16	1,40	4,07	2,36
	EPM	5,45	0,34	1,36	63,63	0,09	0,05	0,05	0,18	0,12
	CV (%)	37,6	30,8	46,2	39,0	20,4	22,3	21,2	26,0	27,2
Fonte de Variação (Valor de P)										
AFB_1		0,191	0,49	<0,0001	0,0169	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,0122	0,622
HSCAS		0,103	0,064	0,7315	0,1318	0,422	0,097	0,8873	0,098	0,009
AFB_1 X HSCAS		0,836	0,993	0,7993	0,6313	0,932	0,319	0,3081	0,3687	0,163
Efeitos Principais										
AFB_1	0	103,13	7,50	13,00b	1225,25a	3,88a	1,67a	1,71a	5,12a	2,95
	500	89,54	7,09	26,13a	938,31b	2,61b	1,25b	1,36b	1,36b	2,81
HSCAS	0	105,38	7,95	20,19	1178,1	2,92	1,40	1,52	4,34	2,57b
	0,5	88,08	6,69	19,00	993,91	3,07	1,52	1,55	4,95	3,17a

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes pela fonte de efeito principal (P<0,05).

[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 2 aves cada (12 aves). AST = aspartato aminotransferase, ALT = alanina aminotransferase, GGT = gama-glutamiltransferase, LDH = lactato-desidrogenase, PT = proteína total, ALB = albumina, GLOB = globulinas, AU = ácido úrico, UR = uréia.

Analisando-se os resultados obtidos nas amostras coletadas aos 21 dias de idade das aves, as enzimas hepáticas sofreram efeito de interação apenas para a enzima alanina aminotransferase. Para esta variável, a dieta contendo 0,5% de HSCAS apresentou os maiores valores. A menor atividade enzimática foi detectada nos animais que consumiram a dieta que associou HSCAS e AFB_1, e os demais tratamentos apresentaram valores intermediários, permitindo afirmar que o adsorvente comercial foi capaz de igualar os valores aos do grupo controle negativo. Os resultados encontrados no presente estudo não corroboram os trabalhos de Aravind et al. (2003) e Tedesco et al. (2004), nos quais se observou diminuição precoce da atividade da ALT em frangos de corte submetidos a dieta naturalmente contaminada com micotoxinas (168 µg de AFB_1/kg de ração) e em frangos de corte submetidos a 800 µg de AFB_1/kg de ração durante 35 dias de tratamento, respectivamente.

O HSCAS exerceu efeito isolado apenas sobre a atividade da enzima gama-glutamiltransferase, em que a presença do adsorvente diminuiu a concentração média da enzima. Quanto às demais variáveis analisadas, a aflatoxina B_1 exerceu efeito isolado sobre a atividade enzimática de AST e sobre as proteínas plasmáticas. A concentração de aspartato aminotransferase foi aumentada pela presença de AFB_1, e a micotoxina foi capaz de diminuir a concentração de todas as proteínas avaliadas. Estes resultados mostram claramente o efeito deletério causado pela AFB_1 sobre a concentração de proteína total, albumina e globulinas. Todos os três parâmetros foram diminuídos nas amostras oriundas das dietas contendo toxina, podendo ser calculadas quedas de 48,09% na concentração sérica de proteína total, de 51,06% na concentração de albumina e de 40,82% na concentração de globulinas.

Quanto às análises feitas com as amostras de aves de 42 dias de idade, não houve efeito de interação entre os fatores (HSCAS e AFB_1) para nenhuma variável estudada, o que indica uma não ação do adsorvente escolhido sobre os parâmetros de saúde das aves. O HSCAS exerceu efeito isolado apenas sobre a concentração sérica de uréia, promovendo aumento nas amostras oriundas de aves submetidas a dietas em que esteve presente. Em contraponto, a aflatoxina B_1 exerceu efeito deletério sobre quase todos os demais quesitos analisados. A enzima GGT teve sua ação elevada nas aves submetidas a dietas contaminadas em pouco mais de 50%. A lactato desidrogenase, a proteína total, a albumina, as globulinas e o ácido úrico tiveram concentração diminuída em função da presença de AFB_1. Estas diminuições, principalmente as relacionadas às proteínas plasmáticas, são sintomas clássicos de aflatoxicose crônica em aves de produção. As quedas de 32,7% na concentração de proteína total, 25,2% na de albumina e 20,5% na de globulinas, embora menores do que os

resultados apresentados pelas aves de 21 dias de idade, ainda são efeitos negativos muito importantes para a saúde avícola, que pode ser uma das causas de menor crescimento das aves, conseqüente à menor deposição de proteína muscular por ação inibitória da AFB_1 sobre a ação da enzima RNA-polimerase, tendo como consequência final uma queda na produção de proteínas nas células.

O potencial de diminuição das taxas de proteína total, albumina e globulinas está de acordo com o encontrado por Franciscato (2006) para frangos de 42 dias de idade. Comparando-se os resultados de ambas datas de colheita de material é possível inferir que os animais mais jovens são mais efetivamente afetados, uma vez que os resultados encontrados indicam pior estado de saúde nos animais de 21 dias, havendo uma melhora aos 42 dias de idade. Quezada et al. (2000) e Rosa et al. (2001) trabalhando com altas concentrações de AFB_1 (2 mg e 5 mg/kg de ração, respectivamente) também observaram redução de proteínas e albumina plasmáticas em animais de 21 dias de idade. Porém, Del Bianchi et al. (2005), mesmo alimentando as aves com altas doses de AFB_1 (2450 µg/kg de ração), não encontraram diferença estatística entre o grupo controle negativo e as aves contaminadas com 42 dias de idade. Este dado contraria a tendência de dados apresentados na literatura internacional. Oğuz et al. (2002) usando baixas doses de aflatoxinas na ração das aves (50 e 100 µg/ kg), não observaram nenhuma alteração nas concentrações de proteínas e albumina, permitindo inferir que baixas doses de toxina não causem estes efeitos deletérios aos animais. O efeito positivo do uso de HSCAS na dieta de frangos de corte pode ser observado nos estudos de Kubena et al. (1990a,b), em que houve melhora estatística nas concentrações de PT e ALB em amostras de soro de aves de 21 dias de idade. Porém, testando outro tipo de adsorvente, o carvão ativado, não obtiveram resultados positivos sobre as proteínas plasmáticas. Kubena et al. (1993) também observaram ação efetiva do HSCAS sobre PT e ALB em soros de aves de 21 dias ingerindo 3,5 mg AF/kg de ração.

Quanto à enzima gama-glutamiltransferase, a concentração presente da toxina na dieta aos 42 dias foi suficiente para promover aumento dos níveis séricos de GGT. Aravind et al. (2003) também relataram aumento na concentração de GGT no soro de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade submetidos a dieta naturalmente contaminada com aflatoxina (169 µg/kg de ração). Resultados semelhantes foram encontrados por Borsa et al. (1998) em frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dieta com 5000 µg/kg de ração de aflatoxinas (69,9% de AFB_1).

Para as concentrações das enzimas aspartato aminotransferase e lactato-desidrogenase aconteceu um fenômeno muito interessante. Na análise dos dados obtidos a partir da primeira coleta, a concentração de enzima no soro aumentou nos animais ingerindo micotoxina; porém, na segunda coleta, os níveis no soro diminuíram. Isto corrobora o efeito de agudez ou cronicidade da intoxicação: algumas enzimas, em fases agudas de intoxicação, podem ter sua liberação aumentada para o plasma, e mais tardar, em casos de intoxicação crônica, têm sua concentração diminuída. Também é válido lembrar que a concentração da toxina utilizada pode alterar estes resultados. Uma diminuição significativa da concentração sérica da AST foi constatada por Franciscato (2006) em frangos de corte submetidos a dieta contendo 3000 µg de AFB_1/kg de ração, quando em comparação a aves não contaminadas. Um aumento significativo da ação da AST em frangos de 41 dias de idade foi constatada por Tessari et al. (2006) em intoxicação experimental por 50 e 200 µg de AFB_1/kg de ração. Aos 21 dias de idade, 5000 µg de aflatoxina (60,69% de AFB_1) por quilograma de ração foi capaz de reduzir a média de ação da enzima LDH em frangos de corte com aflatoxicose aguda experimental (BORSA et al., 1998). Também nestes casos o adsorvente experimental não foi capaz de deter os efeitos deletérios hepáticos causados pela AFB_1, refletindo em alteração para mais (primeira coleta) e para menos (segunda coleta).

As concentrações séricas de Ácido Úrico também diminuíram nos soros dos animais ingerindo aflatoxina, sendo que aos 42 dias o adsorvente experimental foi mais eficiente em tentar diminuir os efeitos deletérios da toxina. Batina (2004) verificou que a montmorilonita sódica foi mais eficaz que o HSCAS em reduzir os efeitos negativos da aflatoxina para este metabólito. A concentração de Uréia não sofreu efeito de interação entre os fatores estudados; porém, observou-se um efeito isolado do adsorvente comercial. Sua presença foi capaz de elevar os níveis de uréia sérica, o que corrobora os dados apresentados por Batina (2004) e não corroborando os dados apresentados por Del Bianchi et al. (2005). Neste trabalho, os autores não observaram diferença estatística significativa entre os resultados de Ácido Úrico e Uréia apresentados por aves do grupo controle negativo e grupos ingerindo 50, 350 e 2450 µg AFB_1/kg de ração. Estes resultados podem ser explicados pelo pequeno tempo de exposição das aves (21 dias), além de a exposição ter sido iniciada com aves mais velhas (aves de 21 dias de idade), o que poderia justificar uma não-alteração destes parâmetros de saúde dos animais. Resultados semelhantes foram apontados por Aravind et al. (2003) para frangos de corte com 21 e 35 dias alimentados com dieta naturalmente contaminada com micotoxinas (168 µg de aflatoxina/kg de ração). A concentração normal de uréia de aves não-carnívoras é

de 0 a 5 mg/dL (CAMPBELL, 2004). Os valores encontrados neste trabalho para Uréia e Ácido Úrico estão de acordo com Noriega (2000).

5.4. Hemograma completo

O exame de hemograma completo foi feito com amostras de soro de 12 aves por tratamento, aos 21 e aos 42 dias de idade dos frangos. Foram analisadas as variáveis clássicas que compõem um exame hematológico convencional, como contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, determinação do microhemtócrito, VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média), CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) e contagens total e diferencial de leucócitos. Os resultados são apresentados nas Tabelas 16 e 17.

Conforme é possível observar na Tabela 16, não houve efeito de interação entre os fatores estudados para nenhuma variável hematológica avaliada. O efeito isolado mais pronunciado que é possível observar se relaciona à AFB_1, que exerceu influência sobre o VCM, a HCM, a contagem total de leucócitos, e as contagens diferenciais de linfócitos, basófilos e eosinófilos. O VCM e a HCM sofreram influência negativa da aflatoxina $B_{1,}$ em que sua presença reduziu os valores encontrados. A AFB_1 também foi capaz de reduzir as contagens de leucócitos, linfócitos e basófilos, causando clinicamente quadros conhecidos por leucopenia, linfopenia e basopenia. Aumento na contagem diferencial de eosinófilos foi provocada pela presença de micotoxina, cenário conhecido por eosinofilia.

O adsorvente comercial foi capaz de exercer efeito isolado apenas sobre a contagem de eritrócitos, fazendo com que a concentração de hemácias se elevasse.

Quanto aos resultados obtidos das amostras de aves com 42 dias de idade (Tabela 17), houve interação entre a AFB_1 e o HSCAS para as variáveis: contagem total de leucócitos e contagens diferenciais de monócitos, basófilos e eosinófilos. A concentração total de leucócitos foi reduzida nas aves alimentadas com dieta contendo AFB_1, sendo que o adsorvente comercial teve o potencial de recuperar parcialmente os valores desta variável. O quadro de monocitose foi observado nas aves que se alimentaram de ração contendo aflatoxina, e o HSCAS foi capaz de reestabelecer a normocitose nos animais ingerindo AFB_1 e HSCAS na dieta. Basopenia e Eosinopenia foram determinadas no soro de aves alimentadas com a dieta contaminada; porém, a contagem de basófilos foi normalizada e a contagem de eosinófilos parcialmente recuperada em aves suplementadas com adsorvente de micotoxina.

Apenas a variável hemoglobina sofreu influência de efeitos isolados de ambos os fatores estudados. A presença de AFB_1 elevou a concentração de hemoglobina e o adsorvente foi capaz de reduzir a concentração da mesma.

A alteração significativa no tamanho das hemácias influencia o valor do Volume Corpuscular Médio (VCM). Dentre as alterações no tamanho de hemácias de aves estão a microcitose, a macrocitose e anisocitose. As variações de cor das hemácias incluem policromasia e hipocromasia. O citoplasma das hemácias policromatofílicas é fracamente basofílico e o núcleo é menos condensado que o das hemácias maduras. Hemácias hipocromáticas têm cor anormalmente pálida em comparação com as hemácias maduras; apresentam uma área citoplasmática pálida que corresponde a mais da metade do volume citoplasmático. Também podem conter vacúolos citoplasmáticos e núcleos picnóticos arredondados. Hipocromasia significativa proporciona menores valores de Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (CAMPBELL, 2006).

A interpretação de leucogramas aviários deve ser baseado nos valores absolutos de leucócitos por microlitro de sangue. Isto resulta em menores interpretações errôneas comparado às interpretações feitas baseadas apenas no percentual (LATIMER; RAKICH, 1989). A leucopenia relaciona-se ao consumo de leucócitos periféricos ou à diminuição de sua produção. Leucopenia e linfopenia podem representar uma resposta precoce ao leucograma induzido por corticosteróides em algumas espécies de espécies de aves (como o estresse de manipulação ou a administração exógena de corticoesteróides) (LATIMER; BIENZLE, 2010). Leucopenia e linfopenia também sugerem alguma infecção viral; entretanto esta causa é pouco relatada em aves (CAMPBELL, 2006). O mecanismo pelo qual este evento acontece possui uma origem complexa, envolvendo um ou mais mecanismos, os quais incluem liberação de corticosterona endógena com redistribuição temporária de linfócitos, recirculação dos linfócitos em tecidos linfóides para permitir contato com o antígeno, e destruição direta do tecido linfóide, especialmente em casos de infecções virais (LATIMER; RAKICH, 1989). Em aves que possuem predominância de linfócitos, a leucopenia frequentemente é sinônimo de linfopenia (LATIMER; BIENZLE, 2010).

A monocitose em geral associa-se a doenças infecciosas causadas por microorganismos que promovem inflamação granulomatosa, como *Mycobacterium*, *Chlamydia* e fungos, como o *Aspergillus*. Ganuloma crônico e necrose tecidual extensa também podem provocar monocitose (CAMPBELL, 2006). Porém, a mocitose pode

acontecer tanto em doenças aguda quanto crônicas (LATIMER; BIENZLE, 2010). Alguns tipos de deficiência nutricional, como a de zinco, tmbém podem causar monocitose (WIGHT et al., 1980).

A função dos basófilos de aves não é conhecida. Presume-se que seja semelhante à de basófilos e mastócitos de mamíferos, pois seus grânulos citoplasmáticos contém histamina (HODGES, 1974; RAWLEY; RATCLIFFE, 1988), além de participarem de reações inflamatórias e de hipersensibilidade tipo IV (CARLSON; ALLEN, 1969; FOX; SOLOMON, 1981). Quanto ao pouco conhecimento da função dos eosinófilos em aves, a eosinofilia periférica nessa espécie pode ser interpretada livremente como sendo uma resposta aos parasitas internos ou externos ou à exposição aos antígenos estranhos (resposta de hipersensibilidade) (CAMPBELL, 2006; LATIMER; BIENZLE, 2010). De acordo com Noriega (2000), os eosinófilos não são propriamente fagócitos e atuam na membrana plasmática da célula infectada e por degranulação, libertam seus grânulos que contêm histaminase que inibe a histamina encontrada nos basófilos e mastócitos, moderando assim as reações de anafilaxia, na presença das IgG e IgE.

A literatura propõe valores referenciais para os parâmetros hematológicos de aves comercias. Um exemplo é o estudo feito por Cardoso e Tessari (2003), que apresenta os seguintes valores como referência aos 24 dias (VCM 134,98 fL; HCM 35,41 pg; CHCM 26,27%; Hematócrito 32,0%; Leucócitos 17,32/mm^3; Linfócitos 11046/mm^3; Heterófilos 5522/mm^3; Monócitos 674/mm^3; Eosinófilos 44/mm^3; Basófilos 34/mm^3) e aos 45 dias de idade (VCM 144,82 fL; HCM 24,48 pg; CHCM 35,88%; Hematócrito 34,4%; Leucócitos 28,72/mm^3; Linfócitos 16290/mm^3; Heterófilos 10938/mm^3; Monócitos 1370/mm^3; Eosinófilos 64/mm^3; Basófilos 58/mm^3). Comparando-se estes valores de literatura com os encontrados no presente trabalho, é possível observar que há valores muito discrepantes na quase totalidade das variáveis analisadas, o que sugere que deva haver um amplo leque de valores em normalidade, a depender da linhagem trabalhada e das condições de criação dos animais e colheita de material de análise.

Quando se compara os valores de VCM obtidos no presente trabalho com os apresentados por Tessari et al. (2006), observa-se que os resultados são discrepantes, pois os autores apresentam dados de aumento no VCM quando as aves foram alimentadas com 200 µg de AFB_1/kg de ração. Este fenômeno se repete para a análise da HCM e da CHCM, o que não acontece no presente estudo. Porém, os resultados apresentados por Kubena et al. (1990b) são corroborados pelos aqui apresentados, uma vez que o VCM e a HCM também diminuiram

no sangue de aves contaminadas por AFB_1. Os frangos submetidos a dieta contaminada com AFB_1 apresentaram leucopenia, corroborando Tessari et al. (2006); porém mostraram monocitose, não corroborando os dados para dos mesmos autores para aves consumindo 50 ou 200 µg de AFB_1/kg de ração.

Tabela 16. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre o hemograma completo[1] de frangos de corte com 21 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1.

Dieta Experimental		Hemogl.	Hemat.	VCM	HCM	CHCM	Eritrócitos	Leucócitos	Monócitos	Linfócitos	Basófilos	Heterófilos	Eosinófilos
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**(g/dl)**	**(%)**	**(fL)**	**(pgr)**	**(%)**	**(10^6/mm^3)**	**(10^3/mm^3)**	**(/mm^3)**				
0	0	24,97	31,81	144,2	114,6	78,87	455	28	510	17169	856	9395	70
0	0,5	23,81	33,27	120,5	88,63	73,92	547	28	728	17579	1113	9762	26
500	0,5	24,53	31,91	112,45	85,67	77,03	588	23	843	13855	450	8474	167
500	0	22,4	30,14	111,3	85,97	76,78	523	22	891	12413	500	8240	205
	EPM	0,6	0,5	4	3,89	1,62	13	0,9	84,00	719	90	527	35
	CV (%)	17,5	9,2	21,5	27,2	13,9	17,3	23,9	74,6	31,7	84,5	39,9	202
Fonte de Variação (Valor de P)													
AFB_1		0,485	0,106	0,0077	0,0342	0,8813	101	0,004	0,1511	0,0026	0,0037	0,2622	0,0484
HSCAS		0,715	0,086	0,13	0,0756	0,4894	0,011	0,901	0,6195	0,4879	0,5388	0,7809	0,5626
AFB_1 X HSCAS		0,218	0,862	0,096	0,0822	0,4459	0,261	0,711	0,4365	0,6986	0,3595	0,9509	0,0694
Efeitos Principais													
AFB_1	0	24,34	32,54	131,9a	101a	76,29	501	28a	608	17374a	990a	9578	47b
	500	23,68	31,26	111,9b	85,79b	76,93	541	23b	867	13103b	475b	8357	186a
HSCAS	0	23,89	31,16	130,4	102,53	77,99	489b	25	709	14688	671	8792	140
	0,5	24,17	32,56	116,5	87,15	75,47	568a	25	793	15717	781	9090	96

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes pela fonte de efeito principal ($P<0,05$).[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 2 aves cada (12 aves). VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 17. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre o hemograma completo[1] de frangos de corte com 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1.

Dieta Experimental		Hemogl.	Hemat.	VCM	HCM	CHCM	Eritrócitos	Leucócitos	Monócitos	Linfócitos	Basófilos	Heterófilos	Eosinófilos
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**(g/dl)**	**(%)**	**(fL)**	**(pgr)**	**(%)**	**(10^6/mm^3)**	**(10^3/mm^3)**			**(/mm^3)**		
0	0	9,67	32,50	150,07	43,13	29,61	450	26a	127b	11420	787ab	9889	2466a
0	0,5	9,82	32,00	143,16	43,76	30,81	455	20ab	267ab	8833	280b	9038	1288ab
500	0,5	9,63	34,33	148,93	45,94	28,13	451	22ab	124b	8983	810a	9576	1753ab
500	0	13,03	32,43	137,25	49,67	27,88	461	19b	418a	7373	451ab	9308	1283b
	EPM	0,64	0,37	3,49	2,06	0,37	12	1,0	40	595	84	440	172
	CV (%)	43,2	8,3	16,6	31,3	8,9	16,7	30,5	111,0	45,1	96,9	31,9	69,2
Fonte de Variação (Valor de P)													
AFB_1		0,0133	0,1310	0,6219	0,9067	0,2517	0,8809	0,1581	0,3253	0,0972	0,5471	0,9814	0,2756
HSCAS		0,0226	0,3497	0,7389	0,9993	0,0941	0,9211	0,3826	0,3046	0,6732	0,6458	0,7488	0,2821
AFB_1 X HSCAS		0,1058	0,1116	0,1976	0,6790	0,4112	0,7542	0,0116	0,0056	0,0749	0,0098	0,5402	0,0152
Efeitos Principais													
AFB_1	0	9,75b	32,25	112,48	43,65	30,23	453	23	197	10127	521	9445	1877
	500	11,57a	33,25	104,75	47,86	28,01	456	20	285	8176	614	9442	1518
HSCAS	0	11,59a	32,46	142,59	46,67	28,71	456	22	279	9396	604	9586	1849
	0,5	9,72b	33,16	145,92	44,83	29,47	453	21	199	8908	532	9307	1530

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey (efeito de interação) ou pela fonte de efeito principal ($P<0,05$).[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 2 aves cada (12 aves). VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

5.5. Análise de minerais séricos

Os minerais séricos, como o cálcio e o fósforo, também podem sofrer influência da intoxicação por aflatoxinas. Os resultados para as amostras de 3 e 6 semanas são apresentados nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

Tabela 18. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros bioquímicos séricos1 de frangos de corte com 21 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B1.

Dieta Experimental		**Ca**	**P**
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**(mg/dL)**	**(mg/dL)**
0	0	11,76	9,37
0	0,5	12,49	8,09
500	0,5	7,90	6,85
500	0	8,50	7,02
	EPM	0,58	0,35
	CV (%)	39,2	30,1
Fonte de Variação (Valor de P)			
AFB_1		0,0005	0,0086
HSCAS		0,956	0,956
AFB_1 X HSCAS[2]		0,5261	0,5261
Efeitos Principais			
AFB_1	0	12,12a	8,73a
	500	8,19b	6,92b
HSCAS	0	8,19	6,92
	0,5	10,19	7,47

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes pela fonte de efeito principal (P<0,05).
[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 2 aves cada (12 aves). Ca = cálcio, P = fósforo.

Como é possível observar, aos 21 dias de idades os resultados para Cálcio, bem como para Fósforo, não sofreram influência do efeito de interação entre a AFB_1 e o HSCAS. Apenas a aflatoxina se mostrou atuante como fator isolado, diminuindo tanto as concentrações de cálcio quanto de fósforo no soro. Neste caso, a diminuição destas variáveis nos tratamentos em que a AFB_1 se fez presente veio acompanhada de hipoproteinemia e hipoalbuminemia, podendo justificar a hipocalcemia, chamada de pseudo-hipocalcemia, uma vez que apenas a fração ligada à albumina estava diminuída, e não a fração livre, que é responsável pela sintomatologia clínica.

Tabela 19. Efeito do aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) sobre os parâmetros bioquímicos séricos[1] de frangos de corte com 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxina B_1.

Dieta Experimental		Ca	P
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**(mg/dL)**	**(mg/dL)**
0	0	8,11	5,67
0	0,5	7,96	5,30
500	0,5	9,03	6,32
500	0	11,37	7,20
	EPM	0,38	0,18
	CV (%)	27,7	19,7
Fonte de Variação (Valor de P)			
AFB_1		0,0022	0,0001
HSCAS		0,068	0,045
AFB_1 X HSCAS[2]		0,104	0,397
Efeitos Principais			
AFB_1	0	8,03b	5,47b
	500	10,20a	6,76a
HSCAS	0	9,81	6,47a
	0,5	8,47	5,79b

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes pela fonte de efeito principal ($P<0,05$).
[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 2 aves cada (12 aves). Ca= cálcio sérico, P = fósforo sérico.

Os resultados das amostras refrentes aos animais de 42 dias de idade também nos mostra uma ausência de interação entre os fatores estudados. Contrário ao que aconteceu com as amostras de aves com 3 semanas, tanto o cálcio quanto o fósforo estavam aumentados na presença de AFB_1. Curiosamente, a AFB_1 também foi capaz de promover hiproteinemia e hipoalbuminemia, mas estas não exerceram efeito sobre os minerais. A presença de adsorvente diminuiu o fósforo do soro dos animais aos quais foi administrado.

Glahn et al. (1991) explicam que os efeitos das aflatoxinas sobre os minerais podem estar relacionados com alterações no metabolismo da vitamina D e do paratormônio, pois estas micotoxinas podem diminuir a síntese de PTH endógeno ou alterar a sensibilidade renal a este hormônio, podendo ainda, reduzir a síntese de 1,25-DH Vitamina D, causando assim, diminuição da excreção de fósforo e aumento na excreção de cálcio.

As concentrações de cálcio e fósforo apresentaram diminuição em amostras de frangos de 21 dias após a administração de 3,5 mg de AF/kg de ração, e mesmo com auxílio de HSCAS os valores não retornaram ao normal (KUBENA et al., 1990b, 1993). Jindal et al. (1994) também apresentam dados de redução do cálcio e do fósforo séricos de aves com 14,

28 e 42 dias sob dieta contaminada com 500 µg de AFB_1/kg de ração, corroborando os dados do presente estudo.

Os níveis reduzidos de cálcio e fósforo podem dever-se ao fato de que as aflatoxinas atrapalham a absorção de cálcio independentemente da relação cálcio:fósforo, enquanto possuem ação específica sobre o fósforo (HUFF et al., 1977).

5.6. Análise de biomarcadores de aflatoxinas

5.6.1. Resíduos hepáticos de aflatoxinas

Para a demonstração dos resultados obtidos das amostras analisadas, foram confeccionadas três tabelas diferentes para que se tenha uma visão mais ampla dos dados de análise: uma tabela de incidência de amostras positivas e duas outras tabelas estatísticas de comparação entre os resultados das amostras das dietas que possuíam aflatoxinas.

Na primeira tabela (Tabela 20), é possível observar que a incidência de amostras com concentrações detectáveis é alta para a AFB_1, a AFB_2 e a AFG_1. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que estas sejam as aflatoxinas mais facilmente quantificadas pelos aparelhos, devido ao bom sinal cromatográfico produzido por sua leitura e detecção. O AFL, a AFG_2 e a AFM_1 são mais difíceis de serem detectadas e quantificadas, por suas menores concentrações e/ou piores qualidades de picos cromatográficos. As maiores concentrações de aflatoxinas encontradas referem-se à AFB_1, seguida pela AFG_1 e AFB_2. Também foram feitos testes para detecção e quantificação de aflatoxina P_1 (AFP_1), aflatoxina Q_1 (AFQ_1) e Aflatoxina $B_{2\alpha}$ ($AFB_{2\alpha}$); porém não foram detectadas e quantificadas nenhuma delas, o que faz sentido, ma vez que AFP_1 e AFQ_2 não são considerados metabólitos originados de AFB_1 em aves.

Quando se analisa a Tabela 21, se observa que não houve diferença estatística entre os tratamentos para resíduos de AFB_1 e AFB_2. Nas amostras oriundas de aves de 21 dias nota-se menores concentrações de resíduos nas amostras da dieta contaminada com AFB_1. Às seis semanas, não se encontra diferença entre as dietas para resíduos de AFB_1 e AFG_2. Tanto para AFB_2 quanto para AFG_1, as concentrações foram menores na dieta com aflatoxinas sem adição de adsorvente.

Quanto aos resíduos hepáticos de AFM_1, AFG_2 e AFL nas amostras de 21 dias (Tabela 22), observa-se que houve efeito de interação entre os fatores para AFM_1. As amostras oriundas das aves submetidas a dieta contaminada com AFB_1 exibiram o maior valor

Tabela 20. Incidência de resíduos de micotoxinas em amostras[1] de fígado de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com aflatoxinas e suplementada com adsorvente.

Dieta Experimental		Resíduos Hepáticos											
		AFB_1		AFB_2		AFL		AFG_1		AFG_2		AFM_1	
		(%)	ng/g(n)	(%)	ng/g(n)	(%)	ng/g(n)	(%)	ng/g(n)	(%)	ng/g(n)	(%)	ng/g(n)
AFB_1 (µg/kg)	HSCAS (%)												
							21 dias						
0	0	0	↓LOQ[2]	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ
0	0,5	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ
500	0,5	100	0,0902±0,0995 (n=12)	100	0,0236±0,0148 (n=12)	33,33	0,0122±0,0004 (n=4)	33,33	0,0404±0,0240 (n=4)	16,67	0,0107±0,0012 (n=2)	16,67	0,1743±0,0754 (n=2)
500	0	100	0,0952±0,0555 (n=12)	100	0,0188±0,0034 (n=12)	33,33	0,0038±0,0008 (n=4)	66,67	0,0157±0,0058 (n=8)	0	0	16,67	0,1109±0,0048 (n=2)
							42 dias						
0	0	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ
0	0,5	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ	0	↓LOQ
500	0,5	100	0,0952±0,0456 (n=12)	100	0,0292±0,0036 (n=12)	16,67	0,0189±0,0073 (n=2)	100	0,0653±0,0154 (n=12)	16,67	0,0471±0,0023 (n=2)	41,67	0,1169±0,0131 (n=5)
500	0	100	0,0697±0,0253 (n=12)	100	0,0261±0,0026 (n=12)	0	0	100	0,0466±0,0074 (n=12)	8,33	0,0673 (n=1)	16,67	0,0977±0,0002 (n=2)

[1]Número de amostras totais analisadas igual a 12. [2]Limite de Quantificação. AFB_1 = Aflatoxina B_1, HSCAS = Aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado, AFB_2 = Aflatoxina B, AFL = Aflatoxicol, AFG_1 = Aflatoxina G_1, AFG_2 = Aflatoxina G_2, AFM_1 = Aflatoxina M_1.

Tabela 21. Efeito do HSCAS sobre os resíduos hepáticos[1] de aflatoxinas em amostras de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com AFB_1.

Dieta Experimental		AFB_1 (ng/g)	AFB_2 (ng/g)	AFG_1 (ng/g)	AFG_2 (ng/g)
AFB_1[2] (µ/kg)	**HSCAS[3] (%)**	**21 dias**			
500	0,5	0,0902	0,01764	0,0135a	-
500	0	0,0952	0,01885	0,0100b	-
	CV (%)	85,04	20,58	145,63	-
	EPM	0,016	0,0008	0,003	-
	P valor	0,0674	0,3094	0,0225	-
AFB_1 (µ/kg)	**HSCAS (%)**	**42 dias**			
500	0,5	0,0857	0,0292a	0,0652a	0,0471
500	0	0,0696	0,0261b	0,0466b	0,0336
	CV (%)	38,44	12,58	27,13	70,76
	EPM	0,006	0,0007	0,003	0,014
	P valor	0,2233	0,0200	0,0011	0,7274

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes (P<0,05).
[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 2 aves cada (12 aves). AFB_1 = aflatoxina B_1. [3]HSCAS = aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado. AFB_2 = aflatoxina B_2, AFG_1 = aflatoxina G_1, AFG_2 = aflatoxina G_2.

Tabela 22. Efeito do HSCAS sobre os resíduos hepáticos[1] de aflatoxinas em amostras de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade submetidos a dieta contaminada com AFB_1.

		Resíduos Hepáticos				
		21 dias			42 dias	
Tratamento		**AFM_1**	**AFG_2**	**Aflatoxicol**	**AFM_1**	**Aflatoxicol**
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**(ng/g)**	**(ng/g)**	**(ng/g)**	**(ng/g)**	**(ng/g)**
0	0	0,0000c	0,0000	0,0000	0	0
0	0,5	0,0000c	0,0000	0,0000	0	0
500	0,5	0,029a	0,0027	0,0042	0,0597	0,0189
500	0	0,054b	0,0000	0,0013	0	0
	EPM	0,0066	0,0005	0,0005	0,0140	0,0030
	CV (%)	219	368	263	283	185
Fonte de Variação (Valor de P)						
AFB_1		0,0002	0,1587	0,0023	0,0719	0,3916
HSCAS		0,1587	0,1498	0,0646	1	0,3173
AFB_1 X HSCAS[2]		0,0083	0,1498	0,0646	1	0,3173
Efeitos Principais						
AFB_1	0	0b	0	0b	0	0
	500	0,041a	0,0015	0,0027a	0,0290	0,0094
HSCAS	0	0,027a	0	0,0006	0	0
	0,5	0,014b	0,0013	0,0021	0,0298	0,0094

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes pela interação entre os efeitos principais ou pelos fatores isolados (P<0,05).
[1]Valores referentes à média de 6 repetições de 2 aves cada (12 aves). AF_1 = aflatoxina B_1. [3]HSCAS = aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado. AFM_1 = aflatoxina M_1, AFG_2 = aflatoxina G_2, AFL = aflatoxicol.

médio. Para a AFB_2 residual, não houve diferença estatística entre as amostras avaliadas. A presença de AFB_1 nas dietas fez com que houvesse resíduo quantificável de AFL nos fígados.

Quanto às amostras de 42 dias de idade, observa-se que não houveram efeito de interação, tampouco efeitos isolados destes fatores, indicando que não houve diferença entre as concentrações para amostras oriundas de quaisquer dietas, tanto para AFM_1 quanto para aflatoxicol.

Bintvihok e Kositcharoenkul (2006) relataram 0,05 e 0,13 µg AFB_1/kg e 0,10 e 0,32 µg de AFM_1/kg em fígados de aves alimentadas com dietas contaminadas com 50 e 100 µg AFB_1/kg de ração, respectivamente. Denli et al. (2009) encontraram uma média de 0,166 µg AFB_1/kg de fígado em aves de 42 dias alimentadas com 1 mg de AFB_1/kg de ração. A incorporação de agente adsorvente de micotoxinas (terra diatomácea com 60% de dióxido de silício) nas concentrações de 1, 2 e 5 g/kg de ração reduziu as concentrações de AFB_1 residual hepática, o que auxiliou na validação de seu uso como adsorvente comercial. Neeff et al. (2013) relataram presença de várias aflatoxinas residuais em tecido hepático de aves de 21 dias alimentadas com 2,5 mg AFB_1/kg de ração. A concentrações (µg/ kg de fígado) foram as seguintes: AFM_1 = 0,21 µg/kg, AFB_1 = 8,32 µg/kg, AFB_2 = 0,48 µg/kg, AFL = 2,34 µg/kg, AFG_1 = 3,95 µg/kg, AFG_2 = 0,03 µg/kg. A adição de 0,5% de HSCAS foi capaz de reduzir os resíduos de AFB_1, AFB_2, AFL e AFG_1, não exercendo efeito sobre AFM_1 e AFG_2, embora as concentrações de AFG_2 encontradas nas dietas contaminadas não tenham diferido das dietas não contaminadas.

Quando se compara os valores de resíduos obtidos nos trabalhos acima, verifica-se que os valores dos resíduos encontrados no presente trabalho são muito inferiores aos encontrados pelos autores. Outra observação a ser feita é de que o HSCAS não foi capaz de reduzir as concentrações de resíduos encontradas nas amostras de 21 ou 42 dias de idade, com exceção da AFM_1 aos 21 dias de idade. Os demais estudos mostram haver redução dos resíduos na presença dos adsorventes utilizados. Também há de se apontar que, em média, apenas a AFB1 sofreu redução das concentrações de resíduos nas dietas contaminadas da colheita do dia 21 para a colheita do dia 42.

5.6.2. Análise de aduto Aflatoxina B_1-lisina (AFB_1-lisina)

A avaliação do aduto AFB_1-lisina em aves de produção é um estudo sem precedentes na literatura.

Para a avaliação estatística do aduto AFB_1-lisina foram feitos contrastes ortogonais entre os resultados obtidos com a dieta AFB_1 + Adsorvente e os valores resultantes da dieta com AFB_1.

A partir da análise da Tabela 23, é possível inferir que houve diferença estatística entre os valores de AFB_1-lisina das dietas apenas para as colheitas realizadas nos dias 21 e 35. Nestas datas, o adsorvente comercial foi capaz de reduzir as concentrações do aduto, mostrando eficiência. Nas demais datas de colheita, o HSCAS não foi eficiente em reduzir as concentrações do aduto.

Tabela 23. Efeito do HSCAS sobre a concentração de AFB_1-lisina em frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade sob dieta contaminada com AFB_1.

Dieta Experimental		**AFB_1-lisina (ng/mL)**				
AFB_1 (µg/kg)	**HSCAS (%)**	**14 dias[2]**	**21 dias[3]**	**28 dias[2]**	**35 dias[2]**	**42 dias[3]**
500	0,5	22,92	26,93b	24,40	8,43b	19,09
500	0	22,64	34,29a	21,80	11,63a	20,16
	EPM	1,29	1,73	12,71	0,66	0,97
	CV (%)	33,16	38,30	51,38	43,61	40,63
	P valor	0,918	0,033	0,060	0,014	0,224

[a,b]Valores com subscritos diferentes são estatisticamente diferentes ($P<0,05$).
[2]Valores referentes à média de 6 repetições de 1 aves cada (6 aves). [2]Valores referentes à média de 6 repetições de 2 aves cada (12 aves). HSCAS = aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado, AFB1-lisina = aflatoxina B_1-lisina, AFB1 = aflatoxina B_1.

As datas de colheita de material que apresentaram diferença estatística entre as dietas coincidem com os picos de maior (21 dias) e menor (35 dias) concentração média ao longo do período total de colheita (14 a 42 dias).

Observa-se uma diminuição numérica nas concentrações ao longo do tempo, fato que pode ser explicado por aumento na concentração de albumina sérica e diminuição na concentração média de AFB_1-lisina (Figura 2). Esta diminuição na concentração de AFB_1-lisina pode ser explicada por manutenção na ingestão de AFB_1 por kg de ração, um aumento no volume sanguíneo corporal e aumento na concentração de albumina sérica decorrentes do crescimento fisiológico do animal, além da diminuição da absorção intestinal de AFB_1 devido à maturidade adquirida com a idade.

As concentrações médias de ingestão de AFB_1 nos intervalos semanais foram: 21,07 µg/dia (14 dias), 21,43 µg/dia (21 dias), 60,57 µg/dia (28 dias), 75,07 µg/dia (35 dias), 96,29 µg/dia (42 dias). A maior absorção de AFB_1 nos primeiros dias de vida pode ser justificada por um maior tamanho dos enterócitos, juntamente com uma menor capacidade seletiva das substâncias absorvidas e pela lipossolubilidade das aflatoxinas, que atravessam com maior facilidade a membrana lipídica celular. Uni et al. (1999), estudando o desenvolvimento de três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) durante os primeiros 12 dias de vida de pintinhos afirmam haver aumento na massa do intestino mais rapidamente que no comprimento do mesmo. Ao exame microscópico, foi indicado que a altura dos vilos aumento paralelamente no duodeno e no jejuno e mais lentamente no íleo. Nos primeiros dias após o nascimento, há um decréscimo de 20 a 30% no número de enterócitos por vilo, provavelmente devido a aumento no tamanho do enterócito decorrente de hiperplasia celular.

O número de enterócitos por área de vilo sobe de 200 para 280 mil células em todos os seguimentos e mudam pouco com a idade (Uni et al.; 1998). Além disso, pico de peso de duodeno, jejuno e íleo foram estabelecidos ao redor dos 21 dias de idade, com posterior queda, indicando que o volume das células diminuiu, uma vez que seu número não aumenta muito (DHOR et al., 1977).

A concentração corrigida de AFB_1-lisina (ng)/Albumina (mg) aos 21 e aos 42 dias de idade também diminui, como pode ser observado na Tabela 24. Além disso, uma redução numérica nas concentrações do aduto e da concentração AFB_1-lisina (ng)/Albumina (mg) é observada, para ambas datas de colheita, para a dieta HSCAS + AFB_1, quando comparada à dieta AFB_1, mostrando que para esta variável o adsorvente foi eficiente em reduzir as concentrações.

Figura 5. Comportamento da Aflatoxina B_1-lisina (AFB_1-lisina) ao longo do tempo para frangos de corte alimentados com AFB_1 e HSCAS (Aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado).

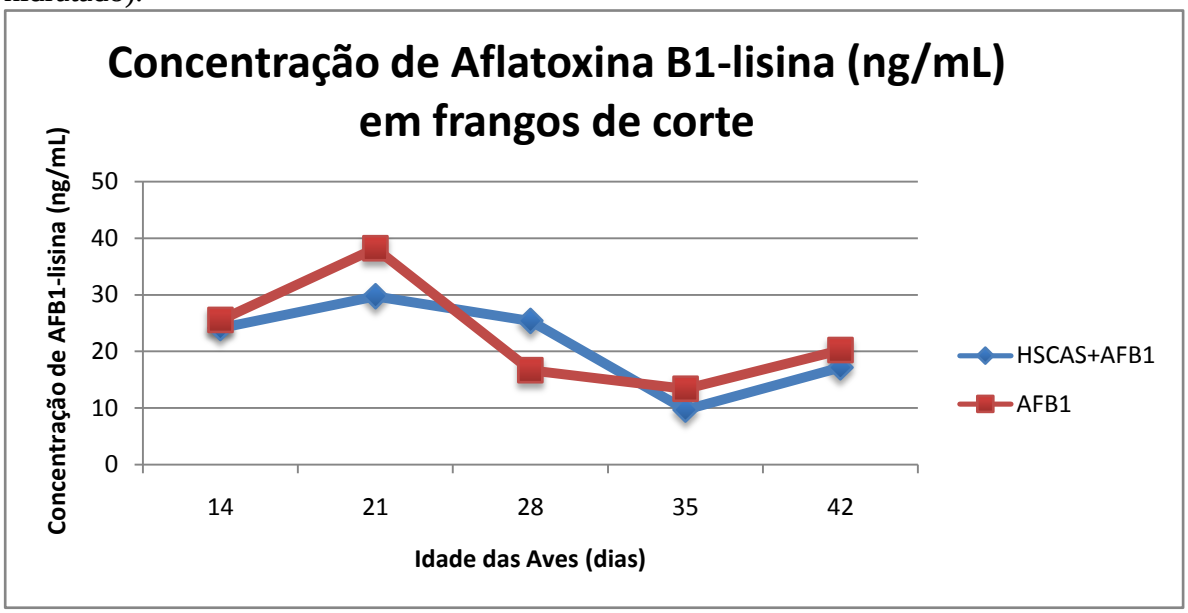


Tabela 24. Efeito do HSCAS sobre a concentração AFB_1-lisina:Albumina sérica[1] de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade alimentados com dieta contaminada com AFB_1.

Dieta Experimental		AFB_1-lisina (ng/mL)		Albumina (ng/mL)		Concentração AFB1-lisina (ng)/Albumina sérica (mg)	
AFB_1 (µg/kg)	HSCAS (%)	21 dias	42 dias	21 dias	42 dias	21 dias	42 dias
500	0,5	26,93	8,43	0,93	1,34	2,93	1,54
500	0	34,29	11,63	0,92	1,16	4,74	1,64

[1]Média referente a 6 repetições de 2 aves cada (12 aves).

Os gráficos que mostram os índices de Correlação Linear de Pearson para as dietas HSCAS + AFB_1 e dieta AFB_1 (21 e 42 dias) podem ser visualizados a seguir.

Figura 6. Índice de Correlação de Pearson entre AFB_1-lisina e Albumina séricas para frangos de corte de 21 dias submetidos a dieta contaminada com AFB1 (Aflatoxina B_1 – 500 µg/kg de ração) e suplementada com HSCAS (Aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado –0,5%.

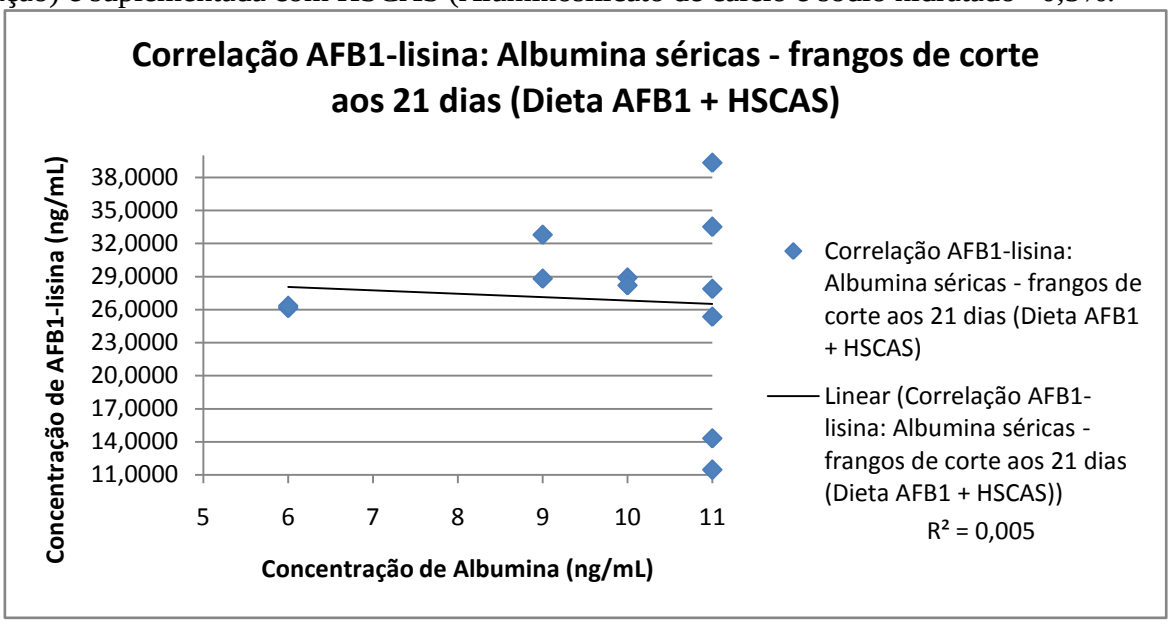


Figura 7. Índice de Correlação de Pearson entre AFB_1-lisina e Albumina séricas para frangos de corte de 21 dias submetidos a dieta contaminada com AFB1 (Aflatoxina B_1 – 500 µg/kg de ração).

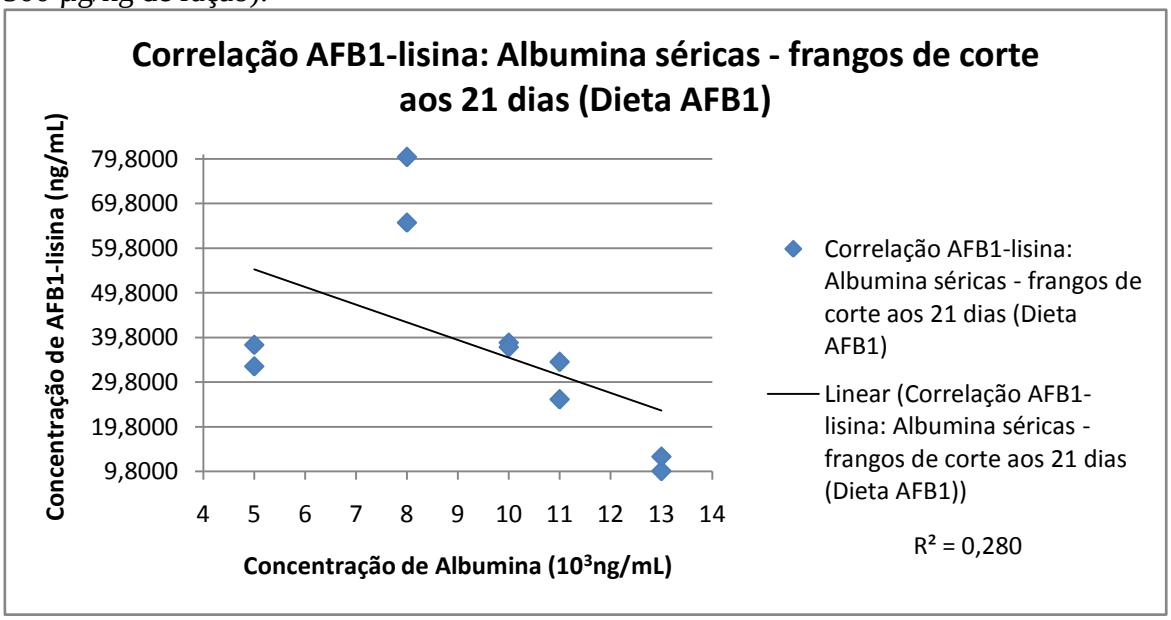


Figura 8. Índice de Correlação de Pearson entre AFB_1-lisina e Albumina séricas para frangos de corte de 42 dias submetidos a dieta contaminada com AFB_1 (Aflatoxina B_1 – 500 µg/kg de ração) e suplementada com HSCAS (Aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado – 0,5%).

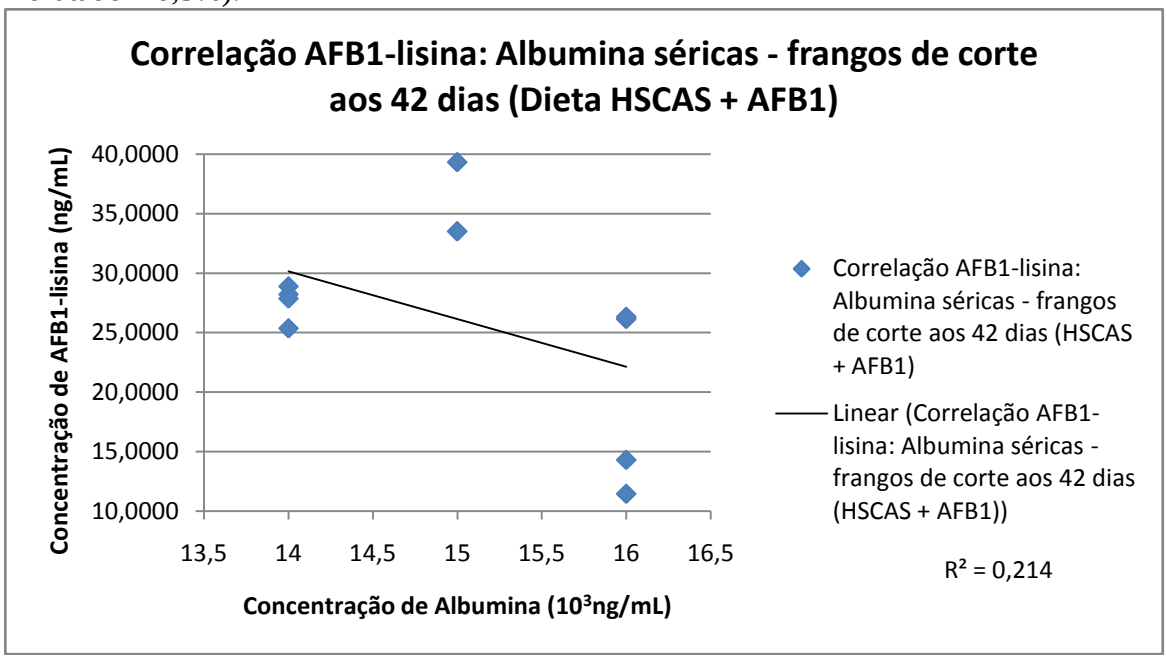
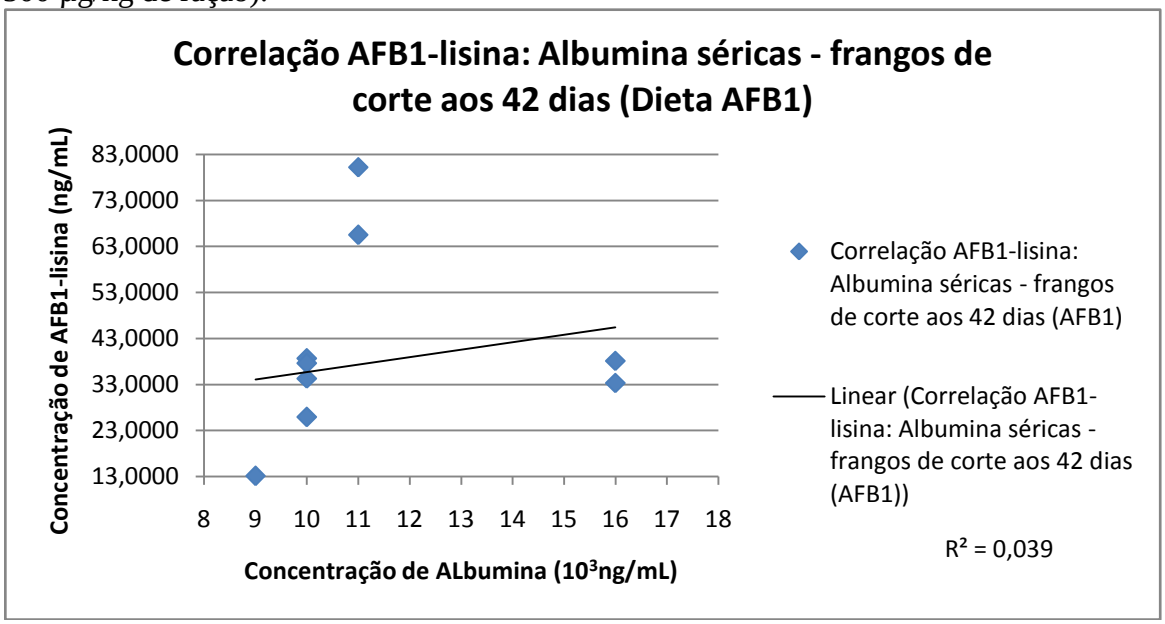


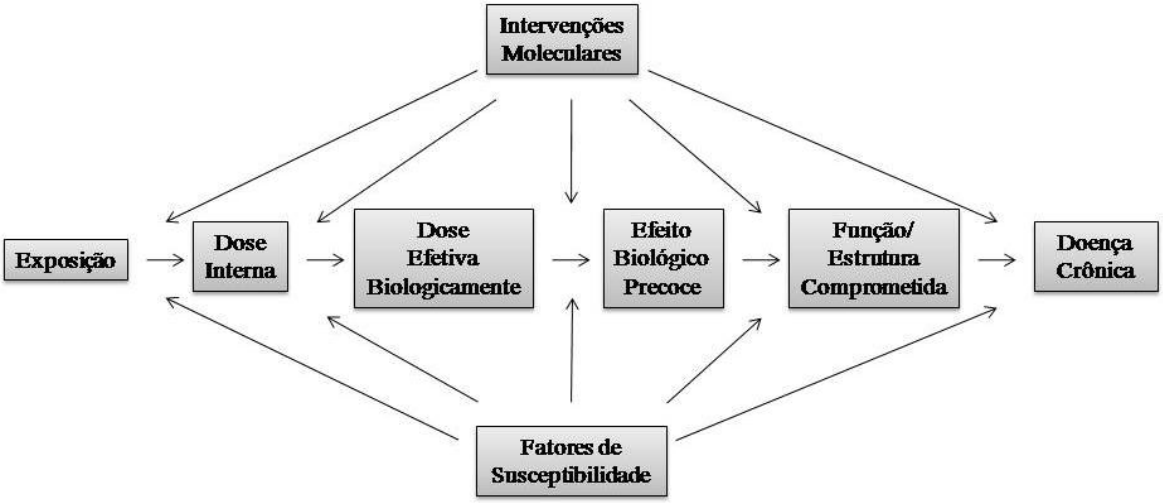
Figura 9. Índice de Correlação de Pearson entre AFB_1-lisina e Albumina séricas para frangos de corte de 42 dias submetidos a dieta contaminada com AFB1 (Aflatoxina B_1 – 500 µg/kg de ração).



Analisando-se os gráficos, observa-se que as correlações são de natureza baixa, não havendo ligação íntima entre os fatores. Isto indica que o aumento/diminuição de albumina sérica não é seguido pelo aumento/diminuição de AFB_1-lisina, bem como o inverso.

A partir da análise dos dados é possível afirmar que a AFB_1-lisina constitui um biomarcador de dose interna, o que significa que não necessariamente há a presença de sintomas que caracterizem a intoxicação. De acordo com Groopman e Kensler (1999), o esquema abaixo ilustra a distribuição dos biomarcadores no intervalo da exposição ao agente até o estabelecimento da doença.

Figura 10. Vias de biomarcadores moleculares (Adaptado de GROOPMAN; KENSLER (1999)).



O uso de biomarcadores químicos específicos para a identificação de estágios na progressão do desenvolvimento dos efeitos tóxicos de agentes ambientais possui o potencial de prover informações importantes para regulamentos críticos, e problemas de saúde pública e clínica (ANONYMOUS, 1987;WOGAN, 1992). Em seres humanos, entretanto, as interpretações dos níveis de biomarcadores são feitas em base individual e não usando médias e variâncias populacionais (GROOPMAN; KENSLER, 1999).

Sendo assim, é possível verificar-se a importância dos estudos de biomarcadores em animais de produção, pois no futuro a técnica se constituirá uma ferramenta importante para o auxílio ao monitoramento da saúde e produção, possibilitando o estabelecimento de níveis de segurança preventivos, não havendo necessidade de ocorrência de sintomas clínicos e/ou redução de desempenho zootécnico para a tomada de decisões.

6. CONCLUSÕES

1. Não houve efeito de interação entre os fatores estudados (AFB_1 X HSCAS), sendo assim não é possível afirmar que o HSCAS foi efetivo em melhorar as variáveis de desempenho zootécnico estudadas;

2. A biometria de órgãos e o estudo histopatológico mostram que o adsorvente comercial não foi eficiente na redução do tamanho dos órgãos afetados, uma vez que não houve interação entre os fatores estudados, e nem na redução das lesões histopatológicas em rim. Apenas reduziu numericamente o grau de lesão hepática das amostras;

3. De maneira geral, o adsorvente comercial não exerceu influência sobre as variáveis bioquímicas estudadas. As proteínas séricas foram seriamente afetadas pela presença de AFB_1, indicando não haver melhora com o uso de HSCAS;

4. Os efeitos de interação entre fatores observados para algumas variáveis de bioquímica sérica justificam o uso de HSCAS, pois este auxiliou na normalização dos índices;

5. As concentrações de cálcio e fósforo sanguíneas não foram afetadas pela interação de AFB_1 x HSCAS; porém a AFB_1 exerceu efeito negativo sobre as variáveis;

6. As concentrações de resíduos hepáticos de aflatoxinas quantificadas foram muito baixas (algumas até ausentes) e não foram diminuídas pela adição de adsorvente, não justificando seu uso;

7. Os valores obtidos para o aduto AFB_1-lisina tem comportamento variável ao longo do tempo, embora só exista concentração de albumina determinada às 3 e 6 semanas, com picos aos 21 e aos 35 dias de idade, sendo que o pico aos 21 dias coincide com o final da fase inicial de criação. A diminuição da concentração, tanto na dieta contaminada com AFB_1 ou na com AFB_1 e HSCAS, do 21º dia em diante mostra que há íntima relação da concentração do aduto com o crescimento fisiológico do animal; mas

também há necessidade realização de mais estudos aprofundados objetivando detalhar o comportamento do biomarcador ao longo da vida produtiva do animal.

7. REFERÊNCIAS

ANONYMOUS. Biological markers in environmental health research. **Environ. Health Perspect**, v. 74, p. 3-9, 1987.

ARDREY, R. E.; Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introdution. Wiley: Huddersfield, 2003.

ARAVIND, K. L.; PATIL, V. S.; DEVEGOWDA, G.; UMAKANTHA, B.; GANPULE, S. P. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters ein broilers. **Poultry Science**, v. 82, p. 571-576, 2003.

ASAO, T. Aflatoxins B_1 e G_1. **Journal American Chemical Society**, v.85, p. 1706-1707, 1963.

BATATINHA, M. J. M.; SIMAS, M. M. S.; GÓRNIAK, S. L. Micotoxicoses. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J. (Eds.).**Toxicologia aplicada à medicina veterinária.** Barueri:Editora Manole, 2008.

BATINA, P. N. **Perfil bioquímico de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxinacom ou sem a adição de montmorilonita sódica na dieta alimentar.** 43f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2004.

BINTVIHOK, A.; KOSITCHROENKUL, S. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B_1. **Toxicon**, v. 47, n. 01, p. 41-46, 2006.

BORSA, A.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M.; MALLMANN, C. A.; LOPES, J. M.; FERNANDES, R. R. Enzimas de função hepática na aflatoxicose aguda experimental em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 28, n. 04, p.587-590, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Relatório técnico do grupo de trabalho sobre micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. MAPA:Brasília, DF, 2006.

CAMPBELL, T.W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M.A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.** Philadelphia:Lippincott, Williams & Wilkins, 2004.

CAMPBELL, T. W. Hematologia de Aves. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DE NICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. (Eds). **Hematologia e bioquímica clínica aviária.** São Paulo:Editora Roca, 2006.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 419-424, 2003.

CARLSON, H. C.; ALLEN, J. R. The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. **Avian Diseases**, v. 14, p. 817-833, 1969.

CLIFORD, J. I.; REES, K. R. Aflatoxin: a site of action in the rat liver cell. **Nature**, v. 209, p. 312-313, 1966.

DEL BIANCHI, M.; OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J. L.; CORRÊA, B. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 84, p. 1835-1840, 2005.

DALVI, R. R.; ADEMOYERO, A. A. Toxic effects of aflatoxin B1 in chickens given feed contaminated with *Aspergillus flavus* and reduction of the toxicity by activated charcoal and some chemical agents. **Avian Diseases**, v. 28, n. 01, p. 61-69, 1984.

DENLI, M.; BLANDON, J. C.; GUYNOT, M. E.; SALADO, S.; PEREZ, J. F. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. **Poultry Science**, v. 88, p. 1444-1451, 2009.

DENNIS, V.W. Phosphate metabolism: contribution of different cellular compartments. **Kidney international,** v.49, p.938-942, 1996.

DHOR, Y.; NIR, I.; NITSAN, Z. The relative growth of the internal organs in light and heavy breeds. **British Poultry Science**, v. 18, p. 493-496, 1977.

DIAZ, D. E.; SMITH, T. K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralization of mycotoxins. In: DIAZ, D. E. (Ed.) **The mycotoxin blue book.** Nottingham:University Press, 2005.

EMEROLE, G. O.; NESKOVIC, N.; DIXON, R. L.The detoxification of aflatoxin B1 with glutathione in the rat. **Xenobiotica**, v. 09, p. 737-743, 1979.

FERNANDEZ, A.; VERDE, M. T.; GASCON, M.; RAMOS, J.; GOMEZ, J.; LUCO, D. F.; CHAVEZ, G. Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin-containing feed. **Avian Pathology**, v. 23, p. 37-47, 1994.

FOX, A. J.; SOLOMON, J. B. Chicken non-lymphoid leukocytes. In: ROSE, L. N.; PAUJNE, L. N.; FREEMAN, M. B. (Eds). **Avian immunology.** Edimburgo:Poultry Science, 1981.

FRANCISCATO, C. Avaliação dos minerais séricos e da função hepática de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxina e submetidos a diferentes concentrações de

montmorilonita sódica na dieta. 38f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria/Centro de Ciências Agrárias/Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. 2006.

GAN, L. S.; SKIPPER, P. L.; PENG, X. C.; GROOPMAN, J. D.; CHEN, J. S.; WOGAN, G. N.; TANNENBAUM, S. R. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carciongenesis: correlation with aflatoxin B_1 intake and urinay excretion of aflatoxin M1. **Carcinogenesis**, v. 09, n. 07, p. 1323-1325, 1988.

GHOSH, R.C.; CHAUHAN, H. V. S.; ROY, S. Immunosupression in broilers under experimental toxocosis. **Brazilian Veterinary Journal,** v. 146, p. 457-462, 1990.

GLAHN, R. P.; BEERS, K. W.; BOTTJE, W. G.; WIDEMAN, R. F. JR.; HUFF, W. E.; THOMAS, W. Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium, and vitamin D metabolism. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 34, p. 309-321, 1991.

GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W. The light at the end of the tunnel for chemical-specific biomarkers: daylight or headlight? **Carcinogenesis**, v. 20, n. 01, p. 1-11, 1999.

GROOPMAN, J. D.; EGNER, P. A.; SCHULZE, K. J.; WU, L. S. F.; MERRIL, R.; MEHRA, S.; SHAMIM, A. A.; ALI, H.; SHAIKH, S.; GERNAND, A.; KHATRY, S. K.; LECLERQ, S. C.; WEST JR., K. P.; CHRISTIAN, P. Aflatoxin exposure during the first 1000 days of life in rural South Asia assessed by aflatoxin B_1-lysine albumin biomarkers. **Food and Chemical Toxicology.** v. 74, p. 184-189, 2014.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. (Eds.). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora da UNICAMP:Campinas, 1998.

HODGES, R. D. The histology of the fowl. Academic Press:Londres, 1974.

HAUNG, S.; HU, D.; WANG, Y.; ZHU, F.; JIANG, R.; OUYANG, G. Automated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the analysis of aflatoxin M_1 in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1416, p. 137-140, 2015.

HUFF, W. E.; DOERR, J. A.; HAMILTON, P. B. Decreased bone strength during ochratoxicosis and aflatoxicosis. **Poultry Science**, v. 56, p. 724, 1977.

JAGER, A. V.; RAMALHO, F. S.; ZAMBELLI, L. N.; OLIVEIRA, C. A. F. Biomarkers of aflatoxin exposure and its relationship with the hepatocellular carcinoma. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G. (Ed). **Aflatoxins – Biochemistry and molecular biology.** *On line version*, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/aflatoxins-biochemistry-and-molecular- biology/biomarkers-of-aflatoxin-exposure-and-its-relationship-with-the-hepatocellular-carcinoma>. Acesso em 16/07/2015.

JAGER, A. V.; TONIN, F. G.; BAPTISTA, G. Z.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: A pilot study. **International Journal of Hygiene and Environmental Health.** ***In Press, Corrected Proof.*** Disponível *online* em 17 de dezembro de 2015. Disponível em:< http://ac.els-cdn.com/S1438463915001601/1-s2.0-S1438463915001601-main.pdf?_tid=ddb7e23a-bed4-11e5-ab81-00000aab0f26&acdnat=1453225896_602c1af7d5cae5e5650d82020b0d5089>. Acesso em: 19/01/2016.

JEWERS, K. Mycotoxins and their effect on poultry production. In: SAUVEUR, B. (Ed). L'aviculture em Méditerranée. Options Méditerrannéennes:Série A. Séminaires Méditerrannéens. n. 07, p. 195-202, 1990.

JINDAL, N.; MAHIPAL, S. K.; MAHAJAN, N. K. Toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks and its reduction by activated charcoal. **Research in Veterinary Science**, v. 56, p. 37-40, 1994.

KHAYOON, W. S.; SAAD, B.; SALLEH, B.; MANAF, N. H. A.; LATIFF, A. A. Micro-solid phase extraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of aflatoxins in coffee and malt beverage. **Food Chemistry**, v. 147, p. 287-294, 2014.

KERR, M. G. Enzimologia clínica – enzimas plasmáticas no diagnóstico. In: **Exames laboratoriais em medicina veterinária – bioquímica clínica e hematologia.** Editora Roca:São Paulo, 2003.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; HEIDELBAUGH, N. D. Novel approach to the preventive management of aflatoxicosis in poultry. **Proceedings of the United States Animal Health Association**, p. 302-304, 1987.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T D.; CORRIER, D. E.; HUFF, W. E. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated, sodium calcium aluminosilicate. **Poultry Science**, v. 69, p. 727-735, 1990a.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; HUFF. W. E.; CORRIER, D. E.; PHILLIPS, T. D.; ROTTINGHAUS, G. E. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. **Poultry Science**, v. 69, p. 1078-1086, 1990b.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; HUFF, W. E.; ELISSALDE, M. H.; YERSIN, A. G.; PHILLIPS, T. D.; ROTTINGHAUS, G. E. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. **Poultry Science**, v. 72, n. 01, p. 51-59, 1993a.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; CLEMENT, B. A. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicates on aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 72, p. 651-657, 1993b.

LATIMER, K. S.; BIENZLE, D. Determination and interpretation of the avian leukogram. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. (Eds). **Schalm's Veterinary Hematology**. Ames:Wiley-Blackwell Publishing, 2010.

LATIMER, K. S.; RAKICH, P. M. Clinical interpretation of leukocyte responses. **Veterinary Clinical and Nutrition of American Small Animal Production**, v. 19, p. 637-668, 1989.

LATTANZIO, V. M. T.; CIASCA, B.; POWERS, S.; VISCONTI, A. Improved method for the simultaneous determination of aflatoxins, achratoxin A and *Fusarium* toxins in cereals and derived products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after multi-toxin immunoaffinity clean up. **Journal of Chromatography A**, v. 1354, p. 139-143, 2014.

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

Lewandowski , A.H.; Campbell, T.W.; Harrison , G.J. Clinical Chemistries. In: Harrison , G.J.; Harrison, L.R. **Clinical Avian Medicine**, Philadelphia:W. B. Sauders, 1986.

MACIEL, R. M.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M.; MARTINS, D. B.; ROSA, A. P.; EMANUELLI, M. P. Função hepática e renal de frangos de corte alimentados com dietas com aflatoxinas e clinoptilolita natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 42, n. 09, p. 1221-1225, 2007.

MAIORKA, A.; MACARI, M. Absorção de minerais. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Org.) **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal:FUNEP/UNESP, 2002.

MASOERO, F.; GALLO, A.; MOSCHINI, M.; PIVA, G.; DIAZ, D. Carryover of aflatoxin from feed to Milk in dairy cows with low or high somatic cells count. **Animal**, v. 01, n. 09, p. 1344-1350, 2007.

MEYER, D. J. et al. **Veterinary laboratory medicine, interpretation and diagnosis**. Philadelphia:W. B. Saunders, 1992.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbilogy**. Symposium, v. 84, p. 62S-76S, 1998.

NATT, M. P.; HERRIK, C. A. A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, n. 04, p. 735-738, 1952.

NEEFF, D. V.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; BERMUDEZ, A. J.; DAKOVIC, A.; MURAROLLI, R. A,; OLIVEIRA, C. A. F. *In vitro* and *in vivo* efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B_1. **Polutry Science**, v. 92, p. 131-137, 2013.

NORIEGA, C., M. I. V. C. Apuntes de hematologia aviar: material didático para curso de hematologia aviária. Mexico:Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Departamento de Producción Animal: Aves, 2000. (Apostila mimeo).

OĞUZ, H.; KURTOĞLU, F.; KURTOĞLU, V.; BIRDANE, Y. O. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 101-103, 2002.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M_1 em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 48, p. 22-25, 1997.

OSSA, D. E. H.; HINCAPIÉ, D. A.; PEÑUELA, G.A. Determination of aflatoxin M_1 in ice-cream samples using immunoaffinity columns and ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Control**, v. 56, p. 34-40, 2015.

OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v. 85, p. 89-94, 1990.

PASHA, T. N.; FAROOQ, M. V.; KHATTAK, F. M.; JABBAR, M. A.; KHAN, A. D. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, p. 103-110, 2007.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia.** São Paulo:Cengage Learning, 2010.

PHILLIPS, T. D.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; TAYLOR, D. R.; HEIDELBAUGH, N. D. Hydrated sodium calcium aluminosilicate. A high affinity sorbent for aflatoxin. **Poultry Science**, v. 67, p. 243-247, 1988.

PIER, A. C. An overview of mycotoxicosis of domestic animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 163, p. 1259-1261, 1973.

QUEZADA, T.; CUÉLLAR, H.; JARAMILLO-JUARÉZ, F.; VALDIVIA, A. G.; REYES, J. L. Effects of aflatoxin B_1 on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Parte C. v. 125, p. 265-272, 2000.

RAWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. Dieterien – Lievre F. Birds. In: RAWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. (Eds). **Vertebrate blood cells**. Cambridge:Cambridge University Press, 1988.

ROSA, C. A. R.; MIAZZO, R.; MAGNOLI, C.; SALIANO, M.; CHIACCHIERA, S. M.; FERRERO, S.; SAENZ, M.; CARVALHO, E. C. Q.; DALCERO, A. Evaluation of the efficacy of bentonite from the South of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **Poultry Science**, v. 80, p. 139-144, 2001.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Memorial do Instituto Butantã**, v. 20, p. 329-335, 1947.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição dos alimentos e exigências nutricionais.** Viçosa:UFV, 2011.

SAS Institute, 2002. SAS® (Statistical Analysis System) User's Guide: **Statistics**. Version 9.1, 4th Edition, Inc., Cary. NC (2002).

SAAS, D. C.; JAGER, A. V.; TONI, F.; ROSIM, R. E.; CONSTANTINO, M. G.; OLIVEIRA, C. A.F. Synthesis and purification of aflatoxin B_1-lysine adduct. **Toxin Reviews, Early On line 1-7**, v. 34, n. 01, p. 53-59, 2014.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos.** FUNEP:Jaboticabal. 1ª Edição. 2007. 283p.

SANTIN, E. Micotoxicoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. (Org.). **Doenças das aves.** Campinas:FACTA, 2000.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses em avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola.** Campinas. v. 02, n. 01, *on line version*, Jan/Abr 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516635X2000000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em 12/01/2016.

SCHIMIDT, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C. Patologia Clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola-revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 03, p. 09-20, 2007.

SCOTT, P.M. Natural poisons. In: HELRICH, K. (Ed) **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** Arlington, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), v. 02, p. 1184-213, 1990.

SCOTT, R. P. W. Detection devices. In: MILLNER, P. A. (Ed.) **High Resolution Chromatography.** Oxford:Oxford University Press, 1999.

SHI, Y. H.; XU, Z. R.; FENG, J. L.; WANG, C. Z. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, p. 138-148, 2006.

SHOTWELL OL, HESSELTINE CW, STUBBLEFIELD RD, et al. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology**, v. 15, p. 425-428, 1966.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Determination of aflatoxins in food using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS). **Food Control**, v. 31, p. 35-44, 2013.

SKADHAUGE, E. Formation and composition of urine. In: FREEMAN, B. M. **Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl.** London: Academic Press, 1983.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis.** Fort Worth:Saunders College Publishing, 1997.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Enzimas. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. (Org.). **Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária.** Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2011.

TEDESCO, D.; STEIDLER, S.; GALLETTI, S.; TANENI, M.; SONZOGNI, O.; RAVAROTTO, L. Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B_1 in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 83, p. 1839-1843, 2004.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 04, p. 419-424, 2003.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Efeitos da aflatoxina B_1 e fumonisina B_1 sobre os níveis séricos de aspartatoamino-transferase e proteína total de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 02, p. 185-189, 2005.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B_1 e fumonisina B_1. **Ciência Rural**, v. 36, n. 03, p. 924-929, 2006.

TUNG, H.T.; COOK, F. W.; WYATT, R. D.; HAMILTON, P. B. The anemia caused by aflatoxin. **Poultry Science**, v.54, p.1962-1969, 1975.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, p. 75-82, 1998.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of small intestine function in the poult. **Poultry Science**, v. 78, p. 215-222, 1999.

VERMA, J.; SWAIN, B. K.; JOHRI, T. S. Effect of various levels of aflatoxin and ochratoxin A and combinations thereof on protein and energy utilization in broilers. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 82, p. 1412-1417, 2002.

VICAM, L. P. Aflatest®. Instruction Manual:Watertown, M. A., U.S.A.:Vicam, 1999. Modificações na derivatização de acordo com Scott, P. M. Natural Poisons. In: HELDRICH, K. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Associations of Official Analytical Chemists**. Arlington:Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990.

WHO – WHO Task Group on Environmental Health Criteria for Mycotoxins. Mycotoxins. Geneva:World Health Organization1979.

WIGHT, P. A. et al. Monocytes in experimental zinc deficiency of domestic birds. **Avian Pathology**. v. 09, p. 61-66, 1980.

WOGAN, G. N. Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: recent progress and avenues for future research. **Environmental Health Perspectives**, v. 98, p. 167-178, 1992.

ANEXO.

ANEXO A. Artigos e Capítulo de Livro Publicados – Direitos de Publicação pertencentes às Editoras das Revistas.

Ciência Rural, Santa Maria, v.44, n.4, p.699-705, abr, 2014
ISSN 0103-8478

Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola

Physical and chemical methods of detoxification of aflatoxins and reduction of fungal contamination on poultry productive chain

Ágatha Cristina de Pinho Carão[I*] Maria Fernanda de Castro Burbarelli[I]
Gustavo do Valle Polycarpo[I] Amanda Ramos dos Santos[I] Ricardo de Albuquerque[I]
Carlos Augusto Fernandes de Oliveira[II]

RESUMO

As aflatoxinas são responsáveis por grandes prejuízos à saúde de aves comerciais e à produção animal, essencialmente por perda financeira decorrente de diminuição de ganho de peso dos animais. A detoxificação da ração ou de suas matérias-primas, bem como tentativas de diminuir a contaminação fúngica que leva à produção das toxinas, além de técnicas nutricionais, são métodos que podem ser adotados para tentar diminuir os efeitos deletérios sobre os frangos de corte. Sendo assim, o objetivo desta revisão é mostrar o que a ciência fornece como meios de detoxificação e/ou redução de contaminação por fungos; e algumas substâncias naturais que auxiliam a produção avícola na redução de micotoxicoses .

Palavras-chave: *avicultura, contaminação fúngica, micotoxinas, detoxificação.*

ABSTRACT

Aflatoxins are answerable for large losses for the health of commercial birds and for the animal production, essentially by financial losses due to animal body weight diminution. Detoxification of feed or its raw materials, well as attempts of diminution of fungal contamination that leads to toxins production, beyond of nutritional techniques, are methods that can be adopted trying to diminish deleterious effects among broiler chickens. This way, the objective of this review is to show what science supplies like ways of detoxification and/or reduction of contamination by fungi, and some natural substances that help poultry production on reduce mycotoxicosis.

Key-words: *poultry production, fungal contamination, mycotoxin, detoxification.*

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que podem entrar na dieta de seres humanos e animais por meio de contaminação direta ou indireta de cereais e grãos. São difíceis de diagnosticar e, de acordo com suas propriedades físico-químicas e a espécie animal envolvida, cada micotoxina pode afetar especificamente um órgão ou sistema, levando a manifestações clínicas específicas de natureza aguda ou crônica (PIER. et al., 1973).

Aflatoxicoses são micotoxicoses causadas por toxinas classificadas como aflatoxinas, produzidas por cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*) descobertas em 1960, após provocarem um surto tóxico em perus na Inglaterra (Turkey-X-disease) em que milhares de aves morreram após consumirem torta de amendoim na ração, proveniente do Brasil, e as aves doentes apresentaram necrose do tecido hepático (LEESON et al., 1995). Os principais compostos de interesse médico-sanitário são identificados como B1, G1, B2 e G2; sendo que a aflatoxina B1 (AFB1), além de ser a mais frequentemente encontrada em cereais, é que apresenta maior poder toxigênico (LEESON et al., 1995). A toxicidade das aflatoxinas depende de sua concentração, sua duração da exposição, a espécie, o sexo, a idade e a condição de saúde dos

[I]Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil. E-mail: agathapinho@usp.br. *Autor para correspondência.
[II]Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil.

Recebido 07.06.13 Aprovado 21.10.13 Devolvido pelo autor 30.01.14
CR-2013-0801.R1

animais (JEWERS, 1990). Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento de animais jovens (LEESON et al., 1995). A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxina, sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo. As aflatoxinas induzem a vários efeitos biológicos, tais como doenças hepáticas, alterações na taxa de crescimento, mudanças nos mecanismos imunogênicos, e efeitos carcinogênicos e mutagênicos em espécies animais diferentes, especialmente em aves domésticas (PIER et al., 1973).

Métodos de combate às aflatoxinas

Visando a diminuição dos efeitos deletérios causados pelas aflatoxinas, há, basicamente, três técnicas possíveis para evitá-los: a prevenção e/ou a diminuição da contaminação do alimento, a detoxificação do alimento e o impedimento da absorção das micotoxinas pelo trato digestivo dos animais. Porém, qualquer que seja a estratégia de descontaminação usada, ela deve ir de encontro a alguns critérios básicos (PARK & POMERANZ et al. *apud* BATA & LÁSZTITY, 1999): a micotoxina deve ser inativada (destruída) pela transformação em compostos não-tóxicos; os esporos e o micélio de fungos devem ser destruídos, afim de que novas toxinas não sejam formadas; o material do alimento ou da ração deve reter seu valor nutritivo e permanecer palatável; as propriedades físicas do material cru não devem ser alteradas significativamente, e deve ser economicamente viável.

Inativação física

Enquadra-se nos meios de detoxificação dos alimentos já contaminados.

Extração por solventes

Alimentos tratados por este método só podem ser utilizados para a alimentação animal. Os solventes usados incluem: 95% de etanol, 90% de acetona aquosa, 80% de isopropanol, hexano-metanol, metanol-água, acetonitrila-água, hexano-etanol-água e acetona-hexano-água. A extração por solventes pode remover todos os traços de aflatoxinas das farinhas de sementes oleaginosas sem a formação de sub-produtos tóxicos ou redução na qualidade ou no conteúdo de proteína. Entretanto, esta técnica em larga escala limita-se por altos custos e problemas relacionados à disposição dos extratos tóxicos (RUSTOM, 1997).

Tratamento térmico (Aquecimento, Extrusão e Tratamento por Microondas)

O tratamento térmico utilizado é com auxílio de calor. A extensão da destruição alcançada é muito dependente de: nível de contaminação inicial, temperatura de aquecimento, tempo de exposição ao calor, tipo de alimento e de aflatoxina, além de umidade, pH e concentração iônica do alimento. O conteúdo de umidade é um fator crítico; alimentos contaminados que possuem maior umidade podem ser mais facilmente inativados pelo calor (RUSTOM, 1997). De acordo com HWANG & LEE (2006), o tratamento térmico é capaz de produzir reduções significativas de contaminação de aflatoxina B1 em aveia não-umedecida (>80% de umidade, a temperatura de 200ºC, durante 30, 60 ou 90 minutos) ($P<0,01$).

A extrusão é um tipo de tratamento térmico de que a indústria se utiliza para a produção de muitos alimentos. Para destruir ou inativar aflatoxinas, as condições de cozimento da extrusão precisam ser severas (alto cisalhamento, alta temperatura e correto pH) afim de providenciar o ambiente necessário no tambor. SAALIA & PHILLIPS (2011), trabalhando com farinha de amendoins naturalmente contaminados por aflatoxinas (200μg kg^{-1} de B1 e G1 e 60μg kg^{-1} de B2 e G2) e submetendo-a a extrusão com 35% de umidade, obtiveram redução de 59% na quantidade de aflatoxinas detectáveis por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta *Performance*), sem prejuízo ao valor nutricional protéico do alimento. H A M E E D (1993) trabalhando com extrusão de farinha de milho contaminada com 500ppb de aflatoxinas, obteve redução de 70% nos níveis de contaminação com auxílio somente do processo de extrusão.

O aquecimento por microondas é outra técnica que pode ser aplicada com mesmo objetivo. BASARAN & ÜMRAN (2010) afirmam haver redução da contaminação de nozes por *A. parasiticus* (o que contribuiria para a redução da concentração de aflatoxinas ao longo do período de estocagem) em dois logaritmos após a exposição da superfície das nozes a microondas por 60 segundos, sob temperatura externa da casca em 50-55ºC. Após 120 segundos de exposição, até 2,5 logarítmos de redução foi possível. Quando testou-se a efetividade das microondas em diminuir a concentração das aflatoxinas já presentes nas nozes, estas foram ineficazes. Os níveis de aflatoxinas permaneceram inalterados ($P>0,05$) sob 2,45GHz por 120 segundos.

Irradiação (Irradiação Solar, Raios Gama e Luz Ultra-violeta)

A técnica mais simples consiste na secagem de materiais sob exposição à luz solar. GOWDA et al. (2007) constataram redução de 83,7% (de 326

para 52ppb de aflatoxina B1) em dieta de ovelhas contaminada artificialmente e exposta à luz solar por 14 horas, em temperaturas entre 27 e 35ºC.

A irradiação de alimentos é um processo físico que envolve a exposição do alimento a um dos três tipos de energia ionizante: radiação gama, raios-X ou feixe de elétrons. A mais usada para processamento de alimentos é a de radiação gama, proveniente do radioisótopo Cobalto-60 (DULLEY *apud* CAMARGO et al., 2011). Existem trabalhos que sugerem que os fungos são muito sensíveis à radiação gama, e em adição, a sua produção de micotoxina diminui após a irradiação (REFAI et al. e YOUSSEF et al., *apud* AQUINO et al., 2005). AQUINO et al. (2005), avaliando o efeito da radiação gama sob a sobrevivência dos fungos da espécie *A. flavus* e a destruição das aflatoxinas B1 e B2, afirmam haver redução do número de unidades formadoras de colônia do fungo ($P<0,01$) e a destruição parcial das toxinas sob 2 e 5kGy de irradiação, bem como a destruição total das toxinas sob 10kGy de irradiação em milho artificialmente contaminado (Umidade relativa de 97-99% e atividade de água de 0,88-0,94). SIMAS et al. (2010) também relatam haver melhora nos parâmetros de produção zootécnica de frangos alimentados com dieta submetida a radiação gama de 5kGy.

A radiação ultravioleta (UV) também pode ser aplicada. Ela tem efeito microbicida se utilizada com intensidade e tempo de exposição suficientes. As irradiações ultravioletas na faixa de 210 e 330nm são mais eficientes como germicidas por serem absorvidas pelas proteínas e ácidos nucléicos, provocando o rompimento de cromossomo, mutações genéticas e inativação de enzimas e, consequentemente a morte da célula (CARDOZO *apud* ALEXANDRE et al., 2008). O método mais prático de gerar radiação UV é aquele das lâmpadas germicidas (ALEXANDRE et al., 2008). SAMARJEEWA et al. (1990) afirmam que a radiação gama pode reduzir de 75 a 100% os níveis de aflatoxina na farinha de amendoim; que a luz ultravioleta reduz até 50% a concentração de aflatoxina; bem como a irradiação solar de 50 a 90% da toxina presente.

Inativação química

Métodos químicos consistem em degradar ou inativar as micotoxinas, com uso de ácidos, bases, aldeídos, agentes oxidantes e gases (NORRED, 1993). A inativação química das aflatoxinas pode ser realizada com o auxílio de compostos que induzam modificações químicas irreversíveis na molécula e que estas substâncias não sejam tóxicas aos seres vivos. Porém, em sua grande maioria, estes métodos podem ser não-práticos, ineficazes ou inseguros, além de diminuir os níveis nutricionais e o paladar do alimento.

Amonização

O tratamento com amônia em forma de gás, em solução ou com substâncias capazes de liberá-la, alcançou resultados ótimos na detoxificação de farelo de amendoim, milho e algodão (PIVA et al., 1995). SAMARJEEWA et al. (1990), trabalhando com concentrações que variavam de 0,5 a 5,0% de amônia sobre diferentes substratos mostram haver redução acima de 93% nos níveis de contaminação por aflatoxina. THANABORIPAT et al. (1992) também testaram a ação do hidróxido de amônia sobre milho contaminado experimentalmente por *A. flavus* produtores de AFB1 e AFG1. Quando adicionados 0,2, 0,5, 1,0 e 1,5% de Nh_4OH houve redução de produção de 45 a 100% de AFB1 + AFG1. Porém, para se trabalhar com amônia, é necessária uma planta especial e cuidado, uma vez que o gás pode sofrer combustão em misturas com ar em volumes acima de 15%, além de alterações nutricionais e organolépticas (PIVA et al., 1995).

Ozonização

A ozonização é uma técnica que está apresentando uma técnica promissora. O gás ozônio apresenta certas características sanitizantes atraentes para a indústria alimentícia, por ser mais seguro e potente do que os desinfetantes convencionais, agindo sobre um grande número de microorganismos. Age através do ataque direto do ozônio e do ataque através dos radicais OH formados na decomposição do O_3 (GIORDANO, 2009). KELLS et al. (2001) notaram redução de 63% na contaminação por *A. parasiticus* em milho após exposição a 50ppm de ozônio durante 3 dias. Em seu trabalho, GIORDANO et al. (2012) afirmam haver redução da contaminação fúngica (de 4,83 para 0log ufc g^{-1} de *A. flavus* e *A. parasiticus*) e não-detecção de aflatoxinas em castanha-do-Pará submetidas a ozonização (14 e 31,5mg l^{-1}) por 5 horas. Na tentativa de provar que o ozônio obtido através de eletrólise é capaz de conter os efeitos negativos da aflatoxina B1 em perús jovens, McKENZIE et al. (1998) forneceram milho contaminado (1220+/-73,3ppb de AFB1) e tratado com 200mg min^{-1} de O_3 por 92 horas aos animais. Houve redução de 95% da micotoxina na ração tratada e reteve os efeitos indesejáveis da AFB1 na produção animal.

Acidificação

Ácidos orgânicos também podem ser usados como químicos fungistáticos, que impedem

o crescimento da população de fungos e a produção de micotoxinas. O mais eficiente custo-benefício tem sido encontrado com o uso de ácido propiônico (Al-HILLI & SMITH, 1992). Além das concentrações de 500, 1000 e 1500 μg g^{-1} de ácido propiônico não terem sido capazes de inibir a produção de aflatoxinas B1 e G1 por ***A. flavus***, funcionaram como substrato para a síntese microbiana. Ácidos fracos, com baixo potencial de ionização, são potentes inibidores do transporte de aminoácidos por parte da célula fúngica, pela ionização interna do citoplasma e acidificação do conteúdo celular, dificultando a sobrevivência do microorganismo Ledoux (2012 – Informe verbal).

Uso de substâncias naturais

Os extratos herbais vêm sendo estudados com o intuito de uso em alimentos para inibição de crescimento fúngico e consequente produção de toxinas, muito embora atualmente também os empregue como meio nutricional de combate aos efeitos negativos das micotoxicoses. Óleos essenciais extraídos de ervas comestíveis constituem uma alternativa utilizada em estudos para investigação de possível uso em alimentos, a exemplo de óleos de plantas como orégano, cravo, canela, alho e tomilho (SHAPIRA, 2004). CHINAPHUTI & AUKKASARAKUL (2008) testaram 15 espécies de ervas que são cultivadas na região da Tailândia e afirmam que a grande maioria pode ser usada como inibidor de crescimento de ***A. flavus***. Extrato brutos de ***Allium sativum***, ***Occimum tenuiflorum*** e ***Occimum basillicum*** possuem a capacidade de inibir a produção de aflatoxinas, bem como o crescimento do fungo. REDDY et al. (2009) também mostram que o extrato de ***Syzygium aromaticum*** (5g kg^{-1}) mostram inibição completa do crescimento de ***A. flavus*** e produção de aflatoxina B1. Em menor porcentagem (65-78%), ***Curcuma longa***, ***Allium sativum*** e ***Occimum sanctum*** também inibem efetivamente a proliferação fúngica e a produção de micotoxina (72,2-85,7%) em concentração de 5g kg^{-1}. AL-SOHAIBANI et al. (2011) também relatam que extratos de espécies de pimenta usadas como especiarias e como ervas medicinais (***Elettaria cardamomum*** e ***Syzygium aromaticum***) na Índia possuem efeito inibitório e podem ser usados como antimicrobianos em chás. Entretanto, resultados contraditórios têm sido reportados em muitos casos a respeito da atividade de alguns constituintes de plantas.

Meios nutricionais de prevenção dos efeitos negativos das aflatoxicoses também estão sendo estudados como métodos auxiliares ao combate às lesões patológicas nos animais de criação. A utilização de vitamina E e selênio foi estudada por HE et al. (2013) na tentativa de melhora de *performance* e redução de alterações patológicas em patos, o que permitiu que os efeitos negativos da aflatoxina B1 sobre o crescimento e a mortalidade fossem parcialmente contidos (50UI de vitamina E + 0,2mg kg^{-1} de selênio) ($P<0,05$). CHEN et al. (2013) demonstraram melhora na função imunológica de frangos alimentados com 0,6 e 0,8mg kg^{-1} de selênio e intoxicados com 0,3ppm de alfatoxina B1, com maior concentração de linfócitos $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ e interleucina-2 e intérferon-γ.

Óleos essenciais também podem ser usados na nutrição como método combate aos efeitos deletérios causados por micotoxinas. A piperina, componente do óleo essencial de pimenta negra (***Piper nigrum***) também vem se mostrando útil no combate aos efeitos negativos provocados por aflatoxinas. CARDOSO et al. (2011) apontam significativa redução da toxicidade hepática causada por aflatoxinas B1 e G1 (2ppm) na administração de 2,25mg kg^{-1} de piperina na ração de frangos de corte, com redução das lesões histopatológicas decorrente da ingestão da toxina.

Uso de adsorventes

Os adsorventes são utilizados quando não há mais como se detoxificar os alimentos, sendo usados para impedir que as toxinas sejam absorvidas pelo trato gastrintestinal, com conseqüente diminuição dos efeitos deletérios no organismo. Um caminho para o problema tem sido usar materiais absortivos não-nutritivos na alimentação objetivando-se redução na absorção pelo trato gastrointestinal (KUBENA et al., 1990b).

Aluminosilicatos de sódio e cálcio hidratados (HSCAS)

A utilização de HSCAS em dietas de aves domésticas tem mostrado resultados satisfatórios, pela sua capacidade em adsorver toxinas, tornando-as menos disponíveis para absorção pelo trato gastrointestinal. O HSCAS na concentração de 0,5% na dieta diminuiu significativamente os efeitos adversos no peso corporal e nas principais mudanças hepáticas causados por 3,5ppm e 7,5ppm de aflatoxina B1 em frangos de corte e em poedeiras comerciais, respectivamente (KUBENA et al., 1990a; 1990b).

A eficácia dos HSCAS como adsorvente também foi comprovada por DENLI et al. (2009). Observou-se que a adição de 2 e 5g de HSCAS kg^{-1} de ração foi capaz de diminuir significativamente ($P<0,05$) os efeitos inibitórios da Aflatoxina B1 (1ppm) sobre o desempenho zootécnico. A redução de efeitos deletérios em frangos também foi mostrada

por KUBENA et al. (1998), uma vez que a adição de 0,25 e 0,375% de HSCAS a dietas experimentalmente contaminadas com 5 ou 8ppm de aflatoxinas (79% AFB1+16% AFG1+4% AFG2+1% AFG1) foi capaz de melhorar o ganho de peso, o consumo de ração, a conversão alimentar e a mortalidade (P<0,05). LEDOUX et al. (1999) também obtiveram ótimos resultados com o uso de HSCAS em dieta contaminada com 4ppm de aflatoxina B1. A adição de 1% de HSCAS preveniu completamente a redução de desempenho zootécnico, as mudanças nos pesos dos órgãos e na bioquímica sérica, além da severidade das alterações histopatológicas de fígado e rins.

ZHAO et al. (2010) também evidenciaram o efeito positivo dos HSCAS na alimentação de frangos de corte. Tanto 0,1% quanto 0,2% de HSCAS adicionados à alimentação foram capazes de reduzir em mais de 90% os efeitos deletérios de 1ppm de AFB1 sob o desempenho zootécnico e peso de fígado (P<0,05).

CONCLUSÃO

A literatura mostra diversas técnicas passíveis de serem usadas como métodos auxiliares à prevenção, ou diminuição, dos prejuízos causados pelas aflatoxinas. Os adsorventes mostram-se como a alternativa mais segura e eficaz para diminuir e até evitar os efeitos deletérios causados às aves pelas aflatoxinas. À exceção dos adsorventes, embora a maioria das demais técnicas sejam eficazes, há de se observar possíveis alterações de palatabilidade e nutricional, além da produção de compostos tóxicos. Há de se considerar o nível inicial de contaminação e o tipo de técnica a ser empregada, afim de se aplicar a mais apropriada. Além disso, deve-se atentar para a correta destinação dos compostos resultantes da detoxificação e para a necessidade de plantas de processamento especiais; além do custo de emprego de cada método.

INFORME VERBAL

LEDOUX, D.R. Approaches for reducing the toxic effects of mycotoxins in poultry. Aula ministrada para Programa de Pós-Graduação VNP/FMVZ/USP. Pirassununga-SP. 2012. Contato: ledouxd@missouri.edu.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, F.A. et al. Avaliação da eficiência da luz ultravioleta na esterilização de embalagens plásticas. **Ciência e Agrotecnologia** [on line], v.32, n.5, p.1524-1530, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v32n5/25.pdf>. Acesso em: maio, 2013.

Al-HILLI, A.L.; SMITH, J.E. Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by ***Aspergillus flavus*** in liquid submerged and solid substrate conditions. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.11, n.2, p.57-60, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=alHilli%20AL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=1573566>. Acesso em: maio, 2013.

AL-SOHAIBANI, S. et al. Xerophilic aflatoxigenic black tea fungi and their inhibition by ***Elettaria cardamomum*** and ***Syzygium aromaticum***. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.18, p.387-394, 2011. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1319562X11000465/1-s2.0-S1319562X11000465-main.pdf?_tid=6e252822-1cb2-11e3-ba4d-00000aacb361&acdnat=1379104022_5aff2ab71e9dccda97c27de4d3ccc7d5>. Acesso em: set. 2013. doi: 10.1016/j.sjbs.2011.06.005.

AQUINO, S. et al. Evaluation of viability of ***Aspergillus flavus*** and aflatoxins degradation in irradiated sample of maize. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, n.4, p.352-356, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v36n4/v36n4a09.pdf>. Acesso em: maio, 2013.

BASARAN, P.; ÜMRAN, Ü. Microwave irradiation of hazelnuts for the control of aflatoxin producing ***Aspergillus parasiticus***. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, n.1, p.113-117, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.010>. Acesso em: maio, 2013.

BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feeds by microorganisms. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, n.6-7, p.223-228, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224499000503>. Acesso em: abr. 2013.

CAMARGO, A.C. et al. Efeitos da radiação gama na cor, capacidade antioxidante e perfil em ácidos-graxos de amendoim (***Arachis hypogaea*** L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n.1, p.11-15, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v31n1/02.pdf>. Acesso em: abr. 2013.

CARDOSO, V.S. et al. Efficacy of piperine in reducing the effects of aflatoxin intoxication in broiler chickens: a preliminary report. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.495-448, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v63n2/31.pdf>. Acesso em: set. 2013.

CHEN, K. et al. Protective role of sodium selenite on histopathological lesions, decreased T-cell subsets and increased apoptosis of thymus in broilers intoxicated with aflatoxin B1. **Food and Chemical Toxicology**, v.59, p.446-454, 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0278691513004092/1-s2.0-S0278691513004092-main.pdf?_tid=41eeaffc-1d44-11e3-8113-00000aacb362&acdnat=1379166658_0c848a9a53999bb4f190db0bacf8b9c3>. Acesso em: set. 2013. doi: 10.1016/j.fct.2013.06.032.

CHEN, K. et al. Effects of sodium selenite on the decreased percentage of T cell subsets, contents of serum IL-2 and IFN-γ induced by aflatoxin B1 in broilers. **Research in Veterinary Science**, v.95, p.143-145, 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0034528813000738/1-s2.0-S0034528813000738-main.pdf?_tid=a419056c-1d47-11e3-a9f2-00000aab0f02&acdnat=1379168110_4eb147f19edf966a9716c026843dbe9b>. Acesso em: set. 2013. doi:10.1016/j.rvsc.2013.02.019.

CHINAPHUTI, A.; AUKKASARAKUL, S. Inhibition of ***Aspergillus flavus*** growth and aflatoxin production using herbal extracts.

Journal of Biotechnology, v.136, p.751-759, 2008. (Resumo). Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S016816560801938X/1-s2.0-S016816560801938X-main.pdf?_tid=3fee22e6-1c9f-11e3-8db7-00000aab0f6c&acdnat=1379095785_eba6dc1836dd098e0af9dd7cc7fb025c>. Acesso em: set. 2013. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.07.1672.

DENLI, M. et al. Effects of a dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. **Poultry Science**, v.88, n.7, p. 1444-1451, 2009. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/88/7/1444.full.pdf+html>. Acesso em: abr. 2013. doi:10.3382/ps.2008-00341.

GIORDANO, B.N.E. **Efeito do ozônio sobre a micoflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-Brasil com casca (*Bertholletia excelsea* H.B.K)**. 2009. 193f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

GIORDANO, B.N.E. et al. Susceptibility of the in-shell Brazil nut microflora and aflatoxin contamination to ozone gás treatment during storage. **Journal of Agricultural Science [on line]**, v.4, n.8, 2012. Disponível em: <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/14510>. Acesso em: maio, 2013.

GOWDA, N.K.S. et al. Efficacy of heat treatment and sun drying of aflatoxin-contaminated feed for reducing the harmful biological effects in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, n.1-2, p.167-175, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=269550983&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=875ec8bc2e1c6e2dff5647c684adeb37&searchtype=a>. Acesso em: abr. 2013.

HAMEED, H.G. **Extrusion and chemical treatments for destruction of aflatoxin in naturally-contaminated corn**. 1993. 105f. Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais) - Comitê de Ciências Nutricionais/Universidade do Arizona.

HE, J. et al. Effects of vitamin E and selenium yeast on growth performance and immune function in ducks fed maize naturally contaminated with aflatoxin B1. **Livestock Science**, v.152, p.200-207, 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1871141313000255/1-s2.0-S1871141313000255-main.pdf?_tid=9474c6f8-1d3f-11e3-9a6c-00000aab0f6c&acdnat=1379164646_d6e36bd6beaaee36a418c4a35ba7e1b4>. Acesso em: set. 2013. doi: 10.1016/j.livsci.2012.12.018.

HWANG, J-H.; LEE, K-G. Reduction of aflatoxin B1 contamination on wheat by various cooking treatments. **Food Chemistry**, v.98, n.1, p.71-75, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=-269559790&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=b213dfe48f5647027c7a5ad139ae3470&searchtype=a>. Acesso em: abr. 2013.

JEWERS, K. Mycotoxins and their effect on poultry production. In: Sauveur, B. **L'aviculture en Méditerranée**. Montpellier: CIHEAM (Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes), 1990. p.195-202. (Options Méditerranéennes: Série A. Seminaires Méditerrannéens; n. 07). Disponível em: <http://om.ciheam.org/om/pdf/a07/CI901593.pdf>. Acesso em: abr. 2013.

KELLS, S.A. et al. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, n.4, p.371-382, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=269564061&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=3d45509fa7f8870f55136b871b166842&searchtype=a>. Acesso em: maio, 2013.

KUBENA, L.F. et al. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. **Poultry Science**, v.69, n.1, p.1078-1086, 1990a. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/69/7.toc>. Acesso em: maio, 2013. doi: 10.3382/ps.0691078.

KUBENA, L.F. et al. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hidrated sodium calcium aluminosilicate. **Poultry Science**, v.69, p.727-735, 1990b. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/69/5.toc>. Acesso em: maio, 2013. doi:_10.3382/ps.0690727.

KUBENA, J. F. et al. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind®) on mycotoxicosis in young broiler chickens. **Poultry Science**, v.77, n.10, p.1502-1509, 1998. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/77/10.toc>. Acesso em: maio, 2013.

LEDOUX, D.R. et al. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers chicks. **Poutry Science**, v.78, n.2, p.204-210, 1999. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/78/2.toc>. Acesso em: maio 2013.

LEESON, S. et al. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995. 352p.

McKENZIE, K.S. et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, n.8, p.807-820, 1997. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=269570505&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=255440593e46311ec7298950bf6fcd77&searchtype=a>. Acesso em: abr. 2013.

McKENZIE, K.S. et al. Aflatoxicosis in turkey poults is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. **Poultry Science**, v.77, n.8, p.1094-1102, 1998. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/77/8.toc>. Acesso em: maio 2013.

NORRED, W.P. Fumonisins – mycotoxins produced by ***Fusarium moniliforme***. **Journal of Toxicology, Environment and Health**, v.38, n.3, p.309-328, 1993. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/15287399309531720>. Acesso em: maio, 2013. doi: 10.1080/15287399309531720.

OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v.85, n.1, p.89-94, 1990.

PIVA, G. et al. Detoxification methods of aflatoxins: a review. **Nutrition Research**, v.15, n.5, p.767-776, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=-269620606&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=6718453e1f33bff55a2cfff645038163&searchtype=a>. Acesso em: maio, 2013.

PIER, A.C. et al. Mycotoxins as a veterinary problem. In: RODRICKS, J.V. et al. **Mycotoxins in human and animal health**. Illinois: Pathox Publishers, 1973. p.745-750.

REDDY, K.R.N. et al. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by ***Aspergillus flavus*** infecting rice grains. **Food Control**, v.20, p.173-178, 2009. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0956713508000996/1-s2.0-S0956713508000996-main.pdf?_tid=28edbb34-1cad-11e3-b47c-00000aacb361&acdnat=1379101759_c211a9bfae1f83e221f4337e97105c09>. Acesso em: set. 2013. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.03.009.

RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v.59, n.1, p.57-67, 1997. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=-269630691&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=0a35f470c4fea3a5bab7116365d1773e&searchtype=a>. Acesso em: abr. 2013.

SAALIA, F.K.; PHILLIPS, R.D. Degradation of aflatoxins by extrusion cooking: effects on nutritional quality of extrudates. **LWT – Food Science and Technology**, v.44, n.6, p.1496-1501, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=-269635605&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=6e2b2f16a35cd6e383e7b85cf02c4015&searchtype=a>. Acesso em: maio, 2013.

SAMARJEEWA, U. et al. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. **Journal of Food Protection**, v.53, n..06, p.489-501, 1990.

SIMAS, M.M.S. et al. Influence of gamma radiation on productivity parameters of chicken fed mycotoxin-contaminated corn. **Applied Radiation and Isotopes**, v.68, n.10, p.1903-1908, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=-269648611&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=451e4c3e5f2fbc60302421bdc246ea35&searchtype=a>. Acesso em: abr. 2013.

ZHAO, J. et al. Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v.89, n.10, p.2147-2156, 2010. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/89/10.toc>. Acesso em: maio, 2013. doi:_10.3382/ps.2009-00608.

Aflatoxicoses: prejuízos causados ao desempenho zootécnico de frangos de corte, boas práticas agrícolas e métodos biológicos de detoxificação

***Aflatoxicosis:** losses in poultry performance, agricultural good practices and biological methods of detoxification*

Ágatha Cristina de Pinho CARÃO[1]; Ricardo de ALBUQUERQUE[1]; Carlos Augusto Fernandes de OLIVEIRA[2]; Pedro de Assunção Pimenta RIBEIRO[1]; Carlos Eduardo Bellinghausen MERSEGUEL[1]; Karen ANDRADE[1]

[1] Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento da Faculdade USP de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga – SP, Brasil
[2] Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga – SP, Brasil

Resumo

As aflatoxicoses são micotoxicoses causadas por toxinas produzidas por estirpes de fungos do gênero *Aspergillus*. Causam prejuízos importantes à produção animal, em especial àquelas que têm nos grãos sua matéria-prima base para preparação de ração, como a avicultura de corte. Atualmente, diversas técnicas, tais como uso de substâncias químicas, métodos físicos, estratégias de colheita, armazenagem e processamento de alimentos, estão sendo estudadas para que se diminua e, se bem aplicadas, evite os efeitos deletérios causados por essas substâncias à saúde animal. O objetivo desta revisão é descrever os principais efeitos das aflatoxinas sobre o desempenho zootécnico na produção de frangos de corte, as alterações nas matérias-primas de ração e os avanços científicos em metodologias de detoxificação biológica e de boas práticas agrícolas.

Palavras-chave: AFB_1. Avicultura. Detoxificação. *Aspergillus*. Armazenamento.

Abstract

Aflatoxicosis are mycotoxicosis caused by toxins produced by strains of fungi of the genus *Aspergillus*. They cause important losses to animal production, especially to those that use grains like base raw-material to prepare feeds, like poultry production. Currently, many techniques are being studied to prevent the deleterious effects caused by these substances to animal health, including the use of chemical substances, physical methods, strategies for harvest, storage and processing food. The objective of this review is to describe the main effects of aflatoxins on poultry performance, the alterations in raw-materials of feeds and scientific advances on methods for biological detoxification and agricultural good practices.

Keywords: AFB_1. Poultry production. Detoxification. *Aspergillus*. Storage.

Introdução

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que podem estar presentes na dieta de seres humanos e animais, por meio de contaminação direta ou indireta de grãos e cereais. Após a ingestão, as micotoxinas podem causar efeitos agudos, caracterizados pela ingestão de altas concentrações da toxina na dieta, ou crônicos, sendo estes os mais observados em condições de campo com exposição dos animais a baixas concentrações. Nesses casos, as micotoxinas causam síndromes com sintomatologia difusa, que podem facilmente ser confundidas com doenças causadas por microrganismos (PIER; CYSENSKY; RICHARD, 1973), como a Doença Infecciosa da Bursa de Fabricius, causada por um Birnavírus, ou deficiências de manejo ou nutricionais (MALLMANN; DILKIN; RAUBER, 2009).

Correspondência para:
Ágatha Cristina de Pinho Carão
Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Departamento de Nutrição e Produção Animal
Av. Duque de Caxias Norte, 225
CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil
e-mail: agathapinho@gmail.com

Recebido: 06/09/2013
Aprovado: 12/06/2014

Aflatoxicoses são micotoxicoses causadas por aflatoxinas, as quais foram descobertas em 1960, na Inglaterra (*Turkey-X-disease*), após provocarem um surto tóxico em perus alimentados com torta de amendoim, no qual milhares de aves morreram apresentando necrose do tecido hepático (ASAO et al., 1963; LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). As aflatoxinas são produzidas por estirpes de fungos do gênero *Aspergillus,* espécies *A. flavus, A. parasiticus* e *A. nomius*. Os principais tipos de aflatoxinas de interesse médico-sanitário são identificados como B1, G1, B2 e G2, sendo que a aflatoxina B1 (AFB_1), além de ser a mais frequentemente encontrada em cereais, é a que apresenta maior poder toxigênico.

Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento de animais jovens (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxinas, sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo. Caracteriza-se principalmente pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (OSWEILLER, 1990). As aflatoxinas induzem a vários efeitos deletérios, tais como doenças hepáticas, alterações na taxa de crescimento, mudanças nos mecanismos imunogênicos, e efeitos carcinogênicos e mutagênicos em espécies animais diferentes, especialmente em aves domésticas (PIER; CYSENSKY; RICHARD, 1973), o que leva a muitos prejuízos envolvendo a produção de aves comerciais, em especial, os frangos de corte. Assim, o objetivo desta revisão é descrever os principais efeitos das aflatoxinas sobre o desempenho zootécnico na produção de frangos de corte, as alterações causadas nas matérias-primas das rações, e os avanços científicos em metodologias de biodetoxificação e boas práticas agrícolas.

Efeitos das aflatoxinas sobre o desempenho de frangos de corte

Os parâmetros zootécnicos clássicos adotados em avicultura, como o ganho de peso, o consumo de ração, a conversão alimentar, a mortalidade e o índice de eficiência produtiva, são negativamente influenciados pelas aflatoxicoses. Em consequência, os efeitos das aflatoxinas sobre o desempenho zootécnico acarretam diminuição no lucro dos produtores, cujo impacto na atividade dependerá da severidade da intoxicação.

Os efeitos das aflatoxinas em aves comerciais têm sido estudados desde a descoberta destas toxinas. Em experimento realizado com frangos de corte, Doerr et al. (1983) observaram diminuição significativa do peso dos animais alimentados com ração contendo aflatoxina (2,7 mg/kg). Bailey et al. (1998) obtiveram redução no ganho de peso corporal aos, 21 dias de frangos alimentados com 5,0 mg/kg de aflatoxinas (79% de AFB_1, 16% de AFG_1, 4% de AFB_2 e 1% de AFG_2). Tedesco et al. (2004) utilizaram menor concentração de AFB_1 (0,8 mg/kg) na ração de aves durante 35 dias, e observaram diminuição do peso corporal e do consumo de ração das aves intoxicadas em relação às aves não-intoxicadas. Tejada-Castañeda et al. (2008) também relataram que frangos alimentados com milho contaminado com AFB_1 (1,155 mg/kg de ração) apresentam menor peso corporal aos 21 dias de idade. Similarmente, Denli et al. (2009) alimentaram frangos de corte com ração contendo 1,0 mg AFB_1/kg durante 42 dias, e constataram diminuição significativa no ganho de peso e no consumo de ração, além de aumento na conversão alimentar das aves intoxicadas. Ressalta-se que esses estudos foram conduzidos com rações adicionadas experimentalmente com AFB1. No entanto, Aravind et al. (2003) utilizaram dieta naturalmente contaminada com 0,168 mg/kg de aflatoxinas totais, fornecida a 350 aves durante 35 dias. Os autores observaram redução significativa do ganho de peso e do consumo de ração, além de piora na conversão alimentar, indicando que em condições de campo com exposição à ração naturalmente contaminada os níveis de aflatoxinas necessários para causar efeitos sobre o desempenho podem ser menores do que as concentrações utilizadas nos estudos realizados com rações contaminadas experimentalmente.

Analisando-se os trabalhos apresentados, são notáveis os efeitos deletérios das aflatoxinas sobre a saúde das aves e seus reflexos nos índices zootécnicos, mesmo quando os animais são expostos a concentrações baixas na ração. Considerando-se que a avicultura industrial possui seu lucro sensivelmente atrelado ao ganho de peso das aves, efeitos negativos decorrentes da presença de micotoxinas nas rações podem determinar diminuição da lucratividade para a cadeia produtiva de carne de frangos. Além disso, a imunossupressão causada por aflatoxinas normalmente é um fator determinante para o aparecimento de doenças secundárias às aflatoxicoses, como as salmoneloses, aspergilose, coccidiose e Doença de Marek (MALLMANN; DILKIN; RAUBER, 2009).

Efeitos das aflatoxinas sobre os alimentos constituintes da ração de frangos

Cerca de 70% da ração de aves industriais é composta de grãos, que são altamente susceptíveis ao crescimento de fungos. Os principais fungos capazes de colonizar sementes, grãos, fibras naturais e seus subprodutos são categorizados em fungos de campo, intermediários e de armazenamento (LÁZZARI, 1993). As principais espécies de fungos de campo pertencem aos gêneros *Alternaria, Cladosporium, Fusarium* e *Helmintosporium*, os quais podem alterar a aparência dos grãos e o valor comercial do produto, enquanto os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os fungos de armazenamento ou depósito mais frequentemente encontrados (PUZZI, 1986). A presença de fungos toxigênicos é um indicativo de deterioração das sementes ou grãos de cereais e oleaginosas, sendo que estes patógenos causam danos ao embrião, descoloração, perdas nutricionais e de massa seca (MILLER, 1995; SINHA; SINHA, 1992).

O desenvolvimento fúngico nos alimentos afeta todos os nutrientes do produto. Em geral, alimentos com alto teor de carboidratos são mais favoráveis ao desenvolvimento de fungos e produção de toxinas, embora as espécies do gênero *Aspergillus* apresentem ótimo desenvolvimento em grãos de oleaginosas, principalmente o amendoim (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010). As gorduras e os carboidratos servem de fonte energética para o crescimento fúngico, enquanto os aminoácidos servem de base para a biossíntese de proteínas e as vitaminas e os minerais estão envolvidos no metabolismo global. O milho apresenta-se como um excelente substrato para o desenvolvimento fúngico, tendo em vista sua riqueza nutricional, sobretudo a alta proporção de amido (BANKOLI; ADEBANJO, 2003).

A contaminação de grãos por fungos é favorecida pela ocorrência de lesões provocadas por atrópodes e outras pragas. Souza (1999) observou que o aumento dos níveis de carunchamento de milho foi acompanhado pelo aumento linear do teor de matéria seca, fibra bruta e cinzas, além de produzir efeito quadrático sobre o extrato não nitrogenado, a gordura, a proteína bruta, a densidade e a energia bruta. Essa diferença na composição bromatológica do alimento pode ser determinante na redução do desempenho produtivo dos animais, seja por diminuição do valor nutritivo da matéria-prima da ração quanto por ser porta de entrada para a contaminação fúngica e produção de micotoxinas. Esse fato é coerente com os resultados apresentados por Stringhini et al. (2000), os quais relataram aumento nas alterações hepáticas e no aparelho locomotor de frangos de corte quando alimentados, durante os primeiros 28 dias de vida, com dietas contendo 20 ou 40% de milho infestado por insetos ou fungos. Os dados apresentados ressaltam a importância do controle da qualidade dos grãos oferecidos aos animais, com intuito de preservação da saúde e bem-estar das aves.

Silva et al. (2008) analisaram o efeito de diferentes densidades de milho (alta, média, baixa e total) e milho sem seleção densitométrica sobre a produção de micotoxinas. Os autores observaram aumento crescente da concentração de aflatoxinas e tricotecenos à medida que houve redução da densidade do milho, devido à maior presença de pó segregado pela mesa

densitométrica. Ainda, a energia metabolizável aparente e a energia metabolizável aparente corrigida para nitrogênio diminuíram conforme aumentou a colonização por fungos.

Boas Práticas Agrícolas

O Brasil, devido ao seu clima predominantemente tropical, propicia condições ideais para a proliferação de fungos toxigênicos. Além disso, observam-se frequentemente condições inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenamento de produtos agrícolas. Desse modo, a adoção de práticas agrícolas que previnam a contaminação e o desenvolvimento de fungos é fundamental para garantir a obtenção de insumos de boa qualidade para a elaboração de rações empregadas em avicultura (ROSMANINHO; OLIVEIRA; BITTENCOURT, et al., 2001).

As boas práticas agrícolas enquadram-se na tentativa de impedir e/ou reduzir a contaminação da matéria-prima das rações por fungos toxigênicos, sejam de campo ou de armazenamento. A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos. Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com a umidade relativa de 90% – 100% para crescerem. Os principais gêneros são *Cephalosporium, Fusarium, Gibberella, Nigrospora, Helminthosporium, Alternaria* e *Cladosporium,* os quais invadem grãos e sementes durante o amadurecimento, sendo que o dano é causado antes da colheita. Esses fungos não se desenvolvem normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (MARCIA; LÁZZARI, 1998).

Os fungos de armazenamento (*Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* e *Mucor*) são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto. As espécies do gênero *Aspergillus* (*A. halophliticus, A. restrictus, A. glaucus, A. candidus, A. alutaceus* (*A. ochraceus*) e *A. flavus*) e as do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum, P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos, causando danos ao germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (MARCIA; LÁZZARI, 1998).

A ocorrência e a magnitude da contaminação por fungos variam de acordo com os fatores geográficos e sazonais, com as condições locais de crescimento do vegetal e ainda com as práticas de colheita e estocagem utilizadas. *A. flavus* e *A. parasiticus* são saprófitas naturais do solo e do ar, sendo que em condições ideais são capazes de contaminar os alimentos. A formação de micotoxinas é dependente de muitos fatores, como a umidade, a temperatura, a presença de oxigênio, o tempo para o crescimento fúngico, a constituição do substrato, as lesões à integridade dos grãos causadas por insetos ou dano mecânico ou térmico, a quantidade de inóculo fúngico, bem como a interação ou competição entre as linhagens fúngicas (MALLMANN; DILKIN; RAUBER, 2009). Essa gama de fatores evidencia o grau de dificuldade para o controle efetivo dos mesmos com a finalidade de prevenir a ocorrência de fungos toxigênicos nos alimentos, sobretudo no Brasil, onde as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus*, tendo em vista as elevadas temperatura e umidade na maior parte de sua extensão territorial.

O tipo do sistema de secagem e armazenagem utilizado também contribui para a dinâmica da contaminação fúngica. A temperatura da massa de grãos no interior dos silos, em muitas situações, ultrapassa os 18°C recomendados, permitindo o crescimento intenso de fungos, especialmente pela deficiente aeração da maioria das unidades armazenadoras, que, mesmo existindo, pelo excesso e má distribuição das impurezas, não são efetivas no controle dos pontos de calor na massa de grãos (MALLMANN; DILKIN;

RAUBER, 2009). Adicionalmente, as condições climáticas brasileiras no período de colheita dos cereais, em função do regime pluviométrico, não favorecem a secagem dos grãos nas principais regiões produtoras, especialmente do milho (MALLMANN; DILKIN; RAUBER, 2009).

A presença de fungos nas rações ou nos grãos pode representar importantes perdas em termos da qualidade nutricional, o que torna o processo de descontaminação oneroso e difícil. Os problemas decorrentes da contaminação fúngica podem ser reduzidos se adotadas medidas preventivas no tratamento dos grãos e das rações, entre as quais se destacam (GONZALES; STRINGHINI; CAFÉ, 2005):

a) redução no período de armazenamento;
b) manutenção dos teores de umidade, temperatura e taxas de oxigênio em níveis desfavoráveis para o desenvolvimento fúngico durante o armazenamento;
c) secagem rápida e eficiente do grão logo após a colheita, para atingir os níveis de umidade recomendados (para milho, até 15%, m/m);
d) controle de impurezas nos grãos e aeração da massa armazenada para manter a uniformidade de temperatura e umidade;
e) peletização da ração, que reduz a carga fúngica;
f) limpeza periódica dos equipamentos e silos da fábrica de ração e das granjas.

Assim, métodos que visam à detoxificação das matérias-primas ou da ração em si têm sido estudados visando à diminuição dos efeitos deletérios das micotoxinas à saúde e produção animal. Uma alternativa promissora, porém que necessita ainda de muitos estudos aplicados, é a inativação biológica por meio de microrganismos vivos, constituintes estruturais ou suas enzimas.

Inativação Biológica de Micotoxinas

Existe um grande interesse em se usar produtos biológicos para reduzir a biodisponibilidade de micotoxinas. A melhor abordagem para a descontaminação deveria ser a degradação de micotoxinas por microrganismos, possibilitando a remoção das micotoxinas sob condições suaves, sem o uso de produtos químicos perigosos (como o etanol, acetona aquosa, isopropanol, hexano-metanol, metanol-água, acetonitrila-água, hexano-etanol-água e acetona-hexano-água) e sem perdas significativas no valor nutritivo e na palatabilidade de alimentos e rações descontaminadas (BATA; LÁSZTITY, 1999).

Utilização de Leveduras

Uma estratégia disponível para atenuar o efeito de alguns grupos de micotoxinas é usar a capacidade adsortiva dos complexos de carboidratos presentes na parede celular de leveduras (ROSSI et al., 2010). Stanley et al. (1995) relataram reestabelecimento do ganho de peso, peso de fígado, coração e proventrículo de frangos de corte submetidos à dieta contaminada com 5 ppm de aflatoxina e adicionadas de 1% de cultura viva de *Saccharomyces cerevisiae*. Aravind et al. (2003) avaliaram glucomanano esterificado, que é a substância encontrada na parede celular de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e sugeriram que a adição desta cultura à dieta é efetiva na contenção dos efeitos tóxicos de alimentação naturalmente contaminada com micotoxinas (178 ppb de aflatoxina B1; 8,4 ppb de ocratoxina; 54 ppb de zearalenona; 32 ppb de toxina T-2).

Recentemente, Pizzolitto et al. (2013) descreveram a eficácia da adição de cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CECT1891 à dieta contaminada com aflatoxina B1. Frangos jovens alimentados com ração contendo 1,2 ppm de AFB1 apresentaram efeito protetor positivo para o peso de fígado, histopatologia de fígado, parâmetros bioquímicos séricos, além de melhora no desempenho zootécnico, quando foram fornecidas $5x10^9$ células/L adicionadas à água de bebida.

Utilização de enzimas microbianas

Pesquisas recentes avaliaram enzimas produzidas por bactérias cuja função seria detoxificar alimen-

tos. Entre as descobertas, destaca-se a uma enzima exógena produzida por estirpe específica da bactéria *Myxococcus fulvus* (ANSM068). Essa enzima recebe a denominação de Enzima de Degradação de Aflatoxina da Mixobactéria (EDAM, do original em Inglês MADE), a qual foi capaz de degradar as aflatoxinas B1 (71-79%), G1 (13-68%) e M1 (63-82%). A produção em escala dessa enzima representa uma inovação importante na área de micotoxinas, tendo em vista seu potencial de aplicação em processos industriais de transformação de alimentos (ZHAO et al., 2010), incluindo a fabricação de rações.

Extratos livres de células de *Rhodococcus erythropolis* e de *Mycobacterium fluoranthenivorans* foram capazes de reduzir significativamente a concentração de AFB_1 em testes in vitro, possivelmente pela presença de enzimas degradadoras, indicando uma possível aplicação na indústria de alimentos devido às altas taxas de degradação e ampla faixa de temperatura de funcionamento (TENIOLA et al., 2005). Similarmente, Tejada-Castañeda et al. (2008) demonstraram a viabilidade da utilização de *Nocardia corynebacterioides* NRRL24037 para detoxificação de milho contaminado com aflatoxina, uma vez que o microrganismo não causou prejuízo ao desempenho das aves e reduziu parcialmente o nível de contaminação da ração.

MA et al. (2012) relataram que a bactéria *Bacillus subtilis* ANS060, isolada de intestino de peixes, possui uma forte habilidade em detoxificar aflatoxinas. Os autores observaram que a adição dessa estirpe na ração contaminada de poedeiras comerciais diminuiu os efeitos tóxicos das aflatoxinas no fígado e rins, além de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes e restaurar a síntese proteica hepática. Outra estirpe de *B. subtilis,* UTBSP1, encontrada em pistaches, também foi capaz de reduzir a concentração de AFB_1 em 85,66% e 95% em meio de cultura de caldo de carne e nas nozes, respectivamente (FARZANEH et al., 2012). O sobrenadante dos extratos da bactéria reduziu a concentração da toxina em 78,39%, indicando que a enzima responsável pela degradação é extracelular (FARZANEH et al., 2012). Embora os dados experimentais indiquem uma perspectiva para detoxificação enzimática de aflatoxinas, novos estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de degradação das aflatoxinas pelas enzimas, bem como estabelecer os parâmetros ideais para a ação enzimática com vistas à futura aplicação em alimentos.

Conclusão

As aflatoxinas causam efeitos adversos em frangos de corte e alterações nas matérias-primas utilizadas em rações, os quais resultam na diminuição do desempenho zootécnico de criações avícolas comerciais. Considerando a complexidade de fatores que contribuem para a contaminação dos cereais utilizados na alimentação animal, especialmente o milho, as atividades de controle devem envolver a aplicação de Boas Práticas Agrícolas direcionadas a todas as etapas produtivas, desde a colheita dos cereais até a produção e armazenagem das rações prontas. Os métodos químicos e físicos de descontaminação de alimentos contendo aflatoxinas apresentam importantes limitações que impedem seu uso regular pela indústria. Avanços recentes em técnicas biológicas têm demonstrado novas perspectivas para o uso de enzimas microbianas para redução da concentração de aflatoxinas em matérias-primas alimentares. Deve-se ressaltar, contudo, que a prevenção de micotoxicoses em criações avícolas requer ações integradas para a aplicação de técnicas tanto de prevenção quanto de descontaminação, visando combater estas enfermidades silenciosas que tantos prejuízos financeiros causam à cadeia produtiva de carne de frango.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Referências

ARAVIND, K. L.; PATIL, V. S.; DEVEGOWDA, G.; UMAKANTHA, B.; GANPULE, S. P. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 571-576, 2003.

ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KADER, M. M.; CHANG, S. B.; WICK, E. L.; WOGAN, G. N. Aflatoxins B1 e G1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 11, p. 1706-1707, 1963. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00894a050>. Acesso em: 6 ago. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1021/ja00894a050.

BAILEY, R. H.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; BUCKLEY, S. A.; ROTTINGHAUS, G. E. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 77, n. 11, p. 1623-1630, 1998. Disponível em: <http://ps.oxfordjournals.org/content/77/11/1623>. Acesso em: 13 jul. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1093/ps/77.11.1623.

BANKOLI, S. A.; ADEBANJO, A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of combating it. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 9, p. 254-263, 2003.

BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and fees by microorganisms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 223-228, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224499000503>. Acesso em: 5 jul. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00050-3.

DENLI, M.; BLANDOM, J. C.; GUYNOT, M. E.; SALADO, S.; PEREZ, J. F. Effects of a dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. **Poultry Science**, v. 88, n. 7, p. 1444-1451, 2009. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/26296904_Effects_of_dietary_AflaDetox_on_performance_serum_biochemistry_histopathological_changes_and_aflatoxin_residues_in_broilers_exposed_to_aflatoxin_B(1)>. Acesso em: 18 jul. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.3382/ps.2008-00341.

DOERR, J. A.; HUFF, W. E.; WABECK, C. J.; CHALOUPKA, G. W.; MAY, J. D.; MERKLEY, J. W. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 62, n. 10, p. 1971-1977, 1983.

FARZANEH, M.; SHI, Z-Q.; GHASSEMPOUR, A.; SEDAGHAT, N.; AHMADZADEH, M.; MIRABOLFATHY, M.; JAVAN-NIKKHAH, M. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBPS1 isolated from pistachio nuts of Iran. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 100-106, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511002477>. Acesso em: 19 jul. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.018.

GONZALES, E.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B. Antifúngicos. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura**: boas práticas no manejo de medicamentos. São Paulo: Roca, 2005. p. 175-187.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, p. 138-161, 2010.

LÁZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 1993. Curitiba: EMBRAPA, 1993. 140 p.

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

MA, Q. G.; GAO, X.; ZHOU, T.; ZHAO, L. H.; FAN, Y.; LI, X. Y.; LEI, Y. P.; JI, C.; ZHANG, J. Y. Protective effect of *Bacillus subtilis* ANS060 on egg quality, biochemical and histopathological changes in layers exposed to aflatoxin B1. **Poutry Science**, v. 91, n. 11, p. 2852-2857, 2012. Disponível em: <http://ps.oxfordjournals.org/content/91/11/2852>. Acesso em: 14 jul. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02474.

MARCIA, B. A.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20611998000400001&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 13 ago. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000400001.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; RAUBER, R. H. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 821-832.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022474X9400039V>. Acesso em: 5 ago. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0022-474X(94)00039-V.

OSWEILLER, G. D. Mycotoxins and livestock: what role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v. 85, p. 89-94, 1990.

PIER, A. C.; CYSENSKY, S. L. J.; RICHARD, J. L.Mycotoxins as a veterinary problem. In: RODRICKS, J. V.; HESSELTINE, C. W. L.; MEHLMAN, M. **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Pathox Publishers, 1973. p. 745-750.

PIZZOLITTO, R. P.; ARMANDO, M. R.; SALVANO, M. A.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* as an antiaflatoxicogenic agent in broiler feedstuffs. **Poultry Science**, v. 92, n. 6, p. 1655-2663, 2013. Disponível em: <http://ps.oxfordjournals.org/content/92/6/1655>. Acesso em: 3 ago. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02846.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 603 p.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. Comunicação Científica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 107-114, 2001.

ROSSI, P.; RUTZ, F.; LIMA, G. J. M. M.; NUNES, J. K.; ANCIUTI, M. A.; MORAES, P. V. D.; SILVA, J. G. C.; SILEVIRA, M. H. D.; MAIER, J. C. Efeito do absorvente a base de glucomanano esterificado no desempenho e caracterização visceral de frangos de corte. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 16, n. 1-4, p. 91-100, 2010.

SILVA, C. S.; COUTO, H. P.; FERREIRA, R. A.; FONSECA, J. B.; GOMES, A. V. C.; SOARES, R. T. R. N. Valores nutricionais de milhos de diferentes qualidades para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 883-889, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982008000500016>. Acesso em: 16 jul. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008000500016.

SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Impact of stored grains pests on seed deterioration and aflatoxin contamination in maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 28, n. 3, p. 211-219, 1992. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022474X9290043P>. Acesso em: 13 ago. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0022474X(92)90043-P.

SOUZA, A. V. C. **Composição química e valor nutritivo do milho com diferentes níveis de carunchamento para suínos**. 1999. 88 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-

MG, 1999. Disponível em: <http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/zootecnia/1999/149637f.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2013.

STANLEY, V. G.; OJO, R.; WOLDESENBET, S.; HUTCHINSON, D. H.; KUBENA, L. F. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 72, n. 10, p. 1867-1872, 1995.

STRINGHINI, J. H.; MOGYCA, N. S.; ANDRADE, M. A.; ORSINI, G. F.; CAFÉ, M. B.; BORGES, S. A. Efeito da qualidade do milho no desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 191-198, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982000000100026&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 13 jul. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000100026.

TEDESCO, D.; STEIDLER, S.; GALLETTI, S.; TAMENI, M.; SONZOGNI, O.; RAVAROTTO, L. Efficacy of silymarin-phospholipid in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 83, p. 1839-1843, 2004.

TEJADA-CASTAÑEDA, Z. I.; ÁVILA-GONZALEZ, E.; CASAUBON-HUGUENIN, M. T.; CERVANTES-OLIVARES, R. A.; VÁSQUEZ-PELÁEZ, C.; HERNÁNDEZ-BAUMGARTEN, E. M.; MORENO-MARTÍNEZ, E. Biodetoxification of aflatoxin-contamined chick feed. **Poultry Science**, v. 87, n. 8, p. 1569-1576, 2008. Disponível em: <http://ps.oxfordjournals.org/content/87/8/1569>. Acesso em: 17 ago. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.3382/ps.2007-00304.

TENIOLA, O. D.; ADDO, P. A.; BROST, I. M.; FÄRBER, P.; JANY, K.-D.; ALBERTS, J. F.; ZYL, W. H. VAN; STEYN, P. S.; HOZAPFEL, W. H. Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM44556. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 11-117, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160505003168>. Acesso em: 27 ago. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.004.

ZHAO, J.; SHIRLEY, R. B.; DIBNER, J. D.; URAIZU, E.; OFFICER, M.; KITCHELL, M.; VAZQUEZ-ANON, M.; KNIGHT, C. D. Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 89, n. 10, p. 2147-2156, 2010. Disponível em: <http://ps.oxfordjournals.org/content/89/10/2147>. Acesso em: 25 jul. 2013. doi: http://dx.doi.org/10.3382/ps.2009-00608.

Toxin Reviews

http://informahealthcare.com/txr
ISSN: 1556-9543 (print), 1556-9551 (electronic)

Toxin Rev, Early Online: 1–11
© 2014 Informa Healthcare USA, Inc.
DOI: 10.3109/15569543.2014.905604

informa healthcare

REVIEW ARTICLE

Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds

Mayra Carraro Di Gregorio[1], Diane Valganon de Neeff[1], Alessandra Vincenzi Jager[1], Carlos Humberto Corassin[1], Ágatha Cristina de Pinho Carão[2], Ricardo de Albuquerque[2], Antônio Carlos de Azevedo[3], and Carlos Augusto Fernandes Oliveira[1]

[1]*Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil,* [2]*Department of Nutrition and Animal Production, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil, and* [3]*Department of Soil Science, Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil*

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

Abstract

Mycotoxins are toxic metabolites produced by several fungi species, with the aflatoxins, fumonisins, zearalenone, trichothecenes and ochratoxin A being the most important found in feedstuffs. The economic impact caused by mycotoxins motivated the investigation of detoxification strategies to reduce its bioavailability by enterosorption. Although there are several types of adsorbents, the efficiency of the adsorption depends on the physical and chemical characteristics of both the adsorbent and the mycotoxin. This review describes the most important types of mineral adsorbents [aluminosilicates, HSCAS, bentonites (montmorillonites), zeolites, sepiolite, diatomite and activated carbons] used in feeds, especially for poultry and pigs, and their adsorption mechanisms.

Keywords

Aflatoxins, clays, detoxification, fumonisins, ochratoxin A, trichothecenes

History

Received 25 October 2013
Revised 20 February 2014
Accepted 27 February 2014
Published online 8 April 2014

Introduction

Mycotoxins are toxic, non-immunogenic compounds of low molecular weight that are produced as secondary metabolites by several fungi species. Mycotoxins can be formed during growth, harvesting, drying or storage of fruits, seeds, grains and by-products that are widely used in food and feed preparations. The incidence of contamination and concentration of mycotoxins depends on the temperature and humidity, which are also the main factors involved in the development of fungi. However, other factors may also contribute to the fungal development, such as water activity, pH, aeration and substrate temperature, storage period, inoculum concentration, physical condition of grains or seeds, microbial interactions, and insect infestations (Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

Diseases caused by mycotoxins are called mycotoxicoses, which effects are highly dependent on the dose, period of intoxication, species, breed, sex and age. Depending on the type of toxin, lesions predominantly affect a given organ or tissue, such as liver, kidneys, epithelial tissue and central nervous system (Council for Agricultural Science and Technology, 2003; Jaynes et al., 2007). Among more than 300 known mycotoxins, aflatoxins, ochratoxins, trichothecenes, zearalenone and fumonisins are the most important because of their frequent occurrence in feedstuffs and the high toxigenic potential demonstrated in domestic animals (Chaytor et al., 2011). Importantly, mycotoxins coexist along with other compounds in food and feed that might interact with each other, interfering with the toxicity. This interaction is favored by heat, and these conjugates can be found in finished food, either in soluble form or incorporated into macromolecules (Tapia-Salazar et al., 2010).

The economic impact of mycotoxins includes mortality of domestic animals, increased costs due to veterinary care and decreased production efficiency, especially in poultry and swine operations. Consequently, considerable scientific efforts have been expended to investigate and develop strategies to prevent the formation of mycotoxins, as well as their elimination, inactivation or reduction of their bioavailability in feeds. Good agricultural practices (GMP) at pre- and post-harvest levels are considered the best ways to control fungal contamination and the production of mycotoxins. However, GMP is not enough to completely prevent mycotoxin formation in field and storage conditions. Thus, detoxification processes including biological, chemical and physical methods are often necessary to remove, destroy or reduce toxic effects, without producing or leaving toxic residues or carcinogens in the food and feed material (Bovo et al., 2012). Detoxification methods should also preserve nutritional value and palatability of the foods, not significantly modify physical properties of the food, and be affordable and easy to use. Biological methods include the action of microorganisms, such as yeasts, filamentous fungi, bacteria and algae over mycotoxins by means of competition for nutrients and space, interactions, and antibiosis (Bovo et al., 2012). Chemical methods consist of structural

Address for correspondence: Carlos Augusto Fernandes Oliveira, Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga, SP, Brazil. Tel: +55 19 3565 4173. E-mail: carlosaf@usp.br

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

degradation of mycotoxins by acids, bases, aldehydes, oxidizing agents and various gases. Physical methods of detoxification involve heat inactivation, irradiation (ultraviolet light or gamma radiation), solvent extraction and adsorption with various types of mineral substances (primarily clays) (Council for Agricultural Science and Technology, 2003). Clays can also be incorporated in animal feed with other purposes (e.g. anti-caking agent), and are considered the best alternatives to reduce mycotoxin bioavailability in animal feeds by enterosorption.

Although several types of adsorbents are known, their efficacy is dependent not only on their physical and chemical characteristics, but also on the mycotoxin being investigated (Jaynes et al., 2007). Kolosova & Stroka (2011) published an extensive review about the most important types of mycotoxin binders, their mechanism of action and application as part of a general strategy to counteract mycotoxins. The scientific interest on these issues has markedly increased in the last years, leading to new published data on the efficacy of adsorbents for mycotoxins. Thus, the objective of this article is to review recent data on *in vitro* and *in vivo* adsorption studies with mineral adsorbents, especially for poultry and swine, and to describe adsorption mechanisms and possible interactions among them.

Toxicological characteristics of the main mycotoxins

Aflatoxins (AFL) are relatively hydrophilic molecules produced by fungi of the genus *Aspergillus*, mainly *A. flavus* and *A. parasiticus*. The main aflatoxins are B_1, B_2, G_1 and G_2, being aflatoxin B_1 (AFB_1) the most toxic compound (Chaytor et al., 2011; European Food Safety Authority, 2009). After ingestion, the aflatoxins are efficiently absorbed by passive diffusion at gastrointestinal tract, reaching the liver where they may be metabolized into different compounds. The main metabolite, AFB_1-8,9-epoxide, results from AFB_1 epoxidation by cytochrome P450, which interacts with DNA and proteins and originates the toxic effects of aflatoxins including carcinogenicity (Chaytor et al., 2011; Corcuera et al., 2012). Besides being hepatocarcinogenic and teratogenic, AFB_1 also causes direct or indirect effects, such as immunosuppression, reduced growth rate, decreased production of milk and eggs, lower feed efficiency, impaired reproduction, and anemia in a broad range of species (Rawal et al., 2010).

Fumonisins are a group of highly polar and hydrosoluble mycotoxins produced mainly by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. Fumonisins are associated with equine leukoencephalomalacia, porcine pulmonary edema and esophageal cancer in humans, although the mechanism of toxicity is not completely understood. Studies have shown that fumonisin inhibits ceramide synthesis, so that their effect is related to the interference with the synthesis of sphingolipids in various organs. Several fumonisin analogs have been identified, being fumonisin B_1 (FB_1) the most abundant and toxic compound found as natural contaminant in cereals (Chaytor et al., 2011).

Ochratoxins are produced by a series of molds of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. The largest amounts of ochratoxin are synthesized by *A. ochraceus*. The ochratoxin group consists of metabolites, but only ochratoxin A (OTA) is found as a worldwide contaminant in most grains used in animal feed. OTA is a polyaromatic molecule, more hydrophobic than zearalenone (ZEA) when ionized, and it is a potent nephrotoxin (European Food Safety Authority, 2009; Markov et al., 2013). It is considered immunosuppressive, hepatotoxic, genotoxic and nephrotoxic in all mammalian species. OTA has been related with the spontaneous avian and porcine nephropathy, and with the Balkan endemic nephropathy in humans. However, its mechanism of genotoxicity remains controversial (Corcuera et al., 2012; Denli et al., 2008).

Several fungi species in the genus *Fusarium*, mainly *F. graminearum* are responsible for the production of zearalenone in corn, sorghum, wheat and barley. Most of these fungi are also producers of other toxins, such as those belonging to the trichothecene group, which complicates the elucidation of specific effects of zearalenone in animals. ZEA is much more hydrophobic than AFL, considered to be icoestrogenic due to its ability to interfere with steroid hormones, leading to alterations in reproductive parameters and vulvovaginitis. Although ZEA mainly affects the reproductive system, the protein, energy and mineral metabolism are also altered (European Food Safety Authority, 2009; Hauschild et al., 2007; Wang et al., 2012).

Trichothecenes are a group of over 100 mycotoxins characterized by an epoxide at the $C_{12,13}$ positions, produced by several fungal genera. However, most of them have been isolated from *Fusarium* genus. The epoxide $C_{12,13}$ is responsible for the toxic activity of trichothecenes, and removal of this epoxide group leads to a significant loss of toxicity. At the cellular level, the main toxic effect appears to be a primary inhibition of protein synthesis. The most important type A trichothecenes are T-2, HT-2 and diacetoxyscirpenol (DAS) toxins, and among type B, deoxynivalenol (DON or vomitoxin). Trichothecenes range from somewhat hydrophilic (DON) to moderately hydrophobic (HT-2 and T-2). Their great structural diversity results in a wide variety of effects, affecting organs of the gastrointestinal, hematopoietic, nervous, immune, cardiac and hepatobiliary systems (European Food Safety Authority, 2009). Poultry are more sensitive to trichothecenes than ruminants, while pigs seem to be the most sensitive farm animals. Effects occurring at low trichothecenes levels were reduced feed intake and weight gain, as well as impairment of the immune system. When taken in large doses, DON cause nausea, vomiting and diarrhea; whereas if ingested in small doses, it may cause food refusal, with consequent weight loss (Eriksen & Pettersson, 2004). The absorption of DON occurred in the jejunal compartment, being detected in pig blood 15–30 min after intragastric or oral administration of the toxins (Avantaggiato et al., 2004). The DON molecule transport reached a steady-state of absorption within 30 min and has an elimination half-life of 3.9 h (Pestka & Smolinski, 2005; Yiannikouris et al., 2013).

General characteristics of adsorbents for mycotoxins

In the adsorption process, the substances are drawn from the interfacial area of the liquid phase due to the existence of interactions with the adsorption surface. Adsorbing agents

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

are substances of high molecular weight that, upon reaching the gastrointestinal system (aqueous medium), are capable of binding mycotoxins, preventing their absorption, and allowing fecal excretion of this adsorbent–toxin complex (Tapia-Salazar et al., 2010).

Adsorbents can be classified as mineral adsorbents, organic adsorbents or synthetic polymers. Different types of intermolecular interactions can be involved in the same adsorption process. Physical adsorption or physisorption is an almost always reversible phenomenon. The forces in physical adsorption such as *Van der Waals* interactions (always present), and electrostatic interactions of attraction or repulsion, including polarization, dipole and quadrupole interactions, are significant only in the case of adsorbents that have an ionic structure, such as zeolites (Tapia-Salazar et al., 2010). A convenient and commonly used concept such as ''hydrophobic binding'' actually designates a complex process, involving more than one type of bond, but in which lipophilic/hydrophilic balance is the most relevant feature and allows for qualitative and quantitative prediction. Likewise, ''electrostatic binding'' designates a process in which the electrostatic attraction between an ionized molecule and an adsorbing agent is a dominant feature. Either electrostatic or hydrophobic bonds can be affected by pH: if the molecule and the adsorbing agent are both anionic above a certain pH, electrostatic repulsion will prevent the hydrophobic binding that would be possible at a lower pH (European Food Safety Authority, 2009). In chemical adsorption or chemisorption, there is an effective exchange of electrons between the adsorbent and adsorbate, forming a single layer on a solid surface in an irreversible way, involving a considerable amount of energy (Tapia-Salazar et al., 2010).

As the adsorption is essentially a surface phenomenon, its effectiveness is influenced by several physical characteristics such as size and distribution of the porous, total charge and its distribution. On the other hand, properties related to mycotoxins such as polarity, shape, size, low surface area and solubility, as well as uncoupling and charge distribution (in the case of ionized compounds) also influence the adsorption process (Huwig et al., 2001).

The European Regulation EC No. 1831/2003 (European Parliament of the Council, 2003) on additives for use in animal nutrition has been amended by the Commission Regulation (EC) No. 386/2009 of 12 May 2009 (European Commission, 2009), and in the category of technological feed additives a new functional group was defined as ''substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: substances that can suppress or reduce the absorption, promote the excretion of mycotoxins or modify their mode of action''. In particular, that regulation lays down that any person or company seeking authorization for a feed additive or for a new use of a feed additive shall submit an application to the EC. After, the EC forwards the application to the European Food Safety Authority (EFSA) which receives from the applicant the technical dossier in support of this application and undertakes an assessment of the dossier.

The most important criteria for the evaluation of adsorbents include the stability of the sorbent–toxin bond and their effectiveness over a broad pH range, since the product is expected to work throughout the gastro-intestinal tract (Binder, 2007). In this context, the EFSA has stated that *in vitro* adsorption tests are not enough to prove the efficacy of mycotoxin-detoxifying agents, being also necessary to perform *in vivo* trials (European Food Safety Authority, 2010). The results of *in vitro* studies conducted in the last 5 years are presented in Table 1. In recent years, *in vitro* studies using cultured cells or intestinal fragments on the adsorption of mycotoxins by different adsorbents have been developed (Table 2). In *in vivo* studies, factors such as pH, food composition, and presence of specific ions or molecules may affect the binding of the mycotoxin to the adsorbents (Magnoli et al., 2013). Also, it is important to consider that there are variations between species, especially in poultry and swine, as shown in Tables 3 and 4.

Adsorption and prevention of mycotoxicosis action by adsorbents

Aluminosilicates

Silicates constitute the most abundant group of rock-forming minerals, in which the presence of silicon (Si) and oxygen (O) is mandatory and occurs in combination with other elements. The structure of all silicates consists of a fundamental unit made up of four oxygen atoms coordinated with a silicon ion, resulting in a tetrahedral configuration (Dakovic et al., 2005; Tapia-Salazar et al., 2010). These tetrahedra are linked in different ways to form groups, such as nesosilicates (single tetrahedron), sorosilicates (double), cyclosilicates (ring), inosilicates (single and double chain), phyllosilicates (sheets), tectosilicates (three-dimensional structures). Within this group, there are two major subclasses: phyllosilicates and tectosilicates. Phyllosilicates include bentonites, montmorillonites, smectites, among others. Tectosilicates include zeolites (Rossetto et al., 2009; Tapia-Salazar et al., 2010). In phyllosilicates, three of the four oxygen atoms can be shared with other silicon atoms, making up the components of other tetrahedrons, and thus forming a tetrahedral sheet (Luna & Schuchardt, 1999).

Clay minerals are composed of aluminum, iron and magnesium hydrated silicates, which usually contain alkaline and alkaline earth ions. Clays are finely granulated earthy substances (diameter under 2 μm) which, when moistened, present a certain plasticity (Tapia-Salazar et al., 2010). The basic structural unit of silicate clay minerals consists of the combination of silica tetrahedral and aluminum octahedral sheets, both with oxygen and hydroxyl groups. Thus, it is possible that oxygen atoms of the tetrahedral sheet are shared with the octahedral sheet (group clay 1:1 – two-layer clays), or even between one octahedral sheet with a tetrahedral sheet on both sides, originating three-layer clays (group 2:1) (Dakovic et al., 2008; Luna & Schuchardt, 1999). These conditions allow the determination of the overall characteristics of clays, such as charge, polarity, expandability, source, formation, structure, cation exchange capacity, pH, particle size, surface area, rheology, ability to swell, adsorption capacity, among others (Luna & Schuchardt, 1999; Tapia-Salazar et al., 2010).

The electronegativity of clays is mainly related to their isomorphous substitution ability, that is, the capacity of the tetrahedron to replace Si^{4+} by Al^{3+}, and of the octahedron to

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

Table 1. *In vitro* studies (isotherm studies, gastro-intestinal tract model) on the adsorption of mycotoxins by different adsorbents.

Adsorbent	Mycotoxin (concentration)	Adsorbent (mg)	Diluent	pH	Adsorption capacity (%)	References
Activated charcoal	DON (1–12 μM)	1.0	0.1 M HCl	3.0	97.6–99.2	Cavret et al. (2010)
			0.05 M PBS	7.0	95.1–99.9	
	ZEA (0.1, 0.5, 1, 10, 20, 40 and 50 μg/ml)	2.0	Citrate buffer Acetate buffer	3.0	>99.5	Yiannikouris et al. (2013)
				5.0		
	AFB_1 (0.821 μg/ml)	82.0	Deionized water	7.0	>99	Gallo & Masoero (2010)
			Buffer solution	2.0 and 7.0	>99	
Bentonite	AFL (0.2 μg/ml)	50.0	0.1 M K_2HPO_4	3.0	96.9	Bočarov-Stančić et al. (2011)
				6.9		
	OTA (2 μg/ml)	500.0		3.0	0	
				6.9		
	ZEA (0.8 μg/ml)	200.0		3.0	37	
				6.9	25	
	DON (2 μg/ml)	500.0		3.0	50	
				6.9	0	
	DON (1 and 2 μM)	1.0	0.05 M PBS	7.0	<5	Cavret et al. (2010)
	AFB_1 (0.821 μg/ml)	82.0	Deionized water	7.0	48–99	Gallo & Masoero (2010)
			Buffer solution	2.0 and 7.0	97–99	
Bentonite (organic[a])	OTA (0.1 μg/ml) and ZEA (0.5 μg/ml)	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 or 5.0	Buffer solution	7.4, 3.0 and 8.4	75.9–99.7% 87.1–99.7%	Santos et al. (2011)
Diatomite	AFL (0.2 μg/ml)	50.0	0.1 M K_2HPO_4	3.0	95	Bočarov-Stančić et al. (2011)
				6.9	95	
	OTA (2 μg/ml)	500.0		3.0	67	
				6.9	0	
	ZEA (0.8 μg/ml)	200.0		3.0	25	
				6.9		
	DON (2 μg/ml)	500.0		3.0	25	
				6.9	0	
	ZEA (0.0083 μg/ml)	100.0	Synthetic gastric fluid	1.0	53	Sprynskyy et al. (2012)
			Synthetic body fluid	7.4	42	
HSCAS	AFB_1 (20 μg/ml)	75.0	PBS	6.0 and 8.0	100 and 98, respectively	Li et al. (2010)
	AFB_1 (2 μg/ml)	100.0	0.1 M PBS	3.0	1.0	Neeff et al. (2013)
		10.0			91.1	
		1.0			81.8	
		0.5			75.4	
		0.25			40.1	
		0.05			8.8	
Montmorillonite	DON (1 and 2 μM)	1.0	0.05 M PBS	7.0	<5	Cavret et al. (2010)
	AFB_1 (4 μg/ml)	5.0, 10.0, 100.0	0.1 M PBS	3 and 7	96–100	Dakovic et al. (2012)
Sepiolite	DON (1 and 2 μM)	1.0	0.05 M PBS	7.0	<25	Cavret et al. (2010)
Zeolite	AFL (0.2 μg/ml)	50.0	0.1 M K_2HPO_4	3.0	95	Bočarov-Stančić et al. (2011)
				6.9		
	OTA (2 μg/ml)	500.0		3.0	0	
				6.9		
	ZEA (0.8 μg/ml)	200.0		3.0	12	
				6.9		
	DON (2 μg/ml)	500.0		3.0	50	
				6.9	0	

(*continued*)

DOI: 10.3109/15569543.2014.905604

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

Adsorbent	Mycotoxin (concentration)	Adsorbent (mg)	Diluent	pH	Adsorption capacity (%)	References
	AFB_1 (0.821 μg/ml)	82.0	Deionized water	7.0	80%	Gallo & Masoero (2010)
			Buffer solution	2.0 and 7.0	<10%	
Zeolite (organic[b])	OTA (2 μg/ml)	100.0	Mes-Krebs solution	6	80.86%	Trailović et al. (2013)
Zeolite (organic[c])	FB_1 (2 μg/ml)	4.0, 10.0, 20.0, 40.0 or 100.0	0.1 M PBS	3.0	95–98%	Dakovic et al. (2010)
				7.0	82–95%	
				9.0	83–97%	

[a]Commercially available organic activated bentonite (Poortershaven Industrial Minerals BV, Rotterdam, The Netherlands).
[b]Minazel-plus®.
[c]Modified with octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride.
PBS, phosphate buffer solution; DON, deoxynivalenol; ZEA, zearalenone; AFL, aflatoxins; OTA, ochratoxin A; AFB_1, aflatoxin B_1; HSCAS, hydrated sodium calcium aluminosilicate.

replace its Al^{3+} by divalent cations (Mg^{2+}, Fe^{2+}), creating a deficiency in positive charges, and making the particles electronegative, resulting in the cation exchange capacity of clay minerals. Other factors that also interfere with clay electronegativity are: the possibility of octahedral hydroxyl dissociation, originating negative charges; and the existence of uncompensated charges at the particle edges as a result of interrupted connections (Rossetto et al., 2009). The use of aluminosilicate is more frequent in AFL adsorption, although they have been tested with other mycotoxins with little success because their hydrophilic surface is less effective in the adsorption of non-polar mycotoxins (Hauschild et al., 2007). The beta-dicarbonyl system of AFL enables the formation of coordination bonds with metallic cations present in clays. Doll et al. (2004) reported that the *in vitro* efficiency of ZEA detoxification by aluminosilicate is greater when incubated in neutral medium than in acid medium.

The incorporation of long-chain organic acids on the surface of the aluminosilicate (organoaluminosilicate) results in increased hydrophobicity of the clay surface, which raises the affinity for non-polar molecules and reducing the adsorption of hydrophilic molecules (Dakovic et al., 2005). Organoaluminosilicates are produced by exchange of aluminosilicate cations by organocations (usually alkylammonium quaternary ions). This modification enables the aluminosilicate to sequester low polarity mycotoxins, such as ZEA, OTA and T-2 (Hauschild et al., 2007; Tapia-Salazar et al., 2010). For aflatoxins, a low binding capacity of two organoaluminosilicate was observed by Marroquin-Cardona et al. (2009), which was attributed to the small amount of clay-sized particles in the products. The authors also speculated that the exchanged organic cations used for production of those compounds are also bound in the interlayer of the parent clays and therefore compete for the active binding sites available for AFB_1. Organoaluminosilicates can also form biliary acid complexes in the small intestine at doses >0.4% in the diet, interfering with fat digestibility and, therefore, with energy intake (Doll et al., 2005). Baglieri et al. (2013) reported that there is a higher adsorption of FB_1 by the modified clays than montmorillonite. Most adsorption of the modified clays took place within the first hour (88.3–84.7%) and no significant increase was observed at 24 h (85.9–95.8%).

Hydrated sodium calcium aluminosilicate

Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS) is one of the most effective adsorbents for aflatoxins, and is also commonly used as an anti-caking additive in animal feed. This compound is considered a type of Ca-montmorillonite that can be obtained naturally or by means of heat treatment of calcium clay. It has, in its structure, water molecules bound to a metal center or crystallized with a complex metal. The deficiency in positive charges characteristic of aluminosilicates creates a potential to adsorb positively charged compounds (Huwig et al., 2001; Ramos & Hernandez, 1997; Tapia-Salazar et al., 2010). The hypothesized mechanism of AFL sorption by HSCAS is based on an electron donor acceptor (EDA) process. The adsorption involves sharing electrons of metallic cations from the negative surface of the

Table 2. *In vitro* studies using cultured cells or intestinal fragments on the adsorption of mycotoxins by different adsorbents.

Adsorbent	Mycotoxin (concentration)	Adsorbent (concentration)	Cell type or tissue	Adsorption capacity (%)	References
Activated charcoal	DON (0.5 and 1.0 μg/ml)	1.0 mg/ml	IPEC–J2	>99	Devreese et al. (2013)
HSCAS	ZEA (0.03 μg/ml)	3 mg/ml	Distal ileum	11	Yiannikouris et al. (2013)
Zeolite (organic[a])	OTA (2.0 μg/ml)	200 mg/ml	Duodenal segments	45.7	Trailović et al. (2013)

[a]Minazel-plus®.
DON, deoxynivalenol; OTA, ochratoxin A; ZEA, zearalenone.

Table 3. *In vivo* studies on the adsorption of mycotoxins by different adsorbents in poultry.

Adsorbent				
Type	Level (kg/100 kg)	Mycotoxin (concentration)	Effects observed	References
Bentonite	0.3	AFB_1 (100 μg/kg)	Addition of Na-B decreased the histological lesions in liver.	Magnoli et al. (2011a)
	0.5, 0.75, 1.0	AFB_1 (5 mg/kg)	Na-B improved significantly body weight gain, feed consumption, efficiency of feed utilization, relative weights of liver and kidney. No effect was observed on the relative weights of gizzard and pancreas, serum concentration of uric acid and albumin, relative thymus and bursal weights, activity of serum gamma glutamyl transferase and alanine amino transferase.	Manafi (2012)
	0.3	AFB_1 (50 μg/kg)	No differences were observed among treatments with respect to broiler performance, biochemical parameters or relative liver weights. The protective effect of Na-B against aflatoxicosis was demonstrated by the normal appearance of liver in the group receiving the bentonite. The authors concluded that at low levels of aflatoxin in the feed, a non-selective adsorption occurred with this particular Na-B.	Magnoli et al. (2011b)
	1.5, 3.0	AFL (250 μg/kg)	Na-B improved the average feed consumption and body weight gain of broilers.	Mogadam & Azizpour (2011)
	0.5, 1.0	FB_1 (59 mg/kg)	Improvement of body weight, prevention of macroscopic lesions in liver and decrease in the AST activity.	Vizcarra-Olvera et al. (2012)
HSCAS	0.2	AFB_1 (225.3 μg/kg) OTA (34.2 μg/kg) T-2 (160.25 μg/kg)	Increased feed intake, apparent retention of phosphorus and improved lightness values of breast and thigh muscle.	Liu et al. (2011)
	0.1, 0.2	AFB_1 (1.0 and 2.0 mg/kg)	Protective effect against aflatoxin lesions in the liver and improvement in growth performance.	Zhao et al. (2010)
	0.2	AFB_1 (0.2 mg/kg)	HSCAS improved the growth performance, feed intake and decreased the liver weight.	Attia et al. (2013)
	0.2	AFB_1 (450.6 μg/kg), OTA (68.4 μg/kg) and T-2 (320.5 μg/kg)	Naturally contaminated diet was used. HSCAS alleviated the changes in RBC, WBC, Hgb and AST, and prevented the increase of myeloperoxidase activity.	Che et al. (2011)
	0.5	AFB_1 (2.5 mg/kg)	Concentrations of aflatoxin residues decreased in livers and kidneys of broilers fed AFB_1 plus HSCAS. However, HSCAS used did not prevent injuries in the liver associated with aflatoxicosis.	Neeff et al. (2013)
Montmorillonite	0.1	AFB_1 (25, 50 and 100 μg/kg)	The use of Ca-montmorillonite improved the relative weights of the small intestine, spleen and thymus, as well as the villus height, villus/crypt ratio of the duodenum and jejunum, and the serum IgG and IgM concentrations.	Wan et al. (2013)
Zeolite	0.5, 1.0	FB_1 (59 mg/kg)	Increased body weight, prevention of macroscopic lesions in the liver and decreased AST activity.	Vizcarra-Olvera et al. (2012)
Zeolite (organic[a])	0.2	OTA (2 mg/kg)	Significantly reduced the concentration of toxin in liver and pectoral muscle.	Trailović et al. (2013)

[a]Minazel-plus®.
AFL, aflatoxins; OTA, ochratoxin A; AFB_1, aflatoxin B_1; FB_1, fumonisin B_1; HSCAS, hydrated sodium calcium aluminosilicate; Na-B, sodium bentonite; RBC, red blood cells; WBC, white blood cells; Hgb, haemoglobin; AST, Aspartate amino transferase.

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

Table 4. *In vivo* studies on the adsorption of mycotoxins by different adsorbents in pigs.

Adsorbent				
Type	Level (kg/100 kg)	Mycotoxin (level)	Effects observed	References
Montmorillonite	0.125, 0.25, 0.5, 1	ZEA (1.3 mg/kg)	Improvement of serum levels of AST, ALT, ALP, GGT, CK, CKI, total proteins, globulin, cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, urea, creatinine, platelets and haemoglobin in blood. Otherwise showed light granular degeneration in renal tubular epithelial cell. Overall, the rank order of clay for protection from ZEA was 0.5 > 1.0 > 0.25 > 0.125%.	Jiang et al. (2010)
	0.5	AFB_1 (500 μg/kg)	The adsorbent was effective in preventing the negative effects of dietary aflatoxin in young pigs as measured by growth and serum chemistry parameters.	Harper et al. (2010)
	0.05, 0.1, 0.2	ZEA (0.2, 0.4, 0.8 mg/kg)	The addition of adsorbent improved feed efficiency and nitrogen digestibility in the all growth phases. Also, it decreased the average vulva width and area, and reversed the increase of serum malondialdehyde concentration and enzymes activities (superoxide dismutase and aspartate amino transferase). At 0.2%, increased ADG.	Wang et al. (2012)
Modified montmorillonite[a]	0.1, 0.2, 0.4	ZEA (1.05 mg/kg)	Increased concentrations of triglycerides and HDL in serum, activity of total superoxide dismutase and glutathione peroxidase in serum and liver. It reduced all tested serum enzymes and lowered elevated concentrations of urea, and creatinine in serum, and malondialdehyde in serum and liver caused by dietary ZEA.	Jiang et al. (2012b)
	0.1, 0.2, 0.4	ZEA (1 mg/kg)	Ameliorated the adverse effects of ZEA on the relative weight of genital organs in piglets, proliferative changes of the corpus uteri tissues in females, and serum hormones of progesterone and testosterone in males and females, and estradiol in females.	Jiang et al. (2012a)

[a]Calibrin®-Z.
AST, aspartate amino transferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, γ-glutamyltransferase; CK, creatine kinase; CKI, creatine kinase isoenzyme; ZEA: zearalenone; AFB_1: aflatoxin B_1; ADG: average daily gain; HDL: high-density lipoprotein.

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

clay with the carbons comprising the β-carbonyl system in AFL (partially positive) forming a complex (Phillips, 1999). Evidence suggests that AFL may react at multiple sites on HSCAS particles, especially the interlayer region, but also at edges and basal surfaces (Jaynes et al., 2007). Thus, the optimal orientation of AFB_1 is probably planar on interlayer surfaces of HSCAS. Other mechanisms of AFB_1 sorption by HSCAS surfaces may involve the chelation or interaction of AFB_1 with interlayer cations (especially Ca) or various edge-site metals (Phillips et al., 2008).

Bentonites (montmorillonites)

Although the term bentonite originally referred to sedimentary rocks formed by hydrated aluminum silicates created from the weathering of volcanic ash *in situ* (Ramos et al., 1996), it currently designates clay with a layered crystalline microstructure of variable composition. Bentonites are frequently referred as smectites because it is the dominant clay mineral. Smectite is a family which includes mainly montmorillonite, although hectorite, saponite, beidellite and nontronite may also be present. The adsorption effectiveness of bentonite basically depends on its montmorillonite content and the interchangeable cations (Kolosova & Stroka, 2011; Marroquin-Cardona et al., 2011). Montmorillonite clays have the smallest particles of a clay mineral, and belong to the group of 2:1 phyllosilicates building a three-layer sheet. In bentonites, the gaps called interlayer spaces have ~80% of the exchangeable cations compensating for the negative charges that occurs in the reticulated space (Paiva et al., 2008; Rossetto et al., 2009). Associated with this structure, the large surface area and high cation exchange capacity of the smectite group make them capable of adsorbing organic substances by the penetration of both cations and polar molecules (Bočarov-Stančić et al., 2011; Luz & Lins, 2008). The external basal surfaces, edges and the interlayer space of smectites are possible adsorption sites for aflatoxin. Desheng et al. (2005) suggested that AFB_1 sorbed onto the edge of montmorillonite by a double hydrogen bond, and AFB_1 molecules did not penetrate into the interlayer area of montmorillonite. Previous studies have indicated that aflatoxins may react at multiple sites, especially the interlayer region, but also at edges and basal surfaces (Deng et al., 2010; Phillips, 1999; Phillips et al., 2002). Under dry conditions, the mainly bonding between adsorbed AFB_1 and smectite was ion–dipole interactions and coordination among exchangeable cations and carbonyl groups. Under humid conditions, H-bonding between carbonyl groups and exchangeable-cation hydration-shell water was the dominant bonding force (Deng et al., 2010). Those evidences indicate that the binding of AFB_1 on interlayer surfaces of smectites (e.g. Ca-montmorillonite) involves chemical bonding mechanisms

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

(Kannewischer et al., 2006; Marroquin-Cardona et al., 2009). Due to these characteristics, most BEN have a more pronounced ability to adsorb aflatoxins (90–95%) than zearalenone and ochratoxin (Huwig et al., 2001). It should be noted that, in mostly *in vitro* studies, the phosphate buffer solution is used as system solvent for the assays. At pH 6, there are mainly hydrogen phosphate and dihydrogen phosphate ions. Phosphate ions strongly interact with montmorillonites, yielding an increase in the edge charge density. Hence the presence of these ions could decrease the montmorillonite aggregation, making it more accessible for AFB_1 adsorption at the interlayer surface (Magnoli et al., 2013). A bentonite/dioctahedral montmorillonite (Mycofix®, Biomin, Herzogenburg, Austria) has become the first-ever product authorized by the EU as adsorbent with proven mycotoxin counteracting properties that fulfills the strict requirements on aflatoxin-binding capability according to the European Union Reference Laboratory (EURL).

Zeolites

Zeolites are tectosilicates that were once considered only the three-dimensional structures formed by $(SiO4)^{4-}$ and $(AlO4)^{4-}$ tetrahedral. Currently, zeolites are considered to be any structure containing a crystalline substance with a framework of linked tetrahedral, each consisting of four oxygen atoms surrounding a cation (Luz & Lins, 2008). This framework has large pores in the form of channels and "cages" that may be occupied by water molecules, and large extra-framework cations of the metal alkaline and/or earth alkaline group, which are generally exchangeable without changes in their crystalline structure (Camblor et al., 2001).

The zeolite channel systems are formed by different combinations of linked tetrahedral rings which are, therefore, called "molecular sieves". The wider the narrowest part of the channels, the larger the cations that can be accepted in the structure. Thus, the transfer of material between intracrystalline spaces is allowed, but is limited by the diameter of the pore (Camblor et al., 2001). This type of microporous structure gives zeolites a large internal surface in relation to the external one which, associated with its elevated cation exchange capacity (making it a hydrophilic compound), is capable of efficiently adsorbing polar molecules. However, its performance is practically zero with non-polar molecules (Luz & Lins, 2008). Tomasevic-Canovic et al. (2003) postulated that the adsorption mechanism of zeolites is related to interactions of AFB_1 with Ca^{2+} at the zeolitic surface. Dakovic et al. (2010) showed that the better sorption of FB_1 by zeolite occurred in pH 3.0, indicating the existence of electrostatic interactions between the anionic FB_1 and the positively charged surface in acidic conditions. Among the ~40 known natural zeolites, only a few are widely used, such as mordenite, clinoptilolite, heulandite, phillipsite, erionite and chabazite.

Sepiolite

Sepiolite is a complex magnesium silicate belonging to the group of hormites, whose structure is an open channel, forming elongated crystals also commonly used as a pellet binder. It may have partial isomorphic substitution in the octahedral sheet of the 2:1 layer clay minerals, aluminum by magnesium and/or iron, characterized as a crystalline lath-shaped structure. These excess negative charges associated with the high-specific surface make sepiolite an adequate sorbent for some polar molecules or positive ions (Murray, 2000; Murray & Zhou, 2006; Weaver et al., 2013). An important difference between sepiolite and montmorillonite is the large amount of external silanol groups in sepiolite that might explain the differences in AFB_1 adsorption (Jaynes et al., 2007).

There is limited evidence that sepiolite is potentially carcinogenic, although few studies have been reported regarding the toxicological effects of sepiolite exposures. Sepiolites with higher crystallinity and longer fibres have been shown to have a high intrinsic biological activity in animals (European Food Safety Authority, 2013; Galan, 1996). A 3-month study with males rats exposed to sepiolite (5 mg/kg) did not produce any toxic effect or necrosis (Warheit et al., 2010). In 1997, the IARC reviewed the possible carcinogenicity of sepiolite by other routes of administration and concluded that the compound cannot be classified as a carcinogen to humans (European Food Safety Authority, 2013).

Usually, sepiolite is associated with bentonite and both have similar properties, such as medium to high surface area, and significant sorption capacity. However, cation exchange capacity of sepiolite is much lower than that of smectite (Luz & Lins, 2008). Jaynes et al. (2007) reported that, *in vitro*, in the presence of corn flour, sepiolite was more effective than HSCAS and montmorillonite to bind to AFB_1. Eser et al. (2012) concluded that 1% sepiolite in the diets of broiler reduce the levels of serum cholesterol and triglycerides.

Diatomite

Diatomite (DIA) is a material of sedimentary origin formed by the accumulation of diatomaceous algae shells in lacustrine and marine environments. It is fossilized by the deposit of silica in its structure, which is arranged in thin or thick layers, interspersed by clay lenses. Silica fixation by the diatom algae is related with the geochemical cycle of clay decomposition (Bočarov-Stančić et al., 2011; Luz & Lins, 2008). This material is very thin, with a porous structure, high surface area and microstructure mainly composed of amorphous silica, or opal and frustules. In addition to amorphous silica, other components may be associated, such as alumina, iron, calcium, magnesium, sodium, potassium, titanium and others, in smaller proportions. Impurities and co-deposited minerals may also be present such as: sponge remains, Radiolaria, calcium carbonates, magnesium, iron oxides, clays, quartz, gypsum, mica, calcite, kaolinite, montmorillonite, feldspar, pyrite, sulfur and manganese nodules (Bočarov-Stančić et al., 2011; Thimm et al., 2001). There are different terminologies to describe these materials, according to the impurities that are associated with the diatomite. For example, if it contains a lot of clay, it is called diatomaceous earth; if it is associated with limestone, it is referred to as diatomaceous marl (Luz & Lins, 2008). Diatomaceous earth is commonly used as an anti-caking agent during feed processing (Weaver et al., 2013).

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

Due to the high content of silicon dioxide present in its structure, DIA has a reduced mass and a honeycomb structure that leads to high adsorption capacity. Its permeability is high due to the entanglement of the individual diatom particles, and to the fact that each diatom has pores and very fine channels that allow the flow of fluid (Bočarov-Stančić et al., 2011; Luz & Lins, 2008; Thimm et al., 2001). The results of Sprynskyy et al. (2012) showed that the surface of diatomite is more hydrophilic than talc, affecting ZEA adsorption, which mainly occurs in hydrophobic surfaces.

The diatomite surface has a predominance of silanol groups over siloxane ones. The most probable driving force linking ZEA and DIA is the hydrophobic bonding between the siloxane groups on the DIA surfaces and partial positive charges of the ZEA molecules, considering this process as a physical adsorption process. The adsorption of the ZEA on diatomite is limited by competition of less polar toxin molecules with the stronger polar water molecules (Sprynskyy et al., 2012).

Activated charcoal

Activated charcoal (AC) is a powder formed by the pyrolysis of various organic compounds and manufactured by activation processes that aim to develop a highly porous structure. AC is one of the most effective and non-toxic adsorbents for a large variety of drugs and toxic agents, such as mycotoxins. The sequestering properties of AC depend on many factors, such as the size of its pores, surface area and structure of the mycotoxin. It is a relatively non-specific adsorbent, thus the essential nutrients are also adsorbed, especially if their concentrations are greater than that of mycotoxins (European Food Safety Authority, 2009). The ability of AC to adsorb fumonisin B_1 in aqueous solutions has been demonstrated *in vitro,* but it was not effective in *in vivo* experiments. The affinities of aflatoxin for activated carbons are also very high, and the main mechanism is probably hydrophobic binding. AC showed high affinity for all toxins (including DON) in *in vitro* tests. However, they have low specificity and, when analyzed *in vivo,* were saturated by the food matrix.

Concluding remarks

Mycotoxins may bind to adsorbents by means of different types of interactions, which often occur simultaneously. Some of the most important types of interactions are hydrophobic binding, hydrogen bonding, electrostatic attraction or repulsion, and coordination bonds. Although *in vitro* tests demonstrate that many mineral compounds are effective in mycotoxin adsorption, *in vivo* analysis showed that some are not able to protect animals from the toxicity of these substances (Jaynes et al., 2007). In contrast, most of the mycotoxins are sufficiently adsorbed by at least one type of adsorbent, either natural or modified. Some adsorbents can be used to minimize the toxic effects of various mycotoxins, while others are able to adsorb only one specific mycotoxin (Huwig et al., 2001).

The composition and structure of aluminosilicates make these compounds excellent adsorbents for low polar compounds, such as AFL, as they combine high affinity, selectivity and cation exchange capacity, with HSCAS as the most efficient compound. Other mineral compounds (sepiolite, AC, DIA) also show good results in the adsorption of aflatoxin, however, similar to aluminosilicates, efficiency of adsorption of other mycotoxins is limited. In contrast, the incorporation of long organic chains increased the efficiency in the adsorption of non-polar molecules, such as ZEA and OTA, and decreased the efficiency of adsorption of polar compounds. Therefore the main mycotoxins are adsorbed sufficiently by at least one type of adsorbent, but a few adsorbents may be used for various mycotoxins and none of them have been shown to be effective against all toxins. In conclusion, the results reported in the literature on the ability of adsorbents to bind to mycotoxins are variable because the composition of clay minerals is also variable, making it necessary to use a set of different adsorbents when different mycotoxins are found in the same animal feed.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest relevant to this study. The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the financial support and research grants.

References

Attia YA, Allakany HF, Al-Hamid AEA, et al. (2013). Capability of different non-nutritive feed additives on improving productive and physiological traits of broiler chicks fed diets with or without aflatoxin during the first 3 weeks of life. J Anim Physiol Anim Nutr 97:754–72.

Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti, A. (2004). Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. Food Chem Toxicol 42:817–24.

Baglieri A, Reyneri A, Gennari M, Nègre M. (2013). Organically modified clays as binders of fumonisins in feedstocks. J Environ Sci Health 48:776–83.

Binder EM. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Anim Feed Sci Technol 133:149–66.

Bočarov-Stančić A, Adamović M, Salma N, et al. (2011). *In vitro* efficacy of mycotoxins adsorption by natural mineral adsorbents. Biotech Anim Husbandry 27:1241–51.

Bovo F, Corassin CH, Rosim RE, Oliveira CAF. (2012). Efficiency of actic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M_1 in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. Food Bioprocess Tech 5:1–5.

Camblor MA, Barrett PA, Cabañas MJD, et al. (2001). High silica zeolites with three-dimensional systems of large pore channels. Microporous Mesoporous Mater 48:11–22.

Cavret S, Laurent N, Videmann B, et al. (2010). Assessment of deoxynivalenol (DON) adsorbents and characterisation of their efficacy using complementary *in vitro* tests. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 27:43–53.

Chaytor AC, Hansen JA, Heugten EV, et al. (2011). Occurrence and decontamination of mycotoxins in swine feed. Asian Aust J Anim Sci 24:723–38.

Che ZQ, Liu YL, Wang HR, et al. (2011). The protective effects of different mycotoxin adsorbents against blood and liver pathological changes induced by mold-contaminated feed in broilers. Asian Australas J Anim Sci 24:250–7.

Corcuera LA, Vettorazzi A, Arbillaga L, et al. (2012). An approach to the toxicity and toxicokinetics of aflatoxin B1 and ochratoxin A after simultaneous oral administration to fasted F344 rats. Food Chem Toxicol 50:3440–6.

Council for Agricultural Science and Technology. (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. 1 ed. Ames, USA: CAST.

Dakovic A, Kragovic M, Rottinghaus GE, et al. (2012). Preparation and characterization of zinc-exchanged montmorillonite and its effectiveness as aflatoxin B1 adsorbent. Mater Chem Phys 137:213–20.

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

Dakovic A, Kragovic M, Rottinghaus GE, et al. (2010). Influence of natural zeolitic tuff and organozeolites surface charge on sorption of ionizable fumonisin B1. Colloids Surf B 76:272–8.

Dakovic A, Matijasevic S, Rottinghaus GE, et al. (2008). Aflatoxin B1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. Colloids Surf B 66:20–5.

Dakovic A, Tomasevic-Canovic M, Dondur V, et al. (2005). Adsorption of mycotoxins by organozeolites. Colloids Surf B 46:20–5.

Deng Y, Velázquez ALB, Billes F, Dixon JB. (2010). Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. Appl Clay Sci 50:92–8.

Denli M, Blandon JC, Guynot ME, et al. (2008). Efficacy of a new ochratoxin-binding agent (OcraTox) to counteract the deleterious effects of ochratoxin A in laying hens. Poult Sci 87:2266–72.

Desheng Q, Fan L, Yanhu Y, Niya Z. (2005). Adsorption of aflatoxin B1 on montmorillonite. Pout Sci 84:959–61.

Devreese M, Pasmansb F, Backer P, Croubels S. (2013). An in vitro model using the IPEC-J2 cell line for efficacy and drug interaction testing of mycotoxin detoxifying agents. Toxicol Vitro 27:157–63.

Doll S, Danicke S, Valenta H, Flachowsky G. (2004). *In vitro* studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. Arch Anim Nut 58:311–24.

Doll S, Gericke S, Danicke S, et al. (2005). The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in Fusarium toxin contaminated maize containing diets for piglets. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 89:342–58.

Eriksen GS, Pettersson H. (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. Anim Feed Sci Technol 114:205–39.

Eser H, Yalçin S, Yalçin S, Şehu A. (2012). Effects of sepiolite usage in broiler diets on performance, carcass traits and some blood parameters. Kafkas Univ Vet Fak Derg 18:313–8.

European Commission. (2009). Commission regulation (EC) No. 386/2009 of 12 May 2009 amending Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives. Off J Eur Union. L 118/166.

European Food Safety Authority. (2009). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. CFP/EFSA/FEEDAP.

European Food Safety Authority. (2010). Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group ''substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins''. EFSA J 8:1–8.

European Food Safety Authority. (2013). Scientific opinion on the safety and efficacy of a preparation of bentonite and sepiolite (Toxfin® Dry) as feed additive for all species. EFSA J 11:3179. http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3179.pdf.

European Parliament of the Council. (2003). Commission regulation (EC) No. 1831/2003 of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Off J Eur Union. L 268/29.

Galan, E. (1996). Properties and applications of palygorskite–sepiolite clays. Clay Min 31:443–53.

Gallo A, Masoero F. (2010). *In vitro* models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins. Ital J Anim Sci 9:109–16.

Harper AF, Estienne MJ, Meldrum JB, et al. (2010). Assessment of a hydrated sodium calcium aluminosilicate agent and antioxidant blend for mitigation of aflatoxin-induced physiological alterations in pigs. J Swine Health Prod 18:282–9.

Hauschild L, Lovatto PA, Lehnen CR, et al. (2007). Digestibilidade e metabolismo de dietas de suínos contendo zearalenona com adição de organoaluminossilicato. Pesq Agropec Bras 42:219–24.

Huwig A, Freimund S, Kappeli O, Dutler H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicol Lett 122:179–88.

Jaynes WF, Zartman RE, Hudnall WH. (2007). Aflatoxin B_1 adsorption by clays from water and corn meal. App Clay Sci 36:197–205.

Jiang S, Yang Z, Yang W, et al. (2010). Physiopathological effects of zearalenone in post-weaning female piglets with or without montmorillonite clay adsorbent. Livest Sci 131:130–6.

Jiang SZ, Yang ZB, Yang WR, et al. (2012a). Effect of purified zearalenone with or without modified montmorillonite on nutrient availability, genital organs and serum hormones in post-weaning piglets. Livest Sci 144:110–8.

Jiang SZ, Yang ZB, Yang WR, et al. (2012b). Effect on hepatonephric organs, serum metabolites and oxidative stress in post-weaning piglets fed purified zearalenone-contaminated diets with or without Calibrin-Z. J Anim Physiol Anim Nutr 96:1147–56.

Kannewischer I, Tenorio AMG, White GN, Dixon JB. (2006). Smectite clays as adsorbents of aflatoxin B1: initial steps. Clay Sci 12:199–204.

Kolosova A, Stroka J. (2011). Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. World Mycotoxin J 4:225–56.

Li J, Suo D, Su X. (2010). Binding capacity for aflatoxin B_1 by different adsorbents. Agric Sci China 9:449–56.

Liu YL, Meng GQ, Wang HR, et al. (2011). Effect of three mycotoxin adsorbents on growth performance, nutrient retention and meat quality in broilers fed on mould-contaminated feed. Br Poult Sci 52:255–63.

Luna FJ, Schuchardt U. (1999). Argilas pilarizadas – uma introdução. Quim Nova 22:104–9.

Luz AB, Lins FF. (2008). Rochas e minerais industriais: usos e especificações. 2 ed. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 223–38.

Magnoli AP, Alonso VA, Cavaglieri LR, et al. (2013). Effect of monogastric and ruminant gastrointestinal conditions on *in vitro* aflatoxin B_1 adsorption ability by a montmorillonite. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 30:743–49.

Magnoli AP, Texeira M, Rosa CAR, et al. (2011a). Sodium bentonite and monensin under chronic aflatoxicosis in broiler chickens. Poult Sci 90:352–7.

Magnoli AP, Monge MP, Miazzo RD, et al. (2011b). Effect of low levels of aflatoxin B_1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B_1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. Poult Sci 90:48–58.

Manafi M. (2012). Counteracting effect of high grade sodium bentonite during aflatoxicosis in broilers. J Agric Sci Tech 14:539–47.

Markov K, Pleadin J, Bevardi M, et al. (2013). Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. Food Control 34:312–7.

Marroquin-Cardona A, Deng Y, Garcia-Mazcorro JF, et al. (2011). Characterization and safety of uniform particle size NovaSil clay as a potential aflatoxin enterosorbent. Appl Clay Sci 54:248–57.

Marroquin-Cardona A, Deng Y, Taylor JF, et al. (2009). *In vitro* and *in vivo* characterization of mycotoxin-binding additives used for animal feeds in Mexico. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 26:733–43.

Mogadam N, Azizpour A. (2011). Ameliorative effect of glucomannan-containing yeast product (Mycosorb) and sodium bentonite on performance and antibody titers against Newcastle disease in broilers during chronic aflatoxicosis. Afr J Biotech 10:17372–8.

Murray HH. (2000). Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview. Appl Clay Sci 17:207–21.

Murray HH, Zhou H. (2006). Palygorskite and sepiolite (hormites). In: Kogel JE, Trivedi NC, Braker JM, Krukowsk ST, eds. 7 ed. Industrial minerals and rocks. Englewood: SME, 401–6.

Neeff DV, Ledoux DR, Rottinghaus GE, et al. (2013). *In vitro* and *in vivo* efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B_1. Poult Sci 92:131–7.

Paiva LB, Morales AR, Díaz FRV. (2008). Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. Cerâmica 54:213–26.

Pestka JJ, Smolinski AT. (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. J Toxicol Envir Health 8:39–69.

Phillips TD. (1999). Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. Toxicol Sci 52:118–26.

Phillips TD, Afriyie-Gyawu E, Williams J, et al. (2008). Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: A review. *Food* Addit Contam *Part* A Chem Anal Control Expo *Risk Assess* 25:134–45.

Phillips TD, Lemke SL, Grant PG. (2002). Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. Adv Exp Med Biol 504:157–71.

Ramos AJ, Hernandez E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. Anim Feed Sci Technol 65:197–206.

Ramos AJ, Hernandez E, PlaDelfina JM., Merino M. (1996). Intestinal absorption of zearalenone and *in vitro* study of non-nutritive sorbent materials. Int J Pharm 128:129–37.

Rawal S, Kim JE, Coulombe Jr R. (2010). Aflatoxin B_1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention. Res Vet Sci 89:325–31.

Rossetto E, Beraldin R, Penha FG, Pergher SBC. (2009). Caracterização de argilas, bentonitas e diatomitas e sua aplicação como adsorventes. Quim Nova 32:2064–7.

Santos RR, Vermeulena S, Haritovab A, Fink-Gremmels J. (2011). Isotherm modeling of organic activated bentonite and humic acid polymer used as mycotoxin adsorbents. *Food* Addit Contam *Part* A Chem Anal Control Expo *Risk Assess* 28:1578–89.

Sprynskyy M, Gadzala-Kopciuch R, Nowak K, Buszewski B. (2012). Removal of zearalenone toxin from synthetics gastric and body fluids using talc and diatomite: a batch kinetic study. Colloids Surf B 94: 7–14.

Tapia-Salazar M, García-Pérez OD, Nieto-López M, et al. (2010). Mycotoxins in aquaculture: occurrence in feeds components and impact on animal performance. In: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, et al, eds. Avances en Nutrición Acuícola. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 514–46.

Thimm N, Schwaighofer B, Ottner F, et al. (2001). Adsorption of mycotoxins. Mycotoxin Res 17:219–23.

Tomasevic-Canovic M, Dakovic A, Rottinhghaus G, et al. (2003). Surfactant modified zeolites–new efficient adsorbents for mycotoxins. Microporous Mesoporous Mater 61:173–80.

Trailović JN, Stefanović S, Trailović SM. (2013). *In vitro* and *in vivo* protective effects of three mycotoxin adsorbents against ochratoxin A in broiler chickens. Br Poult Sci 54:515–23.

Vizcarra-Olvera JE, Astiazarán-García H, Burgos-Hernández A, et al. (2012). Evaluation of pathological effects in broilers during fumonisins and clays exposure. Mycopathologia 174: 247–54.

Wan XL, Yang ZB, Yang WR, et al. (2013). Toxicity of increasing aflatoxin-B1 concentrations from contamined corn with or without clay adsorbent supplementation in ducklings. Poult Sci 92: 1244–53.

Wang JP, Chi F, Kim IH. (2012). Effects of montmorillonite clay on growth performance, nutrient digestibility, vulva size, faecal micro-flora, and oxidative stress in weaning gilts challenged with zearalenone. Anim Feed Sci Technol 178:158–66.

Warheit DB, Sayes CM, Frame SR, Reed KL. (2010). Pulmonary exposures to sepiolite nanoclay particulates in rats: resolution following multinucleate giant cell formation. Toxicol Lett 192: 286–93.

Weaver AC, See MT, Hansen JA, et al. (2013). The use of feed additives to reduce the effects of aflatoxin and deoxynivalenol on pig growth, organ health and immune status during chronic exposure. Toxins 5: 1261–81.

Yiannikouris A, Kettunenb H, Apajalahtib J, et al. (2013). Comparison of the sequestering properties of yeast cell wall extract and hydrated sodium calcium aluminosilicate in three in vitro models accounting for the animal physiological bioavailability of zearalenone. *Food* Addit Contam *Part* A Chem Anal Control Expo *Risk Assess* 30: 1641–50.

Zhao J, Shirley RB, Dibner JD, et al. (2010). Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. Poult Sci 89:2147–56.

Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by 177.101.51.255 on 06/04/14
For personal use only.

CAPÍTULO 13

AFLATOXINAS: CONSEQUÊNCIAS SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E A SAÚDE, E ESTRATÉGIAS PARA COMBATE AOS PREJUÍZOS EM FRANGOS DE CORTE

Ágatha Cristina de Pinho Carão[1]; Diane Valganon de Neeff[2]; Gustavo do Valle Polycarpo[1]; Maria Fernanda de Castro Burbarelli[1]; Carlos Eduardo Bellinghausen Merseguel[3]; Pedro de Assunção Pimenta Ribeiro[4]; Rômulo Antunes[1]; Carlos Augusto Fernandes de Oliveira[5]; Ricardo de Albuquerque[6].

[1]Doutoranda(o) do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
[2]Doutoranda do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
[3]Mestrando do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
[4]Ex-aluno de Doutorado do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
[5]Docente do Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
[6]Docente do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Micotoxinas são toxinas produzidas por fungos contaminantes naturais de cereais e oleaginosas, que têm sua proliferação atrelada a condições ambientais como as do Brasil. As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos do gênero Aspergillus, como as espécies Aspergillus flavus, A. parasiticus e A. nomius. São amplamente encontradas em matérias-primas de alimentos para animais, em especial nos cereais, como milho, e têm a capacidade de levar a quadros clínicos agudos ou crônicos de aflatoxicose, caracterizados por, desde a morte por hepatite aguda até a diminuição do desempenho zootécnico por diminuição de peso ou consumo de ração. A aflatoxina B1 tem sido considerada o metabólito mais perigoso, uma vez que possui alto poder hepatotóxico, além de ser mutagênica e carcinogênica. É primordial que os profissionais envolvidos na produção de aves comerciais destinem especial atenção à qualidade da matéria-prima utilizada para a produção das rações utilizadas nas granjas; porém, é de suma importância que os mesmos não somente saibam reconhecer

as alterações produtivas, mas que saibam claramente quais são as alterações de saúde causadas pelas aflatoxinas. Sendo assim, o objetivo deste capítulo é elucidar as principais alterações causadas à produção e à saúde das aves, bem como apresentar alternativa passível de ser usada para diminuição da absorção de aflatoxinas pelo trato digestório e o uso de antioxidante natural que visa abrandar os efeitos negativos causados pelas mesmas.

INTRODUÇÃO

A avicultura é uma atividade pecuária muito importante para o Brasil, uma vez que é grande geradora de empregos à população e renda para a indústria nacional. Em destaque encontra-se a avicultura de corte, responsável pela maior parte das divisas geradas pela criação de aves industriais. O Brasil encontra-se na terceira posição no ranking mundial de produção de carne de frangos, situando-se na liderança da exportação de cortes para o globo.

A situação sanitária das aves é um ponto crucial para o sucesso da atividade, uma vez que um animal saudável pode expressar todo o seu potencial genético para crescimento. Colaborando enormemente para o status sanitário dos animais está a nutrição, ferramenta que, quando bem utilizada, auxilia os frangos a produzirem carne por meio do aproveitamento máximo dos nutrientes constituintes das rações.

As dietas das aves comerciais compõem-se basicamente de grãos, como o milho e o farelo de soja. Para que não haja perda financeira devido ao mal aproveitamento da ração, é preciso que a mesma tenha alto grau de inocuidade. As micotoxinas (toxinas produzidas por fungos) constituem-se problema corriqueiro para a produção animal, uma vez que os grãos são extremamente susceptíveis à contaminação fúngica, podendo levar à produção de compostos toxigênicos. A micotoxina com maior poder deletério à saúde dos animais é a Aflatoxina B1 (AFB1). Embora nunca encontrada isoladamente em dietas contaminadas, quando ingerida em pequenas doses há longo prazo leva a quadros de infecção crônica, com consequente queda de desempenho zootécnico e bem-estar devido a diminuição na qualidade de vida.

Sob esta ótica, é importante estabelecer quais as principais consequências para a saúde avícola e para a indústria produtora de aves; bem como mostrar as principais alternativas de combate aos efeitos deletérios causados pela aflatoxicose crônica.

Este capítulo tem por objetivo apresentar as principais consequências da intoxicação por aflatoxinas sobre a saúde das aves e o desempenho zootécnico, como também algumas alternativas que visam diminuir a perda econômica decorrente da contaminação.

CONCEITOS GERAIS SOBRE MICOTOXINAS E SEUS EFEITOS SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que podem entrar na dieta de seres humanos e animais através da contaminação direta ou indireta de cereais e grãos. Uma vez ingeridas, as micotoxinas são difíceis de diagnosticar, induzindo, em muitos casos, síndromes brandas que podem facilmente ser confundidas com doenças causadas por outros microorganismos. De acordo com suas propriedades físico-químicas e a espécie animal envolvida, cada micotoxina pode afetar especificamente um órgão ou sistema, levando a manifestações clínicas específicas de natureza aguda ou crônica (Pier et al., 1973).

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero Aspergillus, como as espécies A. flavus, A. parasiticus e A. nominus, descobertas em 1960, após provocarem um surto tóxico em perus na Inglaterra (Turkey-X-disease). Neste surto, milhares de aves morreram após consumirem torta de amendoim na ração, e as aves doentes apresentaram necrose do tecido hepático (Asao et al.; 1963; Leeson et al., 1995). A produção de aflatoxinas é favorecida por vários fatores, especialmente pela umidade relativa do ar (superior a 80%), temperatura ambiental e condições de integridade e teor de umidade do substrato. O Aspergillus flavus e o A. parasiticus proliferam em temperaturas entre 32°C e 33°C. As aflatoxinas geralmente são produzidas entre 13°C e 42°C, embora entre 25°C a 30°C seja considerada temperatura ótima para sua síntese (Batatinha; Simas; Górniak, 2008).

São conhecidos, atualmente, 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B1, G1, B2 e G2 (Figura 1); sendo que a AFB1, além de ser a mais frequentemente encontrada em cereais, é que apresenta maior poder toxigênico (Leeson et al., 1995). As aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram classificadas como agentes carcinogênicos (grupo 1), para humanos, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002). A toxicidade das aflatoxinas depende de diferentes fatores, incluindo sua concentração, a duração da exposição, a espécie, o sexo, a idade e a condição de saúde dos animais (Jewers, 1990). Os animais jovens são mais susceptíveis aos efeitos das aflatoxinas, uma vez que seus sistemas enzimáticos hepáticos ainda não estão completamente desenvolvidos. De maneira geral, as aves são mais susceptíveis que os mamíferos, sendo animais adultos os mais resistentes (Batatinha; Simas; Górniak, 2008). A toxicidade (DL50) da aflatoxina em frangos é de 6,5-16,5 mg/kg (Spinosa et al, 2008).

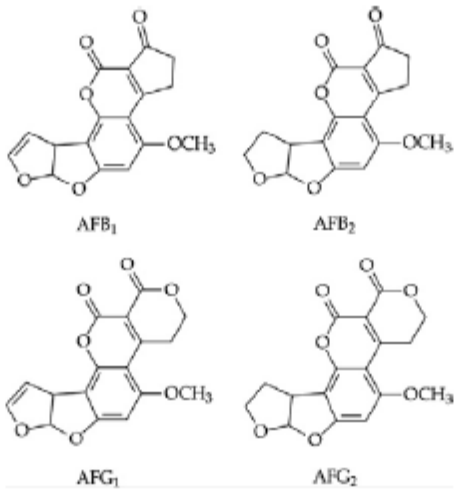


Figura 1. Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (Fonte: Rawal et al., 2010).

Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento de animais jovens (Leeson et al., 1995); porém, a síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxina, sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo. Esta caracteriza-se principalmente pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (Osweiler, 1990). A síntese hepática de gorduras, bem como seu transporte para outras áreas do organismo, é seriamente afetada. A cor desse órgão varia de normal a amarelo pálido, podendo verificar-se o aparecimento de petéquias e grandes áreas hemorrágicas. Ocorre uma infiltração gordurosa no fígado, sendo que o grau de infiltração depende da dose e do tempo de intoxicação por aflatoxina, chegando a 68% de aumento em frangos de corte (Santurio, 2000). Na aflatoxicose não ocorrem erosões de moela, apesar de muitas aves com lesões características desta micotoxicose também apresentarem esse tipo de alteração. Isso parece ser um paradoxo, mas de acordo com Wyatt (1991), cerca de 36% das linhagens de Aspergillus flavus, além de produzirem aflatoxinas, também produzem outra micotoxina, o ácido ciclopiazônico, responsável por erosões na mucosa da moela. As aflatoxinas induzem a vários efeitos, tais como doenças hepáticas, alterações na taxa de crescimento, mudanças nos mecanismos imunogênicos, e efeitos carcinogênicos e mutagênicos em diferentes espécies animais, especialmente em aves domésticas (Pier et al., 1973). A aflatoxicose, envenenamento que ocorre da ingestão de aflatoxinas, é caracterizada em frangos pelo decréscimo de consumo de ração e de

taxa de crescimento, além de pobre utilização de alimentos e mortalidade (Tedesco et al., 2004). Denli et al. (2009), após trabalhar com rações experimentalmente contaminadas com AFB1 também relataram haver redução do consumo de ração, do ganho de peso e aumento da conversão alimentar em aves ingerindo 1000mg/kg de AFB1, quando comparadas a aves não contaminadas. Resultados semelhantes são apresentados por Aravind et al (2003), os quais observaram diminuição no consumo de ração, no ganho de peso, além de piora na conversão alimentar de frangos alimentados com dieta naturalmente contaminada com micotoxinas (168µg de AFB1/kg de ração).

Em decorrência da sua lipossolubilidade, as aflatoxinas são facilmente absorvidas no trato gastrintestinal, sendo então, distribuídas aos diferentes órgãos como músculos, rins, tecido adiposo e, principalmente, fígado, em que as maiores concentrações podem ser encontradas. Nesse órgão, tais toxinas são biotransformadas pelo sistema enzimático das oxidases de função mista (Batatinha; Simas; Górniak, 2008).

A biotransformação das aflatoxinas constitui um processo complexo, com múltiplas vias, tais como epoxidação, hidroxilação, desmetilação e redução. Nas reações de primeira fase, as moléculas tornam-se mais hidrofílicas; na segunda fase, os compostos produzidos inicialmente são conjugados a substâncias endógenas (sulfatos, glutationa, grupos metil e acil) e, em seguida, excretados. Produtos resultantes do metabolismo das aflatoxinas são considerados responsáveis pelos seus efeitos tóxicos (Batatinha; Simas; Górniak, 2008).

EFEITOS DAS AFLATOXINAS SOBRE A FUNÇÃO HEPÁTICA DAS AVES

A determinação dos efeitos das aflatoxinas sobre a bioquímica hepática sérica é importante para o diagnóstico de aflatoxicose em frangos de corte (Rosa et al., 2001). Um dos principais efeitos da AFB1 é a inibição da síntese proteica, uma vez que a maioria das proteínas plasmáticas (albumina e globulinas) é sintetizada pelos hepatócitos (Stockham & Scott, 2011), causando assim, uma queda em seus níveis (Santin, 2000). Este efeito da aflatoxicose é devido a uma marcante inibição da enzima RNA-polimerase. Após a toxina entrar no núcleo do hepatócito, une-se ao DNA e desse modo inibe a RNA-polimerase, reduzindo a síntese de RNA-mensageiro, com consequente acentuada redução na produção de proteínas (Cliford & Rees, 1966). A AFB1 é biotransformada no fígado por monoxigenases, e então transformada pela citocromo P450 em aflatoxina 8,9-epóxido, um composto eletrofílico altamente ativo que é inativado por conjugação com a glutationa e excretado através da urina e da bile (Emerole et al., 1979). Tessari et al. (2005) afirmam que 200µg de AFB1/kg de ração, com ou sem associação de fumonisina B1, determinam uma redução nos níveis séricos de proteínas totais após 20 dias de exposição

contínua através da ração. Ghosh et al. (1990) observaram que 300µg de AFB1/ kg de ração de frangos de corte levou a diminuição significativa de linfócitos T, albuminas e globulinas nos animas intoxicados.

A lesão hepática causada pelas micotoxinas leva a alteração das enzimas existentes nas células do fígado. A Alanina Aminotransferase (ALT) é uma enzima presente em grande quantidade no citoplasma dos hepatócitos e dos miócitos esqueléticos. É uma enzima de liberação, que catalisa uma reação reversível envolvida na desaminação de alanina para formar piruvato, que pode entrar na via da gliconeogênese ou no ciclo de Krebs (Ciclo do Ácido Cítrico). Uma lesão de hepatócito, reversível ou irreversível, ocorrendo por variadas causas (inflamação, hipóxia, substâncias tóxicas, traumatismo...), além de casos de regeneração de doença hepática, liberam ALT para o sangue (Stockham & Scott, 2011). Aravind et al. (2003) observaram diminuição precoce da atividade da ALT em frangos de corte submetidos a dieta naturalmente contaminada com micotoxinas (168µg de AFB1/kg de ração). Diminuição significativa da atividade da ALT foi encontrada em frangos de corte submetidos a 800µg de AFB1/kg de ração durante 35 dias de tratamento (Tedesco et al., 2004).

A Aspartato Aminotransferase (AST) é uma enzima encontrada em altas concentrações no citoplasma dos hepatócitos e em suas mitocôndrias, além de outros tecidos como os músculos cardíaco e esquelético, além dos eritrócitos. É uma enzima de liberação, que catalisa uma reação reversível envolvida na desaminação de aspartato para formar oxaloacetato, que pode entrar no ciclo de Krebs (Ciclo do Ácido Cítrico) (Stockham & Scott, 2011). Baseado em estudos em humanos, aproximadamente 60 a 80% da AST do interior do hepatócito está associado às mitocôndrias, e o restante em forma solúvel no citosol (Meyer et al., 1992). Da mesma forma, uma lesão de hepatócito, reversível ou irreversível, ocorrendo por variadas causas (inflamação, hipóxia, substâncias tóxicas, traumatismo...), além de casos de regeneração de doença hepática, liberam AST para o sangue (Stockham & Scott, 2011). Porém, é necessário um insulto mais severo do que aquele que altera a permeabilidade da membrana celular para provocar a liberação da forma mitocondrial de AST. Uma lesão à membrana, por toxina ou hipóxia, por exemplo, resulta num aumento da ALT sérica, e nas doenças hepáticas crônicas, principalmente em estado final (cirrose), os valores da ALT e do AST séricos podem estar normais ou somente um pouco aumentados (Meyer et al., 1992). Uma diminuição significativa da concentração sérica da AST foi constatada por Franciscato (2006) em frangos de corte submetidos a dieta contendo 3000µg de AFB1/kg de ração, quando em comparação a aves não contaminadas. Um aumento significativo da ação da AST em frangos de 41 dias de idade foi constatada por Tessari et al. (2005) em intoxicação experimental por 50 e 200µg de AFB1/kg de ração.

A Lactato Desidrogenase (LD ou LDH) é uma enzima citosólica

localizada em diversos tecidos, incluindo os hepatócitos e a musculatura esquelética e cardíaca; além de eritrócitos; a qual catalisa uma reação reversível que converte piruvato em lactato no final da glicólise anaeróbica (Meyer et al., 1992; Stockham & Scott, 2011). Sendo assim, a atividade sérica total da LD não traz vantagens diagnósticas sobre os AST. Porém, a LD é composta de 5 isoenzimas, das quais a LD5 pode ser mensurada por espectrofotometria e está localizada primariamente nos hepatócitos e musculatura esquelética (Meyer et al, 1992). Devido ao seu grande tamanho e a meia-vida longa, a atividade de LD fica elevada por algum tempo após a lesão inicial e, às vezes, pode ser útil no diagnóstico retrospectivo (Kerr, 2003). Aos 21 dias de idade, 5000µg de aflatoxina (60,69% de AFB1) por quilograma de ração foi capaz de reduzir a média de ação da enzima LD em frangos de corte com aflatoxicose aguda experimental (Borsa et al., 1998).

A Gama-Glutamiltransferase (GGT) é uma enzima associada à colestase e membranas celulares. Ela catalisa a transferência de grupos glutamil entre peptídeos e está envolvida em reações da glutationa. Muitas células têm atividade de GGT, mas as células epiteliais biliares, as células acinares pancreáticas e as células epiteliais tubulares renais são consideradas classicamente as de maior atividade (Meyer et al, 1992; Stockham & Scott, 2011). Concentrações elevadas de ácidos biliares no fígado e no plasma são esperadas na ocorrência de colestase. O aumento dos ácidos biliares ou de outros constituintes da bile pode estimular a síntese e a liberação de GGT. Aravind et al. (2003) relataram aumento na concentração de GGT no soro de frangos de corte aos 21 e aos 42 dias de idade submetidos a dieta naturalmente contaminada com aflatoxina (169µg/kg de ração). Resultados semelhantes foram encontrados por Borsa et al. (1998) em frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dieta com 5000µg/kg de ração de aflatoxinas (69,9% de AFB1).

EFEITOS DAS AFLATOXINAS SOBRE A FUNÇÃO RENAL DAS AVES

A intoxicação por micotoxinas também afeta a função renal das aves. Sendo assim, a avaliação desta pode ser feita tomando-se parâmetros sanguíneos clássicos, como a determinação das concentrações de ácido úrico e de uréia. O ácido úrico é um metabólito que pode ser usado como parâmetro importante da função renal, além da função hepática. Ele é o maior produto final do metabolismo de nitrogênio, constituindo cerca de 60 a 80% do nitrogênio total excretado na urina das aves. É sintetizado no fígado e nos rins, e 90% são excretados via secreção tubular, independentemente da taxa de formação de urina (Skadhauge apud Stockham & Scott, 2011). Concentrações sanguíneas acima de 15 mg/dL sugerem alterações da função renal, que podem ser causadas por diversos fatores, como nefrotoxinas (Schimidt et al., 2007).

Batina (2004) mostrou haver diminuição significativa na concentração de ácido úrico sanguíneo de frangos de corte aos 42 dias de idade submetidos a dieta contendo 5000µg de aflatoxina/kg de ração.

A uréia é resultante do metabolismo do nitrogênio. É produzida pelo fígado e excretada pelos rins. Sua concentração sanguínea é influenciada pela ingestão de proteínas, pela taxa de excreção renal (que podem aumentar a concentração sanguínea da uréia) e pelo estado do fígado, que é o órgão responsável pela sua síntese. Como as aves são uricotélicas, pequenas quantidades de uréia estão presentes no plasma. A concentração normal de uréia de aves não-carnívoras é de 0 a 5 mg/dL (Campbell apud Schimidt et al, 2007). Diminuição na concentração sérica de uréia foi encontrada por Batina (2004) em frangos de corte com 42 dias intoxicados com 500mg de aflatoxina/ kg de ração. Resultados semelhantes foram apontados por Aravind et al. (2003) para frangos de corte com 21 e 35 dias alimentados com dieta naturalmente contaminada com micotoxinas (168µg de aflatoxina/kg de ração).

EFEITOS DAS AFLATOXINAS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DAS AVES

As micotoxinas também podem afetar os parâmetros hematológicos das aves contaminadas, mesmo em pequenas doses, as quais levam a micotoxicoses sub-clínicas. Tessari et al. (2006), trabalhando com 0, 50 e 200µg de AFB1/kg de ração, em associação ou não com 0, 50 ou 200µg de fumonisina B1/kg, não observaram alteração no estado clínico geral dos frangos durante o período experimental; porém constataram que em todos os tratamentos houve redução nos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e número de hemácias, caracterizando um quadro de anemia, sendo que os grupos mais afetados foram os que receberam as maiores concentrações das toxinas em associação. Também observou-se um menor número de leucócitos em todos os tratamentos, porém esta redução foi mais intensa nos grupos tratados com 200µg de AFB1/kg de ração, com ou sem fumonisina. Aravind et al. (2003) trabalharam com dieta naturalmente contaminada com várias micotoxinas (168µg de AFB1/kg de ração) observaram diminuição no hematócrito das aves intoxicadas aos 21 e aos 35 dias de idade. Além disso, nas aves com 35 dias de idade, houve uma aparente redução na concentração de hemoglobina e na contagem de hemácias em relação ao grupo controle. Diminuição na porcentagem de heterófilos em aves se alimentando de 2450µg de AFB1/kg de alimento, além de aumento na porcentagem de linfócitos no plasma de aves ingerindo 350 e 2450µg de AFB1/kg de ração foram encontradas por Del Bianchi et al. (2005). Tung apud Tessariet al. (2006) alimentaram frangos com 5000 e 10000µg de AFB1/kg de ração e observaram que os efeitos sobre os parâmetros hematológicos foram mais pronunciados quanto maior o nível de aflatoxina.

EFEITOS DAS AFLATOXINAS SOBRE O METABOLISMO DE CÁLCIO E FÓSFORO DAS AVES

Estudos também têm demonstrado que as aflatoxinas afetam direta ou indiretamente o metabolismo do cálcio e do fósforo nas aves (Glahn et al, 1991). O cálcio é o mineral mais abundante no organismo da ave. É considerado um dos principais constituintes dos ossos e tem ainda um papel fundamental no controle das funções celulares dos tecidos nervoso e muscular, bem como de atividades hormonais e de coagulação sanguínea (Maiorka & Macari, 2002). Cerca de metade do cálcio plasmático está livre e esta é a porção ativa do cálcio, enquanto a outra metade encontra-se inativa, ligada à albumina (Keer apud Schimidt et al., 2007), e também à cátions não-protéicos. O cálcio sérico ou plasmático está distribuído em três frações principais. Todo o cálcio nos líquidos corporais está ionizado (Ca^{+2}), mas parte (cerca de 50%) encontra-se livre e parte está ligada a moléculas aniônicas (proteínas (80% albumina e 20% globulina) – 40-45%; e ânions não-protéicos (citrato, fosfato, lactato e outros ânions pequenos e difusíveis) – 5-10%). A porção do cálcio livre no plasma é regulada por hormônios e contribui para estados patológicos (Stockham & Scott, 2011). Os distúrbios renais causam diminuição do cálcio sérico pela perda de proteínas (levando a hipoalbuminemia) ou pela diminuição da reabsorção do cálcio (Lewandoswik apud Schimidt et al., 2007). Como as concentrações séricas de Ca^{+2} em perfis bioquímicos comuns representam a concentração total de Ca^{+2}, uma diminuição na concentração sérica de proteínas (especialmente hipoalbuminemia) diminui o Ca^{+2} ligado às mesmas, e, portanto pode causar hipocalcemia, chamada de pseudo-hipocalcemia (Stockham & Scott, 2011). A pseudo-hipocalcemia não resulta em sinais clínicos nas aves, uma vez que o Ca^{+2} livre que é o mobilizado para as funções celulares. Sendo assim, há constatação da concentração sérica total de cálcio, porém, sem sinais clínicos. Diminuição da concentração de cálcio sérico total foi observada em frangos de corte de 42 dias de idade submetidos a dieta contendo 5000µg de aflatoxinas/kg de alimento (80% AFB1, 12% AFB2, 5% AFG1 e 3% AFG2) e argila clinoptilonita natural (Maciel et al., 2007).

O fósforo está presente predominantemente na forma de hidroxiapatita (90%) na matriz mineralizada dos ossos, e os 10% restantes estão nos tecidos moles intracelularmente, sendo o principal ânion intracelular e faz parte de vários processos metabólicos como metabolismo de energia, contração muscular e integridade do esqueleto (Dennis apud Franciscato, 2006). O fósforo inorgânico, maneira pela qual é referido o fósforo nos organismos vivos, também encontra-se no líquido extracelular. O fosfato inorgânico encontra-se na circulação como monohidrogeniofosfato (HPO_4^{-2}), que é divalente, e como dihidrogeniofosfato (H_2PO_4-), que é monovalente (Maiorka & Macari, 2002). No plasma, 55% do fósforo inorgânico encontra-se livre,

enquanto os outros 45% estão ligados a ânions (10% a proteínas catiônicas e 35% a cátions não-protéicos). Assim como ocorre com o cálcio, a parte livre no plasma é que é regulada por hormônios (Stockham & Scott, 2011). Fernandez et al. (1994) trabalharam com intoxicação experimental de poedeiras comerciais com 2500µg de AFB1/kg relataram presença de hipofosfatemia quando em comparação ao grupo controle negativo.

Ambos minerais são regulados pela função do hormônio paratireóideo (PTH), produzido pelas glândulas paratireóides e inativado ou degradado pelo fígado e pelos rins. O PTH é um hormônio polipeptídico (84% aminoácidos) secretado em resposta a uma diminuição na concentração sérica de cálcio livre, enquanto que a vitamina D ativa e o aumento na concentração sérica de cálcio livre inibem sua síntese. O PTH promove aumento na absorção de cálcio pelo intestino (na presença de vitamina D ativa) e maior reabsorção nos túbulos renais; mobilização de cálcio e fósforo inorgânico dos ossos; e excreção renal de fósforo inorgânico por inibir a reabsorção do mesmo pelos túbulos (ação fosfatúrica potente). Glahn et al. (1991) explicam que os efeitos das aflatoxinas sobre os minerais citados podem estar relacionados com alterações no metabolismo da vitamina D e do PTH, pois estas micotoxinas podem diminuir a síntese de PTH endógeno ou alterar a sensibilidade renal a este hormônio, podendo ainda, reduzir a síntese de vitamina D ativa, causando assim, diminuição da excreção de fósforo e aumento na excreção de cálcio. Estes efeitos resultariam em hipocalcemia verdadeira (por diminuição na concentração de cálcio sérico livre) associada a pesudo-hipocalcemia (por hipoalbuminemia); além de hipofosfatemia devido à baixa na concentração de vitamina D ativa, que estimula a absorção de fósforo no intestino e a mobilização de fósforo dos ossos.

USO DE ALUMINOSILICATO DE CÁLCIO E SÓDIO HIDRATADO (HSCAS) COMO ADSORVENTE DE AFLATOXINAS

É sabido que a indústria avícola se utiliza de vários métodos que objetivam a redução de prejuízos causados à saúde e ao desempenho zootécnico devidos às micotoxinas. Os métodos que objetivam eliminar ou reduzir os níveis de contaminação por micotoxinas nos alimentos levam em consideração estratégias de descontaminação e detoxificação. Isto inclui métodos químicos, físicos e biológicos, desde que estes métodos apresentem efetividade na remoção, destruição e inativação das micotoxinas; ausência de efeitos tóxicos ou carcinogênicos; não alterem as propriedades nutritivas nem a palatabilidade dos alimentos e sejam econômica e tecnologicamente viáveis, não alterando o preço final do produto (Diaz & Smith, 2005). Um caminho para o problema tem sido usar materiais absortivos não-nutritivos na alimentação, com objetivo de redução na absorção das aflatoxinas pelo trato digestório (Kubena et al.,

1990b). Dentre todos os meios, o mais comumente utilizado é a ligação irreversível da micotoxina a um adsorvente (Diaz & Smirh, 2005).

A utilização de aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS), um tipo de zeólita comercial, em dietas de aves domésticas tem mostrado resultados satisfatórios devidos à sua capacidade em adsorver toxinas (Kubena et al, 1990a), tornando-as menos disponíveis para adsorção pelo trato gastrointestinal (Kubena et al, 1990b). O HSCAS é uma classificação geral que inclui diferentes adsorventes, não sendo uma substância específica. Pode ser definido como todo material de aluminosilicato puro, que contenha mistura de água zeolítica e menores quantidades de cálcio e sódio na forma de cátions ou seus sais solúveis.

O HSCAS na concentração de 0,5% na dieta diminuiu significativamente os efeitos adversos no peso corporal e nas mudanças hepáticas principais causados por 7500µg de AFB1/kg de dieta em poedeiras Leghorn e frangos de corte (Phillips et al., 1988). Neeff et al. (2013) também relatam redução dos efeitos deletérios sobre o peso relativo de fígado e rim e redução dos resíduos de AFB1 e também de produtos de biotransformação de AFB1 (AFB2, Aflatoxicol e AFG1) em fígado de frangos de corte ao final da fase inicial de criação (21 dias), com uso de 0,5% de HSCAS e administração de 2500µg de AFB1/kg de ração.

TÉCNICA COM POSSÍVEL APLICAÇÃO FUTURA: USO DE CÚRCUMA COMO ANTIOXIDANTE NATURAL NA ATENUAÇÃO DOS EFEITOS DELETÉRIOS DAS AFLATOXINAS

O consumo de oxigênio relativo ao crescimento de células e ao seu metabolismo normal conduz à geração de uma categoria de substâncias conhecidas como radicais livres. De maneira simples, o termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Como nem sempre os radicais livres possuem elétrons desemparelhados na última camada, o termo mais adequado é "Espécies Reativas do Metabolismo de Oxigênio" (ERMO), e estas são encontradas em todos os sistemas biológicos (Ferreira & Matsubara, 1997). As ERMO são produzidas continuamente pelo uso normal de oxigênio do corpo, tal como a respiração e algumas funções imunes mediadas por células. ERMO incluem radicais livres, tais como radicais ânion superóxido (O_2-), radicais hidroxila (OH-), radical hidroperoxila (HO_2-) e espécies radicais não livres como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1O_2$) (Ak & Gülçin, 2008). Algumas, como o ânion superóxido e o óxido nítrico, produzidos dentro da célula ou por fagócitos ativados presentes durante a inflamação, têm sido

propostas por desempenhar um papel importante no processo multicelular da carcinogênese, provavelmente por danificar e alterar células alvo (Abel & Gelderblom, 1998).

O estresse oxidativo é o evento decorrente da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção destes. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Halliwell & Whiteman, 2004). Além do estresse oxidativo, como as ERMO são produzidas continuamente durante eventos fisiológicos normais, estas podem, facilmente, dar início à peroxidação de lipídios da membrana, conduzindo ao acúmulo de hidroperóxidos lipídicos.

Todos os organismos aeróbios possuem defesas antioxidantes, incluindo enzimas e componentes alimentares antioxidantes, para remover ou reparar as moléculas danificadas. Os compostos antioxidantes podem eliminar os radicais livres e aumentar a vida de prateleira de produtos alimentícios, retardando o processo de peroxidação lipídica, sendo uma das principais razões para a deterioração de alimentos e compostos farmacêuticos durante o processamento e armazenamento (Ak & Gülçin, 2008). Substâncias naturais que podem prevenir a toxicidade da AFB1 seriam úteis para a saúde humana e animal, com um custo mínimo em alimentos e rações.

Recentemente, uma especiaria, conhecida como cúrcuma ou açafrão-da-terra, vem sendo estudada para que seja avaliada a sua eficiência como antioxidante, podendo ser incluída a baixo custo em dietas de aves comerciais, objetivando a atenuação dos efeitos oxidantes deletérios causados pelas aflatoxinas. A cúrcuma é uma planta medicinal nativa do subcontinente asiático e é preparada a partir da raiz e rizoma secos da planta Curcuma longa, um membro da família do gengibre. A curcumina é um dos constituintes encontrados na cúrcuma, sendo um dos principais ingredientes da especiaria em pó. O ingrediente ativo presente na curcumina é o diferuloimetano, um polifenol hidrofóbico, que apresenta cor amarela característica. Mesmo embora o efeito antioxidante principal seja devido à curcumina, esta encontra-se junto a um conjunto de compostos denominados curcuminóides totais, representados por demetóxicurcumina e bisdemetóxicurcumina (Gowda et al., 2009; Epstein et al., 2010; Nayak & Sashidhar, 2010).

A curcumina vem sendo utilizada, por seus benefícios medicinais, há séculos, porém o primeiro caso documentado de seu uso como uma droga surgiu apenas em 1937, quando foi utilizada para tratar doença biliar (Srivastava et al., 2011). Desde então seu potencial terapêutico vem sendo explorado em doenças inflamatórias, neoplásicas, cardiovasculares,

neurodegenerativas, diabetes, fibrose cística e outros distúrbios (Maheshwari et al., 2006; Srivastava et al., 2011). Os efeitos negativos causados pela AFB1 incluem dano celular, liberação de radicais livres e peroxidação lipídica (Surai, 2002). Os curcuminóides totais apresentaram efeitos antioxidantes e protetores contra a AFB1, e como a peroxidação lipídica desempenha um papel importante na toxicidade pela aflatoxina, um efeito protetor através do uso de antioxidantes é possível de ser conseguido (Soni et al., 1997; Galvano et al., 2001). Compostos de plantas como as cumarinas, flavonóides e curcuminóides possuem ação inibitória na biotransformação da aflatoxina aos seus derivados epóxido ativos (Lee et al., 2001).

Gowda et al. (2008) avaliaram que houve aumento na ingestão de alimento, dos níveis séricos de proteína total e colesterol, e melhora significativa no ganho de peso de frangos de corte alimentados com 0,5% de cúrcuma em pó e 1000µg de AFB1/kg, quando comparados com os frangos alimentados somente com AFB1.

Em estudo conduzido por Yarru et al. (2009), verificou-se que a adição de 0,5% de cúrcuma em pó, contendo 74mg/kg de curcuminóides totais, à dieta com adição de 1000µg de AFB1/kg, melhorou significativamente os efeitos negativos da AFB1 no desempenho zootécnico e no peso do fígado de frangos de corte.

Gowda et al. (2009) verificaram que a adição de 74 e 222mg/kg de curcuminóides totais na dieta contendo 1000µg de AFB1/kg não teve efeito significativo na ingestão de alimento, porém apresentou aumento significativo no ganho de peso e melhor conversão alimentar quando comparado com frangos de corte alimentados somente com AFB1. Também verificaram que a suplementação de 222mg de curcuminóides totais/kg de dieta contendo 1000µg de AFB1/kg proporcionou melhora significativa nos valores séricos de proteína total, albumina, globulina, GGT e AST, quando comparado com aves alimentadas somente com AFB1.

PESQUISA EXPERIMENTAL DESENVOLVIDA PELO LABORATÓRIO DE AVICULTURA (FMVZ/USP)

Em uma pesquisa realizada pelo Laboratório de Avicultura, o qual pertence ao Departamento de Nutrição e Produção Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, utilizou-se 240 pintos de um dia, machos, da linhagem comercial Cobb® 500, com peso inicial de 42,8 gramas e que foram submetidos a quatro diferentes tipos de dietas experimentais.

As dietas foram elaboradas de acordo com as recomendações nutricionais de Rostagno (2011) para cada fase de crescimento (inicial, crescimento e terminação), e tiveram como base o milho e o farelo de soja.

Os tratamentos experimentais foram: Dieta 1 = Controle negativo (Ração Basal); Dieta 2 = Dieta 1 + 0,5% de adsorvente experimental (HSCAS

– Aluminosilicato de Cálcio e Sódio Hidratado); Dieta 3 = Dieta 2 + 500µg de AFB1/kg de ração e; Dieta 4 = Dieta 1 + 500µg de AFB1/kg de ração. As aves passaram a receber as dietas contaminadas somente a partir do oitavo dia de criação, uma vez que antes deste período as mesmas são muito sensíveis à contaminação.

A AFB1 utilizada para a contaminação das dietas foi produzida no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (LMMA) do Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, a partir do cultivo de cepa toxigênica de Aspergillus parasiticus NRRL2999 em arroz, seguindo a metodologia científica de Shotwell et al. (1996). A confirmação dos níveis de aflatoxinas nas rações foi feita por meio do método de Vicam (1999), com auxílio de aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Foi feita a análise de desempenho zootécnico, considerando as seguintes características: peso médio, ganho de peso médio, consumo de ração médio, conversão alimentar e viabilidade criatória de frangos de corte aos 42 dias de criação. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Valores de Peso Médio (PM), Ganho de Peso Médio (GPM), Consumo de Ração Médio (CRM), Conversão Alimentar (CA) e Viabilidade Criatória (VC) de frangos de corte para o período total de criação (42 dias).

Característica	Dietas Experimentais				Valor de P
	Controle	**Adsorvente[1]**	**Adsorvente + AFB1[2]**	**AFB1[3]**	
PM (g)	2993a	3079a	2665b	2602b	<0,001
GPM (g)	2946a	3037a	2622b	2509b	<0,001
CRM (g)	3661ab	3947a	3438bc	3176c	<0,001
CA (g/g)	1,24	1,30	1,31	1,27	0,074
VC (%)	96,66	100	100	100	0,089

10,5% de Aluminosilicato de Cálcio e Sódio Hidratado (HSCAS); 20,5% de HSCAS + 0,05µg/kg de ração de Aflatoxina B1 (AFB1); 30,05µg/kg de ração de AFB1. Valores com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa sob o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Como é possível observar, o peso corporal médio e o ganho de peso médio foram afetados negativamente pela ingestão de alimento contaminado pelas aves, uma vez que grande parte da energia e dos nutrientes absorvidos é recrutada para reparar os danos causados pelas aflatoxinas. Além disso, a diminuição no consumo de ração culmina com um menor aporte nutricional, o que colabora para queda no crescimento dos animais e aumento na taxa de refugos. É importante observar que as aves ingerindo toxina com adsorvente

apresentaram consumo de ração estatisticamente igual às do grupo controle. As concentrações de HSCAS e AFB1 utilizadas neste experimento não foram suficientes para exercer influência sobre a conversão alimentar e a viabilidade criatória, mas bastaram para que, ao exame necroscópico, fossem observados fígados lipêmicos e edemaciados, além de dificuldade no processo de coagulação do sangue por parte das aves, visto por meio de punções venosas que não estancavam e leves hemorragias.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista do conteúdo exposto, é possível perceber a dimensão dos efeitos deletérios causados à avicultura e às saúdes animal e humana, além da importância da prevenção e controle dos mesmos ao longo da cadeia produtiva de carne. Atualmente existem algumas alternativas disponíveis comercialmente e outras ainda não consolidadas, que permitem diminuir a toxicidade das micotoxinas em questão. O uso de adsorventes por meio da indústria avícola comprova a real eficácia desta técnica, a qual permite a diminuição do prejuízo financeiro causado aos produtores. Futuramente, o uso concomitante de substâncias antioxidantes possibilitará melhores desempenho e bem-estar aos animais, além de garantir produtos confiáveis aos olhos do consumidor final. Porém, mais estudos são necessários para validar o uso de substâncias que exerçam os mesmos ou, até outros, bons efeitos frente às micotoxinas.

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Projeto Temático no2010/20895-4; Bolsa de Doutorado no2012/07726-4).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AK, T.; GÜLÇIN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chemo-Biological Interactions, v.174, p.27-37, 2008.

ABEL, S.; GELDERBLOM, W.C.A. Oxidative damage and fumonisin B1-induced toxicity in primary hepatocytes and rat liver in vivo. Toxicology, v.131, p.121-131, 1998.

ARAVIND, K. L.; PATIL, V. S.; DEVEGOWDA, G.; UMAKANTHA, B.; GANPULE, S. P. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters ein broilers. Poultry Science. v.82, p.571-576, 2003.
ASAO, T. Aflatoxins B1 e G1. Journal American Chemical Society.v.85, p.1706-1707, 1963.

BATATINHA, M. J. M.; SIMAS, M. M. S.; GÓRNIAK, S. L. Micotoxicoses. In: Spinosa, H. S.; Górniak, S. L.; Palermo-Neto, J. Toxicologia aplicada à medicina veterinária. (Editores). Barueri:Editora Manole. 2008.

BATINA, P. N. Perfil bioquímico de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxinacom ou sem a adição de montmorilonita sódica na dieta alimentar. 2004. 43f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
BORSA, A.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M.; MALLMANN, C. A.; LOPES, J. M.;

FERNANDES, R. R. Enzimas de função hepática na aflatoxicose aguda experimental em frangos de corte. Ciência Rural. v.28, n.04, p.587-590, 1998.

CLIFORD, J. I.; REES, K. R. Aflatoxin: a site of action in the rat liver cell. Nature. v. 209, p.312-313, 1966.

DEL BIANCHI, M.; OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J. L.; CORRÊA, B. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in broiler chickens. Poultry Science. v.84, p.1835-1840, 2005.

DENLI, M.; BLANDON, J. C.; GUYNOT, M. E.; SALADO, S.; PEREZ, J. F. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1.Poultry Science.v.88, p.1444-1451, 2009.

DIAZ, D. E.; SMITH, T. K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralization of mycotoxins. In: Diaz, D. E. The mycotoxin blue book. Nottingham:University Press, 2005. p.323-339.

EMEROLE, G. O.; NESKOVIC, N.; DIXON, R. L.The detoxification of aflatoxin B1 with glutathione in the rat. Xenobiotica. v.09, p.737-743, 1979.

EPSTEIN, J.; SANDERSON, I.R.; MACDONALD, T.T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. British Journal of Nutrition, v.103, p.1545-1557, 2010.

FERNANDEZ, A.; VERDE, M. T.; GASCON, M.; RAMOS, J.; GOMEZ, J.; LUCO, D. F.; CHAVEZ, G. Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin-containing feed. Avian Pathology. v.23, p.37-47, 1994.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira. v.43, n.01, p.61-68, 1997.

FRANCISCATO, C.Avaliação dos minerais séricos e da função hepática de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxina e submetidos a diferentes concentrações de montmorilonita sódica na dieta. 2006. 38f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

GALVANO, F.; PIVA, A.; RITIENI, A.; GALVANO, G. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. Journal of Food Protection. v.64, p.120-131, 2001.

GHOSH, R.C.; CHAUHAN, H. V. S.; ROY, S. Immunosupression in broilers under experimental toxocosis. Brazilian Veterinary Journal. v.146, p.457-462, 1990.

GLAHN, R. P.; BEERS, K. W.; BOTTJE, W. G.; WIDEMAN, R. F. JR.; HUFF, W. E.; THOMAS, W. Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium, and vitamin D metabolism. Journal of Toxicology and Environmental Health. v.34, p.309-321, 1991.

GOWDA, N.K.S.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; BERMUDEZ, A.J.; CHEN, Y.C. Efficacy of Turmeric (Curcuma longa), containing a known level of curcumin, and a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the adverse effects of aflatoxin in broiler chicks. Poultry Science. v.87, p.1125-1130, 2008.

GOWDA, N.K.S.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; BERMUDEZ, A.J.; CHEN, Y.C. Antioxidant efficacy of curcuminoids from turmeric (Curcuma longa L.) powder in broiler chickens fed diets containing aflatoxin B1. Brithish Journal of Nutrition. v.102, p.1629-1634, 2009.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage "in vivo" and in cell culture: how should you do it and what the results mean? British Journal of Pharmacology. v.142, n.02, p.231-255, 2004.

[IARC] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, v.82, p.601, 2002.

JEWERS, K. Mycotoxins and their effect on poultry production. Options Méditerranéennes, Série A, n.07, p.195-202, 1990.

KERR, M. G. Enzimologia clínica – enzimas plasmáticas no diagnóstico. In: Exames laboratoriais em medicina veterinária – bioquímica clínica e hematologia. São Paulo: Editora Roca. 2003.

KUBENA, L.F.; HARVEY, R. B.; HUFF, W. E.; CORRIER, D. E.; PHILLIPS, T. D.; ROTTHINGHAUS, G. E. Efficacy of a hidrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. Poultry Science. v.69, p.1078-1086, 1990a.

KUBENA, L.F.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; CORRIER, D. E.; HUFF, W. E. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hidrated sodium calcium aluminosilicate. Poultry Science. v.69, p.727-735, 1990b.

LEE, S.E.; CAMPBELL, B.C.; RUSSEL, J.; et al. Inhibitory effects of naturally occurring compounds on aflatoxin B1 biotransformation. Journal of Agriculture and Food Chemistry. v.49, p.5171-5177, 2001.

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

MACIEL, R. M.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M.; MARTINS, D. B.; ROSA, A. P.; EMANUELLI, M. P. Função hepática e renal de frangos de corte alimentados com dietas com aflatoxinas e clinoptilolita natural. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v.42, n.09, p.1221-1225, 2007.

MAHESHWARI, R.K.; SINGH, A.K.; GADDIPATI, J. et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review. Life Sciences. v.78, p.2081-2087, 2006.

MAIORKA, A.; MACARI, M. Absorção de minerais. In: Macari, M.; Furlan, R. L.; Gonzales, E. (Org.) Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal:FUNEP/UNESP, 2002. p.167-174.

MEYER, D. J. et al. Veterinary laboratory medicine, interpretation and diagnosis. Philadelphia: W. B. Saunders. 1992. 350 p.

NAYAK, S.; SASHIDHAR, R.B. Metabolic intervention of aflatoxin B1 toxicity by curcumin. Journal of Ethnopharmacology. v.127, p.641-644, 2010.

NEEFF, D. V.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; BERMUDEZ, A. J.; DAKOVIC, A.; MURAROLLI, R. A.; OLIVEIRA, C. A. F. in vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B1. Poultry Science. v.92, p.131-137, 2013.

OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? Veterinary Medicine. v.85, p.89-94,1990.

PHILLIPS, T. D.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; TAYLOR, D. R.; HEIDELBAUGH, N. D. Hydrated sodium calcium aluminosilicate. A high affinity sorbent for aflatoxin. Poultry Science. v.67, p.243-247, 1988.

PIER, A. C.; CYSENSKY, S. L. J.; RICHARD, J. L. Mycotoxins as a veterinary problem. P. 745-750. In: Rodricks, J. V.; Hesseltine, C. W. L.; MEHLMAN, M. (Org.). Mycotoxins in human and animal health. Illinois: Pathox Publishers, 1973. p.745-750.

RAWAL, S.; KIM, J.E.; COULOMBE JR., R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. Research in Veterinary Science. v.89, p.325-331, 2010.

ROSA, C. A. R.; MIAZZO, R.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; CHIACCHIERA, S. M.; FERRERO, S.; SAENZ, M.; CARVALHO, E. C. Q.; DALCERO, A. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. Poultry Science. v.80, p.139-144, 2001.

ROSTAGNO, H. S. Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição dos alimentos e exigências nutricionais. Viçosa:UFV. 2011. 252p.

SANTIN, E. Micotoxicoses. In: Berchieri Júnior, A.; Macari, M. (Org.). Doenças das aves. Campinas:FACTA, 2000. p.379-388.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. Revista Brasileira de Ciência Avícola. v.02, n.01, 2000.

SCHIMIDT, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C. Patologia Clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola- revisão. Archives of Veterinary Science. v.12, n.03, p.09-20, 2007.

SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; STUBBLEFIELD, R. D. et al. Production of aflatoxin on rice. Applied Microbiology. v.15, p 425-428, 1966.

SONI K.B.; LAHIRI, M.; CHACKRADEO, P. et al. Protective effect of food additives on aflatoxin-induced mutagenicity and hepatocarcinogenicity. Cancer Letters. v.115, p.129-133, 1997.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à medicina veterinária. Barueri: Ed. Manole, 2008.

SRIVASTAVA, R. M.; SINGH, S.; DUBEY, SHIV. K. et al. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. International Immunopharmacology. v.11, p.331-341, 2011.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Enzimas. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. (Org.). Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária. Rio de Janeiro:GuanabaraKoogan, 2011.

SURAI, P.F. Natural antioxidants and mycotoxins. In: SURAI, P. F. (Org.) Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p.455-509.

TEDESCO, D.; STEIDLER, S.; GALLETTI, S.; TANENI, M.; SONZOGNI, O.; RAVAROTTO, L. Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. Poultry Science. v.83, p.1839-1843, 2004.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Efeitos da aflatoxina B1 e fumonisina B1 sobre os níveis séricos de aspartatoamino-transferase e proteína total de frangos de corte. Arquivos do Instituto Biológico. v.72, n.02, p.185-189, 2005.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B1 e fumonisina B1. Ciência Rural. v.36, n.03, p.924-929, 2006.

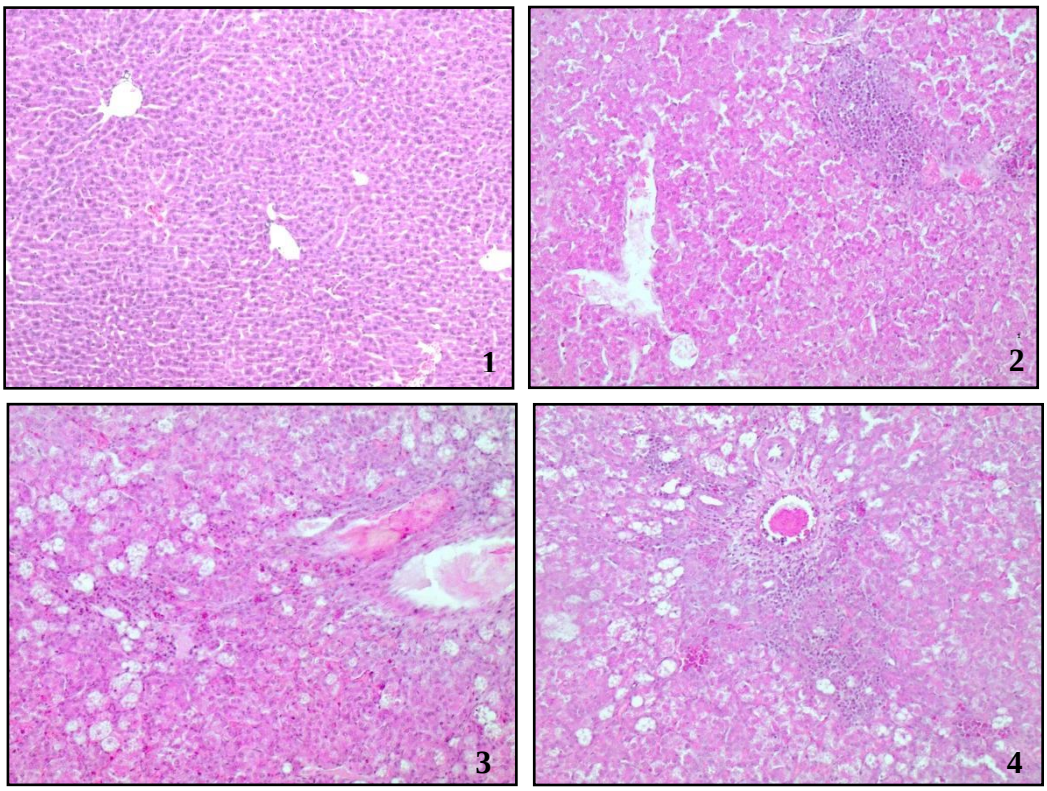
VICAM, L. P. Aflatest®. Instruction Manual:Watertown, M. A., U.S.A.:Vicam, 1999. Modificações na derivatização de acordo com Scott, P. M. Natural Poisons. In: Heldrich, K. (Ed.). Official Methods of Analysis of the Associations of Official Analytical Chemists. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC); 1990. p.1184-1213.

YARRU, L.P.; SETTIVARI, R.S.; GOWDA, N.K.S.; ANTONIOU, E.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of turmeric (Curcuma longa) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems of broiler chicks fed aflatoxin. Poultry Science. v.88, p.2620-2627, 2009.

WYATT, R.D. Poultry. In: SMITH, J.E.; HENDENSON, R.S. (Org.). Mycotoxins and animal foods. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.553-605.

APÊNDICE A. Imagens ilustrativas das lesões histopatológicas em fígado e rim (gentilmente cedidas por Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP).

FÍGADO



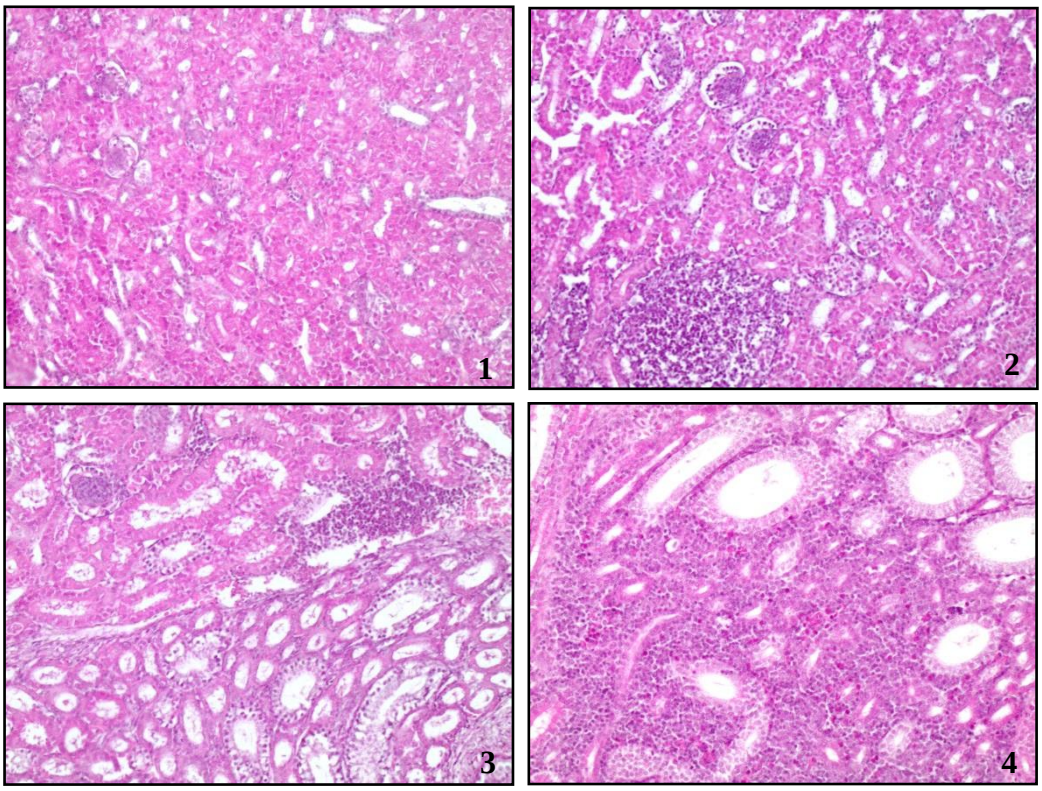
0 = Fígado com arquitetura preservada, sem proliferação/ativação de linfócitose sem degeneração hepatocelular;

1 = Fígado com arquitetura preservada, com proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração hepatocelular;

2 = Fígado com arquitetura pouco distorcida, com proliferação/ativação de linfócitos e degeneração hepatocelular;

3 = Fígado com arquitetura distorcida, moderada proliferação/ativação de linfócitos e intensa degeneração hepatocelular.

RIM



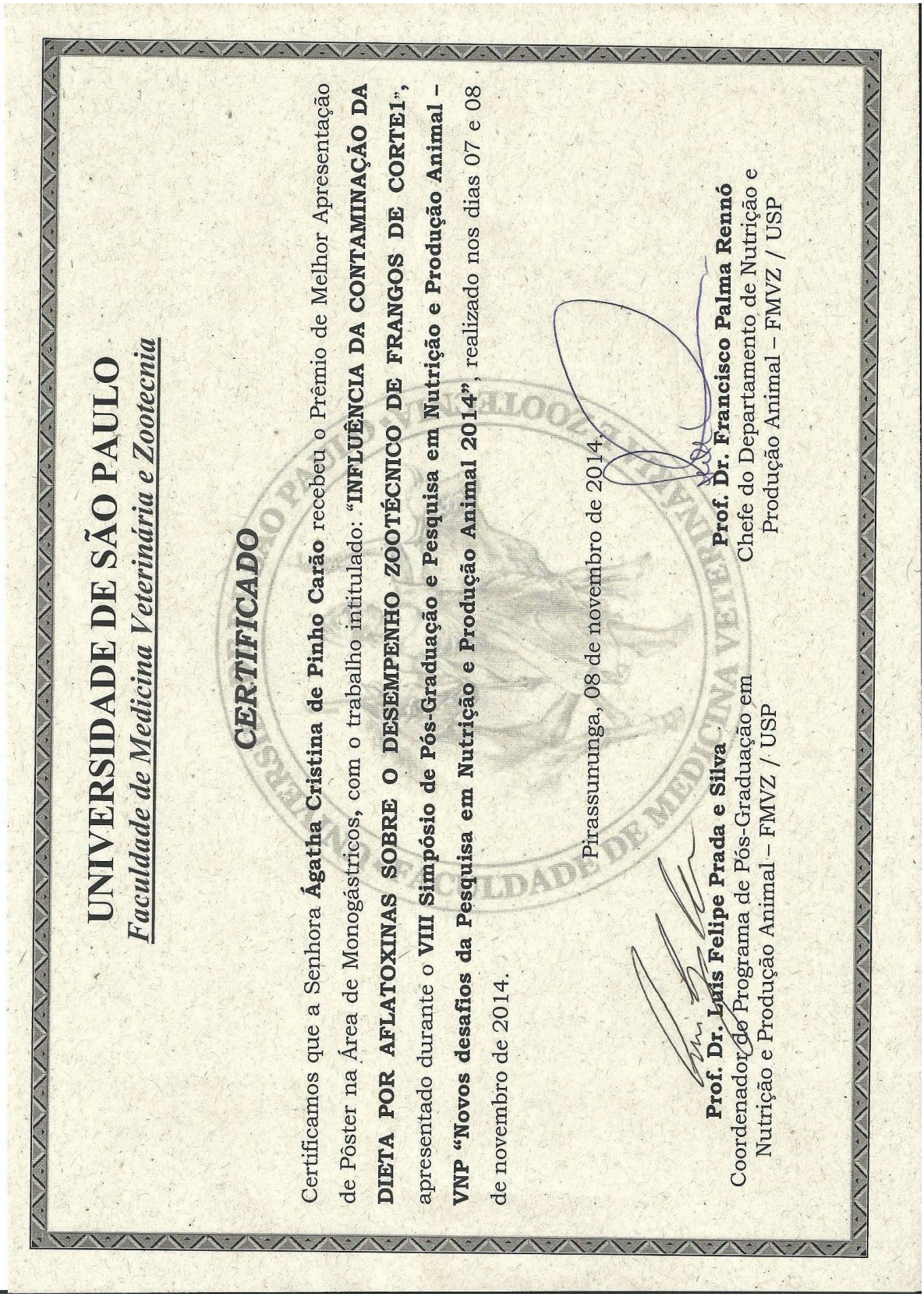
0= Rim com glomérulos preservados, sem proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração tubular;

1 = Rim com glomérulos preservados, com proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração tubular;

2 = Rim com glomérulos preservados, com proliferação/ativação de linfócitos e degeneração tubular;

3 = Rim com glomérulos preservados, intensa proliferação/ativação de linfócitos e degeneração tubular.

APÊNDICE B. Prêmio recebido pela Melhor Apresentação de Pôster em Simpósio Nacional.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

CERTIFICADO

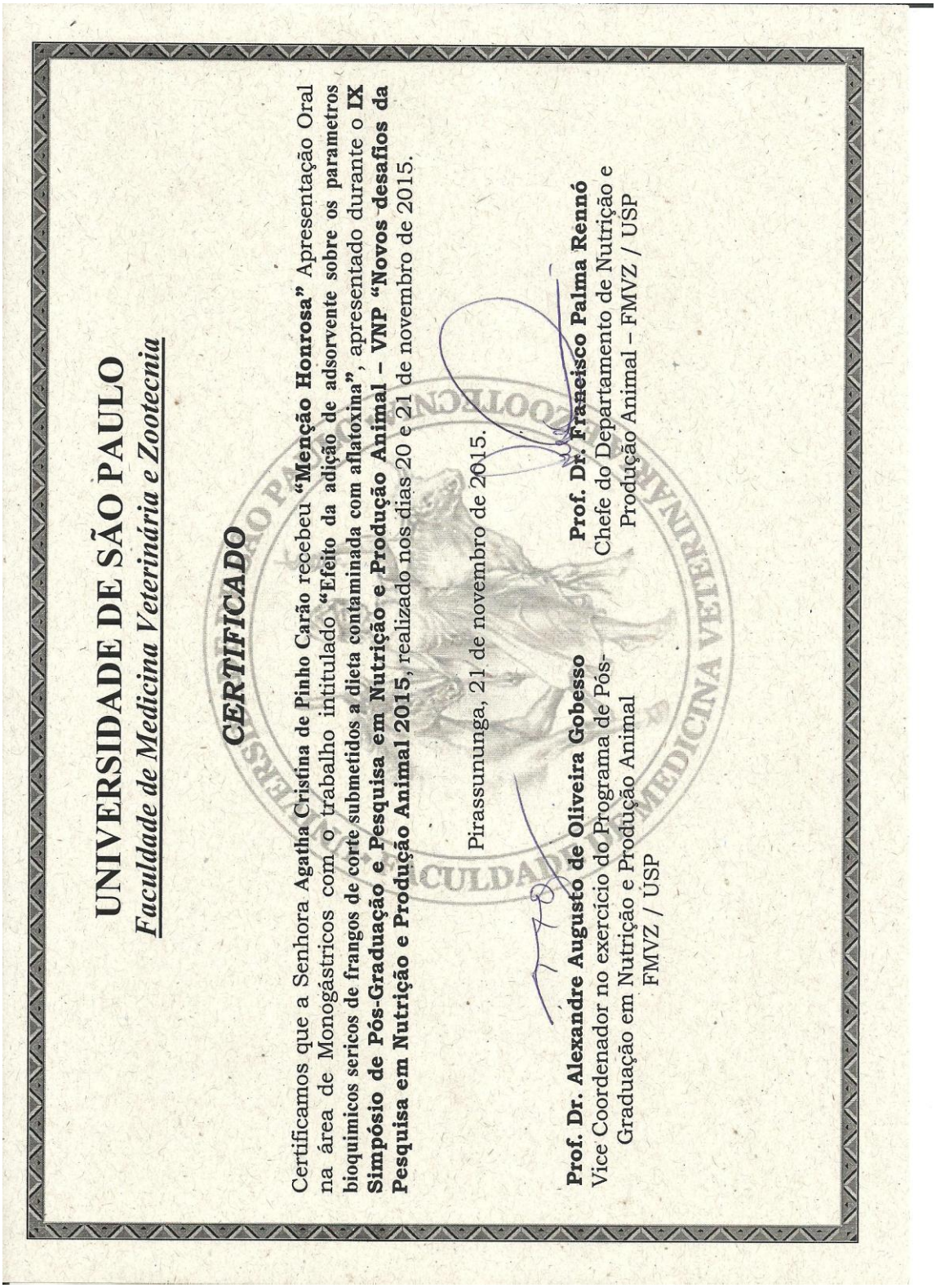
Certificamos que a Senhora **Ágatha Cristina de Pinho Carão** recebeu o Prêmio de Melhor Apresentação de Pôster na Área de Monogástricos, com o trabalho intitulado: "**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO DA DIETA POR AFLATOXINAS SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE FRANGOS DE CORTE1**", apresentado durante o **VIII Simpósio de Pós-Graduação e Pesquisa em Nutrição e Produção Animal – VNP "Novos desafios da Pesquisa em Nutrição e Produção Animal 2014"**, realizado nos dias 07 e 08 de novembro de 2014.

Pirassununga, 08 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Luís Felipe Prada e Silva
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal – FMVZ / USP

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó
Chefe do Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ / USP

APÊNDICE C. Menção honrosa recebida por Apresentação Oral de trabalho em Simpósio Nacional.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

CERTIFICADO

Certificamos que a Senhora **Agatha Cristina de Pinho Carão** recebeu **"Menção Honrosa"** Apresentação Oral na área de Monogástricos com o trabalho intitulado **"Efeito da adição de adsorvente sobre os parametros bioquimicos sericos de frangos de corte submetidos a dieta contaminada com aflatoxina"**, apresentado durante o **IX Simpósio de Pós-Graduação e Pesquisa em Nutrição e Produção Animal – VNP "Novos desafios da Pesquisa em Nutrição e Produção Animal 2015**, realizado nos dias 20 e 21 de novembro de 2015.

Pirassununga, 21 de novembro de 2015.

Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso
Vice Coordenador no exercício do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal
FMVZ / USP

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó
Chefe do Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ / USP