UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

POLLYANA CRISTINA MAGGIO DE CASTRO SOUTO

**Efeitos da administração prolongada de baixos níveis de
fumonisina B₁ em suínos: avaliação de parâmetros de
desempenho, histologia de órgãos, resposta imunológica e
resíduos em materiais biológicos**

Pirassununga

2015

POLLYANA CRISTINA MAGGIO DE CASTRO SOUTO

Efeitos da administração prolongada de baixos níveis de fumonisina B₁ em suínos: avaliação de parâmetros de desempenho, histologia de órgãos, resposta imunológica e resíduos em materiais biológicos

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Zootecnia – Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

S728e Souto, Pollyana Cristina Maggio de Castro
Efeitos da administração prolongada de baixos níveis de fumonisina B₁ em suínos: avaliação de parâmetros de desempenho, histologia de órgãos, resposta imunológica e resíduos em materiais biológicos / Pollyana Cristina Maggio de Castro Souto. -- Pirassununga, 2015.
97 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.
1. FB₁ 2. Níveis baixos 3. Suínos 4. Efeitos tóxicos 5. Análises. I. Título.

Dedico esta Tese...

...a uma pessoa muito especial que, mesmo distante, esteve ao meu lado nas alegrias das conquistas e principalmente nas dificuldades encontradas. À você, meu esposo Milton, dedico este trabalho por todo incentivo, toda paciência e toda compreensão...

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelo discernimento, pela coragem, pela força concedida e por propor novos caminhos a seguir.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, orientador desta Tese, que aceitou o desafio de me orientar em uma área totalmente nova para mim e conceder a oportunidade de expandir meus estudos.

À Dra. Alessandra Vincenzi Jager, pela amizade e confiança, ensinamentos, pela chance de trabalharmos juntas e principalmente pela persistência de resolução de problemas, em todas as difíceis ocasiões na padronização das metodologias.

Ao Prof. Dr. Fernando Gustavo Tonin, pelo auxílio na otimização dos parâmetros da CLAE-EM/EM.

À Especialista de Laboratório do Laboratório de Microbiologia de Micotoxinas de Alimentos (LMMA) da FZEA, Roíce Eliana Rosim, pela amizade, auxílio, dedicação e paciência.

Aos colegas de Pós-Graduação do LMMA: Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin, Dra. Fernanda Bovo, às doutorandas Diane de Neeff, Sarah Lee e Ágatha P. Carão, à mestranda Bruna L. Gonçalves, aos alunos de Iniciação Científica Jéssica Matzner, Danilo Pompeu e Matheus Tres, e às estagiárias Camille de França, Gabriela Zambelli, Ana Laura Franzini e Aline Alves, que de alguma maneira contribuíram indiretamente para a realização desta Tese.

Às amigas “irmãs” do LMMA Keliani Bordin e Mayra Carraro Di Gregorio, parceiras de sempre em todos os momentos, pela amizade e grande apoio, e por me fazer redescobrir o verdadeiro valor do trabalho em equipe.

À dona Maria de Lourdes Almeida, auxiliar de limpeza do laboratório, pela compreensão e quem sempre colaborou quando precisei trabalhar nos momentos mais inoportunos.

À Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho e ao Dr. Fernando Silva Ramalho, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/FMRP – USP/Departamento de Patologia, pelas análises histológicas e esclarecimentos nestes estudos, pela gentileza por enviar as imagens de histopatologia em órgãos e por toda disposição em me auxiliar.

À Dra. Isabelle Oswald, pela receptividade e valiosa orientação durante o meu Doutorado-Sanduíche, no *Institute National de la Recherche Agronomique* (INRA) – Toulouse – Fr.

À toda a Equipe 5 da *Toxicologie Alimentaire* (ToxiAlim) do INRA, em especial aos técnicos de laboratório Anne-Marie Cossalter, Philippe Pinton e Joëlle Laffitte, pela acolhida, aprendizagem, auxílio e pela organização exemplar de equipe no planejamento e execução dos experimentos.

Aos meus pais Ana Maria e Arturo, e irmãos Tatiana, Arturo e Felipe, mesmo distantes, por todas as formas de incentivo e apoio incondicionais.

A todos meus amigos que repartiram comigo esta minha caminhada, vivenciaram, torceram e puderam compreender minha ausência em muitos momentos... a amizade de vocês é muito importante para mim!

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

*A certeza de que seremos interrompidos antes
de terminar...*

Façamos da interrupção um caminho novo.

Da queda, um passo de dança.

Do medo, uma escada.

Do sonho, uma ponte.

Da procura... um encontro.”

Fernando Sabino

*“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões
falham ao esperar da experiência aquilo que ela não é
capaz de oferecer”.*

Leonardo Da Vinci

RESUMO

SOUTO, P.C.M.C. **Efeitos da administração prolongada de baixos níveis de fumonisina B₁ em suínos: Avaliação de parâmetros de desempenho, histologia de órgãos, resposta imunológica e resíduos em materiais biológicos, 2015.** Tese (Doutorado)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

A fumonisina B₁ (FB₁) é um metabólito secundário produzido principalmente por *Fusarium verticillioides* em diversos tipos de alimentos, principalmente o milho, o qual constitui a base para composição de rações para várias espécies de animais domésticos. A FB₁ é particularmente tóxica para suínos, cujas manifestações clínicas são evidentes em animais expostos a altas concentrações de FB₁ na ração (em geral, acima de 30 mg/kg). No entanto, são escassos os estudos sobre os efeitos da FB₁ em suínos alimentados com rações contendo baixas concentrações de fumonisinas, as quais são mais prováveis de serem encontradas em condições de campo. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da exposição de suínos a baixos níveis de FB₁ na ração, durante 28 dias, sobre o ganho de peso, consumo de ração, peso relativo de órgãos e aspectos histológicos do baço, fígado, pulmões, rins, coração e esôfago, a resposta imune e a determinação do resíduo de FB₁ em materiais biológicos como plasma, urina e fezes. Vinte e quatro suínos foram distribuídos em 4 grupos experimentais e alimentados com rações contendo 0 mg (controle), 3,0 mg, 6,0 mg ou 9,0 mg FB₁/kg de ração. As diferentes dietas não afetaram ($P>0,05$) o ganho de peso e nem o peso relativo dos órgãos analisados. Não foram constatadas lesões macroscópicas ou histopatológicas no esôfago, rins, coração e fígado. No entanto, foram observadas lesões histopatológicas nos pulmões de todos os suínos alimentados com rações contaminadas com fumonisinas, indicando que nenhum dos níveis de FB₁ usados no experimento poderia ser considerado como seguro para suínos. Ainda, a FB₁ não alterou as concentrações de imunoglobulinas totais, por outro lado, diminuiu a resposta imunológica dos suínos vacinados com Stellamune®, como também reduziu a expressão de citocinas pro-inflamatórias. As concentrações plasmáticas de FB₁ residual encontradas permaneceram constantes ao longo dos 28 dias de exposição, nos suínos que se alimentaram com 3,0 mg FB₁/kg de ração. Por outro lado, os níveis de FB₁ no plasma variaram de $400,3 \pm 19,6$ pg/mL a $260,6 \pm 61,6$ pg/mL nos animais expostos a 6,0 mg FB₁/kg de ração, e de $1127 \pm 494,5$ pg/mL a $460,7 \pm 69,5$ pg/mL nos animais expostos a 9,0 mg FB₁/kg de ração, entre os dias 7 e 28 dias de exposição, respectivamente. Em relação aos níveis residuais de FB₁ eliminados na urina, embora com variações ao longo dos 28 dias de exposição, foram encontrados níveis que variaram de $28,53 \pm 17,9$ ng/mL a $16,1 \pm 22$ ng/ml

na urina dos suínos expostos com 3,0 mg FB₁/kg de ração, de $47,4 \pm 26,4$ ng/mL a $24,12 \pm 26$ ng/mL nos suínos expostos a 6,0 mg FB₁/kg de ração e de $75,05 \pm 55,2$ ng/mL a $18,9 \pm 4,4$ ng/mL nos suínos expostos a 9,0 mg FB₁/kg de ração. Os níveis de FB₁ residual eliminados nas fezes permaneceram constantes nos animais expostos com 3,0 mg FB₁/kg de ração entre $2,26 \pm 1,6$ mg/kg e $3,25 \pm 2,26$ mg/kg, variando de $5,18 \pm 1,6$ mg/kg a $10,6 \pm 2,3$ mg/kg, e de $8,16 \pm 6,8$ mg/kg a $13,8 \pm 4,8$ mg/kg, nos suínos expostos a 6,0 mg FB₁/kg de ração e 9,0 mg FB₁/kg de ração, respectivamente. Os resíduos de FB₁ encontrados nas fezes decaíram a partir de 21 dias de exposição a FB₁ em suínos expostos a 6,0 mg FB₁/kg de ração, porém, estes níveis permaneceram constantes entre o dia 21 e 28 em suínos expostos 9,0 mg FB₁/kg de ração, indicando uma baixa absorção da toxina em todos os tratamentos. As correlações entre a FB₁ eliminada nas fezes (mg/kg) e os níveis de FB₁ ingeridos por suínos (mg FB₁/animal) foram significativas ($P < 0,05$) em todos os dias. Foram observadas correlações significativas ($P < 0,05$) entre a ingestão de FB₁ nos diferentes tratamentos e as concentrações de FB₁ na urina e no plasma aos 7 e 28 dias, respectivamente. Deste modo, a quantificação de FB₁ na urina e plasma é adequada como biomarcador da ingestão de baixos níveis FB₁ no início (7 dias) e no final (28 dias) do período de intoxicação, respectivamente. São necessários novos estudos sobre os mecanismos de ação tóxica da FB₁ em suínos, sobretudo em condições de exposição prolongada a níveis baixos de contaminação na ração.

Palavras-chave: FB₁, níveis baixos, suínos, efeitos tóxicos; análise.

ABSTRACT

SOUTO, P.C.M.C. **Effects of prolonged administration of low levels of fumonisin B₁ in pigs: evaluation of performance parameters, histology of organs, immune response and residues in biological materials, 2015.** Tese (Doutorado)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Fumonisin B₁ (FB₁) is a secondary metabolite produced mainly by *Fusarium verticillioides* in various types of foods, particularly corn, which is the basis for various feed composition for domestic animals. FB₁ is particularly toxic to swine, which clinical manifestations are clearly observed in animals exposed to high concentrations of FB₁ in the diet (generally above 30 mg/kg). However, there are few studies on the effects of FB₁ in pigs fed diets containing low concentrations of fumonisin, which are more probable to be found in field conditions. The objective of the study was to evaluate the effects of piglets exposed to low levels of FB₁ in the feed for 28 days on weight gain, feed intake, relative weight of organs and histological aspects of the spleen, liver, lungs, kidneys, heart and esophagus, immune response and the determination of FB₁ residue in biological materials such as plasma, urine and feces. Twenty-four pigs were divided into 4 experimental groups and fed diets containing 0 mg (control), 3.0 mg, 6.0 mg or 9.0 mg FB₁/kg diet. The different diets did not affect ($P > 0.05$) weight gain or the relative weight of the analyzed organs. Macroscopic and microscopic lesions were not observed in the esophagus, liver, kidneys and heart. However, histopathological lesions were observed in the lungs of all pigs fed diets contaminated with fumonisin, indicating that none of FB₁ levels used in the experiment could be considered as safe for pigs. Furthermore, the dietary FB₁ did not alter the concentrations of total immunoglobulins, although it decreased the immune response of pigs vaccinated with Stellamune® and also reduced the expression of pro-inflammatory cytokines. The FB₁ concentrations in plasma of pigs fed 3.0 mg FB₁/kg diet remained constant over the 28 days of exposure. Moreover, FB₁ plasma levels ranged from 400.3 ± 19.6 pg/mL to 260.6 ± 61.6 pg/mL in animals exposed to 6.0 mg FB₁/kg of diet and $1,127 \pm 494.5$ pg/mL to 460.7 ± 69.5 pg/mL in animals exposed to 9.0 mg FB₁/kg diet, between 7 and 28 days of exposure, respectively. In relation to residual FB₁ eliminated in urine, although a variation over the 28 days of exposure was observed, the levels ranged from 17.9 ± 28.53 ng/mL to 16.1 ± 22 ng/mL in urine of pigs exposed with 3.0 mg FB₁/kg, 47.4 ± 26.4 ng/mL to 24.12 ± 26 ng/mL in pigs exposed to 6.0 mg FB₁/kg, and 75.05 ± 55.2 ng/mL to 18.9 ± 4.4 ng/mL in pigs exposed to 9.0 mg FB₁/kg of feed. Residual FB₁ levels eliminated in the feces remained constant in animals exposed to 3.0 mg FB₁/kg diet, with values of 2.26

± 1.6 mg/g to 3.25 ± 2.26 mg/kg; in pigs fed 6.0 or 9.0 mg FB₁/kg feed, the levels found in feces were 5.18 ± 1.6 mg/kg to 10.6 ± 2.3 mg/kg and 8.16 ± 6.8 mg/kg to 13.8 ± 4.8 mg/kg, respectively. The FB₁ residues found in feces decreased from 21 days in pigs exposed to 6.0 mg FB₁/kg of feed; however, these levels remained constant between 21 and 28 in pigs exposed to 9.0 mg FB₁/kg of feed, indicating a low absorption of toxin in all treatments. Significant ($P < 0.05$) correlations were found between the FB₁ excreted in feces (mg/kg) and the FB₁ ingested (mg FB₁/animal). The correlations between the ingested FB₁ in the different treatments and the residual FB₁ levels in urine or plasma were also significant ($P < 0.05$) on days 7 and 28 of intoxication, respectively. Thus the quantification of FB₁ in urine or plasma is suitable as biomarker of ingestion of low levels of FB₁ at the beginning (7 days) or at the end (28 days) of the intoxication period, respectively. Further studies are needed on the mechanisms of toxic action of FB₁ in pigs especially under conditions of prolonged exposure to low levels of contamination in the feed.

Keywords: FB₁, low levels, pigs, toxic effects; analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da fumonisina B ₁ , B ₂ , B ₃	5
Figura 2. Estrutura da fumonisina B ₁ e das bases esfingóides.....	6
Figura 3. Fluxograma obtido de procedimento de extração para determinação de FB ₁ em amostras de plasma de suínos.....	27
Figura 4. Fluxograma obtido de procedimento de extração para determinação de FB ₁ em amostras de urina de suínos.....	28
Figura 5. Fluxograma obtido de procedimento de extração para determinação de FB ₁ em amostras de fezes de suínos.....	29
Figura 6. Ganho de peso médio, consumo médio e conversão alimentar média. Os suínos foram intoxicados com rações contaminadas com 3,0, 6,0 ou 9,0 mg FB ₁ /kg de ração durante 28 dias de exposição.....	30
Figura 7. Efeito histopatológico da FB ₁ sobre os pulmões. Os suínos receberam uma ração controle 0 mg FB ₁ /kg de ração ou rações contaminadas com 3,0, 6,0, ou 9,0 mg FB ₁ /kg de ração. As lesões foram estabelecidas após exames histopatológicos de acordo com o grau das lesões. (A) zero. (B) lesão leve (+). (C) lesão moderada (++). (D) lesão grave (+++). HE, obj. 20x (lado esquerdo) e 40x (lado direito)	34
Figura 8. Exame histopatológico de outros órgãos avaliados. (A) esôfago, (B) rim, (C) coração e (D) fígado, sem lesões identificadas induzidas pelo efeito tóxico da FB ₁ . Os suínos receberam uma ração controle 0 mg FB ₁ /kg de ração ou rações contaminadas com 3,0, 6,0, ou 9,0 mg FB ₁ /kg de ração. HE, obj. 20x (lado esquerdo) e 40x (lado direito)	35
Figura 9. Efeito da FB ₁ na produção de imunoglobulina específica. Os suínos foram imunizados com <i>M. hyopneumoniae</i> (vacina Stellamune [®]) no 3º e no 10º dia após a exposição a FB ₁ . O sangue foi coletado e os níveis plasmáticos de IgG-anti- <i>M. hyopneumoniae</i> foram determinados por ELISA. Os resultados são expressos em unidade arbitrária (UA). Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento e *P<0,05 dos tratamentos comparados com o controle.....	38
Figura 10. Efeito da FB ₁ na expressão gênica (RNAm) de citocinas pró-inflamatórias, expressa em unidades arbitrárias (UA), de fragmentos de jejuno de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com FB ₁ após 28 dias de exposição Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento e *P<0,05 dos tratamentos comparados com o controle.....	39

Figura 11. Evolução dos níveis detectáveis de FB ₁ no plasma suíno com os níveis de contaminação das rações (mg FB ₁ /kg de ração) durante 28 dias de exposição.....	42
Figura 12. Cromatograma de amostra de plasma (pg/mL) de suíno expostos naturalmente a FB ₁ . Determinação de FB ₁ pelo método CLAE-EM/EM da amostra do suíno 95J14.....	43
Figura 13. Evolução dos níveis detectáveis de FB ₁ na urina de suínos com os níveis de contaminação das rações (mg FB ₁ /kg de ração) durante 28 dias de exposição.....	44
Figura 14. Cromatograma de amostra de urina (ng/mL) de suínos expostos naturalmente a FB ₁ . Determinação de FB ₁ pelo método CLAE-EM/EM da amostra do suíno 81J14.....	45
Figura 15. Evolução dos níveis detectáveis de FB ₁ nas fezes de suínos com os níveis de contaminação das rações (mg FB ₁ /kg de ração) durante 28 dias de exposição.....	46
Figura 16. Cromatograma de amostra de fezes (mg/kg) de suínos expostos naturalmente a FB ₁ . Determinação de FB ₁ pelo método CLAE-EM/EM da amostra do suíno 88J7.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção mundial de carne suína.....	9
Tabela 2. Consumo de milho por segmento no Brasil	11
Tabela 3: Níveis de fumonisinas detectados em amostras de milho e derivados para rações animais no Brasil.....	12
Tabela 4. Composição da ração experimental.....	18
Tabela 5. Transições MRM empregadas para a quantificação e confirmação de fumonisina B ₁ por espectrometria de massas.....	25
Tabela 6. Composição do gradiente empregada na análise cromatográfica de FB ₁	25
Tabela 7. Peso corporal, ganho de peso e consumo de ração de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B ₁ (FB ₁) após 28 dias de exposição.....	30
Tabela 8. Ingestão semanal estimada de FB ₁ nos diferentes grupos experimentais de suínos.....	31
Tabela 9. Ingestão semanal estimada de FB ₁ em mg/kg de peso corpóreo nos diferentes grupos experimentais de suínos.....	31
Tabela 10. Peso médio (absoluto) de órgãos de leitões alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B ₁ (FB ₁) após 28 dias de exposição.....	32
Tabela 11. Pesos relativos de órgãos de leitões alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B ₁ (FB ₁) após 28 dias de exposição.....	32
Tabela 12. Efeito da FB ₁ na concentração plasmática de IgA (mg/mL) total de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com FB ₁ após 28 dias de exposição.....	37
Tabela 13. Efeito da FB ₁ na concentração plasmática de IgG (mg/mL) total de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com FB ₁ após 28 dias de exposição.....	37
Tabela 14. Resultados de validação do método analítico para determinação de FB ₁ em plasma (pg/ml) de suíno.....	40

Tabela 15. Resultados de validação do método analítico para determinação de FB ₁ em urina (ng/ml) de suíno.....	40
Tabela 16. Resultados de validação do método analítico para determinação de FB ₁ em fezes (mg/kg) de suíno.....	41
Tabela 17. Níveis plasmáticos de FB ₁ (pg/mL) de leitões alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B ₁ (FB ₁) após 28 dias de exposição.....	42
Tabela 18. Níveis urinários de FB ₁ (ng/mL) de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B ₁ (FB ₁) após 28 dias de exposição.....	44
Tabela 19. Níveis de FB ₁ nas fezes (mg/kg) de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B ₁ (FB ₁) após 28 dias de exposição.....	46
Tabela 20. Correlação de Pearson obtida entre os dados dos níveis ingeridos estimados de FB ₁ , níveis de FB ₁ detectados no plasma, na urina e nas fezes, bem como a expressão gênica de citocinas e concentrações plasmáticas de imunoglobulina específica.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP ₁	Aminopentol 1
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
cDNA	DNA complementar
CF	Concentração fecal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CP	Concentração plasmática
CU	Concentração urinária
CV	Coefficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Expressão de citocinas
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPS	Edema Pulmonar Suíno
ESI	<i>Eletrospray Ionisation</i>
EU	<i>European Union</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FB ₁	Fumonisin B ₁
FB ₂	Fumonisin B ₂
FB ₃	Fumonisin B ₃
g	grama
h	hora
HE	Hematoxilina-eosina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

HFB ₁	Fumonisina B ₁ hidrolisada
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-1-β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IU	<i>international unit</i>
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
CLAE-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas
kg	kilograma
L	litro
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
M	molar
m/z	Relação massa/carga
MAPA	Ministério de Estado da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MeOH	metanol
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
MRM	<i>Multi Reaction Monitoring</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massas
ND	Não Detectado
ng	nanograma
NIE	Níveis ingeridos estimados
nm	nanômetro

OD	Densidade óptica
p	p-valor
p.c.	peso corpóreo
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg	picograma
PHFB ₁	FB ₁ parcialmente hidrolisada
PPIA	Peptidilprolil Isomerase A
ppm	parte por milhão
PTFE	Politetrafluoretileno
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
r	coeficiente de Correlação de Pearson
r ²	coeficiente de Determinação
RPL 32	Proteína ribossomal 60S L32
rpm	Rotações por minuto
s	segundo
S/R	sinal/ruído
Sa	Esfinganina
Sa/So	Relação Esfinganina/Esfingosina
SIM	Selected Ion Monitoring
So	Esfingosina
SPE	Colunas em fase sólida
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
UA	Unidades arbitrárias
UE	União Européia
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
V	volts
v/v	volume/volume
°C	graus Celsius
ΔCt	<i>delta cycle threshold</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Fumonisinas.....	4
3.1.2 Propriedades toxicológicas.....	5
3.1.3 Aspectos toxicocinéticos e biomarcadores de exposição.....	7
3.2 Aspectos históricos e situação atual da produção de suínos.....	9
3.3 Alimentação de suínos.....	10
3.3.1 Milho.....	10
3.3.2 Ocorrência de fumonisinas destinados ao consumo animal.....	12
3.3 Determinação de FB ₁ por CLAE-EM/EM – considerações gerais.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Animais.....	17
4.2 Rações experimentais.....	17
4.2.1 Fabricação das rações e adição de fumonisina FB ₁	18
4.3 Exposição prolongada à fumonisina B ₁	19
4.3.1 Delineamento experimental.....	19
4.3.2 Coleta de amostras.....	20
4.3.3 Avaliação histopatológica.....	20
4.4 Avaliação da resposta imunológica de suínos sob os efeitos da FB ₁	21
4.4.1 Dosagem de imunoglobulinas totais e específica.....	21
4.4.2 Determinação da expressão de mRNA para citocinas por PCR em tempo real.....	22
4.4.2.1 Amostras.....	22
4.4.2.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)	22
4.5 Determinação de FB ₁ em materiais biológicos.....	23
4.5.1 Reagentes e equipamentos.....	23
4.6 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	24
4.6.1 Parâmetros de separação cromatográfica.....	25
4.6.2 Validação dos métodos cromatográficos.....	26
4.7 Extração de FB ₁ em plasma.....	27
4.8 Extração de FB ₁ em urina.....	28
4.9 Extração de FB ₁ em fezes.....	28
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
6. RESULTADOS.....	30

6.1 Desempenho animal e exame histopatológico.....	30
6.2 Efeitos da FB1 na resposta imunológica de suínos.....	36
6.2.1 Imunoglobulinas totais (IgA e IgG) e específica (IgG-anti- <i>M. hyopneumoniae</i>).....	36
6.2.2 Expressão gênica das citocinas IL-6, IL-8 e IL-1-β.....	38
6.3 Validação dos métodos analíticos para determinação de FB ₁ por CLAE-EM/EM.....	40
6.4 Determinação de FB1 em amostras biológicas.....	41
6.4.1 Plasma.....	41
6.4.2 Urina.....	43
6.4.3 Fezes.....	45
6.4.4 Correlações.....	47
 7. DISCUSSÃO.....	 49
 8. CONCLUSÕES.....	 58
 9. REFERÊNCIAS.....	 59
 Anexo A.....	 70
Anexo B.....	71

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos com diferentes estruturas e atividades biológicas (DIAZ, 2005). Essas toxinas são encontradas em diferentes regiões e predominam em climas tropicais e subtropicais como encontrado no Brasil, nos quais o desenvolvimento fúngico é favorecido pelas condições ambientais como temperatura e umidade (MALLMANN, 2007).

Dentre as micotoxinas consideradas de maior relevância clínica e econômica, as fumonisinas estão associadas com a contaminação do milho (base da dieta animal) e com a indução de efeitos tóxicos em animais (DILKIN, 2002). A fumonisina B₁ (FB₁) além de ser a mais abundante é a mais tóxica entre as fumonisinas, representando cerca de 70% da contaminação total dos alimentos e rações naturalmente contaminados (MALLMANN et al., 2001).

Os cereais e as sementes oleaginosas são frequentemente afetados durante a colheita, armazenamento e processamento, ocasionando perdas econômicas, como contaminação de produtos agrícolas, perda de produtividade animal, custos indiretos em sistemas de controle e remoção da toxina (SABINO, 1996). O milho é um dos produtos mais afetados sendo a base das rações para todos os tipos de criação. Nesse sentido, a contaminação por fumonisinas representa um grave problema no país, considerando o Brasil como o maior terceiro produtor mundial de milho (depois dos Estados Unidos e da China), com uma produção anual em 2012 de 71,5 milhões de toneladas, representando em torno de 8,31% do total da produção mundial (USDA, 2013). Além disso, estudos realizados anteriormente no Brasil demonstraram a elevada incidência de contaminação por fumonisinas no milho e derivados, chegando a 100% de incidência em rações destinadas ao consumo animal (SOUZA et al., 2013).

A ocorrência de micotoxinas no milho pode levar a perda da produtividade animal, especialmente aqueles não ruminantes (SANTURIO, 2007). Os suínos estão entre os animais mais susceptíveis aos efeitos tóxicos de micotoxinas, principalmente às fumonisinas, que quando ingeridas através do milho contaminado ou rações, podem causar grandes prejuízos econômicos além de danos na saúde destes animais (HUSSEIN et al., 2001, MARIN et al., 2013).

A contaminação de matérias primas alimentares e rações com fumonisinas tem sido associada a várias doenças que podem afetar a saúde de animais domésticos, sendo

extremamente tóxicas para equídeos e suínos (VOSS et al., 2001, STOCKMANN-JUVALA e SAVOLAINEN, 2008). Em casos de intoxicação aguda com elevados níveis da toxina, os animais apresentam um quadro caracterizado pela redução da eficiência reprodutiva, pobre conversão alimentar, diminuição da taxa de crescimento e do ganho de peso (DILKIN, 2002). Como medida preventiva para evitar os efeitos das fumonisinas nas criações animais, os Estados Unidos e a União Europeia recomendam os limites de tolerância de 20,0 mg/kg (milho em grão para rações de suínos) e 5,0 mg/kg (rações de suínos), respectivamente (OLIVEIRA et al., 2014). Contudo, não há limites de tolerância para fumonisinas em ingredientes ou rações animais no Brasil.

Os suínos estão potencialmente expostos a níveis elevados FB₁ na ração em curto prazo, sendo o edema pulmonar suíno (EPS) a principal patologia induzida por esta micotoxina (HASCHECK et al., 2001). O principal mecanismo de ação tóxica da FB₁ está relacionado com a inibição da biossíntese de esfingolipídeos de membrana celular (SORIANO et al., 2005). As manifestações clínicas decorrentes da intoxicação por altas concentrações de FB₁ (em geral, acima de 30 mg/kg) em suínos são bem descritas na literatura (VOSS et al., 2001; HASCHECK et al., 2001). No entanto, são escassos os estudos sobre os efeitos da exposição de suínos a rações contendo baixas concentrações de fumonisinas, as quais são mais prováveis de serem encontradas em condições de campo. Zomborszky-Kovacs et al. (2002) observaram um aumento significativo e dose-dependente nos pesos dos pulmões de suínos expostos a níveis de 5,0 a 10,0 mg de FB₁/kg de ração, porém não há dados disponíveis sobre os efeitos da FB₁ em níveis menores que 5,0 mg/kg.

Para avaliar a exposição de suínos e de outros animais à FB₁, a utilização de material biológico (plasma, urina, fezes, além da bile e tecidos) foi descrito em alguns estudos sobre a toxicocinética da toxina no organismo (PRELUSKY et al, 1996; SEWRAM et al., 2003; MEYER et al., 2003). Estes dados mostraram que a FB₁ são muito pouco absorvidas no trato gastrointestinal (3- 6%), rapidamente eliminadas, podendo acumular-se muito pouco no fígado e nos rins (FODOR et al., 2006; SHEPHARD et al., 2007). Estes estudos descreveram que a urina, por exemplo, é uma matriz biológica útil na avaliação da exposição à FB₁. Por outro lado, a determinação de FB₁ no plasma foi definida como impraticável devido a sua fraca absorção e rápida eliminação, levando a uma baixa concentração deste fluido biológico em suínos. Com relação às fezes, os dados de toxicocinética mostraram que a maior parte da porção absorvida é excretada através da biliar, indicando que esta matriz pode ser útil para avaliar a exposição à FB₁ em situações de rotina (PRELUSKY et al, 1996, MEYER et al.,

2003). Vale ressaltar que nos estudos descritos acima foram utilizadas altas concentrações de FB₁ administradas por diferentes vias, por um curto período de intoxicação.

2. OBJETIVOS

O Objetivo Geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição de suínos a baixos níveis de FB₁ na ração, durante 28 dias, sobre o desempenho dos animais, aspectos histológicos de órgãos, resposta imunológica e a presença de resíduos de FB₁ em materiais biológicos dos animais intoxicados.

Os Objetivos Específicos foram:

- i) Avaliar os efeitos da ingestão de FB₁ sobre o ganho de peso corpóreo, consumo de ração e conversão alimentar de suínos alimentados com ração contendo 0 mg FB₁/kg (controle), 3,0 mg/kg, 6,0 mg/kg e 9,0 mg/kg;
- ii) Avaliar os pesos relativos do baço, fígado, pulmões, rins, coração e esôfago bem como as alterações histopatológicas nos referidos órgãos, decorrentes da exposição dos suínos às toxinas através da ração;
- iii) Avaliar os efeitos da ingestão de FB₁ sobre os níveis plasmáticos de imunoglobulinas totais e específicas contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, e sobre a expressão gênica de citocinas.
- iv) Determinar a concentração de resíduos de FB₁ no plasma, urina e fezes dos animais durante o período de intoxicação prolongada;
- v) Verificar a correlação entre a ingestão de FB₁ na ração e as concentrações de resíduos de FB₁ no plasma, urina e fezes, bem como com as demais variáveis analisadas no experimento, em condições de intoxicação prolongada dos suínos.
- vi) Avaliar a aplicabilidade da determinação de resíduos de FB₁ no plasma, urina e fezes como indicador da ingestão da referida micotoxina em suínos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fumonisinias

3.1.1 Características gerais

A descrição das fumonisinias ocorreu pela primeira vez por Bezuidenhout et al. (1988), especialmente as toxinas da série B, as quais são produzidas principalmente por fungos do gênero *Fusarium sp.* Os fungos *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* são as espécies mais comumente encontradas em milho e outros cereais (DIAZ, 2005).

O *Fusarium verticillioides* (anteriormente *F. moniliforme*) é uma das espécies fúngicas mais prevalentemente associada à contaminação de milho em todo o mundo. Em 1970, esta linhagem foi isolada a partir de lote de milho contaminado com fungos e acreditava-se ser o agente causador de surto de uma doença denominada leucoencefalomalácia equina (MARASAS, 2001; KELLERMAN, 1990) e edema pulmonar suíno (HASCHEK, 2001). Posteriormente, em 1988, as fumonisinias foram isoladas a partir de culturas de *F. verticillioides* linhagem MRC 826. No mesmo ano, as estruturas químicas das fumonisinias também foram classificadas (BEZUIDENHOUT et al., 1988). Além da *F. verticillioides*, que é a principal cepa produtora de fumonisinias, estas micotoxinas também podem ser produzidas por *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme* e *Alternaria alternata f. sp. Lycopersici* (CHEN et al., 1992; AH-SEO e WON LEE, 1999). Pelo menos 15 diferentes estruturas moleculares designadas pelo termo fumonisinias foram agrupadas em quatro principais categorias (A, B, C e P), porém a toxina predominante produzida por linhagens de *F. verticillioides* é a fumonisina B₁ (FB₁) (AH-SEO e WON LEE, 1999).

Somente a FB₁, além das fumonisinias B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) foi detectada quando a produção de fumonisinias ocorreu em condições naturais (HENRY e WYATT, 1993). A fumonisina B₁ possui a fórmula empírica C₃₄H₅₉NO₁₅, composta por um diéster de propano 1,2,3 – ácido tricarboxílico e 2 – amino – 12, 16 dimetil- 3,5,10,14,15 – pentahidroxicosano em que nos C₁₄ e C₁₅ são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1, 2, 3 – ácido tricarboxílico (Figura 1, adaptado de Bezuidenhout et al., 1988), com massa molecular relativa: 721 (BEZUIDENHOUT et al., 1988).

Figura 1: Estrutura molecular da fumonisina B₁, B₂, B₃

As fumonisinas são hidrossolúveis, insolúveis em solventes apolares e apresentam ponto de fusão entre 103-105°C. Provém do metabolismo secundário de fungos, cujas principais características são: amplo espectro de toxicidade, baixo peso molecular, não-imunogenicidade, estabilidade a luz, calor e atuação em baixas concentrações (JACKSON et al., 1996).

3.1.2 Propriedades toxicológicas

Os mecanismos de toxicidade das fumonisinas são complexos (VOSS et al., 2001; SORIANO et al., 2005). Em suma, a FB₁ é estruturalmente similar aos esfingolípídeos de membrana (esfingosina e esfinganina) (Figura 2 - adaptado de Solfrizzo et al., 1997), os quais desempenham um papel fundamental na regulação, diferenciação e morte celular (RILEY et al., 1994; TURNER et al., 1999). Além disso, essas bases esfingóides participam na formação de mensageiros secundários que modulam diferentes processos celulares, incluindo a expressão gênica e a ativação/desativação de proteínas específicas (RILEY et al., 1994).

Figura 2. Estrutura da fumonisina B₁ e das bases esfingóides

O mecanismo de ação das fumonisinas ainda não está completamente elucidado, contudo, WANG e colaboradores (1991) propuseram que a FB₁ poderia intervir na biossíntese de esfingolipídios ou na síntese “*de novo*” de esfingosina, devido à similaridade da molécula de FB₁ com o complexo amino álcool esfingosina, que é um dos trinta ou mais amino álcoois da cadeia longa encontrados nos esfingolipídeos de várias espécies.

O sítio específico de ação de FB₁ parece ser a inibição da enzima esfingosina N-acetiltransferase (ceramida sintase). A inibição desta via metabólica resulta na depleção do complexo esfingolipídeo, induz aumento intracelular da concentração de esfinganina livre (ou em menor grau de esfingosina livre) e um aumento dos produtos de clivagem (ABBAS et al., 1994). O acúmulo de esfinganina livre, um composto altamente ativo, inicia uma cascata de alterações celulares que provavelmente é responsável pela causa primária da toxicidade de FB₁ (MERRILL et al., 1993, 1997; SORIANO et al., 2005).

Para avaliar a hipótese de que a FB₁ altera a biossíntese de esfingolipídeos, estudos sobre os efeitos desta micotoxina em hepatócitos de ratos demonstraram que FB₁ inibiu a biossíntese “*de novo*” de esfingolipídeos em concentrações que poderiam ser atingidas pelo consumo de milho naturalmente contaminado (WANG et al., 1991). *In vivo*, foi demonstrado

que a exposição à FB₁ altera a distribuição dos glicolipídeos de membrana e a relação esfinganina/esfingosina no epitélio intestinal de camundongos e de suínos (ENONGENE et al., 2000; LOISEAU et al., 2007), além de aumentar os níveis plasmáticos de esfinganina livre nestes últimos animais (PIVA et al., 2005).

3.1.3 Aspectos toxicocinéticos e biomarcadores de exposição

Estudos avaliando a toxicocinética da FB₁ foram conduzidos em ratos (SHEPHARD et al., 1992), macacos-vervet (SHEPHARD et al., 1994), suínos (PRELUSKY et al., 1994; DILKIN et al., 2003; FODOR et al., 2006) e demonstram que a FB₁ é absorvida em pequenas quantidades e rapidamente excretada, com pequenas porções sendo detectadas em fígado e rins. A FB₁ é também excretada na bile apesar de baixa absorção, podem ocorrer algumas recirculações entero hepáticas (ORSI et al., 2009). Há relatos onde a micotoxina é pouco absorvida quando administrada por via oral. Além disso, a toxina é rapidamente eliminada da circulação e recuperada na sua estrutura original através das fezes e pequenas quantidades excretadas na urina (WHO, 2000).

A avaliação da exposição, associada aos conhecimentos relativos aos efeitos na saúde bem como os limites considerados seguros, permitem estabelecer formas de intervenção efetiva para proteger uma população dos riscos a determinadas substâncias químicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996). Os estudos de biomarcadores para a exposição a fumonisinas requerem conhecimento da toxicocinética, toxicodinâmica e atividade bioquímica da toxina em questão, nos quais a toxicocinética da FB₁ é abordada em algumas espécies animais incluindo ratos (SHEPHARD et al. 1992), macacos vervet (SHEPHARD et al., 1994) e suínos (PRELUSKY et al., 1994).

O bloqueio do metabolismo de esfingolipídeos pode responder por danos celulares de diversas maneiras, sendo necessário considerar as vias metabólicas paralelas que podem ser afetadas pela inibição da ceramida sintase, a potente bioatividade das bases esfingóides e seus metabólitos, e as múltiplas funções dos esfingolipídeos mais complexos como a modulação e a expressão de muitos fatores de sinalização celular (FINK-GREMMELS, 1999; HE et al., 2005).

A elevação consistente da relação Sa/So em diferentes animais tem sido validada como biomarcador quanto à dose e ao tempo de exposição à fumonisinas na dieta, sendo os

fluidos biológicos como soro e urina, matrizes para o bio-monitoramento da relação Sa/So (TURNER et al., 1999; SOLFRIZZO et al., 2001). Desse modo, o desenvolvimento de biomarcadores capazes de avaliar a exposição do organismo possibilitaria estudos epidemiológicos, auxiliando nos processos de determinação dos riscos à saúde humana e animal, constituindo área prioritária nas pesquisas sobre fumonisinas.

As concentrações detectáveis de fumonisina B₁ nos órgãos, urina e fezes, em sua maioria, são influenciadas pelo metabolismo da toxina no organismo. Apenas alguns dados relatam sobre o metabolismo da FB₁, indicando que enzimas hepáticas e intestinais poderiam hidrolisar FB₁ em aminopentol (AP₁ ou FB₁ totalmente hidrolisada - HFB₁) e em FB₁ parcialmente hidrolisada (PHFB₁), para então excretá-las nas fezes (PRELUSKY et al., 2001; SHEPARD et al., 1994; GALTIER, 1999).

As características hidrofílicas da FB₁, como de outras fumonisinas, contribuem para a sua rápida eliminação dos tecidos animais (BUIM et al., 1999). Estudos de toxicocinética indicam que a FB₁ apresenta uma meia-vida muito curta em diferentes espécies e consequentemente, baixa biodisponibilidade em ratos, suínos, aves, bovinos e macacos (UENO et al., 1997; NORRED et al., 1996; SHEPHARD e SNIJAM, 1999; VOSS et al., 2001; LEDOUX et al., 1992; SEWRAM et al., 2003; FODOR et al., 2006). A reduzida biodisponibilidade da FB₁ deve-se, sobretudo, à sua fraca absorção e também à sua eliminação pelo efeito de primeira passagem no fígado após a sua absorção (LINO et al., 2007).

Os fatores que determinam a via de eliminação de micotoxinas e/ou outros xenobióticos são a massa molecular e a solubilidade em água. Assim, massas moleculares mais baixas e de maior hidrossolubilidade favorecem a eliminação pela via renal em detrimento da via biliar. A disparidade na excreção renal da FB₁ pode provavelmente ser explicada pelas diferenças observadas na polaridade das mesmas. Deste modo, a FB₁, molécula de maior polaridade, apresenta maior excreção renal, apesar de sua massa molecular ser ligeiramente mais elevada (LINO et al., 2007).

Os suínos são altamente susceptíveis à FB₁ e, após exposição a curto prazo, efeitos adversos são observados nesta espécie animal a níveis mais baixos desta toxina, do que em roedores (OSWALD et al., 2003; GRENIER et al., 2011). Estes animais são potencialmente expostos a níveis elevados de FB₁ e, além disso, os suínos podem ser considerados como o modelo animal mais relevante devido a uma fisiologia digestória muito semelhante à do humano (ROTHKOTTER et al., 2002; GUILLOTEAU et al., 2010). Portanto, a partir do

ponto de vista de segurança alimentar, é de extrema importância conhecer a distribuição desta micotoxina no organismo após a sua ingestão (GRENIER et al., 2012).

3.2 Aspectos históricos e situação atual da produção de suínos

Desde os tempos primórdios da nossa civilização, ocorre a produção de suínos no país. Entretanto, foi no final do século XIX e início do século XX que a produção se intensificou, devido à imigração de europeus para região sul, que trouxeram seus hábitos alimentares e produtivos (EMBRAPA, 2010).

Após o ano de 1978, a carne suína passou a ser considerada a principal fonte de proteína animal mundial. Segundo a Embrapa, nos últimos 46 anos a produção de suínos cresceu 75,2 milhões de toneladas, no ano de 2007 havia a estimativa de produção de 99,9 milhões de toneladas no mundo (2010).

Diferente da maior parte do mundo, no Brasil a carne suína não é a mais consumida e está atrás da carne de frango e da bovina, o que contribui negativamente para o crescimento da produção de suínos no país. Por outro lado, nos últimos 15 anos, a produção no Brasil cresceu 40%, sendo hoje o quarto maior produtor do mundo (Tabela1) (EMBRAPA, 2010; ABIMEP, 2013).

Tabela 1. Produção mundial de carne suína (em milhões de toneladas).

País	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
China	45.553	46.505	42.878	46.205	48.905	51.070	49.500	52.350	53.800
U. Europeia - 27	21.676	21.791	22.858	22.596	22.010	22.627	22.93	22.526	22.450
Estados Unidos	9.392	9.559	9.962	10.599	10.442	10.186	10.331	10.555	10.508
Brasil	2.710	2.830	2.990	3.015	3.130	3.195	3.227	3.330	3.370
Rússia	1.735	1.805	1.910	2.060	1.844	1.920	2.000	2.075	2.190
Vietnã	1.602	1.713	1.832	1.850	2.090	2.090	2.130	2.175	2.220
Canadá	1.765	1.748	1.746	1.786	1.788	1.771	1.797	1.840	1.835
Filipinas	1.175	1.215	1.250	1.225	1.246	1.260	1.288	1.310	1.350

Japão	1.245	1.247	1.250	1.249	1.310	1.292	1.267	1.297	1.305
México	1.103	1.109	1.152	1.161	1.162	1.175	1.202	1.239	1.270
Coreia do Sul	1.036	1.000	1.043	1.056	1.062	1.110	837	1.086	1.210
Outros	5.336	5.504	5.714	5.240	5.334	5.492	5.753	5.868	6.006
Total	94.328	95.026	94.585	98.042	100.323	103.188	102.28	105.651	107.514

Fonte: USDA/Abipecs

Mesmo sendo o quarto maior produtor, o consumo de carne suína no país, ainda está abaixo da média mundial. No ano de 2007, o consumo *per capita* de suínos foi de 44,3 kg na União Europeia, 33,3 kg na China, 29,8 kg nos Estados Unidos e de 19,4 kg no Japão, enquanto no Brasil consumiram-se apenas 12,3 kg (EMBRAPA, 2010).

3.3 Alimentação de suínos

A formulação de rações de suínos abrange uma série de questões, tanto econômicas como nutricionais, porém o principal é a elaboração de uma ração com menor custo de produção, isto é, melhor produtividade a menor custo. Há diferentes formulações de rações, devido a algumas exigências nutricionais dependentes de uma série de fatores, como raça, linhagem, sexo, estágio de desenvolvimento, entre outros. Cada fator, finalidade, necessita de uma composição nutricional adequada para suprir suas exigências (ROSTAGNO et al., 2001).

Em média, 80% da dieta dos suínos são constituídas de milho, devido ao seu rico valor nutricional, além do seu alto teor de amido digerível, sendo o principal ingrediente energético das rações. Mas também se utilizam outros cereais nas formulações de rações, principalmente sorgo, soja e trigo, além de outros ingredientes como óleo de soja, vísceras e alguns aminoácidos (RODRIGUES et al., 2002; LOVATTO, et al., 2007; ROSTAGNO et al., 2011).

3.3.1 Milho

Dentre os cereais, o milho é o mais produzido no mundo e é considerado como um dos mais importantes produtos do setor agrícola. No Brasil, é o cultivo mais expressivo com 50,268 milhões de toneladas de grãos produzidos em duas safras. Pode-se relacionar sua

expressividade às suas diversas aplicações, destinado ao consumo familiar e à indústria, sendo que a maior parte do milho produzido no Brasil destina-se ao consumo animal, cerca de 70% do milho produzido no mundo e 70-80% do produzido no Brasil são consumidos na cadeia produtiva de suínos e aves (EMBRAPA, 2011; DERAL, 2012; MAPA, 2010).

O milho contém cerca de 72% de amido, 10% de proteína e 4% de gordura, fornecendo um valor calórico de 365 kcal/100 g. Fornece muitas vitaminas do complexo B, minerais essenciais e fibras, porém não possui outras vitaminas importantes como as vitaminas C e B12, além de geralmente ser considerado uma fonte pobre de ferro, cálcio e ácido fólico (RANUM et al., 2014).

Os Estados Unidos são o maior produtor e consumidor de milho do mundo, responsáveis por cerca de 36% da produção mundial, em seguida tem-se a China, responsável por 20% da produção e em terceiro lugar o Brasil, responsável por 7,4% (DERAL, 2012).

No Brasil, o cultivo do milho é caracterizado pela divisão em duas épocas de plantio, a primeira safra realizada na época tradicional no período chuvoso que vai de agosto a outubro/novembro e, a segunda safra, também chamada de “safrinha” que se refere ao milho sequeiro, plantado em fevereiro ou março (EMBRAPA, 2011).

A maior parte da produção destina-se ao consumo animal, sendo que dentre os animais a produção de aves e suínos são as que mais consomem milho, uma das razões pelas quais os Estados Unidos e a China são os maiores consumidores, pois são os maiores produtores de aves e suínos do mundo, respectivamente (EMBRAPA, 2011). No Brasil, a carne mais consumida é a de frango, por isso a produção de frango é a que mais consome milho no país (Tabela 2).

Tabela 2. Consumo de milho por segmento no Brasil (em milhões de toneladas).

Segmento	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10*
Avicultura	15.427	16.162	20.022	20.846	21.655	21.631	22.994
Suinocultura	8.471	8.852	11.097	12.429	12.972	12.668	13.169
Pecuária	1.911	2.198	2.479	2.374	2.427	2.406	2.414
Outros Animais	1.550	1.581	660	673	1.081	1.081	1.096
Consumo Industrial	4.152	4.256	4.159	4.369	4.888	4.728	4.812
Consumo Humano	1.530	1.568	700	705	760	756	756

Perdas/Sementes	1.660	1.429	310	432	476	458	453
Exportação	3.988	5.000	4.327	11.150	7.309	6.830	6.830
Outros	4.809	4.132	-		-		-
Total	43.498	45.178	43.754	52.978	51.568	50.558	52.523

Fonte: Safras & Mercado *Estimativa 2010

3.3.2 Ocorrência de fumonisinas destinadas ao consumo animal

O milho é cultivado em áreas de climas tropicais e subtropicais, com temperaturas e umidades variáveis, que favorecem o crescimento e a contaminação por diversos fungos produtores de micotoxinas. Estes eventos podem ocorrer em diversas fases do desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento ou armazenamento dos grãos. Por isso, a redução da umidade através da secagem é de fundamental importância para reduzir os níveis de contaminação (SABINO, 1996; DILKIN et al., 2002). Os resultados obtidos em trabalhos preliminares sobre contaminação de milho e derivados para rações com fumonisinas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Níveis de fumonisinas detectados em amostras de milho e derivados para rações animais no Brasil.

Produto	Estado de origem	Frequência ^a (%)	Nível médio (µg/kg) ^b	Referência
Milho	MG	NI	230-6.450	16
Milho	SP	90	870-49.310	34
Milho	SP	76	100-6.580	35
Milho	Diversos	99	200-6.100	36
Milho para alimentos	PA	100	32-6.000	37
Milho para ração		100	50-1.118	37
Produtos de milho	SP	NI	2.290 (média)	47
Milho	SC	NI	20-8.600	48
Milho	PE	94,6	20-8.600	49

^a Número de amostras positivas/total de amostras analisadas.

^b Valores se referem às concentrações mínima e máxima.

NI: não informado.

Mais da metade da produção de milho no Brasil está concentrada nos Estados do Paraná (23,4%), seguido por Mato Grosso (21,9%) e Goiás (11,5%). O milho é praticamente a base das rações para todos os tipos de criação. Na composição das rações (macroelementos), o milho representa: avicultura de corte (63,5%); avicultura de postura (59,5%); pecuária de leite (23%) - em equilíbrio com a participação do farelo de trigo (23%) e farelo de algodão (20%); e suinocultura: 65,5 % (ABIMILHO, 2013).

Ainda, a ocorrência de micotoxinas no milho pode levar a grandes perdas econômicas como a contaminação de produtos agrícolas, custos indiretos em sistemas de controle, gastos na remoção da toxina para recuperar o produto rejeitado, a não aceitação do produto pelo mercado importador e a perda da produtividade animal, especialmente aqueles não ruminantes (SANTURIO, 2007).

Deve-se destacar a importância, não apenas pela ocorrência frequente, mas também pelo elevado potencial toxigênico demonstrado, de micotoxinas em animais de interesse zootécnico, como na suinocultura. No entanto, existem poucos dados sobre a contaminação por fumonisinas e zearalenona em milho utilizados em ração especificamente para suínos. Orsi et al. (2000) estudaram a incidência de fumonisinas em milho recém-colhidos e armazenados no Estado de São Paulo, e os resultados obtidos foram positivos em mais de 90% das 195 amostras com FB₁, em concentrações que variaram de 870 a 49.310 mg/kg. Dezenove cultivares de milho analisados das Estações Experimentais do Instituto Agrônomo de São Paulo, estavam contaminados com fumonisinas em níveis que variaram de 1,63-25,69 mg/kg para FB₁ e 0,38-8,60 mg/kg para FB₂ (CAMARGOS et al., 2000). Nas análises em amostras de milho provenientes das regiões sul, centro e centro-sul do Brasil, o estudo de Vargas et al. (2001) detectou a presença de 99% de fumonisinas.

Souza et al. (2013) avaliaram quantitativamente micotoxinas em amostras de rações à base de milho produzidas no Brasil, utilizando método analítico multi-micotoxinas. Vinte de 101 metabólitos fúngicos pesquisados foram detectados e quantificados, dentre eles, fumonisinas B₁, B₂, e B₃, FB₁ hidrolisada (HFB₁ ou AP₁) e zearalenona. Segundo este estudo, grande parte das amostras estavam contaminadas com mais de uma micotoxina e todas contaminadas com fumonisinas, com valores médios de 1,840 mg/kg, 239 mg/kg e 23.676 mg/kg para o milho, ração e resíduos, respectivamente.

Segundo Salay e Zerlotti Mercadante (2002), a incidência de fumonisinas e de zearalenona (embora em menores níveis) em co-ocorrência com outras micotoxinas em milho cultivado no Estado de São Paulo foi menor do que um dos estados do norte ou do sul do

Brasil. No entanto, a ocorrência destas micotoxinas em milho é generalizada em todo o País (MACHINSKI et al., 2000; VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003; SEKIYAMA et al., 2005; KAWASHIMA et al., 2006).

Recentemente, a legislação brasileira (RDC 7, ANVISA, 2011) estabeleceu limites máximos de tolerância (LMT) para diversas micotoxinas, incluindo fumonisinas e zearalenona em vários tipos de alimentos. Os níveis máximos de contaminação pelas fumonisinas (B_1+B_2) e zearalenona considerados seguros para os alimentos destinados ao consumo humano até o presente são de 5.000 $\mu\text{g/kg}$ e de 400 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente.

Para o milho destinado a rações, particularmente para suínos, o Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal (DOU de 25 de maio de 2006 – Seção 2, pág.5), o qual apresenta uma proposta de regulamentação para estabelecer os LMT para ingredientes destinados a alimentação animal de 1.000 $\mu\text{g/kg}$ para fumonisinas (B_1+B_2). Este grupo também apresenta uma proposta de estabelecer os LMT para fumonisinas (B_1+B_2) de 5.000 $\mu\text{g/kg}$ em rações e concentrados para monogástricos, de 100 $\mu\text{g/kg}$ para zearalenona em rações e concentrados para suínos adultos e de 50 $\mu\text{g/kg}$ para zearalenona em rações e concentrados para suínos nas fases pré-inicial, inicial e marrãs.

A “*European Commission, 2006*” já tem estabelecido níveis ($\mu\text{g/kg}$) de FB_1+FB_2 de 5.000 para rações e complementos para suínos, e de 60.000 para milho e produtos a base de milho. Para zearalenona, os níveis foram estabelecidos de 100 $\mu\text{g/kg}$ para ração e complemento para leitões e marrãs, e de 3.000 $\mu\text{g/kg}$ para milho e seus derivados.

3.4 Determinação de FB_1 por CLAE-EM/EM – considerações gerais

Devido à alta prevalência de fumonisinas em milho ainda há grandes investigações no desenvolvimento e validação de métodos para a análise em grãos, os quais incluem, além do próprio milho, trigo, cevada, aveia e centeio (MARTOS et al., 2010), soja e cereais infantis (DESMARCHELIER et al., 2010). Ainda, para garantir que os produtos tenham qualidade com relação às micotoxinas em geral, há necessidade de métodos de análise mais sensíveis e confiáveis (SHEPHARD et al, 2011).

Recentemente, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM/EM) tornou-se uma ferramenta analítica de grande importância permitindo

a análise de diferentes micotoxinas simultaneamente (SHEPHARD et al. 2007). As metodologias que lidam principalmente com fumonisinas foram desenvolvidas para detectar essas toxinas em uma variedade de diferentes matrizes incluindo produtos à base de cereais (LI et. al, 2010, REN et. al, 2011). Adicionalmente, métodos de CLAE- EM/EM para determinação de micotoxinas no trigo e milho foram validados para tricotecenos dos grupos A e B e seus metabólitos, zearalenona e seus derivados, alcalóides de ergot, ocratoxina, moniliformina, aflatoxinas e fumonisinas (SULYOK et al., 2006), além de micotoxinas que contaminam rações destinadas a alimentação animal (SOUZA et al., 2013).

Em contraste com a grande maioria dos métodos analíticos para micotoxinas descritos na literatura, como os que necessitam de derivatização, a CLAE-EM/EM oferece alta sensibilidade e seletividade e permite a análise rápida da presença de micotoxinas que dificilmente seriam investigadas isoladamente, com inequívoca identificação e confirmação estrutural, conduzido para diferentes estratégias de extração e detecção do analito, não sendo necessária derivação pré- ou pós-coluna (LATTANZIO et al. 2011).

Em materiais biológicos, a CLAE-EM/EM tem sido aplicada para os estudos das associações temporais entre a exposição, os resíduos e os efeitos tóxicos de micotoxinas, particularmente a FB₁ (SHEPHARD et al., 2007).

A análise de resíduos metabólicos é uma ferramenta útil para avaliar a exposição humana e animal a estas toxinas e, estudos recentes no campo da química analítica demonstraram a capacidade da CLAE-EM/EM para a determinação simultânea de resíduos na urina (EDIAGE et al., 2012; SOLFRIZZO et al., 2011; WARTH et al., 2012; GAMBACORTA et al., 2013).

No plasma a determinação da FB₁ foi referenciado por Shephard et al. (1992), porém, a utilização da CLAE-EM/EM para a detecção de micotoxinas em matrizes biológicas, tais como o sangue, ainda são escassos. Os poucos estudos têm demonstrado que níveis muito baixos da FB₁ (1,8 ng/mL) foram detectados no plasma obtidos a partir de macacos utilizando CLAE-EM/EM (SEWRAM et al., 2001). Devreese et al. (2012) desenvolveram e validaram um método para a determinação simultânea e quantificação de várias micotoxinas em plasma suíno. Neste último, os autores descrevem este método para que seja empregado como uma ferramenta de rotina na avaliação da exposição de animais às micotoxinas. Na extração, particularmente para a desproteínização em plasma ou soro, os solventes mais apropriados são o metanol (MeOH) e a acetonitrila (ACN) (SHEPHARD et al., 1995; MEYER et al., 2003). Na remoção de lípidos recorre-se à utilização de hexano (MEYER et al., 2003; SEWRAM et al., 2003). Em adição, para melhores resultados a fase móvel deve ser ácida, pela adição de

ácido acético ou ácido fórmico à fase móvel ou pelo uso de um tampão volátil (PLATTNER et al., 1999).

Em relação às fezes, devido a grande quantidade de FB₁ eliminada e consequentemente detectáveis, ainda são muito utilizados métodos como a CLAE com detecção por fluorescência, no qual as amostras são extraídas com solventes apropriados e purificação (*clean up*) com extração em colunas em fase sólida (SPE), fase-reversa (C₁₈) ou troca-iônica (SAX) (SHEPHARD et al., 1995; SEWRAM et al., 2003; CAI et al., 2007).

Para outras matrizes biológicas, a aplicação de CLAE-EM/EM permite a obtenção de limites de detecção (LOD) na ordem dos 25 pg em amostras de cabelo humano (SEWRAM et al., 2003), 1 µg/kg em tecido muscular e adiposo de suínos e 2 µg/kg em tecido cardíaco de suínos (MEYER et al., 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O estudo foi realizado no *Institute National de la Recherche Agronomique/INRA*, em Toulouse, França. Todos os procedimentos de experimentação em animais foram realizados conforme as diretrizes européias para o uso de animais para fins de investigação científica (Processo nº: *TOXCOM/0018/PP IO, Comité d'Ethique de Pharmacologie - Toxicologie de Toulouse - Midi Pyrénées, Toxcométhique, INRA*) (anexo A).

Vinte e quatro leitões desmamados de 4 semanas de idade, machos castrados (Pietrain/Duroc/Large-white) foram utilizados no presente estudo. Os leitões foram aclimatizados durante 1 semana no biotério do Laboratório *ToxiAlim* INRA (Toulouse, França), antes de serem utilizados para os protocolos experimentais e foram mantidos sob condições controladas com temperaturas variando de 25 °C desde a chegada dos leitões e atingindo 22 °C no final dos experimentos.

Após este período de adaptação, os animais foram mantidos em baias por 28 dias, sendo 3 animais/baia. Água e ração foram fornecidos *ad libitum* durante todo o período experimental. Seis animais foram distribuídos para cada tratamento com base no peso corporal, sendo observados diariamente e pesados semanalmente.

4.2 Rações experimentais

Os animais foram submetidos a quatro diferentes dietas, contaminadas com os seguintes níveis de FB₁ durante 28 dias: dieta controle (0 mg FB₁/kg de ração); 3 mg FB₁/kg de ração, 6 mg FB₁/kg de ração e 9 mg FB₁/kg de ração. A FB₁ utilizada no experimento foi produzida no *Veterinary Medical Diagnostic Laboratory* da Universidade de Missouri, em Columbia, Estados Unidos, a partir do cultivo de cepas toxigênicas de *Fusarium verticillioides*, de acordo com Ogido et al. (2004). Os procedimentos para a produção de fumonisinas foram relatados previamente por Weibking et al. (1993). Brevemente, cepas de *Fusarium verticillioides* H-1325 foram adicionadas em água destilada esterilizada e 2 mL da suspensão foi transferida para frascos esterilizados, sob agitação. Após 24 h de incubação a 27 °C no escuro, os frascos foram novamente agitados para assegurar a completa dispersão do

micélio fúngico. Os frascos foram incubados, durante 5 semanas a 27 °C e uma alíquota de 400 mL de uma solução de acetona:clorofórmio (75:25) foi adicionada diretamente a cada frasco e deixados em repouso durante a noite(*overnight*). Em seguida, o conteúdo de cada frasco foi misturado sob agitação durante 30 segundos para posterior filtração. O resíduo sólido da cultura passou novamente por um processo de re-extração, e foram secas durante a noite. O material de cultivo foi colocado em uma estufa de ar forçado a 40 °C durante 48 h e depois moído a um pó fino em um moinho. O material de cultivo foi quantificado em relação a FB₁, FB₂ e FB₃ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o procedimento de Wilson et al. (1990). O material de cultivo produzido foi enviado diretamente para a ToxiAlim/INRA – Toulouse, sendo 3 kg do material contendo 1.600 mg de fumonisina B₁/kg.

4.2.1 Fabricação das rações e adição de fumonisina B₁

As dietas foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais para leitões como já descrito por Grenier et al. (2011) (Tabela 1) e fabricadas nas instalações do INRA, na cidade de Rennes (França). Os extratos contendo a toxina foram misturados em suplementos de vitaminas e minerais, e em seguida, incorporados na mistura dos cereais antes da peletização. Os níveis de FB₁ nas rações, bem como a ausência de concentrações detectáveis de outras micotoxinas, foram confirmados usando o método multi-micotoxina para espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM), de acordo com o protocolo de 365-007, GIP LABOCEA, França - Relatório de análise 113074005 (anexo B).

Tabela 4. Composição da ração experimental.

Ingredientes (%)	
Trigo	47,50
Farelo de soja	24,30
Cevada	22,90
Fosfato de Cálcio	1,12
Carbonato de Cálcio	1,00
Vitamina e Mineral (Premix) ^a	0,50

Óleo Vegetal	1,40
Cloreto de Sódio	0,40
Fitase	0,01
Lisina	0,465
Metionina	0,165
Treonina	0,195
Triptofano	0,045
Composição^b	
Amido (g)	476,8
Proteína bruta (g)	218,3
Fibra bruta(g)	37,5
Ca (g)	10,5
P (g)	6,5
K (g)	8,7
Energia líquida (MJ)	15,6

^a Vitamina A, 2 000 000 IU/kg; vitamina D3, 400 000 IU/kg; vitamina E, 4000 mg/kg; vitamina C, 8000 mg/kg; vitamina B1, 400 mg/kg; vitamina K3, 400 mg/kg; Ferro, 20 000 mg/kg; Cobre, 4000 mg/kg; Zinco, 20 000 mg/kg; Manganês, 8000 mg/kg.

^b Correspondente a 1000g matéria seca/kg.

4.3 Exposição prolongada à fumonisina B₁

4.3.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, considerando-se 4 tratamentos, correspondendo a quatro níveis (0, 3,0, 6,0 e 9,0 mg/kg) de incorporação de FB₁ às rações, considerando-se cada suíno como uma unidade experimental (total: 6 leitões/tratamento). Após 1 semana de adaptação (35 dias de idade e peso de 10 ± 0,9 kg), iniciou-se o fornecimento da ração contendo FB₁ conforme especificado no item 3.2.

No 3º e 10º dia de intoxicação, todos os leitões foram imunizados por inoculação subcutânea com Stellamune® Mycoplasma us.vét. (Pfizer Animal Health SA), de acordo com

as especificações do fabricante. Esta imunização foi necessária para garantir a saúde dos animais e não haver interferentes sobre o efeito tóxico da FB₁.

As variáveis estudadas durante foram o ganho de peso semanal e o consumo alimentar. No final do período experimental, os suínos foram insensibilizados por eletronarcose, seguido de exsanguinação, de acordo com os procedimentos padrão do INRA/Toulouse.

4.3.2 Coleta das amostras

Semanalmente (7º, 14º, 21º e 28º dia), 8 mL de amostras de sangue dos leitões foram coletadas assepticamente por venipunção jugular, utilizando tubos contendo heparina de sódio (Vacutainer®, Becton-Dickinson, EUA). As amostras de plasma foram obtidas após a centrifugação a 3200 g, durante 15 min a 4 °C do sangue heparinizado, e armazenadas a -80 °C até serem analisadas.

Assim como o plasma, urina e fezes foram coletadas 1 vez por semana após o início da intoxicação para a quantificação de FB₁. Os animais foram alojados dentro de gaiolas metabólicas para a coleta de urina em frascos de vidro para serem transferidos em tubos cônicos de 15 mL. Posteriormente, as urinas foram separadas em alíquotas em tubos cônicos de 1,5 mL e congeladas a -80 °C. Ao mesmo tempo, amostras de fezes foram coletadas em sacos plásticos e secas em placas de Petri dentro de estufa a 50 °C durante 24 horas. As fezes secas foram trituradas e mantidas a temperatura ambiente dentro de potes apropriados para coleta de material biológico até o momento da análise.

4.3.3 Avaliação histopatológica

Os animais foram submetidos à necropsia onde as cavidades abdominal e torácica dos leitões foram abertas por incisão longitudinal para avaliação do baço, fígado, pulmões, rins e coração de todos os animais. Estes órgãos foram pesados e posteriormente coletadas amostras fixadas em formol tamponado a 10% para análise histopatológica. Os cortes de tecidos (pulmão, fígado, coração, rins e esôfago) foram desidratados por meio de álcoois graduados, embebidos em cera de parafina e cortados em espessura de 5 µm. Em seguida, estes cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para realização do exame histopatológico.

Um patologista que desconhecia os tratamentos de intoxicação por FB₁, sob a microscopia de luz, avaliou o grau de inflamação ou os danos celulares. A inflamação do tecido foi classificada da seguinte forma: grau 0; (mínima ou nenhuma evidência de inflamação); grau + (inflamação leve); grau ++ (inflamação moderada a grave); grau +++ (inflamação grave).

4.4 Avaliação da resposta imunológica de suínos sob os efeitos tóxicos da FB₁

4.4.1 Dosagem de imunoglobulinas totais e específica

A determinação da quantidade total das imunoglobulinas G (IgG) e IgA, e de imunoglobulinas específicas para *Mycoplasma hyopneumoniae* (IgG-anti- *M. hyopneumoniae*) foram realizadas por ensaio imunoenzimático (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*), de acordo com Accensi et al. (2006) e Grenier et al. (2011). Resumidamente, amostras de plasma foram diluídas para 1/30.000 para detecção de IgG e 1/6.000 para IgA, em solução salina tamponada (PBS com Tris 0,05 M; Tween 20 a 0,05%; BSA a 1%). Os diferentes isotipos de imunoglobulinas foram detectados com uma enzima peroxidase anti-IgG e anti-IgA específica para suínos (Bethyl, Interchim, Montluçon, França). Curvas padrão com quantidades conhecidas de anticorpos suínos foram utilizadas como referência. Para a determinação de IgG-anti- *M. hyopneumoniae*, um kit comercial para ELISA (ID SCREEN® *M. Hyopneumoniae* Indirect - IDVET innovative diagnostics, France) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. As absorbâncias foram lidas a 450 nm usando um leitor de placas ELISA (Spectra thermo, Tecan, Trappes, France) e o software para gerenciamento de dados 2.0 (Biolise). Os valores foram expressos como a densidade óptica (OD) das imunoglobulinas dosadas.

4.4.2 Determinação da expressão de mRNA para citocinas por PCR em tempo real

4.4.2.1 Amostras

Ao final de 28 dias de exposição à FB₁, os leitões foram autopsiados, a fim de estudar os efeitos da toxina nos diferentes órgãos, mais particularmente o intestino. Fragmentos de tecidos foram congelados a -80 °C para extração do RNA, com o objetivo de avaliar a expressão de genes implicados na resposta imune e na função da barreira intestinal.

Fragmentos de tecidos (0,5 x 0,5 mm) foram preparados a partir do jejuno e de placas de Peyer de jejuno separadamente. Estes fragmentos foram colocados em microtubos de 1,5 ml identificados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido.

Os RNAs foram extraídos de acordo com o método descrito por Grenier et al (2011). No momento da análise, o fragmento tecidual foi transferido para microtubos contendo pequenas esferas de cerâmica, com 1,4 mm de diâmetro (Lysing Matrix Tubes- MP biomédica, Illkirch, France). Em seguida, foram adicionados 1 ml de uma solução de fenol contendo tiocianato de guanidina (EUROBIO, Les Ulis, France) para a realização das extrações de RNAs. Os tubos foram então colocados dentro do equipamento *FastPrep* (MP biomedical) durante 20 segundos, na velocidade 6, com o intuito de triturar os tecidos e lisar as células para coletar o conteúdo celular (duas ou três corridas foram necessárias para uma trituração completa). O conteúdo de cada microtubo foi transferido para microtubos de 2 ml e adicionados com 200 µl de clorofórmio, e, em seguida, centrifugado durante 15 minutos (13000 g/4 °C). Nesta etapa, três fases são identificadas com base na solubilidade diferencial de DNA, proteínas e RNA nas fases orgânicas e aquosas: uma fase de fundo cor de rosa contendo proteínas, uma fase intermédia contendo DNA e uma fase sobrenadante contendo RNA. A última fase foi cuidadosamente aspirada e transferida para outro microtubo de 2 ml em que foi adicionado volume 1:1 de isopropanol. Os tubos foram centrifugados durante 10 minutos (13000 g, 4 °C). As soluções de sobrenadante foram então aspiradas e tomando cuidado para não aspirar o *pellet* de RNAs. Após este processo, 1 ml de uma solução de álcool a 75% foi adicionado para ressuspender o sedimento e, em seguida, centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi mais uma vez aspirado, assegurando que nenhum vestígio do álcool permanecesse no microtubo. Por último, 100-200 µl de água foram adicionados ao sedimento e o microtubo ficou em repouso a 4 °C durante 2 horas para dissolução completa

do sedimento. A concentração de RNA foi mensurada utilizando um espectrofotômetro *NanoDrop* (ND-1000) e não foi observada contaminação, em nenhuma das amostras. Dois microgramas de RNAs foram transcritos para cDNA utilizando *primers* aleatórios (High Capacity Reverse Transcription Kit; Applied BiosystemsTM) para posterior análise da expressão do gene em qPCR.

4.4.2.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

Os cDNAs foram diluídos e adicionou-se os *primers* reversos para cada gene. A reação de PCR foi realizada utilizando um agente fluorescente (Power SYBRgreen® BiosystemsTM Aplicada), que se intercalava entre as cadeias de DNA, permitindo, assim, a detecção de produtos do método PCR.

Sete placas (384 poços) foram preparadas para testar 56 genes de 24 amostras em duplicatas de tecido jejunal. As placas foram preparadas em um equipamento robotizado (Bravo Automated Liquid Handling Platform - Agilent Technologies; VWorks V.11.0.0923), que distribuiu os cDNAs diluídos e as combinações de *primers* e *SYBRgreen* de cada gene. A PCR foi então realizada usando o equipamento *Applied Biosystem® VIIaTM 7 Real Time System PCR* (384 poços; programa WiiATM 7 1.2).

Os dados coletados foram ordenados, eliminando as amostras que não apresentaram qualquer amplificação. A expressão do gene foi calculada de acordo com o método ΔC_t . Para normalizar os resultados, dois genes padrão constitutivos foram escolhidos: a proteínas ribossomal 60S L32 (RPL32) e Ciclofilina A (peptidilprolil Isomerase A (PPIA)).

4.5 Determinação de FB₁ em materiais biológicos

4.5.1 Reagentes e equipamentos

Os reagentes empregados são de grau analítico e a água purificada por deionização (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, EUA). Acetonitrila e metanol grau cromatográfico

(JT Baker, Xalostoc, Mexico) foram utilizados para as análises no sistema CLAE-EM/EM. O padrão de fumonisina B₁ foi adquirido da Sigma (Sigma, St Louis, MO, USA) e pesado em balança analítica. A FB₁ foi dissolvida em solução acetonitrila (50:50, v/v) e as soluções estoques de FB₁ foram preparadas a partir de uma solução de 100 µg/mL.

Todos os experimentos foram realizados em um sistema CLAE-EM/EM (cromatografia líquida de alta eficiência – massa/massa) equipado com bomba de alta pressão Acquity I-Class, amostrador Acquity FTN e coluna C₁₈ BEH (2,1 x 50 mm, 1,7 µm), acoplado a um espectrômetro de massas Xevo TQS (Waters). A coleta e o processamento de dados foram realizados utilizando o software *MassLynx*, versão 4.1.

4.6 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

Soluções individuais dos padrões de fumonisinas B₁ foram empregadas para otimização da detecção no espectrômetro de massas. A voltagem do cone, energia de colisão e as transições MRM (*Multi Reaction Monitoring*) foram automaticamente otimizadas utilizando o programa *Intellistart*, disponível no software utilizado para controle e aquisição de dados. A voltagem do capilar, temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação, fluxo do gás de dessolvatação e gás do cone foram otimizados manualmente para cada analito. O espectrômetro de massas foi operado no modo de aquisição MRM utilizando ionização no modo positivo, com uma voltagem de capilar de 0,75 kV, temperatura da fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 550 °C. Os fluxos do gás de dessolvatação e do gás do cone foram mantidos em 800 L/h e 150 L/h, respectivamente. A transição mais intensa (íon precursor > íon fragmento), determinada previamente utilizando o *Intellistart*, foi empregada para a quantificação e a segunda transição mais intensa para confirmação. A Tabela 5 apresenta as transições empregadas.

Tabela 5. Transições MRM empregadas para a quantificação e confirmação de fumonisina B₁ por espectrometria de massas.

Analito	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íons fragmentos (<i>m/z</i>)	Voltagem do cone (V)	Energia de Colisão (V)
FB ₁	722	352 ^a	30	35
		334 ^b	30	40
FB ₂	706	336 ^a	30	35
		318 ^b	30	35

^a transição de quantificação.

^b transição de confirmação.

m/z, relação massa/carga do íon precursor e dos respectivos fragmentos.

4.6.1 Parâmetros da separação cromatográfica

A eluição foi realizada em modo gradiente empregando água e acetonitrila ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico e mantendo o fluxo da fase móvel em 0,6 mL/min. A coluna foi mantida a 40 °C e as amostras a 15 °C durante as análises. Dez microlitros de amostras, bem como de padrões utilizados na preparação da curva de calibração, foram injetados no sistema cromatográfico. A Tabela 6 apresenta a composição do gradiente de eluição utilizado.

Tabela 6. Composição do gradiente empregada na análise cromatográfica de FB₁.

Tempo (minutos)	% A	% B
0,00	70	30
1,00	5	95
1,50	5	95
1,51	70	30
2,00	70	30

A, água deionizada contendo 0,1 % de ácido fórmico.

B, acetonitrila contendo 0,1 % de ácido fórmico.

4.6.2 Validação dos métodos cromatográficos

Os limites de detecção e quantificação foram calculados para cada analito baseado na relação sinal: ruído (S/R) de 3:1 e 10:1, respectivamente. A linearidade foi avaliada verificando-se o coeficiente de determinação (r^2) e a porcentagem de desvio entre a concentração nominal e a concentração determinada pela equação da reta para cada ponto da curva, de acordo com os procedimentos da FDA (*Food and Drug Administration*/2013). A curva adequada foi considerada quando esse desvio para o primeiro ponto da curva é <20% e para os demais pontos < 15% (FDA, 2013).

Todas as curvas de calibração foram preparadas empregando como solvente amostras controles de plasma diluídas 1:1 (plasma:acetonitrila), amostras de urina diluídas 1:9 (urina:acetonitrila) e amostras de fezes diluídas 1:39 (fezes:água), tratadas normalmente, seguida de fortificação no extrato final para a preparação da curva e compensar o efeito de matriz.

A recuperação e a precisão foram avaliadas empregando amostras com concentração dos analitos em estudo, abaixo do limite de detecção (controles plasma, urina ou fezes ou definidas como amostras “brancas”). As amostras foram fortificadas para FB₁ em 3 níveis injetadas em duplicata para cada nível, a seguir:

- a) Plasma: 40, 100 e 200 pg/ml, para cada nível de fortificação preparado, diluído 1:1 acetonitrila;
- b) Urina: 0,1, 25 e 50 ng/ml, para cada nível de fortificação preparado, diluído 1:9 acetonitrila;
- c) Fezes: 0,04, 0,4 e 2,6 mg/ml, para cada nível de fortificação preparado, diluído 1:39 água.

Cada nível de fortificação foi preparado em cinco réplicas independentes e a concentração final calculada a partir da injeção em duplicata de cada extrato. O procedimento foi repetido em três dias distintos para a determinação da precisão inter e intra-dias.

4.7 Extração de FB₁ em plasma

Descrição do método

Inicialmente foram testadas diferentes concentrações e proporções de diversos solventes para melhor precipitação da proteína presente no plasma, com melhores recuperações de fumonisinas. O protocolo experimental foi desenvolvido conforme Cai et al. 2007 e Devreese et al., 2012, com algumas adaptações.

A Figura 1 apresenta as principais etapas de preparo de amostra para a determinação de FB₁ em plasma.

Figura 3. Fluxograma obtido de procedimento de extração para determinação de FB₁ em amostras de plasma de suínos.

4.8 Extração de FB₁ em urina

Descrição do método

Diferentes diluições foram testadas para uma melhor detecção do analito com melhor separação dos interferentes presentes na corrida cromatográfica. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com Cai et al. (2007) e Gambacorta et al. (2013), com algumas adaptações. Na Figura 2 são descritas as principais etapas de preparo de amostra.

Figura 4. Fluxograma obtido de procedimento de extração para determinação de FB₁ em amostras de urina de suínos.

4.9 Extração de FB₁ em fezes

Descrição do método

A extração de fumonisinas foi testada com diferentes procedimentos, com uso de agitação em vórtex, ultrassom, e novamente, agitação em vórtex. Na Figura 3 são apresentadas as principais etapas de preparo de amostra para determinação de FB₁ em fezes.

Figura 5. Fluxograma obtido de procedimento de extração para determinação de FB₁ em amostras de fezes de suínos.

5. Análise estatística

Os dados foram submetidos à ANOVA unidirecional, seguido de teste de Tukey, para analisar as diferenças entre as médias dos diferentes tratamentos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Para os dados da FB₁ nos fluidos biológicos, a análise estatística foi realizada aplicando-se a estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação). A análise de variância foi aplicada, com o teste Tukey ($p < 0,05$ para comparação das médias). As operações foram realizadas em programa estatístico *GraphPad Prisma* versão 5.

6. RESULTADOS

6.1 Desempenho animal e exame histopatológico

O ganho de peso médio nos diferentes tratamentos variou de $4,5 \pm 0,8$ a $5,2 \pm 0,8$ kg/semana, sendo que o consumo médio de rações foi de $7,6 \pm 1,2$ a $8,2 \pm 1,3$ kg/semana (Tabela 7). No entanto, a ingestão das rações experimentalmente contaminadas com FB_1 não prejudicou ($P > 0,05$) as variáveis de desempenho estudadas (Figura 4).

Tabela 7. Peso corporal, ganho de peso e consumo de ração de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B_1 (FB_1) após 28 dias de exposição¹

Variável	Fumonisina B_1 (mg/kg de ração)			
	0 (Controle)	3	6	9
Peso inicial (kg/animal)	$10,4 \pm 0,6$	$10,5 \pm 0,9$	$11,1 \pm 0,4$	$10,8 \pm 0,9$
Peso final (kg/animal)	$28,4 \pm 2,0$	$30,2 \pm 2,7$	$32,0 \pm 1,3$	$30,6 \pm 1,4$
Ganho de peso (kg/semana/animal)	$4,5 \pm 0,8$	$4,9 \pm 0,9$	$5,2 \pm 0,8$	$4,9 \pm 0,9$
Consumo de ração (kg/semana/animal)	$8,0 \pm 0,8$	$7,6 \pm 1,2$	$8,2 \pm 1,3$	$7,6 \pm 1,4$

Em uma linha, não foram encontradas diferenças entre as médias ($P > 0,05$).

¹ Valores se referem à média $\pm$ desvio padrão para 6 animais em cada tratamento.

Figura 6. Ganho de peso médio, consumo médio e conversão alimentar média. Os suínos foram intoxicados com rações contaminadas com 3,0 6,0 ou 9,0 mg FB_1 /kg de ração durante 28 dias de exposição.

Com base no consumo semanal de ração e nas concentrações de FB₁ na dieta, foram calculados os valores de FB₁ ingerida por semana nos diferentes grupos experimentais, em mg/animal (Tabela 8) e em mg/kg de peso corpóreo (p.c.)/semana (Tabela 9).

Tabela 8. Ingestão semanal estimada de FB₁ nos diferentes grupos experimentais de suínos¹

Fumonisina B ₁ na ração (mg/kg)	Ingestão (mg FB ₁ /animal)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0 (Controle)	0	0	0	0
3,0	16,62	17,11	27,55	30,13
6,0	29,34	46,8	57,12	62,13
9,0	40,45	55	78,7	97,92

A ingestão semanal estimada foi calculada baseada na média do consumo semanal de rações contaminadas com 3,0, 6,0 ou 9,0 mg FB₁/kg de ração após 28 dias de exposição¹.

Tabela 9. Ingestão semanal estimada de FB₁ em mg/kg de peso corpóreo nos diferentes grupos experimentais de suínos¹

Fumonisina B ₁ na ração (mg/kg)	Ingestão (mg FB ₁ /kg p.c./semana)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0 (Controle)	0	0	0	0
3,0	1,6	0,9	1,7	1,0
6,0	2,6	2,4	2,7	1,9
9,0	3,7	3,1	3,3	3,2

A ingestão semanal estimada de FB₁ por mg/kg de peso corpóreo foi calculada baseada na média do consumo semanal de rações contaminadas com 3,0, 6,0 ou 9,0 mg FB₁/kg de ração após 28 dias de exposição¹.

A FB₁ não afetou o peso médio (absoluto) e o peso relativo de órgãos (P>0,05) nos diferentes tratamentos, em relação ao grupo controle (Tabelas 10 e 11). Para o baço, os pesos absolutos variaram de 75,8±4,2 a 61,9±3,7 (0,20 a 0,26% peso relativo), para o fígado de 905,7±53,5 a 1030±22,7 (3,37 a 3,08% peso relativo), para o pulmão de 352,0±22,4 a 382,0±32,6 (1,33 a 1,24% peso relativo), para o rim de 90,3±5,7 a 101,7±6,0 (0,33 a 0,29% peso relativo) e para o coração os pesos absolutos variaram de 221,7±11,9 a 170,1±33,1 (0,76 a 0,58% peso relativo).

Tabela 10. Peso médio (absoluto) de órgãos de leitões alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B₁ (FB₁) após 28 dias de exposição¹

Órgão analisado	Fumonisin B ₁ (mg/kg de ração)			
	0 (Controle)	3	6	9
Baço (g)	74,6 ± 5,8	75,8 ± 4,2	72 ± 4,3	61,9 ± 3,7
Fígado (g)	961,9 ± 80,9	905,7 ± 53,5	1030,0 ± 22,7	948,1 ± 39,9
Pulmão (g)	372,5 ± 28,4	380,5 ± 11,9	352,0 ± 22,4	382,0 ± 32,6
Rim (g)	94,9 ± 3,7	90,3 ± 5,7	93,6 ± 11,6	101,7 ± 6,0
Coração (g)	221,7 ± 11,9	170,1 ± 33,1	204,3 ± 8,9	178,1 ± 9,1

Em uma linha, não foram encontradas diferenças entre as médias (P>0,05).

¹ Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento.

Tabela 11. Pesos relativos de órgãos de leitões alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B₁ (FB₁) após 28 dias de exposição¹

Fumonisin B ₁ na ração (mg/kg)	Pesos relativos (g/100 g de peso corpóreo)				
	Baço	Fígado	Pulmões	Rins	Coração
0 (Controle)	0,24 ± 0,02	3,37 ± 0,24	1,33 ± 0,30	0,33 ± 0,03	0,76 ± 0,20
3	0,26 ± 0,06	3,08 ± 0,33	1,32 ± 0,40	0,31 ± 0,08	0,72 ± 0,30
6	0,22 ± 0,04	3,24 ± 0,37	1,1 ± 0,14	0,29 ± 0,10	0,64 ± 0,07
9	0,20 ± 0,02	3,11 ± 0,40	1,24 ± 0,20	0,33 ± 0,03	0,58 ± 0,06

Em uma coluna, não foram encontradas diferenças entre as médias (P>0,05).

¹ Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento.

Nenhum sinal clínico de intoxicação foi observado em qualquer tratamento durante o experimento. Durante a necropsia, não foram encontradas alterações macroscópicas no pulmão, rim, coração e fígado. Entretanto, uma inflamação intersticial (de moderada a grave), sem edema alveolar, foi observada apenas nos pulmões. Os suínos, alimentados com as rações contaminadas com 3,0 ou 6,0 mg FB₁/kg de ração, apresentaram lesões pulmonares classificadas como leves (+) ou moderadas (++), sendo que lesões moderadas à grave (+++) foram observadas nos animais que consumiram rações com 9,0 mg FB₁/kg. Os animais do grupo controle apresentaram pulmões classificados como grau 0 (mínima ou nenhuma evidência de inflamação), porém, alguns animais controle apresentaram grau leve (+) (Figura 7). Os outros órgãos analisados, como esôfago, rim, coração e fígado, não apresentaram lesões histopatológicas significantes em todos os tratamentos (Figura 8).

Figura 7. Efeito histopatológico da FB_1 sobre os pulmões. Os suínos receberam uma ração controle 0 mg FB_1 /kg de ração ou rações contaminadas com 3,0, 6,0, ou 9,0 mg FB_1 /kg de ração. As lesões foram estabelecidas após exames histopatológicos de acordo com o grau das lesões. (A) zero. (B) lesão leve (+). (C) lesão moderada (++). (D) lesão grave (+++). HE, obj. 20x (lado esquerdo) e 40x (lado direito).

Figura. 8. Exame histopatológico de outros órgãos avaliados. (A) esôfago, (B) rim, (C) coração e (D) fígado, sem lesões identificadas induzidas pelo efeito tóxico da FB₁. Os suínos receberam uma ração controle 0 mg FB₁/kg de ração ou rações contaminadas com 3,0, 6,0, ou 9,0 mg FB₁/kg de ração. HE, obj. 20x (lado esquerdo) e 40x (lado direito).

6.2 Efeitos da FB₁ na resposta imunológica de suínos

6.2.1 Imunoglobulinas totais (IgA e IgG) e específica (IgG-anti-*M.hyopneumoniae*)

As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados das análises das concentrações plasmáticas de IgG e IgA (mg/mL) totais. A ingestão de rações contaminadas com FB₁ não alterou as concentrações plasmáticas ($P>0,05$) de ambas as imunoglobulinas, em comparação ao grupo controle, de suínos alimentados com rações contaminadas com FB₁ após 28 dias de intoxicação. As concentrações plasmáticas de IgA variaram de $0,61\pm0,1$ a $0,88\pm0,3$ mg/mL, de $0,57\pm0,1$ a $0,72\pm0,1$ mg/mL e de $0,55\pm0,2$ a $0,73\pm0,2$ mg/mL, nos suínos que se alimentaram com 3,0, 6,0 ou 9,0 mg FB₁/kg de ração, respectivamente, em relação ao controle (de $0,62\pm0,3$ a $0,78\pm0,2$ mg/mL). Para IgG, os animais que se alimentaram com rações contaminadas com 3,0, 6,0 ou 9,0 mg FB₁/kg de ração, apresentaram uma concentração plasmática variando de $5,7\pm2,6$ mg/mL a $16,9\pm1,3$ mg/mL, de $7,2\pm2,8$ mg/mL a $16,9\pm0,7$ mg/mL e de $4,7\pm3,6$ a $16,5\pm1,0$ mg/mL, respectivamente, em relação ao controle (de $6,6\pm3,7$ a $15,2\pm2,7$ mg/mL).

Por outro lado foi observado que os animais apresentaram uma diminuição da resposta imunológica específica (IgG-anti-*M. hyopneumoniae*), após a segunda imunização, nos suínos que ingeriram as rações contaminadas, em comparação com o grupo de controle (Figura 9). De fato, no 28º dia do experimento, a média OD do nível de anticorpos plasmáticos foi de $9,9\pm5,0$ unidades arbitrárias (UA) nos animais controle vacinados que receberam uma ração sem contaminação, $1,4\pm 2,0$ UA e $2,9 \pm 2,0$ UA ($p<0,05$) nos animais que receberam rações contaminadas com 6,0 ou 9,0 mg FB₁/kg de ração, respectivamente. No entanto, por causa da alta variabilidade individual, a redução de imunoglobulinas específicas não foi significativa para os animais que receberam 3 mg FB₁/kg de ração.

Tabela 12. Efeito da FB₁ na concentração plasmática de IgA (mg/mL) total de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com FB₁ após 28 dias de exposição¹

Dias de coleta de sangue	Fumonisina B ₁ (mg/kg de ração)			
	0 (Controle)	3	6	9
14	0,62 ± 0,3	0,61 ± 0,1	0,57 ± 0,1	0,55 ± 0,2
21	0,85 ± 0,3	0,82 ± 0,1	0,71 ± 0,1	0,78 ± 0,2
28	0,78 ± 0,2	0,88 ± 0,3	0,72 ± 0,1	0,73 ± 0,2

Em uma coluna, não foram encontradas diferenças entre as médias (P>0,05).

¹ Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento.

Tabela 13. Efeito da FB₁ na concentração plasmática de IgG (mg/mL) total de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com FB₁ após 28 dias de exposição¹

Dias de coleta de sangue	Fumonisina B ₁ (mg/kg de ração)			
	0 (Controle)	3	6	9
14	6,6 ± 3,7	5,7 ± 2,6	7,2 ± 2,8	4,7 ± 3,6
21	10,4 ± 4,3	8,4 ± 2,8	8,6 ± 2,4	7,8 ± 3,6
28	15,2 ± 2,7	16,9 ± 1,3	16,9 ± 0,7	16,5 ± 1,0

Em uma coluna, não foram encontradas diferenças entre as médias (P>0,05).

¹ Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento.

Figura 9. Efeito da FB₁ na produção de imunoglobulina específica. Os suínos foram imunizados com *M. hyopneumoniae* (vacina Stellamune®) no 3º e no 10º dia após a exposição a FB₁. O sangue foi coletado e os níveis plasmáticos de IgG-anti-*M.hyopneumoniae* foram determinados por ELISA. Os resultados são expressos em unidade arbitrária (UA). Valores se referem à média $\pm$ desvio padrão para 6 animais em cada tratamento e *P<0,05 dos tratamentos comparados com o controle.

6.2.2 Expressão gênica das citocinas IL-6, IL-8 e IL-1- β

Para complementar os estudos do efeito da FB₁ na resposta imunológica de suínos, a expressão de genes que codificam citocinas (também denominadas interleucinas) pro-inflamatórias foi quantificada no tecido intestinal, particularmente em fragmentos do jejuno coletados no final dos experimentos.

A Figura 10 apresenta os resultados das análises de expressão gênica do RNAm (RNA mensageiro) de IL-6, IL-8 e IL-1- β , em fragmentos de jejuno de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com FB₁ após 28 dias de intoxicação. Os animais que se alimentaram com rações contaminadas com níveis baixos de FB₁ (3,0, 6,0 ou 9,0 mg FB₁/kg de ração), demonstraram uma tendência ou diminuíram significativamente o RNAm das citocinas, quando comparadas com os animais controle. No entanto, a expressão de citocinas revelou diferentes perfis de acordo com os tratamentos.

Os suínos alimentados com 6,0 mg FB₁/kg de ração, apresentaram uma redução significativa da expressão das 3 citocinas avaliadas neste estudo (IL-6, IL-8 e IL-1-β) como demonstrado na Figura 10. As médias para IL-1-β variaram de 1.000±0,511 UA (unidades arbitrárias) (controle) a 0,549±0,257 UA (rações contaminadas com 3 mg FB₁/kg), para IL-6 variaram de 1,000 ± 0,223 UA (controle) a 0,513 ± 0,118 (rações contaminadas com 6 mg FB₁/kg) e para IL-8 variaram de 1,000 ± 0,138 UA (controle) a 0,590 ± 0,068 UA (rações contaminadas com 6 mg FB₁/kg). Nos suínos expostos durante 28 dias com 3 mg FB₁/kg de ração, verificou-se uma tendência em diminuir a expressão de IL-1-β em relação ao controle, contudo não foi significativo.

Figura 10. Efeito da FB₁ na expressão gênica (RNAm) de citocinas pró-inflamatórias, expressa em unidades arbitrárias (UA), de fragmentos de jejuno de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com FB₁ após 28 dias de exposição. Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento e *P<0,05 dos tratamentos comparados com o controle.

6.3 Validação dos métodos analíticos para determinação de FB₁ por CLAE-EM/EM

O método desenvolvido apresentou desempenho satisfatório para a determinação da FB₁ em estudo, conforme apresentado nas Tabelas 14, 15 e 16. A precisão intermediária (*inter-day*) estimada através da análise das mesmas amostras fortificadas apresentou valores entre 3 e 4 % para os analitos FB₁ em plasma, entre 0,1 e 4% para os analitos de FB₁ na urina, e de 1,5 a 3% de FB₁ nas fezes. Os limites de detecção e de quantificação foram de 14 e 40 pg FB₁/mL, respectivamente no plasma, de 0,04 e 0,1 ng FB₁/mL respectivamente na urina e de 0,012 e 0,04 mg FB₁/kg respectivamente nas fezes.

Tabela 14. Resultados de validação do método analítico para determinação de FB₁ em plasma (pg/ml) de suíno

Analito	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)	Faixa de Calibração ^a (pg/mL)	Nível de fortificação (pg/mL)	Precisão CV ^b (%)
FB ₁	14	40	40 - 600	40	3,0
				100	3,0
				200	3,0
				400	4,0

LOD: Limite de Detecção.

LOQ: Limite de Quantificação.

^a Faixa de calibração elaborada para compensar a diluição do analito FB₁.

^b Coeficiente de variação.

Tabela 15. Resultados de validação do método analítico para determinação de FB₁ em urina (ng/ml) suíno

Analito	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Faixa de Calibração ^a (ng/mL)	Nível de fortificação (ng/mL)	Precisão CV ^b (%)
FB ₁	0,04	0,1	0,1 - 50	0,1	0,1
				25	3,0
				50	4,0

LOD: Limite de Detecção.

LOQ: Limite de Quantificação.

^a Faixa de calibração elaborada para compensar a diluição do analito FB₁.

^b Coeficiente de variação.

Tabela 16. Resultados de validação do método analítico para determinação de FB₁ em fezes (mg/kg) de suíno

Analito	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/g)	Faixa de Calibração^a (mg/kg)	Nível de fortificação (mg/kg)	Precisão CV^b(%)
FB₁	0,012	0,04	0,1 - 50	2,6	3,0
				0,4	1,5
				0,04	3,0

LOD: Limite de Detecção.

LOQ: Limite de Quantificação.

^a Faixa de calibração elaborada para compensar a diluição do analito FB₁.

^b Coeficiente de variação.

6.4 Determinação de FB₁ em amostras biológicas

A seletividade do método de quantificação de FB₁ por CLAE-EM/EM neste estudo foi adequada para detectar e quantificar as concentrações plasmáticas de FB₁ nos suínos e a quantidade excretada na urina e nas fezes após a exposição prolongada para a toxina. Os níveis detectáveis de FB₁ foram proporcionais aos níveis de contaminação das rações ao longo dos 28 dias de exposição, como apresentados nas Figuras 11, 13 e 15.

Não foram encontradas FB₁ detectáveis nos materiais biológicos dos suínos que receberam uma ração controle (sem contaminação).

6.4.1. Plasma

As concentrações plasmáticas de FB₁ (pg/mL) detectadas foram similares aos níveis de intoxicação das rações a partir do menor nível (3 mg FB₁/kg de ração), as quais permaneceram constantes ao longo do experimento. Nos suínos que se alimentaram com 6 e 9 mg FB₁/kg de ração, observou-se uma redução significativa da concentração plasmática de FB₁ no 28º dia de intoxicação em relação à 1ª semana (dia 7), não sendo alterada entre os dias 14 e 21 (Tabela 17 e Figura 11).

Tabela 17. Níveis plasmáticos de FB₁ (pg/mL) de leitões alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B₁ (FB₁) após 28 dias de exposição¹

FB1 na ração (mg/kg)	Dias de intoxicação (níveis plasmáticos pg/mL)			
	7	14	21	28
0 (controle)	0	0	0	0
3	171 ± 75,05	148,5 ± 58	177,1 ± 44,5	170,7 ± 37,4
6	400,3 ± 190,6 ^a	374 ± 153,7 ^a	343,4 ± 147,1 ^a	260,7 ± 61,6 ^b
9	1.127 ± 494,5 ^a	831,9 ± 349,2 ^a	850,1 ± 164,4 ^a	460,7 ± 69,5 ^b

^{a,b} Em uma linha, médias seguidas de letras sobrescritas diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05).

¹ Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento.

Figura 11. Evolução dos níveis detectáveis de FB₁ no plasma suíno com os níveis de contaminação das rações (mg FB₁/kg de ração) durante 28 dias de exposição.

A Figura 12 representa um cromatograma de amostra de plasma de suíno exposto naturalmente à FB₁.

Figura 12. Cromatograma de amostra de plasma (pg/mL) de suíno exposto naturalmente a FB₁. Determinação de FB₁ pelo método CLAE-EM/EM da amostra do suíno 95J14.

6.4.2. Urina

A FB₁ urinária (ng/mL) foi eliminada linearmente em função da concentração de toxina nas rações ao longo do tempo. O perfil temporal foi semelhante ao perfil do plasma, porém os níveis de FB₁ sofreu uma ampla variação na concentração da quantidade de FB₁ dentro de um mesmo grupo (Tabela 18 e Figura 13). Em suínos alimentados com 6 mg FB₁/kg de ração foi verificado níveis máximos de FB₁ eliminada no 7º dia após início da exposição, diminuindo na semana seguinte (14 dias) e permaneceu em concentrações menores até 28 dias. Os animais tratados com 9 mg FB₁/kg de ração, a excreção da toxina foi significativamente elevada a partir do dia 7, sendo os níveis reduzidos até 28 dias de exposição em relação a primeira semana.

Tabela 18. Níveis urinários de FB₁ (ng/mL) de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B₁ (FB₁) após 28 dias de intoxicação¹

FB1 na ração (mg/kg)	Dias de intoxicação (níveis urinários ng/mL)			
	7	14	21	28
0 (controle)	0	0	0	0
3	28,53 ± 17,9	17,8 ± 20	31,4 ± 30,5	16,1 ± 22,0
6	47,4 ± 26,4	22,7 ± 17,4	23,08 ± 11,4	24,12 ± 26,0
9	75,05 ± 55,2 ^a	37,5 ± 13,2 ^a	55,2 ± 15,8 ^a	18,9 ± 4,4 ^b

^{a,b} Em uma linha, médias seguidas de letras sobrescritas diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05).

¹ Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento.

Figura 13. Evolução dos níveis detectáveis de FB₁ na urina de suínos com os níveis de contaminação das rações (mg FB₁/kg de ração) durante 28 dias de exposição.

A Figura 14 representa um cromatograma de amostra de urina de suíno exposto naturalmente à FB₁.

Figura 14. Cromatograma de amostra de urina (ng/mL) de suíno exposto naturalmente a FB₁. Determinação de FB₁ pelo método CLAE-EM/EM da amostra do suíno 81J14.

6.4.3. Fezes

Os níveis de FB₁ encontrados nas fezes (mg/kg) foram eliminados em função dos níveis de intoxicação. Obteve-se um aumento significativo da quantidade da micotoxina eliminada pelas fezes a partir do dia 7 até 21 dias de intoxicação nos suínos que se alimentaram com 6 ou 9 mg/FB₁ (Tabela 19 e Figura 15). A quantidade de FB₁ nas fezes foi reduzida no 28º dia nos animais intoxicados com o nível intermediário (6 mg FB₁/kg de ração). Ao mesmo tempo, FB₁ permaneceu constante entre os dias 21 e 28 e durante todo o período de exposição ao menor nível.

Tabela 19. Níveis de FB₁ nas fezes (mg/kg) de suínos alimentados com rações controle e rações contaminadas com fumonisina B₁ (FB₁) após 28 dias de intoxicação¹

FB ₁ na ração (mg/kg)	Dias de intoxicação (níveis fecais mg/kg)			
	7	14	21	28
0 (controle)	0	0	0	0
3	2,26 ± 1,6	1,88 ± 1,13	3,5 ± 2,26	2,25 ± 1,8
6	5,18 ± 1,6 ^a	6,8 ± 2,3 ^a	10,6 ± 2,3 ^b	5,8 ± 2,3
9	8,16 ± 6,8 ^a	9,66 ± 3,9 ^a	13,8 ± 4,8 ^a	13,5 ± 7,6 ^b

^{a,b} Em uma linha, médias seguidas de letras sobrescritas diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05).

¹ Valores se referem à média ± desvio padrão para 6 animais em cada tratamento.

Figura 15. Evolução dos níveis detectáveis de FB₁ nas fezes de suíno com os níveis de contaminação das rações (mg FB₁/kg de ração) durante 28 dias de exposição.

A Figura 16 representa um cromatograma de amostra de fezes de suíno exposto naturalmente à FB₁.

Figura 16. Cromatograma de amostra de fezes (mg/kg) de suíno exposto naturalmente a FB₁. Determinação de FB₁ pelo método CLAE-EM/EM da amostra do suíno 88J7.

6.4.4. Correlações

Como esperado, os resultados demonstraram que ocorreu uma correlação significativa entre a FB₁ eliminada nas fezes (mg/kg) e os níveis de FB₁ ingeridos por suínos (mg FB₁/animal), em todo o período experimental (Dia 7: $r = 0,988$ e $p = 0,012$; Dia 14: $r = 0,9862$ e $p = 0,0137$; Dia 21: $r = 0,9926$ e $p = 0,0073$; Dia 28: $r = 0,9719$ e $p = 0,0281$). Por outro lado, uma correlação significativa entre as concentrações plasmáticas de FB₁ (pg/mL) e FB₁ ingerida (mg FB₁/animal) foi observada apenas no 28º dia de exposição ($r = 0,9925$ e $p = 0,0075$), bem como para urina, na qual, a correlação entre a FB₁ eliminada na urina e a ingestão de FB₁ por suíno (mg FB₁/animal) apresentou uma correlação significativa apenas no 7º de exposição a FB₁ ($r = 0,9948$ e $p = 0,0052$).

Em relação aos níveis ingeridos estimados (NIE) de FB₁ (mg/kg/animal) e a expressão gênica de citocinas IL- β , IL-6 e IL-8, observou-se que não houve qualquer correlação ($P > 0,05$) entre estas variáveis, bem como para as concentrações plasmáticas de imunoglobulina específica (IgG-anti-*M. hyopneumoniae*). Entretanto, a IgG-anti-*M. hyopneumoniae* apresentou uma correlação significativa ($r = -0,9871$, $p = 0,0129$) aos níveis

detectados de FB₁ (ng/mL) na urina dos suínos, após 28 dias de exposição à FB₁ (mg/kg/ de ração). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 20.

Tabela 20- Correlação de Pearson obtida entre os dados dos níveis ingeridos estimados de FB₁, níveis de FB₁ detectados no plasma, na urina e nas fezes, bem como a expressão gênica de citocinas e concentrações plasmáticas de imunoglobulina específica.

	NIE FB₁ mg/animal/ semana	EC IL1-β	EC IL-6	EC IL-8	CP IgG-anti-M. hyopneumoniae Dia 28
NIE FB₁ mg/animal/semana	1,0000	- 0,8506	-0,7703	-0,8493	-0,8506
CP FB₁ pg/mL	0,9077 (dia 7)				
	0,9143 (dia 14)				
	0,9381 (dia 21)				
	0,9925 (dia 28)*	- 0,7751	-0,6902	-0,7789	-0,8317
CU FB₁ ng/mL	0,9948 (dia 7)*				
	0,93 (dia 14)				
	0,8716 (dia 21)				
	0,7795 (dia 28)	-0,9434	-0,5196	-0,6502	-0,9871*
CF FB₁ mg/kg	0,988 (dia 7)*				
	0,9862 (dia 14)*				
	0,9926 (dia 21)*				
	0,9719 (dia 28)*	-0,6075	-0,7533	-0,8077	-0,7034

NIE: Níveis ingeridos estimados de FB₁ (mg/animal/semana).

CP: Concentração plasmática (pg/mL).

CU: Concentração urinária (ng/mL).

CF: Concentração fecal (mg/kg).

EC: Expressão de citocinas relacionadas ao dia 28.

* Resultados que apresentaram correlação significativa com P < 0,05.

7. DISCUSSÃO

Desempenho animal e exame histopatológico

No presente estudo, os leitões foram expostos a níveis baixos de fumonisinas, normalmente encontrados naturalmente em uma variedade de substratos, incluindo produtos agrícolas, principalmente o milho (base da ração para animais) (SABINO 1996). A literatura demonstra que grande parte dos dados sobre os efeitos das fumonisinas em animais domésticos, incluindo aves, cavalos e suínos, foi obtida utilizando rações mono-contaminadas com altas concentrações de FB₁ (DILKIN et al. 2003, BUTKERAITIS et al. 2004, DIREITO et al. 2009).

Os dados deste estudo procurou determinar os efeitos da ingestão sub-crônica de rações contaminadas com níveis baixos de FB₁ nos diversos parâmetros como desempenho animal e histopatologia, resposta imune e avaliação do biomarcador FB₁ em fluidos biológicos de suínos, visto que são animais altamente susceptíveis e estão potencialmente expostos a níveis elevados de FB₁. Assim, sob o ponto de vista de segurança alimentar, são de extrema importância os estudos que utilizam níveis menores da micotoxina para determinar os limites toleráveis que não sejam prejudiciais para o organismo animal.

A FB₁ não interferiu no consumo médio de ração e no ganho de peso corporal. Considerando-se os níveis baixos de contaminação utilizados, nossos dados não são surpreendentes e corroboram os estudos que utilizaram rações contaminadas com 10,0 mg FB₁/kg (DILKIN et al. 2003) ou 6,0 mg FB₁/kg (GRENIER et al. 2011) sobre o desempenho de suínos, os quais não relataram nenhum efeito sobre o ganho de peso corporal. Leitões alimentados com rações que continham de 1,0 a 10,0 FB₁ mg/kg durante 4 a 8 semanas, também não apresentaram efeitos tóxicos das fumonisinas (ZOMBORSZKY et al. 2000, 2002, DILKIN et al. 2010). Burel et al. (2013) demonstraram que a exposição a uma concentração moderada de fumonisinas (11,8 ppm) não teve efeito sobre o desempenho dos animais (consumo de ração, crescimento e eficiência alimentar). Porém, os autores observaram que a FB₁ alterou a razão de esfingolipídeos de membrana, embora nenhuma mortalidade ou patologia tenha sido constatada nos leitões ao longo de 63 dias de exposição.

Alterações no peso de órgãos de suínos intoxicados com FB₁ foram previamente observadas por Harvey et al. (1995). Os autores relataram que o peso do fígado foi reduzido, ocorrendo um aumento de peso do pulmão de leitões intoxicados com níveis elevados da micotoxina (100 mg FB₁/kg de ração) durante 35 dias. No presente estudo, a exposição dos

animais a baixos níveis de FB₁ por 28 dias não resultou em alterações nos pesos de órgãos em todos os tratamentos. Dilkin et al. (2003) também não encontraram diferenças significativas no peso médio do coração, fígado e pulmões, ao avaliarem o efeito de 10,0 mg FB₁/kg e de 30,0 mg FB₁/kg durante 28 dias de exposição. Em contrapartida, suínos expostos a níveis de 5,0 a 10,0 mg FB₁/kg de ração, a ingestão da toxina induziu um aumento significativo dose-dependente nos pesos dos pulmões de suínos (ZOMBORSZKY et al. 2002). Estas alterações podem ser causadas por diferenças nas condições experimentais, no estado de saúde dos animais ou interações com outros contaminantes. A principal micotoxicose induzida por fumonisinas em suínos é caracterizada por lesão pulmonar, conhecida como edema pulmonar suíno (EPS). Dependendo da dose ingerida, a FB₁ pode causar danos hepáticos, cardiovasculares e imunossupressão, devido a alterações no metabolismo dos esfingolipídeos (HASCHECK et al. 2001). Apesar da ausência de efeitos da FB₁ no desempenho animal, observou-se danos pulmonares, apresentando infiltrado celular inflamatório intersticial classificado como leve a moderado, em animais que consumiram rações contaminadas com 3 mg FB₁/kg de ração, lesão moderada para o nível de 6,0 mg FB₁/kg e lesão de moderada a grave para a ingestão do nível de 9,0 mg FB₁/kg de ração. Embora no presente trabalho tenham sido constatadas alterações histopatológicas nos pulmões dos leitões de todos os tratamentos, não foi observado edema pulmonar. Nos estudos de Grenier et al. (2011), as lesões pulmonares microscópicas foram observadas sem sinais macroscópicos, os quais estão de acordo com os dados do presente estudo. Os danos pulmonares induzidos pela FB₁ no nível de 6,0 FB₁ mg/kg de ração foram relacionados com alterações do tecido linfóide bronquiolar associados a danos vasculares Grenier et al. (2011). Contudo, os dados deste estudo não estão de acordo com Zomborszky et al. (2000), o qual observaram a presença de edema pulmonar em suínos alimentados com ração contaminada com 5,0 mg FB₁/kg. Ainda, Dilkin et al. (2003) descreveram o edema pulmonar durante a exposição de leitões recém-desmamados submetidos a 10 mg FB₁/kg na ração.

A ausência de lesões histopatológicas de outros órgãos avaliados (esôfago, rins, coração e fígado) é coerente com as baixas concentrações de FB₁ nas rações utilizadas no presente estudo. Os efeitos tóxicos da FB₁ no fígado, por exemplo, têm sido relatados em vários trabalhos utilizando materiais altamente contaminados (VOSS et al. 2001). Hascheck et al. (2001) demonstraram que alterações morfológicas foram observadas após a ingestão de 23 mg/kg ou após administração intravenosa de FB₁ em suínos. Por outro lado, danos no fígado ocorreram após a ingestão de um nível menor que 12 ppm de fumonisinas (MOTELIN et al.

1994). Mesmo com a exposição de suínos submetidos a 6,0 mg FB₁/kg ter induzido lesões hepáticas (GRENIER et al. 2011), os suínos, que receberam ração contaminada com 9,0 mg FB₁/kg (maior nível de FB₁ no presente estudo), não apresentaram lesões histopatológicas no fígado. Ainda, estas alterações não foram encontradas no rim e nem coração, sem qualquer sinal de inflamação de todos os animais que se alimentaram com 3,0 6,0 ou 9,0 mg FB₁/kg de ração.

Efeitos da FB₁ na resposta imunológica de suínos

*Imunoglobulinas totais (IgA e IgG) e específica (IgG-anti-*M. hyopneumoniae*)*

Para a complementação deste trabalho, os efeitos de FB₁ na resposta imunológica de leitões foram avaliados. Para tanto, alguns protocolos de imunização já são bem descritos na literatura, de modo a conhecer os efeitos de níveis baixos de micotoxinas atuando sozinhas ou em combinação com outras micotoxinas (ACCENSI et al., 2006; MARIN et al., 2007; PINTON et al., 2008).

A exposição prolongada (28 dias) de suínos para rações contaminadas com 3,0 6,0 ou 9,0 mg FB₁/kg de ração não alterou a concentração de imunoglobulinas totais (IgA e IgG), as quais permaneceram nos mesmos níveis dos animais que se alimentaram de rações controle (sem contaminação). Estes resultados estão de acordo com o que aconteceu quando suínos foram expostos a 8,0 mg FB₁/kg de ração, mostrando que são necessárias altas concentrações de FB₁ para alterar a síntese de anticorpos totais (TARANU et al., 2005; MARIN et al., 2006). Outros dados também corroboram os resultados do presente estudo, que descreveram que suínos expostos a rações mono-contaminadas com 6,0 mg FB₁/kg de ração ou em associação com DON (deoxynivalenol), não tem efeito nas concentrações plasmáticas de anticorpos totais (GRENIER et al., 2011). Em contrapartida, a literatura descreve que a FB₁ pode exercer efeitos imunossupressivos e favorecer o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias (OSWALD et al., 2003).

Nos 3º e 10º após o início da exposição a FB₁, os suínos foram vacinados contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (Stellamune®), o qual se refere a um patógeno que causa pneumonia em suínos (GOODWIN et al., 1965). Baixos níveis de FB₁ induziram uma diminuição significativa de IgG-anti-*M. hyopneumoniae* no presente estudo, após 28 dias de exposição. A redução da produção de anticorpos específicos tem sido observada em suínos vacinados contra *Mycoplasma agalactiae*, no qual os autores propõem estudos da resposta imune além de 28 dias a FB₁, para avaliar a influência de FB₁ na imunidade dos animais

(TARANU et al., 2005, MARIN et al., 2006). Ainda, Marin et al. (2006) mostraram que estes efeitos imunossupressivos são mais pronunciados em suínos machos do que em fêmeas. Entretanto, a ingestão de níveis altos de FB₁ durante 8 dias, ou níveis baixos durante 3 a 4 meses, não alteraram as concentrações plasmáticas de anticorpos específicos contra o vírus *Aujeszky* (causador da pseudo-raiva em suínos) (TORNIOUS et al., 2003).

Expressão gênica de citocinas IL-1-β, IL-6 e IL-8

Após avaliar os efeitos da FB₁ nas concentrações plasmáticas de imunoglobulinas totais (IgA e IgG) e específica (IgG-anti-*M. hyopneumoniae*), a capacidade da FB₁ em modular a expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-1-β, IL-6 e IL-8) foi investigada. Estes estudos serviram para verificar os mecanismos de defesa intestinal suína frente à exposição prolongada a FB₁.

As citocinas são moléculas peptídicas as quais desempenham um papel central na regulação das respostas inflamatórias e imunológicas. São produzidas por vários tipos celulares, dentre elas, células epiteliais intestinais (STADNYK et al., 2002). As citocinas avaliadas no presente estudo são expressas constitutivamente nestas células, que, quando ativadas, induzem uma resposta contra infecções microbianas (JUNG et al., 1995).

O efeito imunossupressor da FB₁ foi constatado neste estudo. Em suínos que se alimentaram com rações contaminadas, observou-se que, mesmo em níveis baixos, a FB₁ foi capaz de diminuir a expressão gênica das três citocinas estudadas. Estes efeitos podem ser atribuídos pelo princípio da ação tóxica da FB₁ em afetar os esfingolipídeos de membrana (previamente descritos como importantes na produção de substâncias que atuam na sinalização celular) (LOISEAU et al., 2007, SORIANO et al., 2005).

Os resultados corroboram aos estudos de Bracarense et al. (2012), nos quais os autores descreveram que, suínos alimentados com 6,0 mg FB₁/kg de ração (5 semanas de exposição), apresentaram expressões gênicas de IL-1-β e a IL-6 moderadamente reguladas pela FB₁ no tecido jejunal. Ainda, ao expor os suínos durante 28 dias com o menor nível avaliado no presente estudo (3,0 mg FB₁/kg de ração), verificou-se uma tendência em diminuir a expressão de IL-1-β.

Considerando os efeitos da FB₁ na resposta imunológica de suínos, possivelmente, a redução de imunoglobulinas específicas (IgG- anti- *M. hyopneumoniae*) esteja vinculada com redução da expressão das citocinas deste estudo. Este fato poderia predispor os animais a infecções que comprometam a sua saúde através da barreira intestinal.

Resíduo de FB₁ em material biológico como biomarcador

A avaliação de biomarcadores para fumonisinas requer o entendimento da toxicocinética, toxicodinâmica e bioquímica do metabolismo da toxina, como para qualquer outra micotoxina a ser avaliada. Clássicos estudos que atualmente são citados na literatura sobre a toxicocinética da FB₁, descrevem as suas investigações em diversos animais incluindo animais de laboratório (SHEPHARD et al., 1992); macacos (SHEPHARD et al., 1994, 1995), aves (VUDATHALA et al., 1994) e suínos (PRELUSKY et al., 1994). Contudo, a maioria destes trabalhos avaliaram os efeitos tóxicos da FB₁ em concentrações elevadas por curto período (intoxicação aguda), através de diferentes vias de administração da micotoxina (intraperitoneal, intravenosa ou oral).

Estudos em animais demonstraram que FB₁ é pouco absorvida quando administrada por via oral, rapidamente eliminada da circulação, e grande parte da FB₁ não metabolizada é recuperada nas fezes (SHEPARD et al, 1994; MARTINEZ-LARRANAGA et al., 1999). No entanto, há evidências de que pelo menos três produtos de sua biotransformação (duas formas parcialmente e uma totalmente hidrolisada) podem estar presentes em fluidos biológicos (SHEPARD et al, 1994).

O resíduo de FB₁ foi avaliado como biomarcador da intoxicação prolongada de suínos por fumonisina B₁ no plasma, urina e fezes. Níveis baixos de FB₁ foram utilizados durante vinte e oito dias de intoxicação (ingestão sub-crônica), no qual as rações contaminadas foram fornecidas aos animais *ad libitum*. Estas condições experimentais não tiveram como objetivo fazer um estudo de toxicocinética da FB₁, uma vez que para isso deveria englobar mecanismos de absorção, distribuição, biotransformação/metabolização e eliminação da toxina. Entretanto, devido à escassez de trabalhos que descrevem os efeitos toxicológicos em animais de interesse zootécnico (como os suínos) decorrentes da contaminação natural ou de estudos utilizando baixos níveis de FB₁ em rações, a avaliação de resíduos de FB₁ e as demais análises realizadas neste trabalho são importantes para uma adequada avaliação da toxicidade a que estes animais são comumente submetidos. Para tanto, um método analítico mais sensível e seletivo, como a espectrometria de massas ligadas à cromatografia líquida (CLAE-EM/EM) auxiliou na determinação e quantificação de FB₁.

Recente desenvolvimento na área da química analítica de micotoxinas tem demonstrado a importância do CLAE-EM/EM na determinação de biomarcadores, seja a toxina intacta ou dos produtos de metabolização. Ainda há a necessidade de validar estas moléculas para que possam ser usadas como biomarcadores em estudos animais para avaliar a

eficiência de agentes detoxificantes capazes de reduzir a biodisponibilidade da micotoxina no organismo (GAMBACORTA et al., 2013; WARTH et al., 2012).

Poucos são os estudos que desenvolvem métodos para a determinação e quantificação de FB₁ no plasma de animais, em particular, suínos. Assim, no presente estudo, a própria FB₁ (não metabolizada) foi avaliada como biomarcador específico de intoxicação e quantificada em fluidos como plasma, urina e fezes.

Plasma

Embora exista uma ausência de trabalhos que mensurem FB₁ plasmática, a utilização do CLAE-EM/EM no presente estudo permitiu quantificar em plasma níveis de FB₁ em pg/ml. Além da FB₁ urinária e fecal já validadas como biomarcadores, a FB₁ plasmática também pode ser considerada com um biomarcador de intoxicação, sendo detectada por métodos analíticos mais sensíveis e seletivos (SHEPHARD et al., 2007). Níveis de FB₁ baixos como 1,8 ng/ml, têm sido detectados em plasma obtidos de macacos utilizando CLAE-EM/EM (SEWRAM et al., 2001).

Os resultados obtidos mostraram que durante a exposição prolongada, as concentrações plasmáticas de FB₁ atingiram níveis máximos no dia 7, com declínio dos níveis no 28º dia de intoxicação. Considerando que não houve diferença estatisticamente significativa do consumo de ração entre os tratamentos durante os 28 dias de intoxicação, observou-se que os níveis quantificados de FB₁ no plasma foram proporcionais aos níveis ingeridos, isto é, aumentado semanalmente devido à elevação do consumo de ração, o que conduz a um comportamento dose-resposta nos maiores níveis avaliados (6,0 ou 9,0 mg FB₁/kg de ração). Entretanto, no menor nível estudado (3,0 mg FB₁/kg de ração), embora a ingestão de ração tenha aumentado semanalmente, as concentrações plasmáticas permaneceram constantes.

Analisando apenas o perfil plasmático de FB₁, os resultados do presente estudo foram similares em suínos alimentados via oral com 5,0 mg FB₁/kg corporal (125 mg/suíno) (DILKIN et al., 2010). Neste último, observaram que após 30 minutos da administração da FB₁, níveis máximos foram constatados em 2 horas, seguidos pela diminuição em 6 horas, não sendo mais possível detectar FB₁ em 24 horas. Vale ressaltar, que os autores intoxicaram os suínos com concentrações elevadas de FB₁ por um curto período (horas), ao contrário do presente estudo (exposição prolongada a baixos níveis de FB₁).

De acordo Shephard et al. (2008), em todas as espécies estudadas, os níveis de FB₁ no plasma foram muito baixos após a administração gástrica. A absorção tem sido estimada com níveis abaixo de 6%, com menos de 2% da recuperação de FB₁ intacta na urina (SHEPHARD et al., 2008), e em suínos a biodisponibilidade da toxina, isto é, a fração de FB₁ que alcança a circulação sistêmica no organismo, não ultrapassa $\pm 3,5\%$ (MARTINEZ-LARRANAGA et al., 1999).

Em ratos F344, não foi possível detectar níveis de FB₁ significativos em soro, quando administrado concentrações de 1,0 ou 2,5 mg FB₁/kg corporal (via oral), durante 5 semanas (CAI et al., 2007). O método utilizado foi por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e possíveis explicações para este resultado são que níveis séricos podem ser inferiores ao limite de detecção do método (VOSS e RILEY, 2006), ou a maioria dos FB₁ absorvida pode ligar-se a lipídeos ou proteínas séricas, o que os tornou indetectável a FB₁ como a forma livre (CAI et al., 2007).

No presente estudo, ressalta-se que a alta sensibilidade e especificidade do método CLA-EM/EM foi de extrema importância em possibilitar a determinação e quantificação de baixos níveis de FB₁ plasmático livre (pg/ml) em suínos expostos por período prolongado. Este método poderia permitir o estudo de toxicocinética da FB₁ de forma mais criteriosa em estudos realizados *in vivo*.

Urina

A recuperação da FB₁ tem sido estudada em sua forma inalterada na urina e na bile de animais, sendo sugerida como um biomarcador de intoxicação (SHEPHARD et al., 1995). Em ratos que foram expostos à FB₁ por 5 semanas (1,0 e 2,5 mg/kg de peso corporal), apresentaram níveis máximos na 3ª semana, que se mantiveram constantes até o final dos estudos (CAI et al., 2007). Estes dados diferiram do comportamento de excreção urinário do presente estudo, no qual os níveis máximos desta toxina (ng/ml) foram detectados no 7º dia de exposição. O perfil temporal de detecção de FB₁ urinária foi muito parecido ao da FB₁ detectado no plasma, sendo eliminada de modo dose-dependente a partir do nível intermediário estudado e com redução de FB₁ na urina no 28º dia. Similarmente, Dilkin et al. (2003) detectou concentrações de FB₁ na urina em suínos expostos a 10 mg FB₁/kg de ração. Esta contaminação foi a mais aproximada do maior nível avaliado no presente experimento (9,0 mg/kg de ração) com suínos. Contudo, pelo método de CLAE, observaram que, após 24 horas do início de intoxicação, a concentração urinária de FB₁ encontrava-se em $95 \pm 53 \mu\text{g/l}$

(2,5% recuperados na urina). Estes dados corroboram os achados de Gambacorta et al. (2013), que descreveram que a recuperação de FB₁ urinária foi de 2,6% após 24 horas de intoxicação de suínos alimentados com 3,71 µg/kg de peso corporal, utilizando CLAE-MS/MS. Neste último, os resultados sugerem que a baixa excreção de FB₁ na urina é devido a pobre absorção intestinal. Porém, estudos adicionais são necessários para ter conhecimento se a reduzida absorção se deve ao fato do transporte através do epitélio intestinal ser fraco ou ao fato de existir uma forte associação entre a FB₁ e o conteúdo intestinal (SHEPHARD e SNIJAM, 1999).

Fezes

De acordo com a literatura, algumas das micotoxinas absorvidas podem ser eliminadas através da bile dentro do trato gastrointestinal, de onde são excretadas com as fezes (SHEPHARD et al., 1994, MEYER et al., 2003).

Dilkin et al. (2003) relataram que nas primeiras 24 horas de intoxicação de suínos alimentados com rações contaminadas com 10,0 mg FB₁/kg de ração as concentrações fecais de FB₁ detectadas foram de 8,7±1,6 mg/kg.

Em relação aos níveis de FB₁ fecal (mg/kg) detectados no presente estudo, os níveis máximos foram encontrados em 21 dias de intoxicação dos suínos (6,0 mg FB₁/kg de ração ou 9,0 FB₁/kg de ração). Observou-se que ao longo do tempo os níveis de FB₁ eliminada nas fezes aumentaram de acordo com o nível de contaminação das rações oferecidas aos animais, sendo os níveis fecais proporcionais aos níveis ingeridos. Estes resultados corroboram os dados apresentados por Cai et al. (2007) em ratos, onde após a exposição prolongada (5 semanas) a baixas doses de FB₁ (1,0 ou 2,5 mg/kg/peso corporal/dia) os níveis máximos fecais (ng/g peso corporal) também foram identificados a partir 3ª semana de intoxicação de modo dose-dependente.

As elevadas concentrações de FB₁ encontradas nas fezes podem ser fundamentadas nos dados de Prelusky et al., (1994), onde demonstraram que mais de 90% da dose oral ingerida foi recuperada nas fezes de suínos. Outros estudos atribuíram que, devido à baixa biodisponibilidade de FB₁, a hidrólise desta micotoxina deve ocorrer no nível do trato gastrointestinal pela ação de enzimas intestinais ou pela ação de microrganismos. Além disso, a via predominante de excreção desta micotoxina ocorre nas fezes, principalmente quando a toxina é eliminada inalterada ou parcialmente hidrolisada (SHEPHARD et al., 1999).

No presente estudo, uma correlação significativa já era esperada entre a FB₁ eliminada nas fezes e os níveis de FB₁ ingeridos pelos suínos, tomando como base os estudos de toxicocinética descritos na literatura. Contudo, com o auxílio da CLAE-EM/EM, os dados deste trabalho entre as correlações da FB₁ plasmática com os níveis ingeridos, bem como a FB₁ urinária, podem indicá-las como bons biomarcadores da exposição prolongada a níveis baixos de FB₁. Estes dados contradizem alguns estudos nos quais descrevem que as análises de FB₁ no plasma tornam-se impraticáveis devido à fraca absorção desta toxina e rápida eliminação pelo trato gastrointestinal.

8. CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, os resultados obtidos na avaliação dos efeitos tóxicos de níveis baixos de FB₁, conclui-se que:

- i)* As concentrações de 3,0–9,0 mg FB₁/kg de ração utilizadas neste estudo não induziram manifestações clínicas evidentes ou alteraram o ganho de peso, consumo de ração ou alterações macroscópicas em órgãos dos animais expostos às rações contaminadas. No entanto, lesões histopatológicas nos pulmões foram constatadas de maneira dose-dependente, indicando que nenhum dos níveis de FB₁ usados no experimento poderia ser considerado como seguro para suínos;
- ii)* A avaliação da resposta imunológica sob os efeitos da FB₁, mesmo em níveis baixos, é importante para estimar as consequências da ingestão de FB₁ na saúde animal, podendo conduzir o animal debilitado para a ocorrência de outras doenças;
- iii)* Independente da baixa biodisponibilidade da FB₁ descrita na literatura, os dados do presente estudo indicam que a quantificação de FB₁ na urina e no plasma é adequada como biomarcador da ingestão de baixos níveis de FB₁ no início (7 dias), e no final (28 dias) do período de exposição, respectivamente.
- iv)* A FB₁ em baixos níveis foi capaz de induzir efeitos tóxicos alterando a expressão de citocinas, como também a produção de imunoglobulinas específica independentemente dos níveis encontrados no plasma, na urina e nas fezes.
- v)* São necessários novos estudos sobre os mecanismos de ação tóxica da FB₁ em suínos, sobretudo em condições de exposição prolongada a níveis baixos de contaminação na ração.

9. REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.K.; DUKE, S.O.; TANAKA, T. Phytotoxicity of fumonisin and related compounds. **Journal of Toxicology - Toxin Reviews**, v.12, p.225-251, 1993.
- ACCENSI, F.; PINTON, P.; CALLU, P.; ABELLA-BOURGUES, N.; GUELFI, J.F.; GROSJEAN, F.; OSWALD, I.P. Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets. **J. Anim. Sci.**, v.84, p.1935-1942, 2006.
- AH-SEO, J.; WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.1331-34, 1999.
- ANVISA. **Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. RDC Nº 7, Brasília, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO (ABIMILHO). **Milho-Brasil-Estimativa de consumo por segmento (toneladas)**. Disponível em:< <http://www.abimilho.com.br/estatistica4.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. **Produção Mundial de carne suína**. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/producao-2.html>>. Acesso em 26 jan 2015.
- BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLUM, W.C.A.; GORSF-ALLMAN, C.P. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society Chemical Communications**, p.743-45, 1988.
- BRACARENSE, A. P. F. L.; LUCIOLI, J.; BERTRAND GRENIER, PACHECO, G. D. et al. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, p. 107, p.1776–1786, 2012.
- BUIM, M.R.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; GUIMARÃES, I.G.; KAWAMURA, O.; UENO, Y.E.; HIROOKA, E.Y. Immunohistochemistry of fumonisin in poultry using avidin-biotin-peroxidase system. **Nat. Toxins**, v.7, p.279-282, 1999.
- BUREL, C.; TANGUY, M.; GUERRE, P.; BOILLETOT, E.; CARIOLET, R.; QUEGUINER, M.; POSTOLLEC, G.T; PINTON, P.; SALVAT, G.; OSWALD, I.P.; FRAVALO, P. Effect of Low Dose of Fumonisins on Pig Health: Immune Status, Intestinal Microbiota and Sensitivity to Salmonella 1. **Toxins**, v.5, p.841-864, 2013.

BUTKERAİTİS, P.; OLIVEIRA, C.A.F.; LEDOUX, D.R.; OGİDO, R.; ALBUQUERQUE, R.; ROSMANİNHİ, J.F.; RİTTİNGHAUS, G.E. Effect of dietary fumonisin B₁ on laying Japanese quail. **British Poultry Science**, v.45, n.6, p.798-01, 2004.

CAI, QİNGSONG; LİLİ, TANG; JİA-SHENG, WANG. Validation of Fumonisin Biomarkers in F344 Rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.225, n. 1, p. 28–39, 2007.

CAMARGOS, S.M.; SOARES, L.M.V; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BİRTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the State of São Paulo. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.225-29, 2000.

CHEN, J.; MİROCHA, C.J.; XİE, W.; HİGGİE, L.; OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.3928-31, 1992.

Departamento de Economia Rural – **DERAL. Milho** – Análise da Conjuntura Agropecuária. 2012. Disponível em:
<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/milho_12_13.pdf>.
Acesso em 26 jan 2015.

DEVREESE, M.; DE BAERE, S.; DE BACKER, P.; CROUBELS, S. Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods. **Journal of Chromatography**, v.1257, p.74-80, 2012.

Diaz D.E. 2005. **The mycotoxin blue book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 349p.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, v.64, p.187-91, 2002.

DILKIN, P.; ZORZETE, P.; MALLMANN, C.A.; GİMES, J.D.; UTİYAMA, C.E.; OETTING, L.L.; CORRÊA, B. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food Chem. Toxicol.**, v.41, p.1345-53, 2003.

DILKIN, P.; DIREİTO, G.; SİMAS, M.M.; MALLMANN, C.A.; CORRÊA, B. Toxicokinetics and toxicological effects of single oral dose of fumonisin B₁ containing *Fusarium verticillioides* culture material in weaned piglets. **Chem. Biol. Interact.**, v.3, p.57-62, 2010.

DIREİTO, G. M.; ALMEIDA, A. P.; AQUİNO, S.; REİS, T. A.; POZZI, C. R.; CORRÊA, B. Evaluation of sphingolipids in Wistar rats treated to prolonged and single oral doses of fumonisin B₁. *Int. J. Mol. Sci.* v.10, n.1, p.50-61, 2009.

EMBRAPA. **Central de Informações de Aves e Suínos (CNPSA)**. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/dados/mapa.php>>. Acesso 17 10 2014.

EMBRAPA. **Cultivo de Milho. 2011**. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/index.htm>. Acesso em 26 jan 2015.

ENONGENE, E.N.; SHARMA, R.P.; BHANDARI, N.; VOSS, K.A.; RILEY, R.T. Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B-1. **Food Chem. Toxicol.**, v.38, p.793-799, 2000.

EUROPEAN COMMISSION. Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal Of The European Union. **17 ago. 2006**. p. 7-9. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32006H0576>>. Acesso em 20 11 2014.

FAO. Mycotoxins. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/en/>>. Acesso em: 9 fev. 2013.

FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. 2013

FINK-GREMMELS, J.H. Micotoxins: their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, v.21, n.4, p.115-120, 1999.

FODOR, J.; MEYER, K.; RIEDLBERGER, M.; BAUER, J; HORN, P.; KOVACS, F. et al. Distribution and elimination of fumonisin analogues in weaned piglets after oral administration of *Fusarium verticillioides* fungal culture. **Food Add. Contam.**, v.23, p.492-501, 2006.

GALTIER, P. Biotransformation and fate of mycotoxins. **Journal of toxicology. Toxin reviews**, v.18, p.295-312, 1999.

GAMBACORTA, M.S.; VISCONTI, M.; POWERS, S.; COSSALTER, A.M.; PINTON, P.; OSWALD, I.P. Validation study on urinary biomarkers of exposure for aflatoxins B₁, ochratoxin A, fumonisin B₁, deoxynivalenol and zearalenone in piglets. **World Mycotoxin Journal**, v.6, n.3, p.299-308, 2013.

GOODWIN, R. F.W.; POMEROY, A. P., WHITTLESTONE, P. Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. **Veterinary Record**, v.77, p.1247 1249. 1965.

GRENIER B.; LOUREIRO-BRACARENSE, A.P.; LUCIOLI, J.; PACHECO, G.D.; COSSALTER, A.M.; MOLL, W.D. et al. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. **Mol. Nutr. Food Res**, v.55, p.761-771, 2011.

GRENIER, B.; BRACARENSE, A.P.; SCHWARTZ, H.E.; TRUMEL, C.; COSSALTER, A.M.; SCHATZMAYR, G.; KOLF-CLAUW, M.; MOLL, W.D.; OSWALD, I.P. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B₁ correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. **Biochem. Pharmacol.**, v.83, p.1465-1473, 2012.

GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R.; HAMMON, H.M.; METGES, C.C. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man?. **Nutr. Res. Rev.**, v.23, p.4-22, 2010.

HARVEY, R.B.; EDRINGTON, T.S.; KUBENA, L.F.; ELISSALDE, M.H.; ROTTINGHAUS, G.E. Influence of aflatoxin and fumonisin B₁- containing culture material on growing barrows. **Am. J. Vet. Res.**, v.12, p.1668-1672, 1995.

HASCHEK, W.M.; GUMPRECHT, L.A.; SMITH, G.; TUMBLESON, M.E.; CONSTABLE, P.D. Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. **Environ. Health Perspect.**, v.109, n.2, p.251-257. 2001.

HE, Q.; RILEY, R.T., SHARMA, R.P. Myriocin prevents fumonisin B₁-induced sphingoid base accumulation in mice liver without ameliorating hepatotoxicity. **Food Chem. Toxicol.**, v.43, p.969-979, 2005.

HENRY, M.H.; WYATT, R.D. A review of fumonisin production by *Fusarium moniliforme* and fumonisin toxicoses in animals. **Appl. Poult. Res.**, v.2, p.188-92, 1993.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxin on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134, 2001.

JACKSON, L.S.; HLYWKA, J.J.; SENTHIL, K.R.; BULLERMAN, L.B. Effect of thermal processing on the stability of fumonisins. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.392, p.345-353, 1996.

KAWASHIMA, L.M.; VALENTE SOARES, L.M. Incidência de fumonsina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.2, p.516-21, 2006.

KELLERMAN, T.S.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A.; CAWOOD, M.E.; COETZER, J.A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **J. Vet. Res.**, v.57, p.269-75, 1990.

LATTANZIO, V. M. T.; DELLA GATTA S. M.; VISCONTI A. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v.25, p.1869–1880, 2011

LEDOUX, D.R.; BROWN, T.P.; WEIBKING, T.S.; ROTTINGHAUS, G.E. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.330-333, 1992.

LINO, C.M.; SILVA, L.J.G.; PENA, A.S. Avaliação da exposição às fumonisinas: biomarcadores. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, n.561-562, p.5-15, 2007.

LOISEAU, N.; DEBRAUWER, L.; SAMBOU, T.; BOUHET, S.; MILLER, J.D.; MARTIN, P.G.; VIADERE, J.L.; PINTON, P.; PUEL, O.; PINEAU, T.; TULLIEZ, J.; GALTIER, P.; OSWALD, I.P. Fumonisin B₁ exposure and its selective effect on porcine jejunal segment: sphingolipids, glycolipids and trans-epithelial passage disturbance. **Biochem. Pharmacol.**, v.74, p.144-152, 2007.

LOVATTO, P. A., et al. Relação entre fumonisinas na dieta de leitões na creche e a ocorrência do vício de sucção, desempenho e características de alguns órgãos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, jul-ago, 2007.

MACHINSKI, J.R.; VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v.17, p.875-79, 2000.

MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; ALMEIDA, C. A. A.; DILKIN, P. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern brazil. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.68, n.1, p.41-45, 2001.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. Santa Maria: Sociedade Vicente Pallotti, 2007. 238 p.

MARASAS, W.F.O. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.2, p.239-243, 2001.

MARIN, D.E. et al. Sex-related differences in the immune response of weanling piglets exposed to low doses of fumonisin extract. **Br. J. Nutr.**, v.95, p.1185-1192, 2006.

MARIN, D. E.; GOUZE1, M. E., TARANU I., OSWALD, I. P. Fumonisin B₁ alters cell cycle progression and interleukin-2 synthesis in swine peripheral blood mononuclear cells. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.51, p.1406-1412, 2007.

MARIN, S.; RAMOS, A.J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.218-37, 2013.

MARTINEZ-LARRANAGA, M.R.; ANADON, A.; DIAZ, M.J.; FERNANDEZ-CRUZ, M.L.; MARTINEZ; M.A.; FREJO, M.T.; MARTINEZ, M.; FERNANDEZ, R.; ANTON, R.M.; MORALES, M.E.; TAFUR, M. Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B₁. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.41, p.357-362, 1999.

MERRILL, A.H.; VAN ECHTEN, G.; WANG, E. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N - acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neuron in situ. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.2299-2306, 1993.

MEYER, K.; MOHR, K.; BAUER, J.; HORN, P.; KOVÁCS, M. Residue formation of fumonisin B1 in porcine tissues. **Food Add Contam**, v.20, n.7, p.639-647, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Grupo de trabalho sobre micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal**. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/MAPA.pdf>>. Acesso em 27 10 2014.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Milho**. 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em 26 jan 2015.

Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (**DOU de 25 de maio de 2006 – Seção 2, pág.5**), Grupo de trabalho sobre micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento , DOU de 25 de maio de 2006 – Seção 2, pág.5.

MOTELIN, G. K.; HASCHEK, W. M.; NESS, D. K.; HALL, W. F.; HARLIN, K. S.; SCHAEFFER, D. J.; BEASLEY, V. R. Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. **Mycopathologia**, v.126, n.1, p.27-40, 1994.

NORRED, W.P.; VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; PLATTNER, R.D. Fumonisin toxicity and metabolism studies at the USDA. In: JACKSON, L.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996. 399p.

OGIDO, R.; OLIVEIRA, C. A. F.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; CORRÊA, B.; BUTKERAITS, P.; REIS, T. A.; GONÇALES, E.; ALBUQUERQUE R. Effects of prolonged administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in laying Japanese quail. **Poultry Science**, v.83, n.12, p.1953-1958, 2004.

OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H.; CORRÊA, B.; OSWALD, I. P. 2014. **Animal Health: Mycotoxins**, p. 358-377. In: ALFEN, N.V. (Ed), Encyclopedia of agriculture and food systems. Vol. 1. Elsevier, San Diego.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POZZI, C.R.; SCHAMMAS, E.A.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v.36, p.75-87, 2000.

ORSI, R.B.; OLIVEIRA, C.A.; DILKIN, P.; XAVIER, J.G.; DIREITO, G.M.; CORRÊA, B. Effects of oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Chem. Biol. Interact.**, v.170, n.3, p.201-208, 2007.

OSWALD, I.P.; DESAUTELS, C.; LAFFITTE, J.; FOURNOUT, S.; PERES, S.Y.; ODIN, M. et al. Mycotoxin fumonisin B₁ increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.5870-74, 2003.

PIVA, A.; CASADEI, G.; PAGLIUCA, G.; CABASSI, E.; GALVANO, F.; SOLFRIZZO, M. et al. Activated carbon does not prevent the toxicity of culture material containing fumonisin B-1 when fed to weanling piglets. **J. Anim. Sci.**, v.83, p.1939-1947, 2005.

PINTON, P.; ACCENSI, F.; BEAUCHAMP, E.; COSSALTER, A. M. et al., Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. **Toxicol. Lett.**, v.177, p.215-222, 2008.

PLATTNER, R. D. Detection of fumonisins produced in *Fusarium moniliforme* cultures by HPLC with electrospray MS and evaporative light scattering detectors. **Nat Toxins**, v.3, p.294-298, 1995.

PRELUSKY, D.B.; MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. Disposition of ¹⁴C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B₁. **Food Addit. Contam.**, v.13, p.155-162, 1996.

PRELUSKY, D.B.; TRENHOLM, H.L.; SAVARD, M.E. Pharmacokinetic fate of ¹⁴C-labelled fumonisin B₁ in swine. **Nat. Toxins**, v.2, p.73-80, 1994.

RILEY, R.T.; HINTON, D.M.; CHAMBERLAIN, W.J.; BACON, C.W.; WANG, E.; MERRILL JR, A.H.; VOSS, K. Dietary fumonisin B₁ induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: A new mechanism of nephrotoxicity. **J. Nutr.**, v.24, p.594-603, 1994.

RANUM, P., PEÑA-ROSAS, J. P., GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Apr; 1312:105-12. 2014.

ROSTAGNO, H. S., et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, DZO, 252 p., 2011.

RODRIGUES, B. P., et al. Digestibilidade dos nutrientes e desempenho de suínos em crescimento e terminação alimentados com rações à base de milho e sorgo suplementadas com enzimas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.2, p.91-100, 2002.

ROTHKOTTER, H.J.; SOWA, E.; PABST, R. The pig as a model of developmental immunology. **Hum. Exp. Toxicol.**, v.21, p.533-36, 2002.

SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (Ed). **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 1996, p. 461-472.

SALAY, E.; ZERLOTTI MERCADANTE, A. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v.13, n.2, p.87-92, 2002.

SANTURIO J.M.; DOTTO F.L.; LOMBARDO DE BARROS C.S.; MALUFF F.; GRIS J.; OLIVEIRA F.N.; ALVES S.H. Intoxicação espontânea e experimental por fumonisina em suínos no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, p.191-95. 2002.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e micotoxicoses nos suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.1-8, 2007.

SEKIYAMA, B.L.; RIBEIRO, A.B.; MACHINSKI, P.A.; JUNIOR, M.M. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Braz. J. Microbiol.**, v.36, p.289-94, 2005.

SEWRAM, V.; MSHICILELI, N.; SHEPHARD, G.S.E.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin mycotoxins in human hair. **Biomarkers**, v.8, p.110-118, 2003.

SHEPHARD, G.S.; SNIJMAN, P.W. Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B2 in a non-human primate. **Food Chem. Toxicol.**, v.37, p.111-116, 1999.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. Determination of fumonisin B1 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatography**, v.574, p.299-304, 1992.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. et al. Determination of the mycotoxin fumonisin B1 and identification of its partially hydrolysed metabolites in the faeces of non-human primates. **Food and Chemical Toxicology**, v.32, p.23-29, 1994.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. Initial studies on the toxicokinetics of fumonisin B1 in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.30, p.277-279, 1992.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; ALBERTS, J.F.; CAWOOD, M.E. Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B1 in a non-human primate. **Toxicol.**, v.32, p.735-741, 1994.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SAVARD, M.E. Fate of a single dose of ¹⁴C-labelled fumonisin B1 in vervet monkeys. **Natural Toxins**, v.3, p.145-150, 1995.

SHEPHARD, G.S.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; SEWRAM, V. Biomarkers of exposure to fumonisin mycotoxins: a review. **Food Addit. Contam.**, v.24, p.1196-1201, 2007.

SHEPHARD, G.S.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; SEWRAM, V.; J. ZYL, V.; RHEEDER, J. P. Occurrence of the C-series fumonisins in maize from the former Transkei region of South Africa. **Food Additives and Contaminants**, v.28, n.12, p. 1712–1716, 2011.

SOLFRIZZO, M.; AVANTAGGIATO, G.; VISCONTI, A. Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. **Journal of Chromatography B**, v.692, p.87-93, 1997.

SOLFRIZZO, M.; CARRATU, M.R.; AVANTAGGIATO, G.; GALVANO, F.; PIETRI, A.; VISCONTI, A. Ineffectiveness of activated carbon in reducing the alteration of sphingolipid metabolism in rats exposed to fumonisin-contaminated diets. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p.507-511, 2001.

SOLFRIZZO, M.; GAMBACORTA, L.; LATTANZIO, M. T. V.; POWERS, S. VISCONTI, A., Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α - and β -zearalenols and fumonisin B1 in urine as a multibiomarker method to assess exposure to mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.401, p.2831-2841, 2011.

SORIANO, J.M.; GONZÁLEZ, L.; CATALÁ, A.I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. **Prog. Lipids Res.**, v.44, p. 345-56, 2005.

SOUZA, M.L.M.; SULKYOK, M.; FREITAS-SILVA O.; COSTA, S.S; BRABET C.; MACHINSKI JUNIOR, M.; SEKIYAMA, B.L.; VARGAS, E.A.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Cooccurrence of Mycotoxins in Maize and Poultry Feeds from Brazil by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **The Scientific World Journal**, p.1-9, 2013.

STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K.A. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B₁. **Human & Experimental Toxicology**, v.27, p.799-809, 2008.

TARANU, I.; MARIN, D. E.; BOUHET, S.; PASCALE, F. et al. Mycotoxin fumonisin B-1 alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. **Toxicol. Sci.**, v.84, p.301–307, 2005.

TORNYOS, G.; KOVACS, M.; RUSVAI, M.; HORN, P.; FODOR, J.; KOVACS, F. Effect of dietary fumonisin B1 on certain immune parameters of weaned pigs. **Acta Vet Hung**, v. 51, p. 171–179, 2003.

TURNER, P.C.; NIKIEMA, P.; WILD, C.P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, v.443, p.81-93, 1999.

UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.D.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S.Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of maize harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food Chem. Toxicol.**, v.35, p.1143-1150, 1997.

VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G.S.; SCUSSEL, V.M.; COSTA, L.L.F.; VISMER, H.F.; RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.18, p.5574-78, 2003.

VARGAS, E.A.; PREIS, R.A.; CASTRO, L.; SILVA, C.M.G. Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenone and fumonisin B₁ in Brazilian corn. **Food Addit. Contam.**, v.18, p.981-86. 2001.

VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I.; HOWARD, P.C.; PLATTNER, R.D.; COLLINS, T.F.X.; HANSEN, D.K.; PORTER, J.K. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. **Environmental Health Perspectives, Research Triangle Park**. v.109, n.2, p.259-266, 2001.

VUDATHALA, D.K.; PRELUSKY, D.B.; AYROUD, M.; TRENHOLM, H.L.; MILLER, J.D. Pharmacokinetic fate and pathological effects of 14C-fumonisin B₁ in laying hens. **Natural Toxins**, v.2, p.81-88, 1994.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRILL JR, A.H. Inhibition of sphingolipids biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.14486-14490, 1991.

WARTH, B.; SULYOK, M.; FRUHMANN P.; MIKULA, H. Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.26, p.1533-1540, 2012.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; TURK J.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Sci.**, v.72, p.456-66, 1993.

WILSON, T. M., P. F. ROSS, L. G. RICE, G. D. OSWEILER, H. A. NELSON, D. L. OWENS, R. D. PLATTNER, C. REGGIARDO, T. H. NOON, AND J. W. PICKRELL. Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.2, p.213-216, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fumonisin B₁. Geneva, 2000. (Environmental Health Criteria Monographs, 219).

ZOMBORSZKY, M.K.; VETESI, F.; REPA, I.; KOVACS, F.; BATA, A.; HORN, P.; TOTH, A.; ROMVARI, R. Experiment to determine limits of tolerance for fumonisin B₁ in weaned piglets. **J. Vet. Med. Ser. B.**, v.47, p.277-286, 2000.

ZOMBORSZKY-KOVACS, M.; VETESI, F.; HORN, P.; REPA, I.; KOVACS, F. Effects of prolonged exposure to low-dose fumonisin B-1 in pigs. **J. Vet. Med. Ser. B.**, v.49, p.197-201, 2002.

ANEXO A

Aprovação do comitê de ética em pesquisa - INRA

Comité d'Éthique de Pharmacologie – Toxicologie
de Toulouse – Midi Pyrénées (Toxcométhique)

M Philippe Pinton
Mme Isabelle Oswald
UMR 1331 TOXALIM, INRA/INPT/UPS
E5-IMT
180 chemin de Tournefeuille, BP93173
31027 TOULOUSE cedex 3

Toulouse, le 18 janvier 2013

Référence saisine N°: **TOXCOM/0018/PP IO**
Objet: Avis Final du Comité

Le Comité d'éthique de Pharmacologie-Toxicologie de Toulouse-Midi Pyrénées en matière d'expérimentation animale (Toxcométhique) a évalué le document de saisine cité en référence, relatif au projet intitulé **"Etude chez le porc des effets de la co-contamination de l'aliment par des fusariotoxines"**.

La prise en considération de l'ensemble du dossier et les réponses complémentaires apportées, montrent que les considérations éthiques en matière d'expérimentation animale ont été observées.

Le Comité émet en conséquence un **AVIS FAVORABLE** pour la mise en oeuvre de cette étude. Cet avis restera valide pendant une période maximale de trois ans à compter de la date du présent courrier.

Pour le Comité, le Président,

Rafael Garcia-Villar,
Directeur de Recherche, INRA

ANEXO B

Laudo emitido da análise das rações utilizadas no experimentos

GIP LABOCEA
7, rue du sabot
CS 30054
22440 PLOUFRAGAN
Tél : 02.96.01.37.22
Fax : 02.96.01.37.50
Mel : contactLDA@laboce.fr

**Rapport
d'analyses
113074005**

PRELEVE 32 86860
INRA TOXALIM
UMR 1331 - INRA/INP/UPS
180 CHEMIN TOURNEFEUILLE
TOULOUSE CEDEX 3
31027 TOULOUSE CEDEX 3

DEBITEUR 113074005 / Page 1 / 9
INRA TOXALIM
UMR 1331 - INRA/INP/UPS
180 CHEMIN TOURNEFEUILLE
TOULOUSE CEDEX 3
31027 TOULOUSE CEDEX 3

DESTINATAIRE

INRA TOXALIM
UMR 1331 - INRA/INP/UPS
180 CHEMIN TOURNEFEUILLE
TOULOUSE CEDEX 3
31027 TOULOUSE CEDEX 3

En cours
Ouvert le : 11/12/2013 à 09h18 AA CR
Edité le : 24/02/2014 à 17h53
N° DE COMMANDE: CDE: 568402

8 ALTS PORCS/RATS MYCOTOXINES-INRA TOXALIM

Prélèvement 001 ALIMENT PORC A1 MANIP POLLYANA 2013

Nature du produit : ALIMENT PORCS GRANULE - MANIP POLLYANA 2013
Référence client : A1=VALEUR ATTENDUE FB1 (0mg/Kg) SOUPCONNE DE
MULTICONTAMINATIONS
Prescripteur : INRA (JOELLE LAFFITTE)
Date de début d'analyse : 24/12/2013

Quantité reçue au LDA22 ... g : 817
Masse minimale selon LAB GTA21: 500 g
Matrice : Aliments pour animaux
Sous matrice : bovin, ovin, caprin, volaille, poisson, anx comp.

Teneur en eau % : 12,0
Matières sèches % : 88,0

R CE 152/2009

MYCOTOXINES par méthode multi-résidus LC-MS/MS selon P-365-007

Unité Expression du Résultat: ----- mg/kg 12% eau
Les résultats sont rendus corrigés du taux de récupération.

Mycotoxines de FUSARIUM sp. (moisissures de champ)

TRICHOTHECENES de type A

Diacétoxyscirpénol (DAS) : <0,010
15monoacétoxyscirpénol MAS (métabolite DAS) : <0,010
T-2 Toxin : <0,010
HT-2 Toxin (métabolite de la T-2 Toxin) : <0,010
T-2 tétraol (métabolite de la T-2 Toxin) : <0,020
T-2 Triol (métabolite de la T-2 Toxin) : <0,020
Verrucarol : <0,010

TRICHOTHECENES de type B

Déoxynivalénol (DON, Vomitoxine) : 0,020
Dé-époxy Déoxynivalénol (DOM-1 métabolite) : <0,010
15-O-Acétyl Déoxynivalénol : <0,010
3 Acétyldéoxynivalénol : <0,010
Fusarénone X : <0,010
Nivalénol : <0,010

TRICHOTHECENES de type D

GIP LABOCEA
7, rue du sabot
CS 30054
22440 PLOUFRAGAN
Tél : 02.96.01.37.22
Fax : 02.96.01.37.50
Mel : contactLDA@laboce.fr

**Rapport
d'analyses
113074005**

113074005 / Page 2 / 9

Roridin A : <0,010
Verrucarin A : <0,010

ZEARALENONE ET METABOLITES

Zéaralénone : 0,015
Zéaralanol-alpha (métabolite de zéaralénone) : <0,010
Zéaralanol-béta (métabolite de zéaralénone) : <0,010
Zéaralénol-alpha (métabolite de zéaralénone) : <0,010
Zéaralénol-béta (métabolite de zéaralénone) : <0,010

FUMONISINES

Fumonisine B1 : 0,010
Fumonisine B2 : <0,010
Fumonisine B3 : <0,010
Somme des Fumonisines B1+B2 : 0,020

AUTRES TOXINES DE FUSARIUM sp.

Monoliformine : <0,100

Mycotoxines d'ALTERNARIA sp. (moisissures de champ et de stockage)

Acide ténuazonique : <0,050

Mycotoxines de CLAVICEPS sp. (moisissures de champ et de stockage)

ALCALOIDES DE L'ERGOT

Ergocornine : <0,010
Ergocristine : <0,010
Ergocryptine : <0,010
Ergométrine : <0,010
Ergosine : <0,010
Ergotamine : <0,010

Mycotoxines d'ASPERGILLUS et de PENICILLIUM sp. (moisissures de stockage)

AFLATOXINES

Aflatoxine B1 : <0,001
Aflatoxine B2 : <0,001
Aflatoxine G1 : <0,001
Aflatoxine G2 : <0,001
Somme des Aflatoxines : <0,004

OCHRATOXINES

Ochratoxine A : 0,008
Ochratoxine B : <0,001
Ochratoxine Alpha (métabolite Ochratoxine A) : <0,005

TOXINES TREMORGES

Verruculogen : <0,020

AUTRES TOXINES d'ASPERGILLUS

Acide cyclopiazonique : <0,050
Citrinine : <0,050
Patuline : <0,010
Stérigmatocystine : <0,010

GIP LABOCEA

7, rue du sabot
CS 30054
22440 PLOUFRAGAN
Tél : 02.96.01.37.22
Fax : 02.96.01.37.50
Mel : contact.LDA@laboce.fr

**Rapport
d'analyses
113074005**

113074005 / Page 3 / 9

Prélèvement 002 ALIMENT PORC A1 BIS MANIP POLLYANA 2013

Nature du produit : ALIMENT PORCS GRANULE - MANIP POLLYANA 2013
Référence client : A1 BIS=VALEUR ATTENDUE FB1 (0mg/Kg)
Prescripteur : INRA (JOELLE LAFFITTE)
Date de début d'analyse : 24/12/2013

Quantité reçue au LDA22 ... g : 576
Masse minimale selon LAB GTA21: 500 g
Matrice : Aliments pour animaux
Sous matrice : bovin,ovin,caprin,volaille,poisson,anx comp.

Teneur en eau % : 11,4
Matières sèches % : 88,6

R CE 152/2009

MYCOTOXINES par méthode multi-résidus LC-MS/MS selon P-365-007

Unité Expression du Résultat: ----- mg/kg 12% eau
Les résultats sont rendus corrigés du taux de récupération.

Mycotoxines de FUSARIUM sp. (moisissures de champ)

TRICHOTHECENES de type A

Diacétoxyscirpénol (DAS) : <0,010
15monoacétoxyscirpénol MAS (métabolite DAS) : <0,010
T-2 Toxin : <0,010
HT-2 Toxin (métabolite de la T-2 Toxin) ... : <0,010
T-2 tétraol (métabolite de la T-2 Toxin) .. : <0,020
T-2 Triol (métabolite de la T-2 Toxin) : <0,020
Verrucarol : <0,010

TRICHOTHECENES de type B

Déoxynivalénol (DON, Vomitoxine) : 0,025
Dé-époxy Déoxynivalénol (DOM-1 métabolite) : <0,010
15-O-Acétyl Déoxynivalénol : <0,010
3 Acétyldéoxynivalénol : <0,010
Fusarénone X : <0,010
Nivalénol : 0,010

TRICHOTHECENES de type D

Roridin A : <0,010
Verrucarol A : <0,010

ZEARALENONE ET METABOLITES

Zéaralénone : <0,010
Zéaralanol-alpha (métabolite de zéaralénone): <0,010
Zéaralanol-béta (métabolite de zéaralénone) : <0,010
Zéaralénol-alpha (métabolite de zéaralénone): <0,010
Zéaralénol-béta (métabolite de zéaralénone) : <0,010

FUMONISINES

Fumonisine B1 : <0,010
Fumonisine B2 : <0,010
Fumonisine B3 : <0,010
Somme des Fumonisines B1+B2 : <0,020

AUTRES TOXINES DE FUSARIUM sp.

GIP LABOCEA
7, rue du sabot
CS 30054
22440 PLOUFRAGAN
Tél : 02.96.01.37.22
Fax : 02.96.01.37.50
Mail : contact.LDA@laboce.fr

**Rapport
d'analyses
113074005**

113074005 / Page 4 / 9

Monoliformine	<0,100
Mycotoxines d'ALTERNARIA sp. (moisissures de champ et de stockage)	
*****	*****
Acide ténuazonique	<0,050
Mycotoxines de CLAVICEPS sp. (moisissures de champ et de stockage)	
*****	*****
ALCALOIDES DE L'ERGOT	

Ergocornine	<0,010
Ergocristine	<0,010
Ergocryptine	<0,010
Ergométrine	<0,010
Ergosine	<0,010
Ergotamine	<0,010
Mycotoxines d'ASPERGILLUS et de PENICILLIUM sp. (moisissures de stockage)	
*****	*****
AFLATOXINES	

Aflatoxine B1	<0,001
Aflatoxine B2	<0,001
Aflatoxine G1	<0,001
Aflatoxine G2	<0,001
Somme des Aflatoxines	<0,004
OCHRATOXINES	

Ochratoxine A	0,006
Ochratoxine B	<0,001
Ochratoxine Alpha (métabolite Ochratoxine A):	<0,005
TOXINES TREMORGENES	

Verruculogen	<0,020
AUTRES TOXINES d'ASPERGILLUS	

Acide cyclopiazonique	<0,050
Citrinine	<0,050
Patuline	<0,010
Stéigmatocystine	<0,010

Prélèvement 003 ALIMENT PORC A2 MANIP POLLYANA 2013

Nature du produit : ALIMENT PORCS GRANULE - MANIP POLLYANA 2013
Référence client : A2=VALEUR ATTENDUE FB1 (2mg/Kg)
Prescripteur : INRA (JOELLE LAFFITTE)
Date de début d'analyse : 24/12/2013

Quantité reçue au LDA22 ... g : 659
Masse minimale selon LAB GTA21: 500 g
Matrice : Aliments pour animaux
Sous matrice : bovin,ovin,caprin,volaille,poisson,anx comp.

Teneur en eau % : 11,2
Matières sèches % : 88,8

R CE 152/2009

MYCOTOXINES par méthode multi-résidus LC-MS/MS selon P-365-007

=====

Unité Expression du Résultat: ----- mg/kg 12% eau

GIP LABOCEA

7, rue du sabot
CS 30054
22440 PLOUFRAGAN
Tél : 02.96.01.37.22
Fax : 02.96.01.37.50
Mel : contactLDA@laboce.fr

**Rapport
d'analyses
113074005**

113074005 / Page 5 / 9

Les résultats sont rendus corrigés du taux de récupération.

Mycotoxines de FUSARIUM sp. (moisissures de champ)

FUMONISINES

Fumonisine B1	:	3,08
Fumonisine B2	:	0,665
Fumonisine B3	:	0,570
Somme des Fumonisines B1+B2	:	3,74

Prélèvement 004 ALIMENT PORC A3 MANIP POLLYANA 2013

Nature du produit : ALIMENT PORCS GRANULE - MANIP POLLYANA 2013
Référence client : A3=VALEUR ATTENDUE FB1 (4 mg/Kg)
Prescripteur : INRA (JOELLE LAFFITTE)
Date de début d'analyse : 24/12/2013

Quantité reçue au LDA22 ... g : 768
Masse minimale selon LAB GTA21: 500 g
Matrice : Aliments pour animaux
Sous matrice : bovin,ovin,caprin,volaille,poisson,anx comp.

Teneur en eau	% :	11,4
Matières sèches	% :	88,6

R CE 152/2009

MYCOTOXINES par méthode multi-résidus LC-MS/MS selon P-365-007

=====

Unité Expression du Résultat: ----- mg/kg 12% eau

Les résultats sont rendus corrigés du taux de récupération.

Mycotoxines de FUSARIUM sp. (moisissures de champ)

FUMONISINES

Fumonisine B1	:	6,11
Fumonisine B2	:	1,96
Fumonisine B3	:	1,52
Somme des Fumonisines B1+B2	:	8,07

Prélèvement 005 ALIMENT PORC A4 MANIP POLLYANA 2013

Nature du produit : ALIMENT PORCS GRANULE - MANIP POLLYANA 2013
Référence client : A4=VALEUR ATTENDUE FB1 (8 mg/Kg)
Prescripteur : INRA (JOELLE LAFFITTE)
Date de début d'analyse : 24/12/2013

Quantité reçue au LDA22 ... g : 847
Masse minimale selon LAB GTA21: 500 g
Matrice : Aliments pour animaux
Sous matrice : bovin,ovin,caprin,volaille,poisson,anx comp.

Teneur en eau	% :	11,1
Matières sèches	% :	88,9

R CE 152/2009

MYCOTOXINES par méthode multi-résidus LC-MS/MS selon P-365-007

=====

Unité Expression du Résultat: ----- mg/kg 12% eau

GIP LABOCEA
7, rue du sabot
CS 30054
22440 PLOUFRAGAN
Tél : 02.96.01.37.22
Fax : 02.96.01.37.50
Mel : contactLDA@laboce.fr

**Rapport
d'analyses
113074005**

113074005 / Page 6 / 9

Les résultats sont rendus corrigés du taux de récupération.

Mycotoxines de FUSARIUM sp. (moisissures de champ)

FUMONISINES

Fumonisine B1 : 9,01
Fumonisine B2 : 3,17
Fumonisine B3 : 2,21
Somme des Fumonisines B1+B2 : 12,2

Prélèvement 006 ALIMENT STARTRITE 100H MANIP NADIR

Nature du produit : ALIMENT STARTRITE 100H (ALIMENT 1ER AGE
PORCELET) - MANIP NADIR
Référence client : VALEUR ATTENDUE (0 µg/Kg) PAS DE TOXINES
ALIMENT CONTROLE
Prescripteur : INRA (JOELLE LAFFITTE)
Date de début d'analyse : 24/12/2013

Quantité reçue au LDA22 ... g : 103
Masse minimale selon LAB GTA21: 500 g
Matrice : Aliments pour animaux
Sous matrice : bovin,ovin, caprin, volaille, poisson, anx comp.
*La masse minimale requise n'étant pas atteinte, l'échantillon peut ne pas
être représentatif et le logo COFRAC ne peut pas être apposé conformément
au LAB GTA 21.*

Teneur en eau % : 9,0
Matières sèches % : 91,0

R CE 152/2009

MYCOTOXINES par méthode multi-résidus LC-MS/MS selon P-365-007

Unité Expression du Résultat: ----- mg/kg 12% eau

Les résultats sont rendus corrigés du taux de récupération.

Mycotoxines de FUSARIUM sp. (moisissures de champ)

TRICHOTHECENES de type A

Diacétoxyscirpénol (DAS) : <0,010
15monoacétoxyscirpénol MAS (métabolite DAS) : <0,010
T-2 Toxin : <0,010
HT-2 Toxin (métabolite de la T-2 Toxin) ... : <0,010
T-2 tétraol (métabolite de la T-2 Toxin) .. : <0,020
T-2 Triol (métabolite de la T-2 Toxin) : <0,020
Verrucarol : <0,010

TRICHOTHECENES de type B

Déoxynivalénol (DON, Vomitoxine) : 0,085
Dé-époxy Déoxynivalénol (DOM-1 métabolite) : <0,010
15-O-Acétyl Déoxynivalénol : <0,010
3 Acétyldéoxynivalénol : <0,010
Fusarénone X : <0,010
Nivalénol : <0,010

TRICHOTHECENES de type D

Roridin A : <0,010
Verrucarol A : <0,010