UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DIANE VALGANON DE NEEFF

**Determinação de produtos de biotransformação de aflatoxina B₁ e aplicabilidade na
avaliação da eficiência de um adsorvente à base de aluminossilicato de cálcio e sódio
hidratado em frangos de corte**

Pirassununga

2012

DIANE VALGANON DE NEEFF

Determinação de produtos de biotransformação de aflatoxina B₁ e aplicabilidade na avaliação da eficiência de um adsorvente à base de aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado em frangos de corte

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

N377d Neeff, Diane Valganon de
 Determinação de produtos de biotransformação de
aflatoxina B₁ e aplicabilidade na avaliação da
eficiência de um adsorvente à base de aluminossilicato
de cálcio e sódio hidratado em frangos de corte / Diane
Valganon de Neeff. -- Pirassununga, 2012.
77 f.
Dissertação (Mestrado) -- 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. ABF₁ 2. Aflatoxicol 3. AFM₁ 4. Biomarcadores
5. Adsorvente 6. Frangos de corte. I. Título.

Aos meus amados pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação e ensinamentos.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

Às colegas e amigas de laboratório Alessandra, Carolina, Estela, Fernanda, Giovana, Keliane, Natali e Sarah.

Ao Carlos Corassin pela disponibilidade em ajudar.

Aos Prof. Dr. David R. Ledoux e Dr. George E. Rottinghaus da Universidade do Missouri, pela ajuda na realização do experimento e pela paciência.

Aos inesquecíveis amigos (Ana, Andrew, Andria, Ben, Ben L., Guilherme, Jacqueline, Kizzi, Koray, Lindsay, Lucas, Luciana, Mariana, Marina, Martial, Matias, Mônica, Monique, Natália, Rafael, Renata, Ricardo, Sam, Toni) que fiz durante o estágio na Universidade do Missouri, Columbia, EUA.

À Roice, especialista de laboratório, pela amizade e disponibilidade em ajudar.

Aos meus pais Daniel e Lourdes pela ajuda, apoio e amor.

Ao meu irmão Michael pelo companheirismo e amor.

À minha tia Lupe pela ajuda, apoio e amor.

Aos meus parentes pelo carinho.

Ao meu namorado João pelo apoio, amor e carinho.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

Muito obrigada.

RESUMO

Neeff, D. V. **Determinação de produtos de biotransformação de aflatoxina B₁ e aplicabilidade na avaliação da eficiência de um adsorvente à base de aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado em frangos de corte.** 2012. 76f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O objetivo do presente trabalho foi determinar resíduos de aflatoxinas M₁ (AFM₁), aflatoxicol (AFL), B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) não metabolizadas no fígado e rim de frangos de corte, com a finalidade de verificar sua aplicabilidade na avaliação da eficiência de um adsorvente comercial à base de aluminossilicato de cálcio e sódio (HSCAS) incorporado na dieta, bem como determinar o percentual de ligação do adsorvente com a AFB₁ em ensaios *in vitro*. Cem frangos de corte (Ross 708), machos, de 1 dia de idade, foram mantidos em baterias metálicas, com acesso *ad libitum* à ração e água. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos, sendo cada tratamento composto por 5 gaiolas contendo 5 frangos em cada uma. Os tratamentos foram os seguintes: A) dieta basal (DB), sem adição de HSCAS ou AFB₁; B) DB com adição de 0,5% de HSCAS; C) DB com adição de 2,5 mg/kg de AFB₁; e D) DB com adição de 2,5 mg/kg de AFB₁ e 0,5% de HSCAS. As rações experimentais foram administradas de 1 a 21 dias de vida. No dia 21, 5 frangos de cada tratamento foram insensibilizados com dióxido de carbono, mortos por deslocamento cervical e amostras de fígado e rim foram coletadas para análise de resíduos de AFB₁. O HSCAS foi efetivo em se ligar, *in vitro*, à AFB₁, cujos percentuais de ligação variaram de 8,8 a 99,5%, para concentrações do adsorvente entre 0,05 e 100 mg/10 mL. Apesar de o HSCAS ter melhorado, numericamente, o desempenho dos frangos no estudo *in vivo*, estatisticamente não houve diferença significativa entre os tratamentos C e D. As concentrações de AFB₁, AFL, AFG₁ e AFB₂ foram menores (P<0,05) nos fígados das aves alimentadas com AFB₁ adicionado de HSCAS (dieta D), quando comparado com aves alimentadas somente com AFB₁ (dieta C). As concentrações de AFB₁ também foram menores (P<0,05) nos rins das aves alimentadas com AFB₁ adicionado de HSCAS (dieta D) quando comparado com aves alimentadas somente com AFB₁ (dieta C). A determinação de resíduos de aflatoxinas no fígado e rins não é aplicável para avaliar a proteção do adsorvente contra efeitos tóxicos das aflatoxinas em frangos de corte, sendo, porém, de grande utilidade para verificar a capacidade do adsorvente em reduzir as concentrações das aflatoxinas residuais nas vísceras de frangos destinadas ao consumo humano. Palavras-chave: AFB₁, aflatoxicol, AFM₁, biomarcadores, adsorvente, frangos de corte.

ABSTRACT

Neeff, D. V. **Determination of aflatoxin B₁ biotransformation products and applicability for the efficacy evaluation of a hydrated sodium calcium aluminosilicate-based adsorbent in broiler chicks.** 2012. 76f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The objective of the study was to determine residues of aflatoxin M₁ (AFM₁), aflatoxicol (AFL), B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) and G₂ (AFG₂) non-metabolized in liver and kidney of broiler chicks, aiming to verify its applicability for evaluation of a commercial adsorbent based-HSCAS efficacy incorporated into the diet, as well as to determine the binding capacity of a HSCAS for AFB₁ in an *in vitro* testing. One hundred day-old male broilers (Ross 708) were maintained in chick batteries and allowed *libitum* access to feed and water. A completely randomized design was used with 5 replicate pens of 5 chicks assigned to each of 4 dietary treatments from hatch to 21 days. Dietary treatments included: A) basal diet (BD), with no HSCAS or AFB₁; B) BD supplemented with 0.5% HSCAS only; C) BD supplemented with 2.5 mg AFB₁/kg of feed; and D) BD supplemented with 2.5 mg AFB₁/kg of feed and 0.5% HSCAS. On day 21, 5 chicks from each treatment were insensibilized with carbon dioxide, killed by cervical dislocation and samples of liver and kidney collected for analysis of AFB₁ residues. The HSCAS was effective to binding AFB₁ *in vitro*, with percentage of AFB₁ bound varying from 8.8 to 99.5% for adsorbent concentrations between 0.05 and 100 mg/10mL. Although HSCAS has improved numerically the performance of broilers on the *in vivo* study, there was no statistically significant difference between treatments C and D. Concentrations of AFB₁, AFL, AFG₁ and AFB₂ were lower (P<0.05) in livers of birds fed AFB₁ plus HSCAS (diet D), when compared to birds fed AFB₁ alone (diet C). Concentrations of AFB₁ were also lower (P<0.05) in kidneys of birds fed AFB₁ plus HSCAS (diet D) compared to those fed AFB₁ only (diet C). The determination of aflatoxin residues in liver and kidney is not applicable for evaluation of the adsorbent protection against the toxic effects of aflatoxins in broiler chicks, being, however, very useful to verify the adsorbent capacity to reduce the concentration of aflatoxin residues in the organs of chickens intended for human consumption.

Keywords: AFB₁, aflatoxicol, AFM₁, biomarkers, adsorbent, broilers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ (Fonte: RAWAL et al., 2010). ..18	18
Figura 2. Forma ativada da aflatoxina B ₁ (Adaptado de RAWAL et al., 2010).19	19
Figura 3. Estrutura química da aflatoxina M ₁ (Fonte: RAWAL et al., 2010).20	20
Figura 4. Interconversão enzimática da aflatoxina B ₁ e aflatoxicol (Fonte: WONG et al., 1979).20	20
Figura 5. Pintos de 1 dia e frangos de 2 semanas alojados em bateria metálica.29	29
Figura 6. Moagem, amostras homogeneizadas e centrifugadas.35	35
Figura 7. Passagem do extrato da amostra juntamente com o PBS pela coluna de imunoafinidade.36	36
Figura 8. Secagem da amostra e cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).37	37
Figura 9. Cromatograma dos padrões das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ e aflatoxicol, no CLAE.38	38
Figura 10. Isoterma de Langmuir da adsorção da AFB ₁ pelo HSCAS, em pH 3.40	40
Figura 11. Fígados de frangos dos quatro diferentes tratamentos (Tratamento A: controle; Tratamento B: 0,5% de HSCAS; Tratamento C: 2,5 mg/kg de AFB ₁ ; Tratamento D: 2,5 mg/kg de AFB ₁ + 0,5% de HSCAS).50	50
Figura 12. Taxa de conversão dos resíduos de aflatoxina (concentração de AFB ₁ na ração / concentração de aflatoxina residual) no fígado de aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB ₁ (■) e com 0,5 % de HSCAS + 2,5 mg/kg de AFB ₁ (□).51	51
Figura 13. Taxa de conversão dos resíduos de aflatoxina (concentração de AFB ₁ na ração / concentração de aflatoxina residual) no rim das aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB ₁ (■) e com 0,5% de HSCAS + 2,5 mg/kg de AFB ₁ (□).53	53
Figura 14. Fluxograma do método de análise do fígado e rim de frangos de corte para análise da aflatoxina.77	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos dos efeitos da adição de HSCAS em rações contaminadas por micotoxinas, utilizadas para aves domésticas.....	24
Tabela 2 - Tratamentos para a avaliação da eficácia do HSCAS em reduzir os efeitos tóxicos da aflatoxina.....	30
Tabela 3 – Composição da dieta basal utilizada no período de 1 a 21 dias.	31
Tabela 4 – Valores nutricionais calculados da dieta basal.	31
Tabela 5 - Percentual de ligação de diferentes quantidades de HSCAS em solução de 2 mg/L AFB ₁ , em pH 3.	39
Tabela 6 - Parâmetros da isoterma de Langmuir ajustados para a adsorção da AFB ₁ pelo HSCAS, em pH 3.	40
Tabela 7 – Parâmetros de desempenho e pesos relativos de rim e fígado de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia ¹	41
Tabela 8 - Parâmetros da bioquímica sérica de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia ¹	45
Tabela 9 - Parâmetros histopatológicos de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia ¹	49
Tabela 10 - Parâmetros dos resíduos de aflatoxina em fígado de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia ¹	51
Tabela 11 - Parâmetros dos resíduos de aflatoxina no rim de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia ¹	52
Tabela 12 – Coeficiente de correlação ¹ entre o desempenho e bioquímica sérica de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia.	55
Tabela 13 – Coeficiente de correlação ¹ entre o desempenho e o resíduo de aflatoxina no fígado de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia.	56
Tabela 14. Coeficiente de correlação ¹ entre o desempenho e o resíduo de aflatoxina no rim de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia.	57
Tabela 15 – Coeficiente de correlação ¹ entre a bioquímica sérica e o resíduo de aflatoxina no fígado de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia.	58
Tabela 16 - Coeficiente de correlação ¹ entre a bioquímica sérica e o resíduo de aflatoxina no rim de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB ₁ do 1º até o 21º dia.....	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Produção de Carne de Frango no Brasil e no Mundo.....	15
2.2	Aflatoxinas.....	16
2.2.1	Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	17
2.2.2	Aflatoxina M ₁	19
2.2.3	Aflatoxicol	20
2.3	Efeitos Tóxicos das Aflatoxinas	21
2.4	Adsorventes para Aflatoxinas.....	23
2.5	Biomarcadores	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Animais e Instalações	29
4.2	Adsorvente Experimental	30
4.3	Preparo da AFB ₁ para Intoxicação Experimental.....	30
4.4	Preparo das Rações Experimentais.....	31
4.5	Análise do Percentual de Adsorção <i>In Vitro</i>	32
4.6	Avaliação dos Índices de Produtividade.....	32
4.7	Análises Histopatológica e Bioquímica Sérica.....	33
4.8	Análises de Resíduos de Aflatoxinas em Fígado e Rins	33
4.8.1	Reagentes, Padrões e Instrumentos.....	34
4.8.2	Procedimento de Análise	35
4.9	Análise dos Resultados	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39

5.1	Eficiência <i>In Vitro</i> do HSCAS.....	39
5.2	Eficiência <i>In Vivo</i> do HSCAS	41
5.2.1	Desempenho dos Frangos de Corte.....	41
5.2.2	Bioquímica Sérica dos Frangos de Corte.....	45
5.2.3	Resultados Histopatológicos	49
5.2.4	Resíduos de Aflatoxina no Fígado e Rim	50
5.2.5	Análise de Correlação entre as Variáveis Estudadas	55
5.2.6	Desempenho e Bioquímica Sérica	55
5.2.7	Desempenho e Resíduo de AFB ₁ no fígado.....	56
5.2.8	Desempenho e Resíduo de AFB ₁ no rim	57
5.2.9	Bioquímica Sérica e Resíduo de AFB ₁ no fígado	58
5.2.10	Bioquímica sérica e Resíduo de AFB ₁ no rim.....	59
6	CONCLUSÃO.....	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas englobam um grupo de substâncias, estruturalmente diversificadas, originadas a partir do metabolismo secundário de fungos, que ocorrem como contaminantes de diversos produtos utilizados na alimentação animal (MOSS, 1998). Os metabólitos primários dos fungos, como os de outros organismos, são aqueles essenciais ao crescimento. Já os secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância aparente para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor (JAY, 2005).

A presença de micotoxinas em rações e em produtos alimentícios é de extrema importância em termos de saúde humana e animal, pois muitas dessas toxinas podem resultar em sérias perdas econômicas. Foi estimado que, o custo anual, relacionado com a contaminação de grãos por micotoxinas, para a indústria agropecuária, está em torno de centenas de milhões de dólares (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003). O Brasil, devido ao seu clima, propicia condições ideais para a proliferação de fungos responsáveis pela produção de aflatoxinas (SABINO et al., 1988).

Apesar dos fungos toxigênicos serem conhecidos desde os tempos bíblicos e surtos de micotoxicoses se repetirem periodicamente em determinadas regiões, foi somente a partir da década de 1950 que esse tipo de intoxicação despertou maior interesse, com o aparecimento da aleucia tóxica alimentar (ATA), na Ucrânia, e dos surtos de eczema facial de ovinos, descritos na Nova Zelândia. Na época em que essas duas enfermidades foram associadas à presença de fungos no alimento consumido, muitos pesquisadores não acreditavam que as micotoxicoses poderiam ter a importância que foi assumida posteriormente (SPINOSA et al, 2008).

Em 1960, um evento ocorrido na Inglaterra causou grande interesse internacionalmente. Esse acontecimento, denominado “doença X dos perus” (Turkey X disease) foi decorrente da mortalidade de milhares dessas aves. Após realização de análise microbiológica e química, verificou-se a presença do *Aspergillus flavus* no amendoim, importado do Brasil, para a alimentação desses animais, sugerindo-se que esse fungo era o responsável pela produção de uma micotoxina, posteriormente denominada aflatoxina e comprovada como responsável pela mortalidade dos perus (SPINOSA et al, 2008).

A ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus*, bem como de suas toxinas em alimentos e rações animais, apresenta distribuição mundial, com predomínio nas regiões de clima tropical e subtropical. A ocorrência de aflatoxinas no Brasil tem sido observada com frequência, principalmente no estado de São Paulo, cujos níveis médios encontrados em amostras de milho

e rações variam entre 78 µg/kg e 240 µg /kg (SABINO et al., 1989; SABINO et al., 1988).

Em Saúde Animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos efeitos tóxicos agudos, mutagênicos e carcinogênicos das aflatoxinas, sendo o fígado o principal órgão atingido (OSWEILER, 1990). De modo análogo, em Saúde Pública, as aflatoxinas são identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, consequente à ingestão de alimentos contaminados (HSIEH; ATKINSON, 1991).

A remoção de aflatoxinas de alimentos permanece ainda como um dos grandes problemas, em produção animal, havendo a necessidade de tecnologias efetivas para os procedimentos de descontaminação. Esses processos são baseados na degradação, destruição, inativação ou remoção da aflatoxina, através de métodos físicos, químicos ou biológicos. Um processo de detoxificação efetivo deve ser econômico, capaz de eliminar todos os traços de toxina, sem deixar resíduos indesejáveis, além de não alterar a qualidade nutricional. Métodos de detoxificação de aflatoxina práticos, viáveis economicamente e para uso em larga escala, não são facilmente encontrados, embora uma variedade de procedimentos venha sendo empregada, com limitado sucesso. Também, a estabilidade da aflatoxina ao calor e a outras condições físicas limita o uso dessas formas de inativação (PARLAT et al., 1999).

Como alternativa, há a possibilidade da adição de substâncias não nutritivas, que se liguem a aflatoxina, reduzindo sua absorção no trato gastrointestinal (KUBENA et al., 1990). O aluminossilicato de cálcio e sódio (HSCAS) é utilizado para reduzir a biodisponibilidade de aflatoxina (LEESON et al., 1995).

Deve-se destacar que muitos dos adsorventes atualmente encontrados no mercado não foram testados adequadamente para eficácia *in vivo*, sendo utilizados somente com base em dados *in vitro*. Entretanto, como Scheideler (1993) sugeriu, testes *in vitro* nem sempre podem ser indicadores confiáveis da habilidade de um adsorvente se ligar a uma micotoxina. Portanto, é importante que adsorventes sejam submetidos à avaliação *in vivo* para testar sua eficácia e para determinar se ocorre prejuízo da utilização de nutrientes da dieta.

Biomarcadores são substâncias, seus produtos de biotransformação ou alterações bioquímicas precoces, cuja determinação em fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado permite avaliar a intensidade de exposição a um determinado agente, bem como o risco à saúde (WHO, 1996). Tendo em vista que as aflatoxinas são excretadas em fluidos biológicos, tais como leite, urina e sangue, é possível detectá-las através da mensuração de seus biomarcadores de exposição. Dentre os biomarcadores de exposição às aflatoxinas em fluidos biológicos humanos, destacam os resíduos de AFM₁ no leite, AFM₁ e AFB₁ em vísceras, principalmente o

fígado e os adutos de proteínas séricas (albumina) DNA e RNA. Os resíduos de aflatoxinas e os adutos formados com a albumina sanguínea representam uma exposição recente às aflatoxinas (GROOPMAN; WOGAN, 1994).

A avicultura tem se destacado nas últimas décadas como um dos setores agrícolas que apresenta maior dinamismo. O seu crescimento é decorrente dos avanços tecnológicos nas áreas de genética, nutrição, sanidade e manejo, que possibilitaram a instalação de uma indústria altamente eficiente e competitiva em todo o mundo, particularmente no Brasil (ROSMANINHO et al., 2001), porém as aflatoxinas são grandes impactantes desse setor. As aflatoxinas são extremamente tóxicas para aves, pois são absorvidas rapidamente pelo trato gastrointestinal (WYATT, 1991), o que prejudica a conversão alimentar, resultando em um aumento do custo de produção avícola.

Tendo em vista o exposto, delineou-se o presente trabalho com a finalidade de verificar a aplicabilidade da determinação de produtos de biotransformação de AFB₁ e aflatoxinas residuais não metabolizadas no fígado e rins, para a avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte alimentados com rações contaminadas com aflatoxinas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de Carne de Frango no Brasil e no Mundo

O setor avícola foi o setor mais dinâmico de carne durante a última década, mostrando o maior crescimento de todos os setores de carne refletido no consumo mundial (FAO, 2010). A contínua evolução técnica da avicultura brasileira nas áreas da genética, nutrição e manejo possibilita a obtenção de produtos de baixo custo, alta qualidade e competitividade no mercado mundial (CARRIJO et al., 2005).

O dinamismo do setor avícola global tem sido apoiado por um forte crescimento da demanda. Na Ásia Oriental, a falta de abastecimento em carne suína já observada em 2007 resultou em uma mudança gradual no consumo de carne suína para a de ave. Na Federação Russa e América Latina, o crescimento de renda promoveu significativamente o consumo de carne em geral e, em particular, o de aves. A demanda por carne de aves foi ainda mais importante no Oriente Médio, onde a competição com a carne suína é quase inexistente (FAO, 2010).

Em nível global, a produção total de carne avícola aumentou de 69 milhões de toneladas, em 2000, para 94 milhões de toneladas em 2008, o que corresponde a um aumento de 35%. Este crescimento foi alcançado apesar do medo recorrente do consumidor e restrições comerciais regionais relacionadas com a propagação de várias doenças, como os surtos de gripe aviária e doença de *Newcastle*, que representaram as principais ameaças para o setor avícola em todo o mundo (FAO, 2010).

Com o crescimento econômico continuado, a demanda por proteína em países em desenvolvimento também vem aumentando, especialmente para produtos de baixo custo como a carne de frango e ovos. A demanda por produtos alimentares com baixa caloria e mudanças no estilo de vida, que reduz o tempo que os consumidores gostariam de gastar na preparação do alimento, foi observada no passado e, provavelmente, continuarão a ser observadas no futuro. Mais uma vez, é principalmente a carne de frango que cumpre com a demanda crescente do consumidor para carne magra e fácil de cozinhar (FAO, 2010).

Até os anos 70, a carne bovina representava mais de 50% do total de carnes consumidas pelos brasileiros. A segunda carne mais comprada era a suína, e a de frango vinha na terceira posição. A partir dos anos 80, porém, a busca por uma alimentação mais saudável fez com que o consumo de carnes consideradas brancas aumentasse. O consumo de carnes no Brasil

encontra-se nos patamares observados pelos países desenvolvidos, superando 80 quilos/habitante/ano, sendo que o consumo *per capita* de carne de frango, pelos brasileiros foi, em média, de 35 quilos/ano. Esse aumento do consumo de carne de frango também está ligado ao seu menor preço (CARVALHO; BACCHI, 2007).

Em 2008, o consumo global de carne de frango aumentou 4%. As maiores taxas de crescimento anual de consumo de carne de frango em 2007-2008 foram registradas na Federação Russa, com 8% de crescimento e a China e o México com 6% de crescimento cada. Os cinco maiores consumidores de carne de frango do mundo, em 2008, foram China, Estados Unidos, União Européia (UE), Brasil e Federação Russa, respectivamente. Com quase 18 milhões de toneladas de carne de frango consumida em 2008, a China se tornou a líder mundial de consumo de carne de frango, superando os Estados Unidos. O consumo *per capita* de carne de frango na China foi estimado em 13,5 kg/ano, um pouco abaixo da média mundial. Na UE, o consumo *per capita* de carne de frango tem se mantido estável ao nível de 24 kg/ano (em 2008). Na Federação Russa, o consumo de carne de frango cresceu rapidamente nos últimos anos, sendo que em 2008 o consumo *per capita* alcançou 24,7 kg. (FAO, 2010).

A taxa de crescimento mais marcante na produção de carne de frango, entre os principais países produtores, foi o Brasil, tendo um aumento de 20% da produção mundial entre 1999 e 2006. O rápido crescimento da produção brasileira, em 2008, está ligado à expansão do mercado doméstico assim como ao aumento da demanda internacional. A produção brasileira foi prevista para crescer apenas 2% em 2009, sendo solicitada aos produtores, pela Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), a redução na produção para exportação para combater a situação difícil do mercado mundial (FAO, 2010).

2.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas são micotoxinas que ocorrem naturalmente e seu nome, aflatoxina, é derivado da primeira letra em *Aspergillus* e das primeiras três letras em *flavus* (SCHOENTAL, 1967). As aflatoxinas são definidas como difuranociclopentanocumarinas/difuranopentanolidocumarinas, que contem um anel de dihidrofurano ou um anel de tetrahydrofurano (MOSS, 1989). As aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, caracterizam-se pela capacidade de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais (COULOMBE, 1991).

Aspergillus spp cresce em uma grande variedade de substratos, e a maioria dos

alimentos e rações é susceptível a invasão por cepas aflatoxigênicas, em qualquer estágio de produção, processamento, transporte e/ou estocagem. Esse fato é particularmente importante para grãos e cereais, como milho, amendoim e trigo, os quais são comumente utilizados na composição de rações empregadas em avicultura (LEESON et al., 1995).

A produção das aflatoxinas é favorecida por vários fatores, especialmente umidade relativa do ar (superior a 80%), temperatura ambiental e condições de integridade e teor de umidade do substrato. Os *A. flavus* e *A. parasiticus* proliferam em temperaturas entre 10°C e 43°C, com temperatura ótima entre 32 e 33°C. As aflatoxinas geralmente são produzidas entre 13 e 42°C, embora entre 25 a 30°C seja considerada temperatura ótima para a sua síntese (SPINOSA et al, 2008).

A toxicidade das aflatoxinas varia de acordo com a espécie animal, a idade, o sexo, o estado nutricional, o tempo de exposição e a quantidade de toxina ingerida, sendo os animais mais jovens susceptíveis aos seus efeitos, uma vez que seus sistemas enzimáticos hepáticos ainda não estão completamente desenvolvidos. A toxicidade (DL₅₀) da aflatoxina em frangos é de 6,5-16,5 mg/kg (SPINOSA et al, 2008).

No Brasil, em fevereiro de 2011, entrou em vigor uma nova legislação sobre os limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. A Resolução RDC N° 7 estabelece o limite de 0,5, 5 e 2,5 µg/kg de AFM₁ no leite fluido, leite em pó e queijos, respectivamente e de 1 a 20 µg/kg para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em diversos tipos de alimentos, como milho e seus derivados (20 µg/kg), amendoim e alguns derivados (20 µg/kg), cereais e seus produtos (5 µg/kg), castanhas (10 µg/kg) entre outros, sendo esses limites de aplicação imediata (ANVISA, 2011).

2.2.1 Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

As principais formas de aflatoxinas incluem B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 1), sendo a aflatoxina B₁ o componente biologicamente ativo mais comum de ser encontrado (HSIEH; ATKINSON, 1991).

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

Essas toxinas resultam do metabolismo fúngico, entretanto algumas são produtos da biotransformação hepática, como aflatoxicol, AFB_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFP₁ e AFQ₁ (SPINOSA, 2008). Essa biotransformação da AFB₁ é considerada como passos de desintoxicação, pois a toxicidade e a carcinogenicidade desses metabólitos são menores quando comparados com a da AFB₁ (CAMPBELL; HAYES, 1976). Apesar de possuírem estrutura química bastante semelhante (dihidrofurano ou tetrahidrofurano), estes compostos apresentam diferentes graus de atividade biológica. A aflatoxina B₁ (AFB₁) é a que apresenta maior poder toxigênico, enquanto que a toxicidade aguda das aflatoxinas B₂, G₁ e G₂ é cerca de 50, 20 e 10% da AFB₁. Quando observadas sob luz ultravioleta (UV), essas micotoxinas fluorescem na seguinte coloração: azul para B₁ e B₂, verde para G₁ e verde-azulada para G₂ (JAY, 2005).

As aflatoxinas apresentam estrutura química intimamente relacionadas entre si, formando um grupo único de compostos heterocíclicos altamente oxigenados (furocumarinas complexas). As aflatoxinas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bifuranóide. As aflatoxina B apresentam anel ciclopentanona e as do grupo G apresentam anel lactona na molécula (GOURAMA; BULLERMAN, 1995).

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas,

associadas ao citocromo P-450 (HSIEH; ATKINSON, 1991). A AFB₁ necessita, porém, sofrer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (BIEHL; BUCK, 1987; CHU, 1991; HSIEH; ATKINSON, 1991; WOGAN, 1992). A forma ativada da AFB₁ é o composto identificado como 8,9-óxido de AFB₁, ou AFB₁-epóxido (Figura 2), capaz de reagir rapidamente com macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) celular e proteínas (HSIEH; ATKINSON, 1991). Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas.

Figura 2. Forma ativada da aflatoxina B₁ (Adaptado de RAWAL et al., 2010).

As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram classificadas como agentes carcinogênicos (grupo 1), para humanos, pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002).

2.2.2 Aflatoxina M₁

A aflatoxina M₁ (AFM₁), um composto hidroxilado irreversível, conhecido como aflatoxina do leite, é um dos metabólitos da AFB₁ (CARNAGHAN et al., 1963) e foi o primeiro metabólito da aflatoxina a ser identificado (CAMPBELL; HAYES, 1976) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura química da aflatoxina M₁ (Fonte: RAWAL et al., 2010).

A AFM₁ pode sofrer epoxidação e ser ativada, formando derivados mutagênicos, o que explica sua toxicidade considerável, porém possui 10% da potência hepatocarcinogênica da AFB₁ (BAILEY et al., 1994). Quando um animal ingere um alimento contaminado com AFB₁, 0,5 a 5% da toxina ingerida é biotransformada em AFM₁ (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Quando observada sob luz ultravioleta, a AFM₁ emite coloração azul-violeta (DE IONGH et al., 1964).

A concentração de AFM₁ no leite pode variar entre animais, raças (STOLOFF et al., 1975) e entre fases de lactação (VELDMAN et al., 1992). A detecção desta toxina no leite pode ocorrer de 12 a 24 horas após a ingestão da AFB₁, sendo a máxima concentração atingida entre os dias 3 e 6, com ingestão ininterrupta de sua precursora. Quando a exposição à ração contaminada é interrompida, o nível de AFM₁ diminui e se torna indetectável em 2 a 4 dias (POLAN et al., 1974).

Inicialmente, a AFM₁ foi classificada como possível agente carcinogênico (grupo 2B) para humanos (IARC, 1993). Porém, em 2002, após a realização de novas pesquisas, a AFM₁ foi reclassificada no grupo 1 (IARC, 2002).

2.2.3 Aflatoxicol

O aflatoxicol (AFL) é um dos metabólitos da AFB₁, um produto do ciclopentanol reduzido da AFB₁ cuja formação é catalisada por redutase(s) citoplasmática(s) (WONG et al., 1979) (Figura 4).

Figura 4. Interconversão enzimática da aflatoxina B₁ e aflatoxicol (Fonte: WONG et al., 1979).

O AFL é produzido por um sistema de enzima solúvel, no qual o grupo carbonil no anel ciclopentanona da AFB₁ é reduzido a um grupo hidroxil (DETROY; HESSELTINE, 1970).

Estudos *in vitro* anteriores, usando fígado homogeneizado, mostraram que o AFL pode ser oxidado a AFB₁ novamente (PATTERSON; ROBERTS, 1972; SALHAB; EDWARDS, 1977) (Figura 4). Foi sugerido que a reversibilidade da conversão do AFL a AFB₁ pode prolongar a exposição celular aos efeitos tóxicos da AFB₁ (WONG et al. 1979; PATTERSON; ROBERTS, 1972). Um estudo usando fígado homogeneizado também sugere que a sensibilidade de uma espécie animal ao efeito carcinogênico da AFB₁ pode ser diretamente correlacionada com a atividade hepática para transformar AFB₁ em AFL (HSIEH et al., 1977). O AFL é um metabólito carcinogênico (SCHOENHARD, 1974) e mutagênico (WONG; HSIEH, 1976). Foi reportado que o AFL é menos ativo que a AFB₁, em um ensaio histopatológico com patos, sendo 18 vezes menos tóxico que a AFB₁ (DETROY; HESSELTINE, 1968). O AFL mostrou ser altamente lipofílico e é possível que ele seja mais rapidamente particionado em sangue altamente lipoidal e, por esse motivo, se recuperam mais rapidamente *in vivo*. Isso é consistente com o menor poder mutagênico do AFL quando comparado com a AFB₁ e a bioativação do AFL é provavelmente através da sua reversão para AFB₁ ao invés do inverso (WONG et al., 1979).

2.3 Efeitos Tóxicos das Aflatoxinas

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes tanto da dose quanto do período de exposição, havendo duas formas distintas de aflatoxicoses, denominadas de aguda e crônica (LESSON et al., 1995). As aflatoxinas afetam diferentes espécies, de diversas maneiras, sendo a aflatoxicose, em avicultura, caracterizada por anorexia com diminuição da taxa de crescimento, baixa conversão alimentar, diminuição do ganho de peso, diminuição da produção de ovos, aumento da susceptibilidade ao meio ambiente e à patógenos, e aumento da taxa de mortalidade (ARAFA et al., 1981). Sinais de aflatoxicose também incluem anemia, inibição da função imune, hepatotoxicose, mutagênese, teratogênese, carcinogênese e hemorragias (PARLAT et al., 1999). Outro sinal característico é a diminuição da síntese protéica (TUNG et al., 1975a). Acredita-se que a diminuição da síntese de proteínas seja responsável, em parte, por outros efeitos da aflatoxicose, como imunossupressão e coagulopatias. O fígado é o órgão alvo, em frangos, caracterizando-se por severo aumento de volume e infiltração gordurosa (SMITH; HAMILTON, 1970). A análise histológica revela lesões hepáticas que incluem congestão dos

sinusóides hepáticos, hemorragia focal, degeneração citoplasmática vacuolar centrolobular e/ou necrose, hiperplasia de ductos biliares e infiltração linfóide nodular (LEESON et al., 1995). Com a necrose dos hepatócitos, enzimas são liberadas para o sangue. A elevação de enzimas séricas, tais como fosfatase alcalina pode ser mensurada e usada como um indicador de aflatoxicose (WYATT et al., 1987). Patologias renais e alterações funcionais desse órgão também são características de aflatoxicose, em frangos; porém, essas mudanças são menos severas do que aquelas notadas no fígado (TUNG et al., 1973). Por esses motivos, as aflatoxinas têm sido consideradas de grande importância no que diz respeito à saúde aviária, e também como uma das causas de severas perdas econômicas na indústria avícola (PARLAT et al., 1999).

Em frangos de corte, a síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com altas concentrações de aflatoxina, e os efeitos são observados rapidamente. O animal apresenta perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte. Os efeitos primários da aflatoxicose em aves podem ser utilizados como guia para diagnóstico clínico da doença. A primeira mudança é alteração no tamanho dos órgãos internos como fígado, baço e rins, que aumentam, enquanto a “bursa de Fabricius” e o timo diminuem (OSWEILER, 1990).

Na síndrome crônica, o sinal mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens e ocorre quando o animal ingere concentrações pequenas de aflatoxina por um longo período de tempo (LEESON et al., 1995). A síntese hepática de gorduras, bem como seu transporte para outras áreas do organismo, é seriamente afetada. A cor desse órgão varia de normal a amarelo pálido, podendo verificar-se o aparecimento de petéquias e grandes áreas hemorrágicas. Ocorre uma infiltração gordurosa no fígado, sendo que o grau de infiltração depende da dose e do tempo de intoxicação por aflatoxina, chegando a 68% de aumento em frangos de corte (SANTURIO, 2000).

Na aflatoxicose não ocorrem erosões de moela, apesar de muitas aves com lesões características desta micotoxicose também apresentarem esse tipo de alteração. Isso parece ser um paradoxo, mas de acordo com Wyatt (1991), cerca de 36% das linhagens de *Aspergillus flavus*, além de produzirem aflatoxinas, também produzem outra micotoxina, o ácido ciclopiazônico, responsável por erosões na mucosa da moela. Na avicultura industrial, rações contaminadas mesmo com doses inferiores a 75 µg/kg de aflatoxina causam reduções de até 10% no peso das aves (LAZZARI, 1997). O efeito das aflatoxinas sobre o desempenho de frangos de corte está bem demonstrado em trabalhos prévios, como o realizado por Mariani (1998) em que, o efeito das aflatoxinas nos frangos foi maior na fase inicial de crescimento, ou

seja, quando as aves ingeriram aflatoxinas nos primeiros 21 dias de idade, mas o reflexo negativo sobre o ganho de peso foi irreversível até o abate aos 42 dias de idade.

Em poedeiras, as principais manifestações da aflatoxicose, em condições experimentais, incluem redução da produção e do peso dos ovos, aumento da gordura hepática e alteração de enzimas séricas. Exarchos e Gentry (1982) administraram doses orais de aflatoxinas de 0,7, 1,0 e 5,0 mg/kg de peso corpóreo/dia, durante 5 semanas, e observaram uma redução significativa na produção de ovos em todas as doses da toxina. De acordo com Leeson et al. (1995), os efeitos sobre a produtividade de poedeiras são manifestados quando as aves são expostas à ração contendo aflatoxinas a partir de 1 mg/kg, durante 4 semanas ou mais. Sudhakar (1990), no entanto, observou que concentrações de 0,6 mg/kg, também produziram, após 28 dias de observação, efeitos adversos sobre a produção de ovos.

Em humanos, a aflatoxicose aguda é manifestada por vômito, dor abdominal, edema pulmonar, coma, convulsões e morte com edema cerebral e envolvimento de gordura no fígado, rim e coração (STROSNIDER et al., 2006).

2.4 Adsorventes para Aflatoxinas

Considerando que a contaminação por AFB₁ em produtos alimentícios é quase universal, estratégias para reduzir a toxicidade da AFB₁ em animais têm sido propostos, particularmente para aves domésticas. De fato, por causa de sua sensibilidade, as aves têm sido usadas como modelos para a descoberta de novos agentes protetores para a AFB₁ (RAWAL et al., 2010). Alguns adsorventes, adicionados a rações contaminadas por micotoxinas, são capazes de sequestrar as toxinas, durante o processo de digestão, permitindo que a micotoxina não cause efeitos deletérios no animal (PHILLIPS et al., 1990). Assim, a adição à dieta de zeolitos, bentonita, aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) e carvão ativado tem sido utilizada para reduzir a toxicidade da aflatoxina, em avicultura (PARLAT et al., 1999).

O HSCAS atua removendo a aflatoxina, a partir de uma suspensão aquosa e reduzindo significativamente a absorção e distribuição da aflatoxina no sistema biológico, prevenindo a aflatoxicose em animais domésticos (LEESON et al., 1995). A adição de HSCAS em dietas de frangos em crescimento (KUBENA et al., 1990) e perus (KUBENA et al., 1991) resultou em significativa redução na supressão do crescimento, normalmente associada à aflatoxicose. Os principais efeitos da adição de HSCAS em rações contaminadas por micotoxinas, utilizadas em

rações de aves domésticas, derivados de alguns trabalhos disponíveis na literatura, encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Estudos dos efeitos da adição de HSCAS em rações contaminadas por micotoxinas, utilizadas para aves domésticas.

Micotoxinas	Principais Efeitos Observados	Referência
7,5 mg AFB ₁ /kg de dieta	Diminuiu o efeito de inibição do crescimento, para frangos de corte, e mostrou efetiva proteção contra alterações hepáticas macroscópicas, causadas por AFB ₁ .	PHILLIPS et al. (1988)
3,5 ppm AFB ₁ e/ou 8,0 ppm toxina T-2	Proteção quase total contra os efeitos da AFB ₁ , em frangos de corte; limitada proteção quando da associação das duas toxinas; não proteção contra a toxina T-2 isolada.	KUBENA et al. (1990)
3,5 ppm AFB ₁ e/ou 2 ppm Ocratoxina A	Reduziu o efeito da AFB ₁ , porém causou pouco efeito quando da associação das duas toxinas, ou mesmo com a ocratoxina A isolada.	HUFF et al. (1992)

A análise *in vitro* de sequestro de micotoxinas é uma ferramenta poderosa para potencial triagem de agentes sequestrantes de micotoxina. Se um agente sequestrante não adsorve uma micotoxina *in vitro*, a chance de adsorver *in vivo* é pequena ou nula. Essas técnicas laboratoriais podem ser muito úteis na identificação de potenciais agentes sequestrantes dietários e ajudando a determinar os mecanismos e condições favoráveis para o sequestro ocorrer (DIAZ, 2008).

Estudos *in vitro* anteriores mostraram que o aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) em solução aquosa se liga à AFB₁ e seus análogos que contém o sistema β-dicarbonil (PHILLIPS et al., 1988; SARR, 1992). Esse aditivo alimentar comercial antiaglutinante tem sido relatado como protetor de muitas espécies animais dos efeitos deletérios desse grupo de toxinas (PHILLIPS et al., 1995). O HSCAS também mostrou redução na excreção da AFM₁ no leite de animais lactantes que consumiram AFB₁ (HARVEY et al., 1991; SMITH et al., 1994). A proteção contra a contaminação pela aflatoxina ocorre quando o HSCAS é adicionado em quantidades tão pequenas quanto 0,5% na dieta das espécies animais (PHILLIPS et al., 1995). A proteção resulta da adsorção da aflatoxina pelo HSCAS no trato gastrointestinal, reduzindo assim a biodisponibilidade das aflatoxinas (GRANT; PHILLIPS, 1998).

Um dos modos mais eficientes de investigar a superfície de adsorção é através do uso de isotermas (GRANT; PHILLIPS, 1998), o qual tem sido utilizado com eficácia para avaliar agentes sequestrantes de micotoxina (GRANT; PHILLIPS, 1998; RAMOS; HERNANDEZ,

1996). Para descrever o processo de adsorção, várias abordagens matemáticas foram desenvolvidas. Isotermas de Langmuir constituem um dos métodos mais utilizados, dando a medida de afinidade e capacidade de ligação do adsorvente (RAMOS; HERNANDEZ, 1996). A quantidade de micotoxina adsorvida por unidade de peso é plotada contra a concentração de micotoxina em solução, a uma temperatura constante e sob condições estáveis. Este sistema leva em conta que o sequestro de micotoxinas é um processo reversível que pode ser caracterizado como um equilíbrio químico. Como resultado, a absorção é um processo dependente de concentração influenciado pela concentração de micotoxina, a quantidade de sequestrante e a relativa afinidade do composto pela micotoxina (DAWSON et al., 2001).

As isotermas de adsorção permitem a determinação dos parâmetros relacionados ao equilíbrio do processo, tais como a constante de adsorção (α) e a quantidade máxima de substância adsorvida que o material pode reter na sua superfície ($\beta = Q_{\max}$) (ADAMSON; GAST, 1997).

O modelo de adsorção proposto por Langmuir, também conhecido como isoterma de Langmuir, considera o fenômeno de adsorção em superfície homogênea, com um número fixo de posições de adsorção disponíveis na superfície, e com a formação de uma camada superficial monomolecular. O modelo também considera que as moléculas adsorvidas não sofrem interação como o meio e nem entre si (ORTIZ, 2000).

As curvas das isotermas de Langmuir são obtidas de acordo com as Equações 1 e 2, nas formas normal e linearizada, respectivamente.

$$C_{ads} = \frac{\alpha\beta C_{eq}}{(1 + \alpha C_{eq})} \quad (1)$$

$$\frac{C_{eq}}{C_{ads}} = \frac{1}{\beta\alpha} + \frac{1}{\beta} C_{eq} \quad (2)$$

Nestas expressões, C_{ads} representa a quantidade adsorvida no equilíbrio; C_{eq} é a concentração em solução no equilíbrio; K_{ads} e $Q_{\max}$ têm os seus significados já mencionados. Tais curvas referentes a esse modelo (C_{eq}/C_{ads} versus C_{eq}) apresentam, para muitos casos, uma equação de reta que será utilizada nos cálculos para obtenção dos valores de $Q_{\max}$ e α , a partir dos coeficientes linear e angular que estas retas apresentam (CHAVES, 2009).

O uso de adsorventes para anular os efeitos deletérios de micotoxinas tem a vantagem de ser viável economicamente, relativamente seguro, sendo facilmente adicionados à ração de animais de produção. Porém, existe sempre a necessidade de confirmar a eficiência dos adsorventes através de estudos *in vivo*, cujos protocolos experimentais são geralmente caros, pois envolvem a administração de níveis da toxina com e sem o adsorvente para avaliar diversos tipos efeitos sobre a produtividade dos animais, além de dados histopatológicos e clínicos, entre outros.

2.5 Biomarcadores

Biomarcadores são substâncias ou seus produtos de biotransformação, ou ainda alterações bioquímicas precoces cuja determinação em fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado permitem avaliar a intensidade de exposição a um determinado agente, bem como o seu risco à saúde (WHO, 1996). Para a validação de um biomarcador, é necessário que ele atenda a alguns pré-requisitos, tais como: refletir a interação quantitativa ou qualitativa no organismo e ser sensível e específico em relação a esta interação; ser reprodutível qualitativamente ou quantitativamente; estar presente num meio biológico cuja análise seja acessível, não destrutiva e preferencialmente não invasiva; apresentar exatidão e precisão adequadas na análise; ter valores conhecidos do indicador utilizado em populações não expostas ao agente químico de interesse, assim como variações intra e interindividuais (WHO, 1996).

As aflatoxinas são excretadas em fluidos biológicos, tais como leite, urina e sangue e podem ser detectados através da mensuração de seus biomarcadores de exposição. Em humanos, os biomarcadores de exposição às aflatoxinas em fluidos biológicos que se destacam são os resíduos de AFM₁ no leite, AFM₁ e AFB₁ em vísceras, principalmente o fígado e os adutos de proteínas séricas (albumina) DNA e RNA. Os resíduos de aflatoxinas e os adutos formados com a albumina sanguínea representam uma exposição recente às aflatoxinas (GROOPMAN; WOGAN, 1994).

A capacidade do animal de biotransformar a AFB₁ em compostos menos reativos interfere na susceptibilidade às aflatoxinas. Espécies com capacidade de formar maiores quantidades de aflatoxicol tendem a ser mais sensíveis à intoxicação aguda, uma vez que esse produto de metabolismo pode ser facilmente revertido em AFB₁ (SPINOSA et al., 2008).

Após absorção e biotransformação, as aflatoxinas distribuem-se por vários órgãos e tecidos. Em aves domésticas, os resíduos tendem a se acumular rapidamente no fígado, seguido

por rins, e músculos (TRUCKSESS et al., 1983), embora as maiores concentrações de AFB₁ tenham sido observadas no trato gastrointestinal, sobretudo a moela, no estudo efetuado por Obioha et al. (1986).

A excreção de AFB₁ residual, AFM₁ e aflatoxicol nos ovos, entretanto, assume maior relevância sob o ponto de vista de saúde humana, visto que este alimento pode representar uma fonte de exposição adicional às aflatoxinas. Jacobson e Wiseman (1974) demonstraram que, fornecendo níveis diários de 100 a 400 µg/kg de AFB₁ na ração de poedeiras, os ovos apresentaram níveis de 0,2 a 3,3 µg/kg de AFB₁. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Trucksess et al. (1977), cuja taxa de conversão (nível de AFB₁ na ração dividido pelo nível de AFB₁ residual e/ou derivados) nos ovos foi de 500:1. Por outro lado, de acordo com Park e Pohland (1986), a taxa de conversão de AFB₁ na ração, para AFB₁ residual no ovo, é de 2.200:1. Outros estudos, efetuados com poedeiras, indicaram valores de conversão bastante discrepantes, como 20.000:1 (WOLZAK et al., 1985) e 40.000:1 (TRUCKSESS et al., 1983).

Segundo Van Egmond (1994), desde o início dos anos 60, inúmeros estudos têm sido realizados para estabelecer a conversão da AFB₁ em AFM₁. Gan et al. (1988) realizaram investigação sobre a excreção de AFB₁-soroalbumina e ingestão de AFB₁ e excreção de AFM₁ em urina. Ambos os biomarcadores apresentaram um coeficiente de correlação positivo com a ingestão de AFB₁. A AFB₁-N⁷-guanina e a AFM₁ têm sido descritas como bons biomarcadores de exposição à AFB₁ em urina. Groopman et al. (1992) realizaram estudo sobre a excreção de AFB₁-N⁷-guanina, aflatoxinas M₁, P₁ e B₁, e sua relação com a ingestão de AFB₁. Os biomarcadores AFB₁-N⁷-guanina e AFM₁ apresentaram os maiores valores de correlação com a ingestão de AFB₁. Contudo, não há referência de estudos sobre a utilização de biomarcadores para avaliar a exposição às aflatoxinas por animais domésticos, com ou sem a inclusão de adsorventes na dieta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a aplicabilidade da determinação de produtos de biotransformação de AFB₁ e aflatoxinas residuais não metabolizadas no fígado e rins, para a avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte alimentados com rações contaminadas com aflatoxinas.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar os efeitos da AFB₁ com e sem a inclusão de um adsorvente experimental (aluminossilicato hidratado de cálcio e sódio – HSCAS): ([0 AFB₁+0 adsorvente], [2,5 mg/kg AFB₁+0 adsorvente], [0 AFB₁+0,5% adsorvente] e [2,5 mg/kg AFB₁+0,5% adsorvente], administrados na ração, em frangos de corte, através dos parâmetros: conversão alimentar, ganho de peso, consumo alimentar, proteínas séricas, enzimas hepáticas e histopatologia de fígado.
- Determinar a concentração de resíduos de aflatoxina B₁ (AFM₁, aflatoxicol e AFB₁ não metabolizada), AFG₁, AFG₂ e AFB₂ no fígado e rim das aves.
- Verificar a correlação entre as concentrações de resíduos de aflatoxinas nos tecidos e as demais variáveis analisadas no experimento, em condições de intoxicação com e sem a inclusão de adsorvente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Instalações

O experimento foi conduzido nas instalações experimentais do *Department of Animal Sciences, Univeristy of Missouri*, em Columbia, MO, Estados Unidos da América. Foram utilizados 100 pintos de um dia de idade, provenientes de matrizes comerciais de frangos de corte, linhagem comercial Ross 708, machos e vacinados no incubatório contra doença de Marek. As aves foram pesadas, marcadas, alojadas em baterias metálicas comerciais, constituídas de 4 andares, mantidas em um programa de luz constante de 24 horas e receberam água e ração *ad libitum* (Figura 5).

Figura 5. Pintos de 1 dia e frangos de 2 semanas alojados em bateria metálica.

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos, sendo cada tratamento composto por 5 gaiolas contendo 5 frangos em cada uma. Os tratamentos foram os seguintes: A) dieta basal (DB), sem adição de HSCAS ou AFB₁; B) DB com adição de 0,5% de HSCAS; C) DB com adição de 2,5 mg/kg de AFB₁; e D) DB com adição de 2,5 mg/kg de AFB₁ e 0,5% de HSCAS. As rações experimentais foram administradas aos animais do 1º ao 21º dia de vida.

4.2 Adsorvente Experimental

O termo HSCAS constitui uma classificação geral que inclui diferentes adsorventes, não sendo uma substância específica. Pode ser definido como todo material de aluminossilicato puro, que contenha mistura de água zeolítica e menores quantidades de cálcio e sódio na forma de cátions ou seus sais solúveis. No presente trabalho, utilizou-se HSCAS comercialmente disponível, de marca não declarada por motivo de sigilo industrial.

4.3 Preparo da AFB₁ para Intoxicação Experimental

A AFB₁ utilizada para a contaminação das rações foi produzida no *Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Missouri*, a partir do cultivo de cepa toxigênica de *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999) em arroz (750 mg AFB₁/kg), conforme metodologia desenvolvida por Shotwel et al. (1966). A concentração de aflatoxinas B₁, B₂, G₂ e G₂ na dieta foi confirmada através de análise e todas as dietas foram analisadas para verificar se havia a presença de outras micotoxinas antes do início do experimento. As rações, assim preparadas, foram homogeneizadas por cerca de 15 minutos em misturador horizontal/helicoidal, e armazenadas em local apropriado até a sua utilização.

A preparação das rações contaminadas foi realizada em etapas, no decorrer do experimento. Nestas ocasiões, foram comprovados os níveis de aflatoxinas nas rações prontas, retirando-se 1 amostra de 1 kg de cada ração preparada contendo toxina. A análise de aflatoxinas foi realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), mediante a utilização do método descrito por Rottinghaus et al. (1982, 1992). As concentrações de aflatoxinas B₁, B₂, G₂ e G₂ na dieta dos 4 tratamentos estão apresentadas abaixo na Tabela 2.

Tabela 2 - Tratamentos para a avaliação da eficácia do HSCAS em reduzir os efeitos tóxicos da aflatoxina.

Tratamento	AFB ₁ (mg/kg)	Adsorvente (HSCAS)
A	0	0
B	0	0,5
C	2,5	0
D	2,5	0,5

4.4 Preparo das Rações Experimentais

A dieta basal foi uma dieta comercial de milho e soja formulada para estar de acordo ou exceder os requerimentos nutricionais para frangos de corte em crescimento, como recomendado pelo National Research Council (NRC, 1994). As Tabelas 3 e 4 apresentam a composição da dieta basal dos frangos e os valores nutricionais calculados, respectivamente.

Tabela 3 – Composição da dieta basal utilizada no período de 1 a 21 dias.

Ingredientes	Percentagem (%)
Milho	52,029
Farelo de Soja	36,212
Óleo de Soja	6,000
Farinha de Carne	1,750
Fosfato Bicálcico	1,369
Calcário	1,018
Areia	0,750
Sal comum	0,433
Suplemento Vit/Min.	0,250
DL metionina	0,189
Total	100,000

Suplemento vitamínico/kg de dieta – Arginina(mg) 1,52; Gli+Ser(mg) 2,09; Histidina(mg) 0,60; Isoleucina(mg) 0,94; Leucina(mg) 1,93; Fenilalanina+Tirosina(mg) 1,96; Fenilalanina(mg) 1,08; Treonina(mg) 0,86; Triptofano(mg) 0,31; Valina(mg) 1,05; Ácido linoléico(mg) 4,42; Selênio(mg) 0,19; Riboflavina(mg) 8,25; Ác. Pantotênico(mg) 14,18; Niacina(mg) 48,76; Vit B₁₂(mg) 0,01; Colina(mg) 1731,46; Biotina(mg) 0,18; Folacina(mg) 2,20; Tiamina(mg) 4,09; Piridoxina(mg) 7,05.

Suplemento mineral/kg de dieta – Manganês(mg) 123,56; Zinco(mg) 129,73; Ferro(mg) 509,19; Cobre(mg) 19,01; Iodo(mg) 1,50

Tabela 4 – Valores nutricionais calculados da dieta basal.

EM, kcal/kg	3.200
PB (%)	23,00
Ca (%)	1,00
Fósforo Disponível (%)	0,45
Metionina (%)	0,53
Met+Cis (%)	0,90
Lisina (%)	1,26

EM = Energia Metabolizável; PB = Proteína Bruta; Ca = Cálcio; Met = Metionina; Cis = Cistina.

4.5 Análise do Percentual de Adsorção *In Vitro*

A metodologia de Ledoux e Rottinghaus (1999) foi utilizada para realizar a análise *in vitro* e encontra-se descrita abaixo.

Pesou-se, em duplicata, 0,05, 0,25, 0,5, 1, 10 e 100 mg/10 mL diferentes concentrações do adsorvente em tubos Falcon de 15 mL e pipetar 10 mL de tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, ajustado para pH 3,0, contendo 2 mg/L de AFB₁ em cada tubo.

A fim de medir perdas devido ligações não específicas e para eliminar picos exógenos, um controle foi preparado adicionando-se 10 mL de tampão fosfato salino 0,1 M em pH 3,0 e adsorvente em um tubo Falcon separado. Os tubos foram colocados em um *shaker* rotatório por 30 minutos a 115 rpm, em temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugados a 13.000 rpm durante 5 minutos. Pipetou-se 1,0 mL do sobrenadante em um *vial* limpo para análise no CLAE. O sistema CLAE incluiu um modelo de bomba Hitachi L-7100, com detector de fluorescência Hitachi modelo L-7400 UV ou Model L-7485 (excitação: 365 nm; emissão: 430 nm), amostrador automático Hitachi modelo L-7200 com interface de aquisição de dados Hitachi D-7000 e *software* ConcertChrom em um computador. Utilizou-se coluna Phenomenex® 100 X 4.6 mm Hyperclone C18 (3 µm), com fase móvel de água:acetonitrila (70:30) e fluxo de 1 mL/min.

Uma alíquota da solução tampão teste de aflatoxina pH 3,0 original foi utilizada como padrão para a aflatoxina. Amostras e controle foram analisados pelo CLAE.

A eficiência de ligação do adsorvente à AFB₁ foi determinada através da Equação 3.

$$\% \text{ AFB}_1 \text{ ligada} = \frac{1 - (\text{Área do pico da amostra} - \text{Área do pico controle}) \times 100}{\text{Área do pico do padrão (2,0 } \mu\text{g/mL)}} \quad 3$$

4.6 Avaliação dos Índices de Produtividade

O consumo de ração, ganho de peso corporal, conversão alimentar, percentual de mortalidade e pesos relativos do rim e fígado foram avaliados. O ganho de peso foi avaliado semanalmente. O consumo de ração foi determinado ao final do experimento e a conversão alimentar foi calculada.

Foi determinada, também, a viabilidade dos animais, expressa em percentagem, das aves sobreviventes ao término do experimento, em relação ao total. As aves que vieram a óbito no decorrer trabalho foram necropsiadas para a pesquisa de possíveis alterações anátomo-patológicas. Além disso, os frangos eram inspecionados diariamente e qualquer problema relacionado à saúde era registrado.

4.7 Análises Histopatológica e Bioquímica Sérica

Ao final do experimento, 10 frangos de cada tratamento (5 replicatas de 2 frangos cada) foram anestesiados com dióxido de carbono, sangrados por punção cardíaca e amostras foram utilizadas para análise química das proteínas séricas (albumina, globulina e proteína total), enzimas séricas (GGT, AST e ácido úrico), glicose e cálcio.

Seguido da coleta de sangue, os frangos foram abatidos por deslocamento cervical e o fígado e rim foram removidos e pesados (5 repetições de 3 frangos cada). Amostras de fígado e rim de 5 aves por tratamento foram coletados para análise de resíduo de aflatoxina.

Amostras de fígado coletadas de 6 frangos de cada tratamento foram fixadas em formalina, embebidas em parafina, seccionadas à 4 μ m e coloridas com hematoxilina e eosina. Seções do fígado de todos os tratamentos foram examinadas microscopicamente. Valores de amostras numéricas individuais são relatados abaixo, conforme Luna (1968):

- 1 = Seção do fígado sem lesão (não notável);
- 2 = Lesões na seção do fígado são compatíveis com aflatoxicose suave;
- 3 = Lesões na seção do fígado são compatíveis com aflatoxicose moderada;
- 4 = Lesões na seção do fígado são compatíveis com aflatoxicose severa.

4.8 Análises de Resíduos de Aflatoxinas em Fígado e Rins

Para essas análises, utilizou-se o método adaptado de Chiavaro et al. (2005), com purificação dos extratos através de colunas de imunoafinidade AFLAPREP M[®], para quantificar as aflatoxinas B₁, B₂, M₁, G₁, G₂ e aflatoxicol em fígado e rim. Resumidamente, amostras frescas ou congeladas de fígado ou rim foram moídas com metanol-água (80:20) em um *mixer* e o *slurry* resultante foi centrifugado a 3000 rpm. Uma alíquota do supernadante foi

diluída em tampão fosfato salino (PBS) e passada pela coluna de imunoafinidade. Depois da lavagem com PBS e água destilada, as aflatoxinas foram eluídas com acetonitrila (ACN) e água. As amostras foram analisadas através do CLAE com detecção fluorescente, excitação de 365 nm e emissão de 440 nm. O limite de detecção foi estipulado em 1,0 µg/kg de aflatoxinas.

Os detalhes da marcha analítica para determinação de resíduos de aflatoxinas em amostras de fígado e rins encontram-se descritos a seguir.

4.8.1 Reagentes, Padrões e Instrumentos

Solução padrão primária de aflatoxinas totais ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) – marca Trilogy Analytical (5,0 µg/mL de aflatoxinas em acetonitrila).

Solução padrão primária de aflatoxina M_1 – marca Trilogy Analytical (1,0 µg/mL de aflatoxinas em acetonitrila).

Solução padrão primária de aflatoxicol – marca Sigma-Aldrich (1,37 µg/mL de aflatoxinas em acetonitrila).

Solução padrão intermediária de aflatoxinas totais ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) (50 µg/L) – foi preparada adicionando 10 µL da solução padrão primária de aflatoxinas totais e 990 µL de acetonitrila em um vial de polipropileno.

Solução padrão intermediária de aflatoxina M_1 (50 µg/L) – foi preparada adicionando 50 µL da solução padrão primária de aflatoxina M_1 e 950 µL de acetonitrila em um vial de polipropileno.

Solução padrão intermediária de aflatoxicol (50 µg/L) – foi preparada adicionando 36 µL da solução padrão primária de aflatoxicol e 964 µL de acetonitrila em um vial de polipropileno.

Soluções-trabalho do padrão de aflatoxinas – pipetou-se 10 µL das aflatoxinas totais, aflatoxina M_1 e aflatoxicol em um vial amostrador contendo 800 µL de água destilada e 170 µL de acetonitrila, resultando em uma solução padrão de aflatoxina de 20 ppb.

Colunas de imunoafinidade – Colunas AFLAPREP M (R-Biopharm Rhone LTD), foram armazenadas sob refrigeração e mantidas em temperatura ambiente antes de serem utilizadas.

Tampão fosfato salino (PBS) – pH 7,4, Sigma-Aldrich. Um pacote foi dissolvido em 1 L de água destilada para obter 0,1 M de PBS e foi armazenado em temperatura ambiente.

Sistema CLAE – Modelo de bomba Hitachi L-7100 com detector de fluorescência Hitachi modelo L-7480 ou L-7485, amostrador automático Hitachi modelo L-7200 com interface de aquisição de dados Hitachi D-7000 e software Concert Chrom em um computador.

Parâmetros de operação do CLAE:

Coluna do HPLC: 150 X 4,6 mm de fase reversa HyperClone, coluna de 3 μm C₁₈ BDS (Phenomenex) com uma pré-coluna C₁₈ SecurityGuard (Phenomenex).

Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (2300:150:150) com 1,2 g de KBr e 360 μL de HNO₃ concentrado. A fase móvel foi filtrada e degaseificada passando-a em uma membrana filtradora de nylon de 0,45 μm , sob vácuo.

Taxa de passagem: 1 mL/min

Volume de injeção: 50 μL

Temperatura da coluna: temperatura ambiente

Comprimento de onda para detecção: ex-365nm; em-440 nm (ex = excitação; em = emissão)

Tempo de corrida: 30 min (AFB₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e aflatoxicol)

4.8.2 Procedimento de Análise

1. Pesou-se aproximadamente 5 g de fígado ou rim em um tubo Falcon de 50 mL. Adicionou-se 25 mL de metanol:água (80:20) e a amostra foi moída durante 2-3 minutos. Centrifugou-se por 5 minutos a 3000 rpm (Figura 6).

Figura 6. Moagem, amostras homogeneizadas e centrifugadas.

2. A tampa superior da coluna de afinidade AFLAPREP M foi removida e firmemente acoplada ao reservatório de uma seringa de polipropileno usando um adaptador de coluna que foi colocada em uma prateleira de colunas. Assegurou-se de que a tampa da base da coluna de imunoafinidade estava no lugar.
3. Misturou-se 25 mL de PBS e 4 mL do extrato da amostra em um tubo e adicionou-se ao reservatório. A tampa da base da coluna de imunoafinidade foi removida e permitiu-se a passagem da solução pela coluna por gravidade, com pressão ocasional de um bulbo de pipeta (taxa de passagem de 1-2 gotas/segundo) (Figura 7).

Figura 7. Passagem do extrato da amostra juntamente com o PBS pela coluna de imunoafinidade.

4. Lavou-se a coluna adicionando-se 10 mL de PBS ao reservatório e passou-se pela coluna de imunoafinidade a uma taxa de passagem de 5 mL/min. Repetiu-se o passo da lavagem seguido de 2 mL de água destilada e toda água foi expulsa da coluna com o bulbo de pipeta (bomba).
5. Removeu-se o adaptador e o reservatório vazio da coluna de imunoafinidade e adicionou-se 1 mL de ACN a coluna de imunoafinidade, permitindo-se a passagem pela coluna até que uma gota aparecesse na parte inferior. Tampou-se rapidamente o fundo da coluna e deixou-se descansando por 5 minutos. Removeu-se a tampa inferior e deixou-se eluir a aflatoxina, em um frasco de amostra limpo, pela passagem lenta da acetonitrila através da coluna, a uma taxa de passagem de 1 gota/segundo ou por gravidade.
6. Passou-se 2 mL de ACN pela coluna de imunoafinidade e coletou-se isso no mesmo frasco de amostra; empurrando-se ar pela coluna para coletar as últimas gotas do eluente, obtendo-se assim um volume total de 3 mL.
7. Secou-se o conteúdo do frasco de amostra (Figura 8). Quando não havia mais líquido, adicionou-se 200 μ L de ACN e 800 μ L de água destilada. Agitou-se no Vortex durante 1 minuto.
8. Preparou-se a solução padrão.
9. Rodaram-se as amostras e o padrão no CLAE (Figura 8).

Figura 8. Secagem da amostra e cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

Tempos de retenção aproximados: (Figura 9)

Aflatoxin B ₁	15,03 min
Aflatoxin B ₂	11,04 min
Aflatoxin G ₁	10,05 min
Aflatoxin G ₂	7,49 min
Aflatoxin M ₁	6,27 min
Aflatoxicol	24,35 min

Cálculos:

$$\frac{(\text{Área do pico da amostra}) \times (\text{Volume final})}{\text{Massa do tecido (fígado ou rim)}} = \mu\text{g/kg (ppb) aflatoxinas}$$

Figura 9. Cromatograma dos padrões das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e aflatoxicol, no CLAE.

4.9 Análise dos Resultados

Os resultados do experimento foram submetidos à análise de variância, de acordo com os procedimentos estabelecidos no *General Linear Model* do SAS[®] (SAS Institute, 1992) para a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre as médias das variáveis estudadas nos diferentes tratamentos. Para a comparação entre as médias, quando aplicável, empregou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram utilizados para a determinação do Coeficiente de Correlação de Pearson (r), entre as concentrações de biomarcadores e as demais variáveis analisadas no experimento. O teste “t” de Student, com aproximação normal, foi utilizado para comparar os valores de correlação. Todas as análises foram realizadas considerando-se o nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eficiência *In Vitro* do HSCAS

Os valores para a quantidade de HSCAS, concentração inicial de AFB₁, AFB₁ em solução (CLAE), percentagem de ligação de AFB₁ e AFB₁ adsorvida são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Percentual de ligação de diferentes quantidades de HSCAS em solução de 2 mg/L AFB₁, em pH 3.

Concentração de HSCAS (mg/10 mL)	Concentração inicial de AFB ₁ (µg/mL)	Concentração final de AFB ₁ (µg/mL)	Ligação de AFB ₁ (%)
100	2,0	0,010	99,5
10	2,0	0,178	91,1
1	2,0	0,365	81,8
0,5	2,0	0,492	75,4
0,25	2,0	1,198	40,1
0,05	2,0	1,825	8,8

A percentagem de AFB₁ ligada para cada concentração de adsorvente (0,05, 0,25, 0,5, 1, 10 e 100 mg/10 mL) foi de 8,8, 40,1, 75,4, 81,8, 91,1 e 99,5%, respectivamente. Quanto maior a concentração de HSCAS, maior foi a habilidade de se ligar à AFB₁. Esse resultado está de acordo com os dados reportados por Phillips et al. (1995), que encontraram que a adição de HSCAS à dieta de espécies animais poderia protegê-los dos efeitos tóxicos da aflatoxina.

Shi et al. (2006) testaram a habilidade de ligação do nanocomposto de montmorilonita modificado (MMN) para adsorver aflatoxina, com isoterma de adsorção à um pH 7 e à temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A capacidade de adsorção máxima do MMN para aflatoxina foi estimada em 66,67 µg/mg de MMN. Baseado nos índices de quimiossorção, o MMN possuiu estreita ligação pela aflatoxina (75,4%), o que previu que o MMN pode ser efetivo em adsorver e inativar a toxina no trato gastrointestinal dos animais.

De acordo com Ramos e Hernández (1996), o adsorvente deve ter uma alta afinidade pela micotoxina específica resultando na formação de um forte complexo, reduzindo assim a possibilidade de qualquer ruptura do complexo o que resultaria numa absorção subsequente dos metabólitos fúngicos. O adsorvente deve também possuir uma alta capacidade de ligação para prevenir a saturação do adsorvente. A proteção contra a aflatoxina resulta da ligação de aflatoxinas com o HSCAS no trato gastrointestinal, reduzindo assim a biodisponibilidade de

aflatoxinas (Grant; Phillips, 1998). Os valores de $Q_{\max}$, α e r^2 podem ser encontrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros da isoterma de Langmuir ajustados para a adsorção da AFB₁ pelo HSCAS, em pH 3.

Amostra	AFB ₁		
	Quantidade Máxima Adsorvida ($\beta = Q_{\max}$), mg/g	α (g/L)	Coefficiente de Determinação (r^2)
HSCAS	48,02	1,61	0,885

Os resultados encontrados no presente estudo são similares àqueles observados por Dakovic et al. (2008), que reportaram valores de $Q_{\max}$ de 40,98 e 66,23 mg/g, valores de α de 3,51 e 1,06 g/L e valores de r^2 de 0,9879 e 0,9987 para montmorilonita e montmorilonita modificada com Cu, respectivamente. A modificação da montmorilonita com o Cu aumentou sua eficácia em adsorver AFB₁.

A adsorção da AFB₁ pelo HSCAS, em pH 3, é encontrada na Figura 10.

Figura 10. Isotherma de Langmuir da adsorção da AFB₁ pelo HSCAS, em pH 3.

Considerando que o HSCAS é livre de constituintes orgânicos e a adsorção é específica para AFB₁, Grant e Phillips (1998) afirmaram que a AFB₁ se liga ou reage em um sítio com um íon metal ou superfície metálica. Vários metais em concentrações traço podem ser encontrados

no HSCAS, mas apenas cinco (Al, Ca, Fe, Mg e Si) apresentam-se em quantidades suficientes no HSCAS para se ligar à AFB₁. O adsorvente em questão mostrou, previamente, eficiência para proteger animais da aflatoxicose e essa proteção é atribuída à quimiossorção da região interlamelar do adsorvente com uma quantidade mínima sendo adsorvida no exterior do adsorvente.

5.2 Eficiência *In Vivo* do HSCAS

5.2.1 Desempenho dos Frangos de Corte

Na Tabela 7, é possível observar os resultados da análise de desempenho dos frangos, bem como os pesos relativos de rim e fígado das aves experimentais.

Tabela 7 – Parâmetros de desempenho e pesos relativos de rim e fígado de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia¹.

HSCAS (%)	AFB ₁ (mg/kg)	Consumo de Ração ¹ (g)	Ganho de Peso Corporal ¹ (g)	Conversão Alimentar ¹ (g/g)	Mortalidade ¹ (%)	Peso Relativo do Rim ² (g/100 g.p.c)	Peso Relativo do Fígado ² (g/100 g.p.c)
0 (controle)	0	993 ^a	800 ^a	1,243	0	0,804 ^b	2,668 ^b
0,5	0	970 ^a	772 ^a	1,272	4	0,771 ^b	2,735 ^b
0	2,5	747 ^b	581 ^b	1,396	12	1,277 ^a	4,012 ^a
0,5	2,5	794 ^b	651 ^b	1,246	8	1,354 ^a	3,886 ^a
EPM		19	22	0,064	0,10	0,043	0,089
Probabilidade		< 0,0001	< 0,0001	0,3143	0,4265	< 0,0001	< 0,0001

¹Os dados são médias de 5 gaiolas em replicata, cada gaiola com 5 frangos.

²Os dados são médias de 5 gaiolas em replicata, cada gaiola com 3 frangos.

^{a-b}Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05)

AFB₁=Aflatoxina B₁; HSCAS=Aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado; EPM=Erro padrão da média.

As aves dos tratamentos que continham 2,5 mg/kg de AFB₁ e 0,5% de HSCAS + 2,5 mg/kg de AFB₁ tiveram um consumo de ração, ganho de peso corporal, peso relativo do rim e peso relativo do fígado sem diferença significativa entre si porém apresentaram diferença estatística com as aves do tratamento controle e com as aves do tratamento com 0,5% de HSCAS. Apesar de a mortalidade ter sido maior nos animais alimentados com 2,5 mg/kg de AFB₁, não foi observada diferença estatística.

Experimento *in vivo* foi conduzido por Ledoux et al. (1998) para avaliar a eficácia do HSCAS (Milbond-TX[®] melhorado, IMTX) para aliviar os efeitos tóxicos da AFB₁ em frangos. Os autores observaram que o consumo de ração foi menor em frangos alimentados com AFB₁ (747 g) e AFB₁ com adição do HSCAS (794 g) quando comparados com frangos alimentados com DB (993 g) e DB com adição do HSCAS (970 g). Ledoux et al. (1998) obtiveram resultados similares em frangos alimentados com 4,0 mg/kg AFB₁ (746 g) e 4,0 mg/kg AFB₁ com adição de 1% de IMTX (1.000 g) quando comparado com frangos alimentados com DB (964 g) e DB com adição de 1% IMTX (979 g).

No presente estudo, o ganho de peso corporal também foi menor em frangos alimentados com 2,5 mg/kg de AFB₁ (581 g) e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS (651 g) quando comparados com frangos do tratamento controle (800 g) e 0,5% de HSCAS (772 g). Ledoux et al. (1998) obtiveram resultados similares em frangos alimentados com 4,0 mg/kg de AFB₁ (583 g) e 4,0 mg/kg de AFB₁ com adição de 1% de IMTX (796 g) quando comparado com frangos alimentados com DB (779 g) e DB com adição de 1% de IMTX (788 g). O ganho de peso corporal das aves alimentadas com 3 g de nanocomposto de montmorilonita modificado (MMN) e 3 g de MMN adicionado de aflatoxina não foram significativamente diferentes do controle (DB). O dado sugeriu que o adsorvente avaliado diminuiu significativamente os efeitos inibitórios no crescimento, produzidos pela aflatoxina (SHI et al., 2006) enquanto que no presente estudo, o adsorvente não diminuiu significativamente os efeitos inibitórios da aflatoxina, apesar de ter melhorado, numericamente, o ganho de peso de frangos alimentados com 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS. Os dados do presente estudo estão de acordo com Oğuz et al. (2000), que também não encontraram diferença estatística entre os tratamentos com 100 µg/kg de AFB₁ ($446,31 \pm 11,91$) e 100 µg/kg de AFB₁ + 15 g/kg ($445,81 \pm 8,89$) de clinoptilolita (CLI).

Com relação à conversão alimentar obtida no experimento, não houve diferença significativa entre os tratamentos controle (1,243 g), 0,5% de HSCAS (1,272 g), 2,5 mg/kg de AFB₁ (1,396 g) e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS (1,246 g), porém, a adição do HSCAS à AFB₁ pareceu melhorar a conversão alimentar dos frangos. Esses resultados estão de acordo com Ledoux et al. (1998) que encontraram 1,24 g:g (DB), 1,24 g:g (DB com adição do IMTX), 1,28 g:g (AFB₁) e 1,26 g:g (AFB₁ com adição do IMTX). A conversão alimentar no experimento de Shi et al. (2006), foi significativamente maior ($P < 0,05$) nos frangos alimentados somente com 0,1 mg aflatoxina/kg de alimento ($2,1 \pm 0,07$) quando comparado com os outros tratamentos, DB ($1,9 \pm 0,05$); 3 g MMN/kg de alimento ($1,9 \pm 0,03$); e 0,1 mg

aflatoxina/kg adicionado de 3 g MMN/kg de alimento ($2,0 \pm 0,06$). Denli et al. (2009) realizaram um experimento com cento e vinte frangos de corte (Ross 308) machos, do nascimento até os 42 dias de idade, utilizando 8 tratamentos (Dieta basal (DB) sem adição de AflaDetox e AFB₁; DB com 1 g/kg de AflaDetox; DB com 2 g/kg de AflaDetox; DB com 5 g/kg de AflaDetox; DB com 1 mg/kg AFB₁; DB com 1 mg/kg AFB₁ e 1 g/kg de AflaDetox; DB com 1 mg/kg AFB₁ e 2 g/kg de AflaDetox; e DB com 1 mg/kg AFB₁ e 5 g/kg de AflaDetox), encontrando valores para cada tratamento de 1,62, 1,62, 1,59, 1,65, 1,78, 1,79, 1,67 e 1,66, respectivamente, sendo o tratamento com 5 g/kg de AflaDetox eficaz em diminuir os efeitos deletérios causados pela aflatoxina.

A redução na taxa de crescimento, em aves, é o efeito da aflatoxicose mais significativa economicamente (DENLI et al., 2009). Os efeitos adversos da AFB₁ no desempenho do crescimento têm sido relatados com uma diminuição na utilização de proteína e energia (DALVI; ADEMOYERO, 1984; VERMA et al., 2002) provavelmente como uma consequência da deterioração da eficiência digestiva e metabólica das aves (DENLI et al., 2009).

A mortalidade total obtida no estudo foi de 6 (24%) frangos, dos quais 1 (4%) do tratamento com 0,5% de HSCAS, 3 (12%) que receberam 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2 (8%) do tratamento com 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS. Shi et al. (2006) observaram mortalidade apenas nos frangos alimentados com aflatoxina (2,5%). Ledoux et al. (1998) tiveram cinco frangos mortos (dois DB; dois AFB₁; e um AFB₁ com adição de IMTX). Nenhuma grande lesão relacionada com tratamento foi observada nos frangos da DB, alimentados com IMTX ou alimentados com AFB₁ adicionado de IMTX. Frangos alimentados somente com AFB₁ tiveram fígados pálidos e aumentados.

Huff et al. (1986) realizaram um experimento com frangos de corte (Hubbard x Hubbard) machos, do nascimento até 3 semanas de idade, utilizando 4 tratamentos (0, 1,25, 2,5 e 5,0 mg de aflatoxina/kg de ração). O peso relativo do rim para o tratamento com 2,5 e 5,0 mg/kg de aflatoxina foi significativamente maior do que os valores do grupo controle. Ledoux et al. (1998) obtiveram valores do peso relativo do rim para os quatro tratamentos (DB, DB com adição do IMTX, AFB₁ e AFB₁ com adição do IMTX) de 0,92, 0,93, 1,53 e 0,94%, respectivamente, sendo o tratamento com AFB₁ significativamente diferente dos outros. Shi et al. (1998) obtiveram valores do peso relativo do rim para os quatro tratamentos (DB, DB com adição do MMN, aflatoxina e aflatoxina com adição de MMN) de $0,58 \pm 0,055$, $0,59 \pm 0,067$, $0,67 \pm 0,058$ e $0,60 \pm 0,083\%$, respectivamente, sendo o tratamento com aflatoxina significativamente diferente dos outros. Os resultados encontrados no presente estudo também

foram significativamente maiores para os rins das aves alimentadas com AFB₁ (1,277%) e AFB₁ mais HSCAS (1,354%) quando comparados com os grupos controle (0,804%) e HSCAS (0,771%).

O peso relativo do fígado para os quatro tratamentos (controle, 0,5% de HSCAS, 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% HSCAS) foi de 2,668, 2,735, 4,012 e 3,886%, respectivamente. Ledoux et al. (1998) obtiveram valores do peso relativo do fígado para os quatro tratamentos (DB, DB com adição do IMTX, AFB₁ e AFB₁ com adição do IMTX) de 2,62, 2,62, 4,21 e 2,68%, respectivamente, sendo o tratamento com AFB₁ significativamente diferente dos outros. Shi et al. (1998) obtiveram valores do peso relativo do fígado para os quatro tratamentos (DB, DB com adição do MMN, aflatoxina e aflatoxina com adição de MMN) de $2,3 \pm 0,13$, $2,2 \pm 0,13$, $2,4 \pm 0,11$ e $2,3 \pm 0,08$ %, respectivamente, sendo o tratamento com aflatoxina significativamente diferente dos outros. Denli et al. (2009) obtiveram valores do peso relativo do fígado para os 8 tratamentos (Dieta basal (DB) sem adição de AflaDetox e AFB₁; DB com 1 g/kg de AflaDetox; DB com 2 g/kg de AflaDetox; DB com 5 g/kg de AflaDetox; DB com 1 mg/kg AFB₁; DB com 1 mg/kg AFB₁ e 1 g/kg de AflaDetox; DB com 1 mg/kg AFB₁ e 2 g/kg de AflaDetox; e DB com 1 mg/kg AFB₁ e 5 g/kg de AflaDetox) de 2,09, 2,11, 2,19, 2,21, 2,70, 2,32, 2,30 e 2,20, respectivamente, sendo o AflaDetox eficaz na detoxificação da AFB₁.

O fígado é considerado o órgão alvo durante a aflatoxicose em aves, pois o peso relativo do fígado é significativamente aumentado por pequenas concentrações de aflatoxina quando comparado com qualquer outro órgão (HUFF et al., 1986) porém, o rim também participa do processo de detoxificação da aflatoxina (SAWHNEY et al., 1973). Os efeitos tóxicos produzidos pela AFB₁ estavam, em geral, de acordo com estudos anteriores (HUFF et al., 1986; LEDOUX et al., 1998; SHI et al., 2006; DENLI et al., 2009), reduzindo o consumo de ração e o ganho de peso corporal e aumentando a conversão alimentar, a mortalidade e o peso relativo dos órgãos.

5.2.2 Bioquímica Sérica dos Frangos de Corte

Na Tabela 8, pode-se observar os resultados da análise do soro do sangue dos frangos.

Tabela 8 - Parâmetros da bioquímica sérica de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia¹.

HSCAS (%)	AFB ₁ (mg/kg)	GLI (mg/dL)	ALB (g/dL)	PT (g/dL)	GLOB (g/dL)	Ca (mg/dL)	AST (U/L)	GGT (U/L)	AU (mg/dL)
0 (Controle)	0	351 ^{ab}	0,90 ^a	2,04 ^a	1,14 ^b	10,52 ^{ab}	284	11,4	8,26
0,5%	0	419 ^a	0,94 ^a	2,32 ^a	1,40 ^a	10,76 ^a	283	12,6	9,00
0	2,5	226 ^c	0,42 ^b	1,14 ^b	0,74 ^c	9,28 ^c	216	12,2	7,84
0,50	2,5	264 ^{bc}	0,56 ^b	1,40 ^b	0,88 ^c	9,62 ^{bc}	218	12,8	8,78
EPM		26	0,04	0,08	0,05	0,28	40	1,0	0,94
Probabilidade		0,0004	<0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0044	0,4578	0,7596	0,8175

¹Os dados são médias de 5 gaiolas em replicata, cada gaiola com 2 frangos.

^{a-c}Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05)

AFB₁=Aflatoxina B₁; HSCAS=Aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado; GLI=Glicose; ALB=Albumina; PT=Proteína Total; GLOB=Globulina; Ca=Cálcio; AST=Aspartato Aminotransferase; GGT=Gama Glutamil Transferase; AU=Ácido Úrico; EPM=Erro Padrão da Média.

Diferenças significativas foram observadas entre as quatro diferentes dietas para glicose, albumina, proteína total, globulina e cálcio, sendo que as aves alimentadas com a ração contendo 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS obtiveram os piores resultados. O esperado seria que o adsorvente tivesse melhorado os padrões sorológicos dos animais alimentados com 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS, porém isso não ocorreu.

O parâmetro mais sensível para induzir mudança da medida de aflatoxina no estudo de Huff et al. (1986) foi o nível de albumina no soro. Nos frangos do grupo controle, os níveis de albumina no soro aumentaram durante os dias 3 e 6, e então permaneceram constantes durante os 21 dias de idade (aproximadamente 1,30 g/100 mL). Ledoux et al. (1998) encontraram em seu estudo com quatro dietas (DB, DB com adição de IMTX, DB com adição de AFB₁ e DB com adição de IMTX e AFB₁) níveis de ALB de 1,26, 1,27, 0,91 e 1,28 g/dL, respectivamente. O níveis de albumina no soro de frangos que consumiram 2,5 mg/kg de aflatoxina diminuiu significativamente no dia 6 e permaneceu diminuído até o dia 21 (aproximadamente 0,75 g/100 mL). Shi et al. (1998) obtiveram valores de ALB para os quatro tratamentos (DB, DB com

adição do MMN, aflatoxina e aflatoxina com adição de MMN) de $2,0 \pm 0,13$, $1,9 \pm 0,15$, $1,6 \pm 0,13$ e $1,9 \pm 0,17$ g/dL, respectivamente, sendo o tratamento com aflatoxina significativamente diferente dos outros. Denli et al. (2009) não encontraram diferenças significativas para a ALB no soro nas aves alimentadas com AflaDetox e com AFB₁ + AflaDetox. Os valores de ALB, no presente estudo, para os tratamentos com 2,5 mg/kg de AFB₁ (0,42 g/dL) e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS (0,56 g/dL) foram significativamente diferentes dos tratamentos controle (0,90 g/dL) e 0,5% de HSCAS (0,94 g/dL).

Os valores de glicose, no presente estudo, para os tratamentos controle, 0,5% de HSCAS, 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS foram 351, 419, 226 e 264 mg/dL, respectivamente. Huff et al. (1986) não observaram mudanças consistentes no nível de glicose no soro, enquanto que no presente estudo houve diferença significativa entre os tratamentos. Ledoux et al. (1998) encontraram em seu estudo com quatro dietas (DB, DB com adição de IMTX, DB com adição de AFB₁ e DB com adição de IMTX e AFB₁) níveis de GLI de 357, 288, 230 e 250 mg/dL, respectivamente.

Os resultados da proteína total em aves de 21 dias de idade no grupo controle e em aves alimentadas com 2,5 mg/kg de aflatoxina foram $2,50 \pm 0,05$ g/100 mL e $1,17 \pm 0,16$ mg/100 mL, respectivamente (HUFF et al., 1986). Ledoux et al. (1998) encontraram em seu estudo com quatro dietas (DB, DB com adição de IMTX, DB com adição de AFB₁ e DB com adição de IMTX e AFB₁) níveis de PT de 2,58, 2,63, 1,67 e 2,63 g/dL, respectivamente. Shi et al. (1998) obtiveram valores de PT para os quatro tratamentos (DB, DB com adição do MMN, aflatoxina e aflatoxina com adição de MMN) de $5,1 \pm 0,06$, $5,0 \pm 0,11$, $4,6 \pm 0,13$ e $4,9 \pm 0,11$ g/dL, respectivamente, sendo o tratamento com aflatoxina significativamente diferente dos outros. Denli et al. (2009) encontraram em seu estudo com 8 dietas (Dieta basal (DB) sem adição de AflaDetox e AFB₁; DB com 1 g/kg de AflaDetox; DB com 2 g/kg de AflaDetox; DB com 5 g/kg de AflaDetox; DB com 1 mg/kg AFB₁; DB com 1 mg/kg AFB₁ e 1 g/kg de AflaDetox; DB com 1 mg/kg AFB₁ e 2 g/kg de AflaDetox; e DB com 1 mg/kg AFB₁ e 5 g/kg de AflaDetox), níveis de PT de 2,68, 2,62, 2,70, 2,61, 2,38, 2,62, 2,64 e 2,76 g/dL, respectivamente. Kubena et al. (1998) não encontraram diferenças significativas para PT entre as dietas com 5,0 mg/kg de AFB₁ (1,90 g/dL), 0,25% de T-Bind (aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado) + 5,0 mg/kg de AFB₁ (2,18 g/dL) e 0,375% de T-Bind + 5,0 mg/kg de AFB₁ (1,83 g/dL). No presente estudo, os valores da PT nos tratamentos controle, 0,5% de HSCAS, 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS foram 2,04, 2,32, 1,14 e 1,40

g/dL, respectivamente, sendo que também não houve diferença significativa entre os tratamentos com 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS.

A diminuição na albumina do soro, globulina e proteína total são indicadores de que a síntese de proteína foi comprometida (TUNG et al., 1975b), e níveis reduzidos de PT e ALB são indicadores de aflatoxicose (SHI et al., 2006). A adição de IMTX à dieta com AFB₁ preveniu a diminuição nessas proteínas do soro sensíveis à AFB₁. O IMTX também foi eficiente em prevenir mudanças em outros compostos químicos do soro observados em frangos alimentados somente com AFB₁ (LEDOUX et al., 1998).

Ledoux et al. (1998) encontraram em seu estudo com quatro dietas (DB, DB com adição de IMTX, DB com adição de AFB₁ e DB com adição de IMTX e AFB₁) níveis de globulina de 1,33, 1,37, 0,76 e 1,33 g/dL, respectivamente. Shi et al. (1998) obtiveram valores de GLOB para os quatro tratamentos (DB, DB com adição do MMN, aflatoxina e aflatoxina com adição de MMN) de $3,1 \pm 0,11$, $3,1 \pm 0,08$, $3,0 \pm 0,10$ e $3,0 \pm 0,09$ g/dL, respectivamente. No presente estudo, os valores para GLOB nos tratamentos controle, 0,5% de HSCAS, 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS foram de 1,14, 1,40, 0,74 e 0,88 g/dL, respectivamente.

No presente estudo, os valores para Ca nos tratamentos controle, 0,5% de HSCAS, 2,5 mg/kg de AFB₁ e 0,5% de HSCAS + 2,5 mg/kg de AFB₁ foram de 10,52, 10,76, 9,28 e 9,62 mg/dL, respectivamente. Ledoux et al. (1998) encontraram em seu estudo com quatro dietas (DB, DB com adição de IMTX, DB com adição de AFB₁ e DB com adição de IMTX e AFB₁) níveis de cálcio de 9,36, 8,97, 7,29 e 10,21 mg/dL, respectivamente. Kubena et al. (1998) não encontraram diferenças significativas entre as dietas com 5,0 mg/kg de AFB₁ (8,55 mg/dL), 0,25% de T-Bind + 5,0 mg/kg de AFB₁ (8,90 mg/dL) e 0,375% de T-Bind + 5,0 mg/kg de AFB₁ (8,79 mg/dL). A redução na concentração de cálcio no soro pode ser um reflexo do consumo alimentar reduzido (KUBENA et al., 1998).

No presente estudo, os valores para aspartato aminotransferase (AST) nos tratamentos controle, 0,5% de HSCAS, 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS foram de 284, 283, 216 e 218 U/L, respectivamente, sendo que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Shi et al. (1998) obtiveram valores de AST para os quatro tratamentos (DB, DB com adição do MMN, aflatoxina e aflatoxina com adição de MMN) de $13,9 \pm 0,50$, $13,8 \pm 0,40$, $15,4 \pm 0,42$ e $14,2 \pm 0,54$ IU/L, respectivamente, sendo o tratamento com aflatoxina significativamente diferente dos outros. Denli et al. (2009) também obtiveram diferença estatística somente para o tratamento com 1 mg/kg de AFB₁ (314 U/L), sendo os valores para 1

mg/kg de AFB₁ + 1 g/kg de AflaDetox, 1 mg/kg de AFB₁ + 2 g/kg de AflaDetox e 1 mg/kg de AFB₁ + 5 g/kg de AflaDetox de 257, 278 e 258 U/L, respectivamente.

No presente estudo, os valores para gama glutamil transferase (GGT) nos tratamentos controle, 0,5% de HSCAS, 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS foram de 11,4, 12,6, 12,2 e 12,8 U/L, respectivamente e não houve diferença estatística entre os tratamentos. Denli et al. (2009) também não encontraram diferenças significativas para o GGT no soro. Shi et al. (2006) obtiveram valores de GGT para os quatro tratamentos (DB, DB com adição do MMN, aflatoxina e aflatoxina com adição de MMN) de $6,1 \pm 0,42$, $6,6 \pm 0,34$, $9,4 \pm 0,46$ e $7,0 \pm 0,35$ IU/L, respectivamente, sendo que a toxicidade da aflatoxina foi expressa através de mudanças significantes no valor bioquímico sérico e atividades enzimáticas. Alterações significativas produzidas pela aflatoxina, no soro, foram os níveis reduzidos de PT e ALB e atividades aumentadas de GGT e AST. Quando comparados ao controle, os níveis de soro de PT e ALB foram reduzidos acentuadamente nas aves alimentadas somente com aflatoxina ($P < 0,05$), porém não houve diferença significativa, nesses parâmetros, entre o grupo controle, MMN e MMN adicionado de aflatoxina.

No presente estudo, os valores do ácido úrico (AU) nos tratamentos controle, 0,5% de HSCAS, 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS foram de 8,26, 9,00, 7,84 e 8,78 mg/dL, respectivamente. Os resultados do ácido úrico em aves de 21 dias de idade no grupo controle e em aves alimentadas com 2,5 mg/kg foram $10,6 \pm 0,7$ g/100 mL e $7,5 \pm 0,6$ mg/100 mL, respectivamente (HUFF et al., 1986). Denli et al. (2009) não encontraram diferenças significativas para o AU no soro.

Os efeitos tóxicos produzidos pela AFB₁ no presente trabalho alteraram os parâmetros da bioquímica sérica e cálcio, concordando com estudos anteriores (HUFF et al., 1986; LEDOUX et al., 1998; SHI et al., 2006). O aumento das atividades de GGT e AST no soro tem sido reportado como indicadores sorológicos sensíveis de toxicidade no fígado e rim (SHI et al., 2006). Em estudos anteriores, foram observados os efeitos da aflatoxina nos níveis de proteína sérica e que esses são indicadores de aflatoxicose muito sensíveis em frangos de corte (HUFF et al., 1986; TUNG et al., 1975b). Kubena et al. (1990) relataram que algumas alterações bioquímicas no soro e nos parâmetros enzimáticos, como resultado da aflatoxicose, não foram aliviados pelo HSCAS, como foi encontrado no presente estudo.

5.2.3 Resultados Histopatológicos

Na Tabela 9 observam-se os valores individuais e médios da lesão nos fígados de frangos de corte.

Tabela 9 - Parâmetros histopatológicos de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia¹.

HSCAS (%)	AFB ₁ (mg/kg)	Valor individual da lesão no fígado	Valor médio da lesão no fígado
0 (controle)	0	1, 1, 1, 1, 1, 1	1,0
0,5	0	1, 1, 1, 1, 1, 1	1,0
0	2,5	4, 2, 4, 2, 3, 3	3,0
0,5	2,5	3, 2, 3, 4, 3, 3	3,0

1 = Seção do fígado sem lesão (não notável); 2 = Lesões na seção do fígado são compatíveis com aflatoxicose suave; 3 = Lesões na seção do fígado são compatíveis com aflatoxicose moderada; 4 = Lesões na seção do fígado são compatíveis com aflatoxicose severa.

Nenhuma lesão microscópica significativa foi encontrada nas seções de fígado dos tratamentos controle e com 0,5% de HSCAS. Lesões suaves, moderadas ou severas de aflatoxicose foram encontradas nos exames das seções de fígado dos tratamentos com 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS. Estas lesões hepáticas incluíram hiperplasia biliar moderada, suave a severo inchaço periportal e degeneração vacuolar dos hepatócitos, suave à moderada regeneração dos hepatócitos e suave à severa infiltração heterofílica periportal.

Secções de fígado de frangos alimentados com a DB e dieta com 1% IMTX não apresentaram lesões no estudo de Ledoux et al. (1998). Lesões moderadas de aflatoxicose foram evidentes em todos os frangos alimentados somente com AFB₁ e lesões microscópicas moderadas de aflatoxicose foram notadas em dois de cinco dos frangos alimentados com AFB₁ adicionado de IMTX. Frangos alimentados somente com AFB₁ tiveram vacuolação citoplasmática periportal do hepatócito moderada a severa (mudança gordurosa) com infiltração heterofílica periportal moderada (Ledoux et al., 1998).

Na Figura 11, podem-se observar os fígados dos quatro diferentes tratamentos.

Figura 11. Fígados de frangos dos quatro diferentes tratamentos (Tratamento A: controle; Tratamento B: 0,5% de HSCAS; Tratamento C: 2,5 mg/kg de AFB₁; Tratamento D: 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS).

5.2.4 Resíduos de Aflatoxina no Fígado e Rim

Na Tabela 10, é possível observar os resultados da análise de resíduos de aflatoxina no fígado dos frangos.

Tabela 10 - Parâmetros dos resíduos de aflatoxina em fígado de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia¹.

HSCAS (%)	AFB ₁ (mg/kg)	AFM ₁ (µg/kg)	AFB ₁ (µg/kg)	AFL (µg/kg)	AFG ₂ (µg/kg)	AFG ₁ (µg/kg)	AFB ₂ (µg/kg)
0 (controle)	0	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0	0 ^b	0 ^b
0,5	0	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0	0 ^b	0 ^b
0	2,5	0,21 ^a	8,32 ^a	2,34 ^a	0,03	3,95 ^a	0,48 ^a
0,50	2,5	0,12 ^a	1,49 ^b	0 ^b	0	0,54 ^b	0,07 ^b
EPM		0,02	1,08	0,28	0,01	0,41	0,09
Probabilidade		< 0,0001	0,0001	< 0,0001	0,0829	< 0,0001	0,0047

¹Os dados são médias de 5 gaiolas em replicata, cada gaiola com 3 frangos.

^{a-b}Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05)

HSCAS=Aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado; AFM₁=Aflatoxina M₁; AFB₁=Aflatoxina B₁; AFL=Aflatoxicol; AFG₂=Aflatoxina G₂; AFG₁=Aflatoxina G₁; AFB₂=Aflatoxina B₂; EPM=Erro Padrão da Média.

Na Figura 12, pode-se encontrar a taxa de conversão do resíduo de aflatoxinas no fígado das aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB₁ e 0,5% de HSCAS + 2,5 mg/kg de AFB₁.

Figura 12. Taxa de conversão dos resíduos de aflatoxina (concentração de AFB₁ na ração / concentração de aflatoxina residual) no fígado de aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB₁ (■) e com 0,5 % de HSCAS + 2,5 mg/kg de AFB₁ (▒).

As concentrações de AFB₁, AFL, AFG₁ e AFB₂ foram menores ($P < 0,05$) em fígados de aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS quando comparadas com aves alimentadas somente com 2,5 mg/kg de AFB₁. As concentrações de AFM₁ foram todas menores em aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS quando comparadas com aves alimentadas somente com 2,5 mg/kg de AFB₁. Nenhum resíduo de AFB₁ foi encontrado nos fígados das aves alimentadas com o tratamento controle ou nas aves alimentadas com 0,5% de HSCAS.

Phillips et al. (1988), que encontraram que quando frangos de corte foram alimentados com dietas contendo 7,5 µg/kg de pura AFB₁/kg de dieta mais 0,5% de HSCAS, o adsorvente ofereceu proteção contra os sinais clínicos de aflatoxicose, o que significa que o HSCAS mostrou-se capaz de reduzir a biodisponibilidade da AFB₁. Apesar do HSCAS utilizado no presente estudo não ter sido capaz de impedir que os sinais clínicos de aflatoxicose ocorressem, o adsorvente foi eficaz em diminuir os resíduos de aflatoxina no fígado das aves.

Na Tabela 11, observam-se os resultados da análise de resíduos de aflatoxina no rim dos frangos.

Tabela 11 - Parâmetros dos resíduos de aflatoxina no rim de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia¹.

HSCAS (%)	AFB ₁ (mg/kg)	AFM ₁ (µg/kg)	AFB ₁ (µg/kg)	AFL (µg/kg)	AFG ₂ (µg/kg)	AFG ₁ (µg/kg)	AFB ₂ (µg/kg)
0 (Controle)	0	0 ^b	0 ^c	0	0 ^b	0 ^b	0 ^b
0,5	0	0 ^b	0 ^c	0	0 ^b	0 ^b	0 ^b
0	2,5	0,68 ^a	16,16 ^a	0,48	0,16 ^a	6,94 ^a	0,91 ^a
0,50	2,5	0,42 ^a	7,52 ^b	0,15	0,12 ^{ab}	4,19 ^a	0,66 ^{ab}
EPM		0,09	1,59	0,14	0,03	0,73	0,19
Probabilidade		< 0,0001	< 0,0001	0,0983	0,0034	< 0,0001	0,0064

¹Os dados são médias de 5 gaiolas em replicata, cada gaiola com 3 frangos.

^{a-c}Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

HSCAS=Aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado; AFM₁=Aflatoxina M₁; AFB₁=Aflatoxina B₁; AFL=Aflatoxicol; AFG₂=Aflatoxina G₂; AFG₁=Aflatoxina G₁; AFB₂=Aflatoxina B₂; EPM=Erro Padrão da Média.

Na Figura 13, pode-se encontrar a taxa de conversão do resíduo de aflatoxinas no fígado das aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB₁ e 0,5% de HSCAS + 2,5 mg/kg de AFB₁.

Figura 13. Taxa de conversão dos resíduos de aflatoxina (concentração de AFB₁ na ração / concentração de aflatoxina residual) no rim das aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB₁ (■) e com 0,5% de HSCAS + 2,5 mg/kg de AFB₁ (▒).

As concentrações de AFB₁ também foram menores ($P < 0,05$) em rins de aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS quando comparada com aqueles alimentados somente com 2,5 mg/kg de AFB₁. As concentrações de AFM₁, AFG₂, AFG₁ e AFB₂ foram todas menores em aves alimentadas com 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS quando comparada com aqueles alimentados somente com 2,5 mg/kg de AFB₁. O único resíduo, no rim, que não teve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos foi o AFL. Nenhum resíduo de AFB₁ foi encontrado no rim das aves do tratamento controle ou em aves alimentadas com 0,5% de HSCAS.

Fernández et al. (1994), alimentaram frangos de corte com uma dieta contendo 2,5 mg/kg de AFB₁ durante 32 dias e a média dos resíduos de aflatoxina encontrados no fígado foram 0,23 µg/kg AFB₁, 0,06 µg/kg AFM₁, 0,23 µg/kg AFL e 0,16 µg/kg AFG₁. No rim, os autores encontraram 0,25 µg/kg AFB₁ e 0,12 µg/kg AFM₁. Esses valores são muito menores quando comparados aos resultados do presente trabalho para a dieta contendo 2,5 mg/kg AFB₁.

Outros estudos também reportaram menores concentrações de resíduos de AFB₁ após a ingestão de rações contendo aflatoxina. Bintvihok e Kositcharoenkul (2006), alimentaram frangos de corte com dietas contendo AFB₁ e AFB₁ adicionado de propionato de cálcio (PC) durante três dias e encontraram resíduos de AFB₁ de $0,05 \pm 0,03 \mu\text{g/kg}$ e $0,13 \pm 0,05 \mu\text{g/kg}$ em fígados de aves alimentadas com $50 \mu\text{g/kg}$ AFB₁ e $100 \mu\text{g/kg}$ AFB₁, respectivamente. Para resíduos de AFM₁ em fígado, os valores foram $0,10 \pm 0,04 \mu\text{g/kg}$, $0,32 \pm 0,13 \mu\text{g/kg}$, $0,05 \pm 0,03 \mu\text{g/kg}$, $0,05 \pm 0,04 \mu\text{g/kg}$ em aves alimentadas com $50 \mu\text{g/kg}$ AFB₁, $100 \mu\text{g/kg}$ AFB₁, $100 \mu\text{g/kg}$ AFB₁ + 0,25% PC e $100 \mu\text{g/kg}$ AFB₁ + 0,5% PC, respectivamente.

Hussain et al. (2010), conduziram 3 experimentos com aves de 7, 14 e 28 dias de vida e alimentadas com 0, 1,6, 3,2 e 6,4 mg/kg de AFB₁ por 7 dias e então voltava a alimentar as aves com dieta basal, sem adição de aflatoxina. Em aves de 7 dias de idade, alimentadas com 1,6 e 3,2 mg/kg de AFB₁ por 7 dias, eles detectaram resíduos de AFB₁ no fígado no terceiro dia de administração da aflatoxina, sendo que os maiores valores encontrados ($3,51 \pm 0,08$ e $3,74 \pm 0,09 \mu\text{g/kg}$) foram observados no dia 7, respectivamente. Em aves de 14 dias de idade, alimentadas com 1,6 e 3,2 mg/kg de AFB₁ por 7 dias, eles detectaram resíduos de AFB₁ no fígado no terceiro dia de administração da aflatoxina, sendo que os maiores valores encontrados ($3,65 \pm 0,09$ e $3,26 \pm 0,23 \mu\text{g/kg}$) foram observados no dia 7, respectivamente. Em aves de 28 dias de idade, alimentadas com 1,6 e 3,2 mg/kg de AFB₁ por 7 dias, eles detectaram resíduos de AFB₁ no fígado no quinto e terceiro dias de administração da aflatoxina, respectivamente, sendo que os maiores valores encontrados ($2,87 \pm 0,13$ e $3,03 \pm 0,15 \mu\text{g/kg}$) foram observados no dia 7, respectivamente. Os autores verificaram que aves mais velhas tinham menores concentrações de resíduos de AFB₁ no tecido, quando comparado com aves mais jovens, sugerindo que aves mais velhas desenvolveram um mecanismo mais eficiente para metabolizar AFB₁. Outra possibilidade é a de que tenha ocorrido uma diluição no tecido devido ao maior tamanho da ave.

De acordo com Phillips et al. (1990), o efeito protetor do HSCAS é o resultado de uma ligação rápida da aflatoxina pelo HSCAS no trato gastrointestinal dos frangos, prevenindo assim sua absorção e distribuição normal para o fígado. Os resultados encontrados mostraram que o HSCAS foi eficaz em reduzir os resíduos de aflatoxina, especialmente no fígado. A biotransformação da AFB₁ em AFM₁ e AFL, no fígado, também diminuiu nos frangos de corte que receberam HSCAS, diminuindo assim a toxicidade da AFB₁.

5.2.5 Análise de Correlação entre as Variáveis Estudadas

Nas Tabelas 12, 13, 14, 15 e 16 pode-se observar a correlação entre as variáveis obtidas para desempenho e bioquímica sérica, desempenho e concentração de resíduos de aflatoxinas no fígado, desempenho e concentração de resíduos de aflatoxinas no rim, bioquímica sérica e concentração de resíduos de aflatoxinas no fígado, e bioquímica sérica e concentração de resíduos de aflatoxinas no rim, respectivamente.

5.2.6 Desempenho e Bioquímica Sérica

Na Tabela 12, encontra-se a correlação entre o desempenho e o soro de frangos de corte, sendo as correlações significativas ($P < 0,05$) descritas a seguir.

Tabela 12 – Coeficiente de correlação¹ entre o desempenho e bioquímica sérica de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia.

	PRF	PRR	GP	CR	CA	Mort
GLI	-0,76	-0,70	0,63	0,62	-0,31	-0,27
ALB	-0,90	-0,89	0,84	0,91	-0,26	-0,39
PT	-0,90	-0,87	0,80	0,87	-0,25	-0,35
GLOB	-0,83	-0,78	0,72	0,77	-0,25	-0,31
Ca	-0,78	-0,75	0,64	0,64	-0,12	0,003
AST	-0,44	-0,42	0,36	0,42	-0,05	-0,14
GGT	0,15	-0,02	-0,33	-0,21	0,55	0,37
AU	-0,08	-0,06	0,15	0,08	-0,31	-0,21

¹Correlações em negrito são estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

PRF=Peso Relativo do fígado; PRR= Peso Relativo do rim; GP=Ganho de peso corporal; CR=Consumo de ração; CA= Conversão Alimentar; Mort=Mortalidade; GLI=Glicose; ALB=Albumina; TP=Proteína Total; GLOB=Globulina; Ca=Cálcio; AST=Aspartato aminotransferase; GGT=Gamma Glutamyl Transferase; AU=Ácido Úrico.

O peso relativo do fígado teve correlação positiva com o GGT (0,15) e correlação negativa com a albumina (-0,90), proteína total (-0,90), globulina (-0,83) e cálcio (-0,78). O peso relativo do rim teve correlação negativa com a glicose (-0,70), albumina (-0,89), proteína total (-0,87), globulina (-0,78) e cálcio (-0,75). O ganho de peso corporal teve correlação positiva com a glicose (0,63), albumina (0,84), proteína total (0,80), globulina (0,72) e cálcio (0,64). O consumo de ração teve correlação positiva com a glicose (0,62), albumina (0,91),

proteína total (0,87), globulina (0,77) e cálcio (0,64). A conversão alimentar teve correlação positiva com o GGT (0,55).

O PRF teve correlação positiva ($P<0,05$) com o PRR, o que significa que quanto maior o PRF, maior será o PRR. O PRF teve correlação negativa ($P<0,05$) com o GP, CR, ALB, PT, GLOB e Ca. A GLI, ALB, PT, GLOB e Ca mostraram-se bons indicadores de desempenho em frangos de corte.

Vários estudos observaram redução no desempenho e bioquímica sérica de frangos alimentados com aflatoxina (HUFF et al., 1986; SHI et al., 1998; LEDOUX et al., 1999; DENLI et al., 2009), sendo o mesmo observado no presente trabalho. O aumento do PRF é aceito como um sensível indicador de aflatoxicose em frangos. Essa correlação positiva entre o PRF e o PRR pode ter ocorrido pelo fato de a AFB₁ depositar gordura em alguns órgãos (fígado, rim e coração) e aumentá-los de tamanho. A AFB₁, após ser absorvida, liga-se à ALB e a diferentes células protéicas, espalhando-se pelos tecidos, principalmente o fígado, onde é biotransformado pelo sistema microssomal hepático (SANTURIO, 2000), inibindo o metabolismo lipídico e de carboidrato e da síntese de proteína.

5.2.7 Desempenho e Resíduo de AFB₁ no fígado

Na Tabela 13, encontra-se a correlação entre o desempenho e os resíduos de aflatoxina no fígado de frangos de corte, sendo as correlações significativas ($P<0,05$) descritas a seguir.

Tabela 13 – Coeficiente de correlação¹ entre o desempenho e o resíduo de aflatoxina no fígado de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia.

	PRF	PRR	GP	CR	CA	Mort
AFM ₁	0,82	0,83	-0,70	-0,79	0,06	0,19
AFB ₁	0,68	0,61	-0,63	-0,64	0,24	0,19
AFL	0,57	0,51	-0,54	-0,55	0,17	0,11
AFG ₁	0,68	0,60	-0,65	-0,65	0,25	0,17
AFB ₂	0,60	0,56	-0,51	-0,52	0,08	0,004
AFG ₂	0,44	0,44	-0,31	-0,34	-0,10	-0,18

¹Correlações em negrito são estatisticamente significativas para $P<0,05$.

PRF=Peso Relativo do fígado; PRR= Peso Relativo do rim; GP=Ganho de peso corporal; CR=Consumo de ração; CA=Conversão Alimentar; Mort=Mortalidade; AFM₁=Aflatoxina M₁; AFB₁=Aflatoxina B₁; AFL=Aflatoxicol; AFG₂=Aflatoxina G₂; AFG₁=Aflatoxina G₁; AFB₂=Aflatoxina B₂.

O peso relativo do fígado teve correlação positiva com a AFM₁ (0,82), AFB₁ (0,68), AFL (0,57), AFG₁ (0,68), AFB₂ (0,60) e AFG₂ (0,44). O peso relativo do rim teve correlação positiva com a AFM₁ (0,83), AFB₁ (0,61), AFL (0,51), AFG₁ (0,60) e AFB₂ (0,56). O ganho de peso corporal teve correlação negativa com a AFM₁ (-0,70), AFB₁ (-0,63), AFL (-0,54), AFG₁ (-0,65) e AFB₂ (-0,51). O consumo de ração teve correlação negativa com a AFM₁ (-0,79), AFB₁ (-0,64), AFL (-0,55), AFG₁ (-0,65) e AFB₂ (-0,52). A AFM₁ mostrou-se uma boa indicadora de desempenho, juntamente com a AFB₁ e AFG₁.

A AFB₁ é conhecida por ser hepatotóxica e isso pode resultar em profundos efeitos negativos nas aves que possuem uma conversão alimentar mais eficiente, demandando um metabolismo hepático mais rápido (YUNUS et al., 2011), podendo ter um efeito negativo no desempenho dos frangos.

5.2.8 Desempenho e Resíduo de AFB₁ no rim

Na Tabela 14, encontra-se a correlação entre o desempenho e os resíduos de aflatoxina no rim de frangos de corte, sendo as correlações significativas ($P < 0,05$) descritas a seguir.

Tabela 14. Coeficiente de correlação¹ entre o desempenho e o resíduo de aflatoxina no rim de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia.

	PRF	PRR	GP	CR	CA	Mort
AFM ₁	0,80	0,64	-0,85	-0,82	0,54	0,50
AFB ₁	0,79	0,63	-0,88	-0,84	0,59	0,52
AFL	0,37	0,32	-0,71	-0,58	0,77	0,64
AFG ₁	0,85	0,73	-0,91	-0,86	0,51	0,34
AFB ₂	0,66	0,57	-0,68	-0,72	0,33	0,44
AFG ₂	0,70	0,59	-0,78	-0,76	0,44	0,41

¹Correlações em negrito são estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

PRF=Peso Relativo do fígado; PRR= Peso Relativo do rim; GP=Ganho de peso corporal; CR=Consumo de ração; FC=Conversão Alimentar; Mort=Mortalidade; AFM₁=Aflatoxina M₁; AFB₁=Aflatoxina B₁; AFL=Aflatoxicol; AFG₂=Aflatoxina G₂; AFG₁=Aflatoxina G₁; AFB₂=Aflatoxina B₂.

O peso relativo do fígado teve correlação positiva com a AFM₁ (0,80), AFB₁ (0,79), AFG₁ (0,85), AFB₂ (0,66) e AFG₂ (0,70). O peso relativo do rim teve correlação positiva com a AFM₁ (0,64), AFB₁ (0,63), AFG₁ (0,73), AFB₂ (0,57) e AFG₂ (0,59). O ganho de peso corporal teve correlação negativa com a AFM₁ (-0,85), AFB₁ (-0,88), AFL (-0,71), AFG₁ (-

0,91), AFB₂ (-0,68) e AFG₂ (-0,78). O consumo de ração teve correlação negativa com a AFM₁ (-0,82), AFB₁ (-0,84), AFL (-0,58), AFG₁ (-0,86), AFB₂ (-0,72) e AFG₂ (-0,76). A conversão alimentar teve correlação positiva com a AFM₁ (0,54), AFB₁ (0,59) e AFL (0,77). A mortalidade teve correlação positiva com a AFM₁ (0,50), AFB₁ (0,52) e AFL (0,64). As AFM₁ e a AFB₁ mostraram-se boas indicadoras de desempenho, juntamente com a AFG₁, AFB₂ e AFG₂.

Vários estudos observaram redução no desempenho de frangos alimentados com aflatoxina (HUFF et al., 1986; SHI et al., 1998; LEDOUX et al., 1999; DENLI et al., 2009), sendo também observado no presente trabalho, pois quando os resíduos de aflatoxina no rim aumentaram o ganho de peso e o consumo alimentar diminuíram. A diminuição da proteína e da utilização de energia, provavelmente, é uma consequência da deterioração da capacidade digestiva e metabólica das aves (DENLI et al., 2009).

5.2.9 Bioquímica Sérica e Resíduo de AFB₁ no fígado

Na Tabela 15, encontra-se a correlação entre o soro e os resíduos de aflatoxina no fígado de frangos de corte, sendo as correlações significativas (P<0,05) descritas a seguir.

Tabela 15 – Coeficiente de correlação¹ entre a bioquímica sérica e o resíduo de aflatoxina no fígado de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia.

	GLI	ALB	PT	GLOB	Ca	AST	GGT	AU
AFM ₁	-0,67	-0,45	-0,26	-0,05	-0,52	0,01	-0,37	-0,44
AFB ₁	-0,55	-0,73	-0,66	-0,57	-0,66	-0,23	-0,05	-0,22
AFL	0,48	-0,55	-0,03	0,42	-0,95	0,32	-0,24	-0,33
AFG ₁	-0,56	-0,74	-0,69	-0,60	-0,67	-0,24	-0,07	-0,21
AFB ₂	-0,46	-0,65	-0,58	-0,47	-0,67	-0,19	-0,13	-0,17
AFG ₂	-0,31	-0,50	-0,42	-0,29	-0,60	-0,11	-0,20	-0,11

¹Correlações em negrito são estatisticamente significativas para P<0,05.

GLI=Glicose; ALB=Albumina; TP=Proteína Total; GLOB=Globulina; Ca=Cálcio; AST=Aspartato aminotransferase; GGT=Gamma Glutamyl Transferase; AU=Ácido Úrico; AFM₁=Aflatoxina M₁; AFB₁=Aflatoxina B₁; AFL=Aflatoxina; AFG₂=Aflatoxina G₂; AFG₁=Aflatoxina G₁; AFB₂=Aflatoxina B₂.

A glicose teve correlação positiva com o AFL (0,48) e correlação negativa com a AFM₁ (-0,67), AFB₁ (-0,55), AFG₁ (-0,56) e AFB₂ (-0,46). A albumina teve correlação negativa com a AFB₁ (-0,73), AFG₁ (-0,74), AFB₂ (-0,65) e AFG₂ (-0,50). A proteína total teve correlação

negativa com a AFB₁ (-0,66), AFG₁ (-0,69) e AFB₂ (-0,58). A globulina teve correlação negativa com a AFB₁ (-0,57), AFG₁ (-0,60) e AFB₂ (-0,47). O cálcio teve correlação negativa com a AFB₁ (-0,66), AFL (-0,95), AFG₁ (-0,67), AFB₂ (-0,67) e AFG₂ (-0,60). As AFB₁ e AFG₁ mostraram-se boas indicadoras sorológicas, juntamente com a AFB₂.

A aflatoxina pode causar degranulação do retículo endoplasmático rugoso e inibir a síntese de DNA, RNA e de proteína (THERON et al., 1965; YU, 1977). Esses efeitos podem explicar a redução na concentração da albumina e da proteína total no soro (HUFF et al., 1986). Mollenhauer et al. (1989) observaram acúmulo lipídico em hepatócitos, necrose hepatocelular e redução da concentração protéica no soro.

O fígado, além de ser o órgão primário de acúmulo e metabolismo da AFB₁, é também o principal local onde a AFB₁ é metabolizada e onde os metabólitos de ligam aos ácidos nucleicos e às proteínas. O rim também tem a função de detoxificação de aflatoxinas e está entre os órgãos onde mais se detecta resíduos de aflatoxina (SAWHNEY et al., 1973; FERNANDEZ et al., 1994).

5.2.10 Bioquímica sérica e Resíduo de AFB₁ no rim

Na Tabela 16, encontra-se a correlação entre o soro e os resíduos de aflatoxina no rim de frangos de corte, sendo as correlações significativas ($P < 0,05$) descritas a seguir.

Tabela 16 - Coeficiente de correlação¹ entre a bioquímica sérica e o resíduo de aflatoxina no rim de frangos de corte alimentados com HSCAS e AFB₁ do 1º até o 21º dia.

	GLI	ALB	PT	GLOB	Ca	AST	GGT	AU
AFM ₁	-0,70	-0,78	-0,81	-0,81	-0,55	-0,33	0,30	-0,18
AFB ₁	-0,71	-0,83	-0,84	-0,83	-0,60	-0,31	0,28	-0,18
AFL	-0,40	-0,48	-0,41	-0,36	-0,28	0,07	0,25	-0,13
AFG ₁	-0,73	-0,89	-0,86	-0,78	-0,80	-0,25	0,29	-0,13
AFB ₂	-0,59	-0,68	-0,71	-0,74	-0,46	-0,25	0,22	-0,18
AFG ₂	-0,63	-0,72	-0,72	-0,73	-0,58	-0,17	0,30	-0,19

¹Correlações em negrito são estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

GLI=Glicose; ALB=Albuminn; TP=Proteína Total; GLOB=Globulina; Ca=Cálcio; AST=Aspartato aminotransferase; GGT=Gamma Glutamil Transferase; AU=Ácido Úrico; AFM₁=Aflatoxina M₁; AFB₁=Aflatoxina B₁; AFL=Aflatoxicol; AFG₂=Aflatoxina G₂; AFG₁=Aflatoxina G₁; AFB₂=Aflatoxina B₂.

A glicose teve correlação negativa com a AFM₁ (-0,70), AFB₁ (-0,71), AFG₁ (-0,73), AFB₂ (-0,59) e AFG₂ (-0,63). A albumina teve correlação negativa com a AFM₁ (-0,78), AFB₁ (-0,83), AFL (-0,48), AFG₁ (-0,89), AFB₂ (-0,68) e AFG₂ (-0,72). A proteína total teve correlação negativa com a AFM₁ (-0,81), AFB₁ (-0,84), AFG₁ (-0,86), AFB₂ (-0,71) e AFG₂ (-0,72). A globulina teve correlação negativa com a AFM₁ (-0,81), AFB₁ (-0,83), AFG₁ (-0,78), AFB₂ (-0,74) e AFG₂ (-0,73). O cálcio teve correlação negativa com a AFM₁ (-0,55), AFB₁ (-0,60), AFG₁ (-0,80), AFB₂ (-0,46) e AFG₂ (-0,58). As AFM₁, AFB₁ e AFG₁ mostraram-se boas indicadoras sorológicas, juntamente com a AFB₂ e AFG₂.

Gan et al. (1988) investigaram a ingestão de AFB₁ e a excreção de aflatoxina soro-albumina e de AFM₁ em urina. Ambos os biomarcadores apresentaram um coeficiente de correlação positivo com a ingestão de AFB₁.

O estudo *in vivo* mostrou que a presença de resíduos no fígado e rins decorreu, provavelmente, de altas concentrações de AFB₁ biodisponíveis e que o adsorvente foi eficiente para reduzir esses resíduos. Porém, a redução da biodisponibilidade da AFB₁ pelo adsorvente não foi suficiente para diminuir os efeitos tóxicos da aflatoxicose em frangos de corte, devido a sua grande sensibilidade à aflatoxina.

6 CONCLUSÃO

- O HSCAS foi efetivo em se ligar, *in vitro*, à AFB₁, cujos percentuais de ligação variaram de 8,8 a 99,5%, para concentrações do adsorvente entre 0,05 e 100 mg/10 mL.
- Apesar de o HSCAS ter melhorado, numericamente, o desempenho dos frangos no estudo *in vivo*, estatisticamente não houve diferença significativa entre os tratamentos com 2,5 mg/kg de AFB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS.
- No tratamento 2,5 mg/kg de AFB₁ todos os seis espécimes de fígado tiveram lesões de aflatoxicose branda, moderada ou severa. O adsorvente utilizado no tratamento com 2,5 mg/kg de AFB₁ + 0,5% de HSCAS pareceu não produzir efeito protetor contra a aflatoxicose em frangos de corte, baseado nos resultados histopatológicos.
- Os dados encontrados demonstraram que os indicadores de bioquímica sérica mais sensíveis à aflatoxicose em frangos de corte jovens foram a redução da albumina no soro, glicose, proteína total, globulina e cálcio.
- Resíduos de AFM₁ e aflatoxinas não metabolizadas B₁, B₂, G₁ e G₂ no rim apresentaram correlação negativa com glicose, albumina, proteína total, globulina e cálcio séricos; para resíduos no fígado, essa correlação negativa foi observada somente para AFB₁, AFB₂ e AFG₁.
- Houve correlação positiva entre a ocorrência de resíduos de aflatoxinas no fígado (AFM₁, aflatoxicol e aflatoxinas não metabolizadas B₁, B₂, G₁ e G₂) e os pesos relativos de fígado e rins; para o ganho de peso e o consumo de ração, a correlação foi negativa.
- Todos os resíduos de aflatoxinas no rim (AFM₁, aflatoxicol e aflatoxinas não metabolizadas B₁, B₂, G₁ e G₂) apresentaram correlação negativa com o ganho de peso e o consumo de ração.
- O HSCAS foi efetivo na redução dos resíduos de aflatoxina no fígado e rim de frangos alimentados com 2,5 mg AFB₁/kg da dieta, do dia 1 até o dia 21.
- A determinação de resíduos de aflatoxinas no fígado e rins não é aplicável para avaliar a proteção do adsorvente contra efeitos tóxicos das aflatoxinas em frangos de corte sendo, porém de grande utilidade para verificar a capacidade do

adsorvente em reduzir as concentrações das aflatoxinas residuais nas vísceras de frangos destinadas ao consumo humano.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A.W.; GAST, A.P. Physical chemistry of Surfaces. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. In: CHAVES, J.A.P. **Adsorção de corantes têxteis sobre quitosana: condições, modelagem e otimização**. 2009. 96p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFP, João Pessoa, 2009.

AFLAPREP M application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior to HPLC analysis for aflatoxin M₁. R-Biopharm Rhone LTD, Product code: P04, version P04/V12?22.9.05.

ALMEIDA, R.M.A. et al. Acute effect of aflatoxin B₁ on different inbred mouse strains II. **Mycopathologia**, Den Haag, v.133, p.23-9, 1996.

ANVISA. Resolução RDC N° 7 de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, 2011.

ARAFI, A.S. et al. Susceptibility of various poultry species to dietary aflatoxin. **British Poultry Science**, London, v.52, p.431-36, 1981.

BAILEY, G.S. et al. Effect of aflatoxin B₁-contaminated cottonseed feedstock on the aflatoxin M₁ content of cows' milk and hepatocarcinogenicity in the trout bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.32, n.8, p.707-715, 1994.

BERMUDEZ, A.J.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ in ducklings. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.39, p.879-86, 1995.

BERMUDEZ, A.J. et al. The individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin and fumonisin B₁ in turkeys. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.41, p.304-11, 1997.

BEZUIDENHOUT, S.C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p.743-45, 1988.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.50, p.1058-73, 1987.

BINTVIHOK, A. et al. Toxic effects of dietary aflatoxin and its residue in tissues and eggs in laying quails. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE WORLD ASSOCIATION OF VETERINARY FOOD HYGIENISTS, 11., Bangkok, 1993. *Proceedings*. Bangkok, WAVFH, p.299-307, 1993.

BINTVIHOK, A.; KOSITCHAROENKUL, S. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B₁. **Toxicon**, Oxford, v.47, p.41-46, 2006.

BROWN, T.P.; ROTTINGHAUS, G.E.; WILLIAMS M.E. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: performance and pathology. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.36, p.450-54, 1992.

CAMPBELL, T.C.; HAYES, J.R. The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.35, p.199-222, 1976.

CARNAGHAN, R.B.; HARTLEY, R.D.; O'KELLY, J. Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. **Nature**, London, 200, p.1101, 1963.

CARRIJO, A.S. et al. Alho em pó na alimentação alternativa de frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.673-679, 2005.

CARVALHO, T.B.; BACCHI, M.R.P. **Estudo da elasticidade-renda da demanda de carne bovina, suína e de frango no Brasil**. In: XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2007, Londrina. Conhecimentos para a Agricultura do Futuro, 2007.

CARWOOD, M.E. et al. Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.39, p.1958-62, 1991.

CHANG, C.F.; HAMILTON, P.B. Experimental aflatoxicosis in young japanese quail. **Poultry Science**, Champaign, v.61, p.869-74, 1982.

CHAVES, J.A.P. **Adsorção de corantes têxteis sobre quitosana: condições, modelagem e otimização**. 2009. 96p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFP, João Pessoa, 2009.

CHEN, J. et al. Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.3928-31, 1992.

CHIAVARO, E. et al. Immunoaffinity clean-up and direct fluorescence measurement of aflatoxin B₁ and M₁ in pig liver: comparison with high-performance liquid chromatography determination. **Food Additives and Contaminants**, London, v.22(11), p.1154-1161, 2005.

CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. **Mutation Research**, Amsterdam, v.259, p.291-306, 1991.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P.; Salunkhe, D.K., eds. *Mycotoxins and phytoalexins*. Boca Raton, CRC Press, p.103-43, 1991.

COULOMBE, R.A. et al. Chemoprevention of aflatoxicosis in poultry by dietary butylated hydroxytoluene. **Animal Feed Science and Technology**, New York, v.121, p.217-225, 2005.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY TASK FORCE
REPORT #16. **Mycotoxins: Economic and Health Risks**. Ames, IA. 1989.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY TASK FORCE
REPORT #139. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. Ames, IA. 2003.

DAKOVIC, A., MATIJASEVIC, S., ROTTINGHAUS, G.E., LEDOUX, D.R.,
BUTKERAITIS, P. and SEKULIC, Z. Aflatoxin B₁ adsorption by natural and copper modified montmorillonite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.66, p.20-25, 2008.

DAWSON, K.A.; EVANS, J.; KUDUPOJE, M. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. In: **Science and Technology in the Feed Industry**: Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium, 2001.

DE IONGH, H.; VLES, R.O.; VAN PELT, J.G. Milk of mammals fed an aflatoxin containing diet. **Nature**, London, v.202, p.466-467, 1964.

DETROY, R.W.; HESSELTINE, C.W. Aflatoxicol: structure of a new transformation product of aflatoxin B₁. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v.48, p.830-832, 1970.

DETROY, R.W.; HESSELTINE, C.W. **Nature**, London, v.219, p.967, 1968.

DIAZ, D.E. A review on the use of mycotoxin sequestering agents, in agricultural livestock production, in: SIANTAR, D. et al. (Eds) **Food Contaminants**, v.1001, p.125-150 (Washington, American Chemical Society), 2008.

DIAZ, G.J.; BOERMANS, H.J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.36, p.548-55, 1994.

DOERR, J.A.; OTTINGER, M.A. Delayed reproductive development resulting from aflatoxicosis in juvenile japanese quail. **Poultry Science**, Champaign, v.59, p.1995-2001, 1980.

ESPADA, Y. et al. Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.38, p.454-60, 1994.

EXARCHOS, C.C.; GENTRY, R.F. Effect of aflatoxin B₁ on egg production. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.26, p.191-5, 1982.

[FAO] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Poultry, Meat & Eggs. Rome, p.77, 2010.

FERNANDEZ, A. et al. Aflatoxin and its metabolites in tissues from laying hens and broiler chickens fed a contaminated diet. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v.65, p.407-414, 1994.

GAN, L.S. et al. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: Correlation with aflatoxin B₁ intake and urinary excretion of aflatoxin M₁. **Carcinogenesis**, London, v.9, p.1323-1325, 1988.

GELDERBLOM, W.C.A. et al. Fumonisin: Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1806-11, 1988.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n. 12, p.1395-1404, 1995.

GRANT, P. G.; PHILLIPS, T. D. Isothermal Adsorption of Aflatoxin B₁ on HSCAS Clay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, p.599-605, 1998.

GRIMES, J.L.; ELEAZER, T.H.; HILL, J.E. Paralysis of undetermined origin in Bobwhite quail. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.37, p.582-4, 1993.

GROOPMAN, J.D.; WOGAN, G.N. Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human cancer prevention. **Cancer Research**, Chestnut, v.54, p.1907s-1911s4, 1994.

GROOPMAN, J.D. et al. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. **Cancer Research**, Chestnut, v.52, p.45-52, 1992.

HAMILTON, R.M.G. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. **Poultry Science**, Champaign, v.61, p.2022-39, 1982.

HARVEY, R. B. et al. Effects of Aflatoxin M₁ Residues in Milk by Addition of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Aflatoxin Contaminated Diets of Dairy Cows. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.52, p.1556-1559, 1991.

HARVEY, R.B.; KUBENA, L.F; PHILLIPS, T.D. Evaluation of aluminosilicate compounds to reduce aflatoxin residues and toxicity to poultry and livestock: a review report. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, Supplement 1993, p.1453-1457, 1993.

HARVEY, R.B. et al. Moniliformin from *Fusarium fujikuroi* culture material and deoxynivalenol from naturally contaminated wheat incorporated into diets of broiler chicks. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.41, p.957-63, 1997.

HIROOKA, E.Y. et al. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Addit. Contam.**, London, v.13, p.173-83, 1996.

HSIEH, D. P. H. Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B₁ in rats *in vivo* and in primary hepatocyte culture. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.17, p.481-486. 1979.

HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.283, p.525-32, 1991.

HSIEH, D.P.H. et al. Comparative metabolism of aflatoxin. In: **Mycotoxins in Human and Animal Health**. Edited by RODRICKS, J.V., HESSELTINE, C.W., MEHLMAN, M.A. p.37. Pathotox Publishers, Inc., Park Forrest South, IL, 1977.

HUFF, W.E. et al. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.65, p.1891-1899, 1986.

HUFF, W.E. et al. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. **Poultry Science**, Champaign, v.71, p.64-69, 1992.

HUSSAIN, Z. et al. Residues of aflatoxin B₁ in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B₁ levels. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.48, p.3304-3307, 2010.

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

[IARC] International Agency for Research on Cancer – World Health Organization. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, v.56, p.19-23, 1993.

[IARC] International Agency for Research on Cancer – World Health Organization. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, v.82, p.171, 2002.

JACOBSON, W.C.; WISEMAN, H.G. The transmission of aflatoxin B₁ into eggs. **Poultry Science**, Champaign, v.53, p.1743-5, 1974.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. – Porto Alegre: Artmed, p. 633-640, 2005.

JOHRI, T.S.; AGRAWAL, R.; SADAGOPAN, V.R. Effect of low dietary levels of aflatoxin on laying quails (*Coturnix coturnix japonica*) and their response to dietary modifications. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v.60, p.355-9, 1990.

KUBENA, L.F. et al. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Poultry Science**, Champaign, v.69, p.727-735, 1990.

KUBENA, L.F. et al. Effects of a hydrated calcium aluminosilicate on growing turkey poults during aflatoxicosis. **Poultry Science**, Champaign, v.70, p.1823-30, 1991.

KUBENA, L.F. et al. Effects of feeding fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin singly and in combination to turkey poults. **Poultry Science**, Champaign, v.74, p.1295-303, 1995a.

KUBENA, L.F. et al. Influence of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material, and T-2 toxin on turkey poult. **Poultry Science**, Champaign, v.74, p.306-13, 1995b.

KUBENA, L.F. et al. Individual and combined effects of moniliformin present in *Fusarium fujikuroi* culture material and aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.76, p.265-70, 1997.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2.ed. Curitiba: Ed. do Autor, p.73-123, 1997.

LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, in the young turkey poult. **Poultry Science**, Champaign, v.75, p.1472-8, 1996.

LEDOUX, D.R. et al. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.4, p.330-3, 1992.

LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. *In vitro* and *in vivo* testing of adsorbents for detoxifying mycotoxins in contaminated feedstuffs. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. Proceedings of the 15th Annual Symposium. (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds), Nottingham University Press, UK. p.369-379, 1999.

LEDOUX, D.R. et al. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.77, p.204-210, 1998.

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

LI, Y.C. et al. Effects of fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.78, p.1275-82, 1999.

LUNA, G.L. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3rd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, 1968.

MARIANI, G.V.C. **Efeito de aflatoxinas sobre o desempenho produtivo de frangos de corte em diferentes períodos de desenvolvimento corporal**. Dissertação (Mestrado). Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria. 1998.

MARTINOVA, E.A. Fumonisin B₁ - immunological effects. In: Singh, B.R.; Tu, A.T., eds. **Natural toxins**. New York, Plenum Press, p.331-42, 1996.

MOLLENHAUER, H.H. et al. Ultrastructure of hepatic and renal lesions in chickens fed aflatoxin. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.50, p.771-777, 1989.

MOSS, M.O. Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.67, p.695-815, 1989.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry**. 9.ed. Washington D.C., National Academy of Sciences, 1994.

NORRED, W.P. Fumonisin – mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environment Health Sciences**, Lagos, v.38, p.309-328, 1993.

OBIOHA, W.I.; STAHR, H.M.; FRAFT, A.A. Distribution and effects of aflatoxin in chicken tissues after feeding radiolabelled (¹⁴C) aflatoxin B₁. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.49, p.799-805, 1986.

OĞUZ, H.; KURTOĞLU, V.; COŞKUN, B. Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) exposure. **Research in Veterinary Science**, v.69, p.197-201, 2000.

ORSI, R.B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid mayze. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v.36, p.75-87, 2000.

ORTIZ, N. **Estudo da utilização de magnetita como material adsorvedor dos metais Cu²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺ e Cd²⁺ em solução**. 2000. 176p. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - USP, São Paulo, 2000. In: CHAVES, J.A.P. **Adsorção de corantes têxteis sobre quitosana: condições, modelagem e otimização**. 2009. 96p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFP, João Pessoa, 2009.

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

PARK, D.L.; POHLAND, A.E. A rationale for the control of aflatoxin in animal feeds. In: Steyn, P.S. & Vleggaar, R., eds. *Mycotoxins and phycotoxins*. **Elsevier Applied Science**, Amsterdam, p.473-82, 1986.

PARLAT, S.S.; YILDIZ, A.Ö.; OGUZ, H. Effect of clinoptilolite on performance of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during experimental aflatoxicosis. **British Poultry Science**, London, p.495-500. 1999.

PATTERSON, D.S.P.; ROBERTS B.A. Aflatoxin metabolism in duck-liver homogenates: The relative importance of reversible cyclopentenone reduction and hemi-acetal formation. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.10, p. 501. 1972. In: WONG, Z.A., DECAD, G.M., BYARD, J.L. Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B₁ in rats *in vivo* and in primary hepatocyte culture. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.17, p. 481-486. 1979.

PHILLIPS, T.D. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. **Toxicological Sciences**, Orlando, v.52, p.118-126, 1999.

PHILLIPS, T.D. et al. Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate: A High Affinity Sorbent for Aflatoxin. **Poultry Science**, Champaign, v.67, p.243-247, 1988.

PHILLIPS, T.D et al. Detection and detoxification of aflatoxins: Prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.32, p.15-19, 1990.

PHILLIPS, T.D., SARR, A.B., GRANT, P.G. Selective Chemisorption and Detoxification of Aflatoxins by Phillosilicate Clay. **Natural Toxins**, New York, v.3, p.204-213, 1995.

PLATTNER, R.D. et al. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathology**. Den Haag, v.117, p.23-28, 1992.

POLAN, C.E.; HAYES, J.R.; CAMPBELL, T.C. Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.22, n.4, p.635-638, 1974.

RAMOS, A.J.; HERNÁNDEZ, E. *In vitro* aflatoxin adsorption by means of montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. **Animal Feed Science Technology** 62: 263-269, 1996.

RAWAL, S.; KIM, J.E.; COULOMBE Jr., R. Aflatoxin B₁ in poultry: Toxicology, metabolism

and prevention. **Research in Veterinary Science**, London, v.89, p.325-331, 2010.

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

ROSS, P.F. et al. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *F.proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.3225-6, 1990.

ROTTINGHAUS, G.E; COATNEY, C.E.; MINOR, H.C. A rapid sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.4, p.326-329, 1992.

ROTTINGHAUS, G.E; OLSEN, B.; OSWEILER, G.D. Rapid screening method for aflatoxin B₁, zearalenone, ochratoxin A, T-2 toxin, diacetoxys cirpenol and vomitoxin. In: Proceedings of the 25th Annual American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Nashville, TN. p.477-484, 1982.

SABINO, M. et al. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.48, p.81-5, 1988.

SABINO, M. et al. Natural occurrence of aflatoxins in maize in Brasil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, London, v.6, p.327-31, 1989.

SALHAB, A. S.; EDWARDS, G. S. Comparative *in vitro* metabolism of aflatoxicol by liver preparation from animals and humans. *Cancer Res.*, v. 37, p. 1016. 1977. In: WONG, Z. A., DECAD, G. M., BYARD, J. L., HSIEH, D. P. H. Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B₁ in rats *in vivo* and in primary hepatocyte culture. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.17, p.481-486. 1979.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.2, n.1, 2000.

SARR, A. B. Evaluation of Innovative Methods for the Detection and Detoxification of Aflatoxin. Ph.D. Dissertation, Texas A&M University, 1992.

SAS Institute. SAS[®] User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC., 1992.

SAWHNEY, D.S.; VADEHRA, D.V.; BAKER, R.C. Aflatoxicosis in the laying japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Poultry Science**, Champaign, v.52, p.465-73, 1973. In: FERNANDEZ, A. et al. Aflatoxin and its metabolites in tissues from laying hens and broiler chickens fed a contaminated diet. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v.65, p.407-414, 1994.

SCHEIDELER, S.E. Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B₁ on aflatoxin toxicity, chick performance, and mineral status. **Poultry Science**, Champaign, v.72, p.282-288, 1993.

SCHOENHARD, G.L. Ph.D. Dissertation. Oregon State University, Corvallis, Oregon. 1974. In: WONG, Z. A. et al. Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B₁ in rats *in vivo* and in primary hepatocyte culture. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.17, p. 481-486. 1979.

SCHOENTAL, R. Aflatoxins. **Annual Review of Pharmacology**, Palo Alto, v.7, p.343-356, 1967.

SCOTT, P.M. Natural poisons. In: Helrich, K., ed. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. v.2, p.1184-213.

SHEPHARD, et al. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v.13, p.2077-87, 1990.

SHI et al. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.129, p. 138-148, 2006.

SHOTWELL, O.L. et al. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology** v.14, p.425-428, 1966.

SMITH, E. E. et al. Dietary Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate Reduction of Aflatoxin M₁ Residue in Dairy Goat Milk and Effects on Milk Production and Components. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.72, p.677-682, 1982.

SMITH, J.E. et al. Mycotoxins in Human Nutrition and Health. Brussels: European Commission CG XII, 1994.

SMITH, J.W.; HAMILTON, P.B. Aflatoxicosis in the broiler chicken. **Poultry Science**, Champaign, v.49, p.207-15, 1970.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxins A zearalenona and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multitoxin thin layer chromatografic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.72, p.22-6, 1989.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à medicina veterinária. Barueri, SP: Ed. Manole, 1^a Edição, 2008.

STOLOFF, L. et al. Stability of aflatoxin M in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.58, n.12, p.1789-1793, 1975.

STROSNIDER, H. et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. **Environmental Health Perspectives**, Cary, v.114, p.1898-1903, 2006.

SUDHAKAR, B.V. Effect of aflatoxins on egg production and its quality. **Poultry Adv.** v.23, p.436, 1990.

THERON, J.J.; LIEBENBERG, N; JOUBERT, H.J.B. Histochemistry and electron microscopy of acute liver lesions induced by aflatoxin B₁ in ducklings. **Nature**, London, v.206, p.908-909, 1965. In: MOLLENHAUER, H.H. et al. Ultrastructure of hepatic and renal lesions in chickens fed aflatoxin. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.50, p.771-777, 1989.

TRUCKSESS, M.W. et al. Thin layer chromatographic determination of aflatoxin B₁ in eggs. **Journal of Association of Analytical Chemists**, Arlington, v.60, p.795-8, 1977.

TRUCKSESS, M.W. et al. Aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. **Poultry Science**, Champaign, v.62, p.2176-82, 1983.

TUNG, H.T. et al. Impairment of kidney function during aflatoxicosis. **Poultry Science**. Champaign, v.52, p.873-78, 1973.

TUNG, H.T. et al. The anemia caused by aflatoxin. **Poultry Science**. Champaign, v.54, p.1962-69, 1975a.

TUNG, H.T. et al. Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.34, p.320-326, 1975b.

VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials. **Food Additives and Contaminants**, London, v.12, p.321-330, 1994.

VELDMAN, A. et al. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. **Animal Production**, Bletchley, n.55, p.163-168, 1992.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.266, p.14486-90, 1991.

WEIBKING, T.S. et al. Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in the young turkey poult. **Poultry Science**, Champaign, v.73, p.1517-25, 1994.

WEIBKING, T.S. et al. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Science**, Champaign, v.72, p.456-466, 1993.

WOGAN, G.N. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. **Cancer Research**, Chestnut, 52 (Suppl.), p.2114S-8S, 1992.

WOLZAK, A. et al. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.23, p.1057-61, 1985.

WONG, J.J.; HSIEH, D.P.H. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.**, v.73, p.2241. In: WONG, Z.A. et al. Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B₁ in rats *in vivo* and in primary hepatocyte culture. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.17, p. 481-486. 1979.

WONG, Z.A. et al. Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B₁ in rats *in vivo* and in primary hepatocyte culture. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.17, p. 481-486. 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. (WHO Food Additives Series, 40). Geneva, 1996.

WYATT, R.D. Poultry. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S., Editors. Mycotoxins and animal foods. CRC Press, Boca Raton, FL, p.553-605, 1991.

WYATT, R.D.; MARKS, H.L.; MANNING, R.O. Selection for resistance to aflatoxin in chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.66, p.1901-04, 1987.

YUNUS, A.W.; FAZELI, E.R.; BOHM, J. Aflatoxin B₁ in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. **Toxins**, Basel, v.3, p.566-590, 2011.

Figura 14. Fluxograma do método de análise do fígado e rim de frangos de corte para análise da aflatoxina.