UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DIANE VALGANON DE NEEFF

Efeitos da Administração da Aflatoxina, Fumonisina e Curcumina, Isoladas ou Associadas, sobre a Resposta Imunológica Humoral e Determinação de Produtos de Biotransformação em Frangos de Corte

Pirassununga

2016

DIANE VALGANON DE NEEFF

Efeitos da Administração da Aflatoxina, Fumonisina e Curcumina, Isoladas ou Associadas, sobre a Resposta Imunológica Humoral e Determinação de Produtos de Biotransformação em Frangos de Corte

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N376e

Neeff, Diane Valganon de
Efeitos da Administração da Aflatoxina, Fumonisina e Curcumina, Isoladas ou Associadas, sobre a Resposta Imunológica Humoral e Determinação de Prod... / Diane Valganon de Neeff ; orientador Carlos Augusto Fernandes de Oliveira. -- Pirassununga, 2016.
133 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Aflatoxina B1. 2. Antioxidante. 3. Curcuminóides totais. 4. Micotoxina. 5. Resíduo. I. Augusto Fernandes de Oliveira, Carlos , orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

DEDICATÓRIA

A minha família pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos de minha vida

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A toda a minha família que sempre esteve ao meu lado. Aos meus pais Daniel de Neeff e Maria Lourdes Valgañón Gomez, pelo amor, ajuda, carinho e paciência. Ao meu irmão Michael Valgañón de Neeff pelo amor, carinho e por todos os anos de companheirismo. A minha tia Lupe pelo amor, conversas e ajuda. Sem a ajuda dos meus pais e da minha tia Lupe eu não teria conquistado tantas vitórias.

Ao meu namorado João Paulo Fernandes Ventura, pelo amor, carinho, apoio, risadas, paciência enfim, por dividir sua vida comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação, paciência, por todos os ensinamentos e também pelos momentos de descontração, risadas e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin pela ajuda e dicas, pelas conversas, risadas e amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, pela ajuda na realização do experimento com os frangos, pelos ensinamentos e conversas.

A Roice, especialista do laboratório, pela ajuda nas análises e pela amizade.

A toda equipe do Laboratório de Microbriologia e Micotoxicologia de Alimentos pela ajuda no experimento e pela amizade, em especial à Keli, Bruna, Ágatha, Tânia, Polly, Fernanda, Mayra, Sarah, Estela, Carol, Daiane e aos estagiários Gabi, Thiago, Bárbara, Érika, Maria, Matheus, Ian e muitos outros que já passaram pelo laboratório.

Ao Prof. Dr. David Ledoux por ter me recebido, mais uma vez, na University of Missouri. Agradeço muito a oportunidade, os ensinamentos, a ajuda e pelo Thanksgiving fora de época. Thank you very much for all you've done for me.

Ao pesquisador Dr. George Rottinghaus, da University of Missouri, pelos ensinamentos, ajuda, viagens e por todas as boas conversas. Thanks for everything George.

Aos amigos de Columbia, Missouri (Francine, João “Pé de Pano”, Maurício “Xibungo” “Moreno”, Ricardo “Jamanta”, Lívia, Cintia, Camila, Álvaro, Monica, Mariana, Guilherme, Tiffany, Morgan, Vivian, Juliano, Estela, Colwayne), pela amizade, companheirismo, pelo show dos Rolling Stones, churrascos e muitas risadas. Sem vocês esses seis meses não teriam sido tão inesquecíveis.

Á Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade.

Aos meus amigos de Pirassununga pela amizade, companheirismo, comilanças, festas, conversas e muitas risadas. Em especial a Natali Knorr Valadão, Keliani Bordin, Daniel Gonçalves, Maria Carolina Capellini, Mirian Megumi Sawada, Ágatha Pinho Carão, Bruna Leonel Gonçalves e Taíse Toniazzo, pela amizade incondicional.

A todos os meus amigos, que mesmo de longe, sempre me apoiaram.

Á Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro durante todo o período de Doutorado (Processo FAPESP 2013/13592-3).

EPÍGRAFE

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

RESUMO

NEEFF, D. V. **Efeitos da administração da aflatoxina, fumonisina e curcumina, isoladas ou associadas, sobre a resposta imunológica humoral e determinação de produtos de biotransformação em frangos de corte.** 2016. 133 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O objetivo da pesquisa foi avaliar os efeitos da AFB_1 e FB_1, isoladas e associadas e com ou sem a inclusão de um antioxidante (cúrcuma) em frangos de corte, utilizando-se os seguintes tratamentos (T): T1 (controle): 0 AFB_1 + 0 FB_1 + 0 Cúrcuma; T2: 0 AFB_1 + 0 FB_1 + 222 mg/kg Cúrcuma; T3: 0 AFB_1 + 20 mg/kg FB_1 + 0 Cúrcuma; T4: 0 AFB_1 + 20 mg/kg FB_1 + 222 mg/kg Cúrcuma; T5: 0,5 mg/kg AFB_1 + 0 FB_1 + 0 Cúrcuma; T6: 0,5 mg/kg AFB_1 + 0 FB_1 + 222 mg/kg Cúrcuma; T7: 0,5 mg/kg AFB_1 + 20 mg/kg FB_1 + 0 Cúrcuma; T8: 0,5 mg/kg AFB_1 + 20 mg/kg FB_1 + 222 mg/kg Cúrcuma. Os parâmetros avaliados incluíram: conversão alimentar, ganho de peso, consumo alimentar, proteínas séricas, hematologia, enzimas hepáticas, histopatologia de vísceras, resposta vacinal, resíduos de aflatoxinas e fumonisina em vísceras e músculos. Os dados foram analisados como um fatorial 2 x 2 x 2 por análise de variância. Não houve interação significativa para os três fatores analisados no desempenho zootécnico, porém houve diferença significativa nas dietas contendo aflatoxina, quando comparada com as outras dietas, para todas as variáveis analisadas. A AST e LDH foram as únicas variáveis significativas para a interação de todos os fatores (AFB_1, FB_1 e CMT), porém as outras variáveis, exceto a GGT, apresentaram diferença significativa nas dietas contendo aflatoxina, quando comparada com as outras dietas, para todas as variáveis analisadas. As lesões histopatológicas no fígado, rim e bursa de Fabricius foram aumentando gradualmente do tratamento controle até o tratamento contendo adição de aflatoxina e fumonisina, com ou sem cúrcuma, sendo que o efeito mais severo foi observado nos órgãos desses tratamentos. Não houve diferença significativa com a inclusão da cúrcuma. Não houve nenhuma variável significativa para a interação de todos os fatores avaliados para a biometria dos órgãos, porém fígado, rim e coração apresentaram diferença significativa nas dietas contendo aflatoxina, quando comparada com as outras dietas, para todas as variáveis analisadas. Nenhuma variável foi significativa para a interação de todos os fatores avaliados para o hemograma aos 21 dias, porém aos 42 dias, leucócitos, linfócitos e basófilos apresentaram diferença significativa para a interação de todos os fatores. Não houve diferença

estatística para a interação dos três fatores analisados para os títulos de anticorpos para a doença de Newcastle. Os resíduos de FB_2 no fígado e AFB_2 no músculo peitoral foram as únicas variáveis significativas para a interação de todos os fatores analisados. Os resultados obtidos indicam que não houve efeito da cúrcuma na diminuição dos efeitos deletérios da aflatoxina e fumonisina.

Palavras-chave: Aflatoxina B_1, Antioxidante, Curcuminóides totais, Micotoxina, Resíduo

ABSTRACT

NEEFF, D. V. **Effects of aflatoxin, fumonisin and curcumin, alone or in combination, on the humoral immune response and determination of biotransformation products in broiler chickens.** 2016. 133 f. Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The objective of this research project was to evaluate the effects of AFB_1 and FB_1, alone or in combination and associated or not with an antioxidant (turmeric) in broiler chickens, using the following treatments (T): T1 (control): 0 AFB_1 + 0 FB_1 + 0 Turmeric; T2: 0 AFB_1 + 0 FB_1 + 222 mg/kg Turmeric; T3: 0 AFB_1 + 20 mg/kg FB_1 + 0 Turmeric; T4: 0 AFB_1 + 20 mg/kg FB_1 + 222 mg/kg Turmeric; T5: 0.5 mg/kg AFB_1 + 0 FB_1 + 0 Turmeric; T6: 0.5 mg/kg AFB_1 + 0 FB_1 + 222 mg/kg Turmeric; T7: 0.5 mg/kg AFB_1 + 20 mg/kg FB_1 + 0 Turmeric; T8: 0.5 mg/kg AFB_1 + 20 mg/kg FB_1 + 222 mg/kg Turmeric. The parameters evaluated included: feed conversion, weight gain, food intake, serum proteins, hematology, liver enzymes, histopathology of viscera, vaccine response and residues of aflatoxin and fumonisin in tissues of viscera and muscles. Data were analyzed as a 2 x 2 x 2 factorial by analysis of variance. There was no significant interaction for the three analyzed factors on the performance, but there were significant differences in the diets containing aflatoxin when compared to the other diets, for all variables analyzed. AST and LDH were the only significant variables for the interaction of all factors (AFB_1, FB_1 e CMT), but other variables, with the exception of GGT, showed significant difference in diets containing aflatoxin when compared to other diets for all the variables analyzed. Histopathological lesions in the liver, kidney and bursa of Fabricius were gradually increased from the control treatment to aflatoxin and fumonisin treatment, with or without turmeric, with the most severe effect being observed in the organs of these treatments. There was no significant variable for the interaction of all factors evaluated for organ biometry, but liver, kidney and heart showed a significant difference in diets containing aflatoxin when compared to other diets for all variables analyzed. No variable was significant for the interaction of all factors evaluated for the blood test at 21 days, but at 42 days leukocytes, lymphocytes and basophils showed significant differences for the interaction of all factors. There was no statistical difference for the interaction of all factors analyzed for antibody titers to Newcastle disease. The residues of FB_2 in the liver and AFB_2 in the pectoral muscle were significant for the interaction of all the

factors. The results showed no effect of turmeric powder in reducing the deleterious effects of aflatoxin and fumonisin.

Keywords: Aflatoxin B_1, Antioxidant, Mycotoxin, Residue, Total curcuminoids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estruturas químicas das aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2. 24

Figura 2. Estrutura química das fumonisinas. 27

Figura 3. Estrutura química dos curcuminóides curcumina, dimetóxicurcumina, bisdimetóxicurcumina e ciclocurcumina. 33

Figura 4. Esquema mostrando as várias funções biológicas da curcumina. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais. 49

Tabela 2. Relação massa/carga (m/z) dos íons precursores e produtos, voltagem do cone, energia de colisão e tempo de retenção para os resíduos de aflatoxina. 58

Tabela 3. Gradiente entre a solução de água:ácido fórmico 0,1% (Solvente A) e a de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (Solvente B) ao longo da corrida cromatográfica de 2,5 minutos para determinação de resíduos hepáticos de aflatoxinas. 59

Tabela 4. Relação massa/carga (m/z) dos íons precursores e produtos, voltagem do cone, energia de colisão e tempo de retenção para os resíduos de fumonisina. 61

Tabela 6. Análises micotoxicológicas dos farelos de milho e soja utilizados na ração. 63

Tabela 7. Quantificação das aflatoxinas, fumonisinas e curcuminóides totais nas dietas experimentais. 64

Tabela 8. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma no desempenho de frangos alimentados com dietas experimentais. 66

Tabela 9. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na bioquímica sérica, níveis de enzimas e fósforo de frangos alimentados com dietas experimentais. 69

Tabela 12. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma no hemograma de frangos de 21 dias. 72

Tabela 13. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma no hemograma de frangos de 42 dias. 75

Tabela 14. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma nos títulos de anticorpos de frangos para doença de Newcastle. 79

Tabela 10. Parâmetros histopatológicos de frangos de corte alimentados com aflatoxina, fumonisina e cúrcuma. 82

Tabela 11. Biometria de órgãos de frangos de corte de 42 dias. 88

Tabela 15. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de aflatoxina e fumonisina, no fígado de frangos alimentados com dietas experimentais[1]..... 90

Tabela 16. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de aflatoxina, no fígado de frangos alimentados com dietas experimentais[1]. 91

Tabela 17. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de fumonisina, no fígado de frangos alimentados com dietas experimentais[1]..... 92

Tabela 18. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de aflatoxina, no músculo peitoral de frangos alimentados com dietas experimentais[1]..... 93

Tabela 19. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de fumonisina, no músculo peitoral de frangos alimentados com dietas experimentais[1]..... 94

Tabela 20. Coeficiente de correlação[1] entre o desempenho e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte. 97

Tabela 21. Coeficiente de correlação[1] entre o desempenho e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte. 98

Tabela 22. Coeficiente de correlação[1] entre a bioquímica sérica e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte. 99

Tabela 23. Coeficiente de correlação[1] entre a bioquímica sérica e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte. 100

Tabela 24. Coeficiente de correlação[1] entre o hemograma aos 21 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte. 102

Tabela 25. Coeficiente de correlação[1] entre o hemograma aos 21 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte. 104

Tabela 26. Coeficiente de correlação[1] entre o hemograma aos 42 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte. 106

Tabela 27. Coeficiente de correlação[1] entre o hemograma aos 42 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte. 108

Tabela 28. Coeficiente de correlação[1] entre a títulos de anticorpos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte. 110

Tabela 29. Coeficiente de correlação[1] entre a títulos de anticorpos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte..... 111

Tabela 30. Coeficiente de correlação[1] entre a histopatologia e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte. 112

Tabela 31. Coeficiente de correlação[1] entre a histopatologia e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte. 113

Tabela 32. Coeficiente de correlação[1] entre a biometria e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte. 114

Tabela 33. Coeficiente de correlação[1] entre a biometria e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte. 115

Tabela 34. Coeficiente de correlação[1] entre a títulos de anticorpos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte..... 116

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AFB_1	Aflatoxina B_1
AFB_2	Aflatoxina B_2
AFG_1	Aflatoxina G_1
AFG_2	Aflatoxina G_2
AFM_1	Aflatoxina M_1
ALB	Albumina
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
AU	Ácido Úrico
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
CMT	Curcuminóides Totais
dL	Decilitro
EPM	Erro Padrão Médio
FB_1	Fumonisina B_1
FB_2	Fumonisina B_2
g	Grama
GGT	Gama-Glutamiltransferase
GLOB	Globulinas
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
kg	Kilograma
L	Litro
LDH	Lactato-Desidrogenase
M	Molar
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m/z	Relação massa/carga
ng	Nanograma
OPA	o-Ftalaldeído
P	Fósforo
PBS	Tampão Fosfato Salino
PT	Proteína Total
PTFE	Politetrafluoretileno
rpm	Rotações por minuto

SAX	*Strong Anion Exchange Column*
UPLC	*Ultra Performance Liquid Chromatography*
V	Volts
v/v	Volume/volume
VCM	Volume Corpuscular Médio
µg	Micrograma
°C	Graus Celcius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....20

2. OBJETIVOS.....21

2.1 Objetivos Gerais.....21

2.2 Objetivos Específicos.....21

3. REVISÃO DE LITERATURA.....23

3.1 Aflatoxinas.....23

3.2 Fumonisinas.....26

3.3 Antioxidantes.....28

3.4 Curcumina e Curcuminóides Totais.....33

3.5 Aspectos do Sistema Imune de Aves.....36

3.6 Resíduos de Aflatoxina e Fumonisina.....38

3.7 Métodos Analíticos para Micotoxinas em Alimentos.....40

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....42

4.1 Micotoxinas.....42

4.1.1 Cultivo do Fungo e Produção de Aflatoxinas.....42

4.1.2 Extração e Quantificação da Aflatoxinas no Material de Cultivo.....44

4.1.3 Extração e Quantificação da Fumonisinas no Material de Cultivo.....45

4.2 Cúrcuma.....47

4.3 Animais e Instalações.....47

4.4 Preparo das Rações Experimentais.....48

4.5 Avaliação dos Índices de Produtividade.....50

4.6 Bioquímica Sérica e Fósforo.....50

4.7 Hemograma.....51

4.8 Vacinação das Aves e Análise Imunológica.....52

4.9 Análises Histopatológicas e Biometria de Órgãos.....54

4.10 Análises de Resíduos de Aflatoxina.....54

4.12 Análise de Resíduos de Fumonisina.....59

4.13 Análise dos Resultados.....62

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....63

5.1 Análises de Aflatoxinas e Fumonisinas nos Grãos Utilizados nas Dietas Experimentais e dos Curcuminóides Totais presentes na Cúrcuma.....63

5.2 Análise de Aflatoxina, Fumonisina e Curcuminóides Totais nas Rações.....63

5.3 Índices de Produtividade.....65

5.4 Bioquímica Sérica e Fósforo.....68

5.5 Hemograma.....71

5.6 Títulos de Anticorpos para Doença de Newcastle.....78

5.7 Histopatologia.....81

5.8 Biometria de Órgãos.....88

5.9 Resíduos de Aflatoxina e Fumonisina no Fígado e Músculo Peitoral.....89

5.10 Correlação de Pearson entre os Resíduos e as Variáveis Estudadas.....96

5.10.1 Desempenho e Resíduos.....96

5.10.2 Bioquímica Sérica e Resíduos.....98

5.10.3 Hemograma e Resíduos.....101

5.10.4 Títulos de Anticorpos e Resíduos.....109

5.10.5 Histopatologia e Resíduos.....111

5.10.6 Biometria de Órgãos e Resíduos.....113

5.10.7 Resíduos de Aflatoxina e Fumonisina no Fígado e Músculo.....116

6. CONCLUSÕES.....118

7. REFERÊNCIAS.....120

APÊNDICE.....133

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são substâncias originadas a partir do metabolismo secundário de fungos, com estruturas diferenciadas, que ocorrem como contaminantes de diversos produtos utilizados na alimentação animal. Estes compostos são, de modo geral, resistentes ao calor, frio e luz, de modo que podem permanecer por um longo período nos alimentos, mesmo após o desaparecimento dos fungos que as originaram.

A avicultura é uma das mais importantes atividades pecuárias do Brasil, com destaque para a avicultura de corte que, no momento, encontra-se como terceiro maior produtor mundial de carne de frangos e maior exportador de carne de frangos. Por esse motivo, a cadeia avícola apresenta grande importância para o mercado brasileiro, gerando empregos e renda para o país.

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 (CAST, 2003). Neste contexto, deve-se destacar que o Brasil possui clima favorável para o desenvolvimento de fungos produtores de aflatoxinas e fumonisinas, aumentando a chance de contaminação por micotoxinas nos grãos produzidos.

A aflatoxina B_1 é o metabólito mais frequente e com maior poder toxigênico entre as aflatoxinas. Os efeitos tóxicos das aflatoxinas dependem de vários fatores como a dose, o período de exposição, espécie animal, sanidade, sexo e idade do animal. A intoxicação das aves por aflatoxina causa diminuição do desempenho zootécnico (diminuição do ganho de peso, baixa conversão alimentar), aumenta a susceptibilidade a patógenos devido à diminuição da imunidade, e aumenta a taxa de mortalidade.

Os fungos produtores de fumonisinas possuem elevada ocorrência em grãos, principalmente no milho. A fumonisina B_1 possui maior toxicidade e é a fumonisina mais encontrada. Em aves, sintomas como diarreia, diminuição no consumo de alimentos e ganho de peso, aumento no peso relativo do fígado e rins e necrose hepática podem ser observados com níveis acima de 150 mg/kg de fumonisina (NORRED; VOSS, 1994)

Antioxidantes são conhecidos por inibir o crescimento fúngico e a produção associada de micotoxinas para várias espécies toxigênicas de *Fusarium* (SIRANIDOU et al., 2002;

BOUTIGNY et al., 2009). Foi demonstrado que compostos de plantas, como os curcuminóides, inibem a biotransformação da aflatoxina em seu metabólito epóxido, que é mais genotóxico que seu composto principal (LEE et al., 2001) e que a cúrcuma possuí efeito protetor contra a AFB_1 (SONI et al., 1997). Alguns trabalhos descrevaram que a adição de cúrcuma diminuiu os efeitos tóxicos da AFB_1 em frangos de corte; no entanto, não há relato de trabalhos utilizando a cúrcuma para verificação do efeito em frangos de corte alimentados com fumonisinas, e nem com a associação desta micotoxina com aflatoxinas. Dessa forma, o presente trabalho teve a finalidade de verificar possíveis efeitos protetores da curcumina em frangos de corte em condições de intoxicação por aflatoxinas, fumonisinas ou ambas simultaneamente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da curcumina sobre a ação tóxica das aflatoxinas e fumonisinas, isoladas e associadas, em frangos de corte.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Verificar os efeitos tóxicos da AFB_1 e da FB_1, isoladas e associadas, com ou sem a inclusão de curcumina, administradas em diferentes concentrações na ração, em frangos de corte, através dos parâmetros: conversão alimentar, ganho de peso, consumo alimentar, proteínas séricas, enzimas hepáticas e histopatologia de fígado, rins, bursa de Fabricius e coração;
- ✓ Determinar a concentração de resíduos de aflatoxina B_1 (AFM_1, aflatoxicol e AFB_1 não metabolizada, AFG_1, AFG_2 e AFB_2) e de fumonisina B_1 (FB_1 não metabolizada e FB_2) no fígado e músculo peitoral das aves dos diferentes tratamentos;
- ✓ Verificar a resposta imunológica humoral das aves dos diferentes tratamentos;

- ✓ Verificar a correlação entre as concentrações de resíduos de aflatoxinas e fumonisinas nos tecidos e as demais variáveis analisadas no experimento, em condições de intoxicação com e sem a inclusão de antioxidante;
- ✓ Verificar a aplicabilidade da curcumina em rações, para diminuir os efeitos tóxicos das aflatoxinas e fumonisinas, isoladas ou associadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aflatoxinas

As micotoxinas são compostos de baixo peso molecular produzidos como metabólitos secundários por fungos filamentosos que se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, sendo capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais vertebrados, incluindo o homem (KLICH et al., 2009; COULOMBE, 1991). Os metabólitos primários são aqueles essenciais ao crescimento dos fungos e 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).

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 e humanos (SET; ERKMEN, 2010; COULOMBE, 1991).

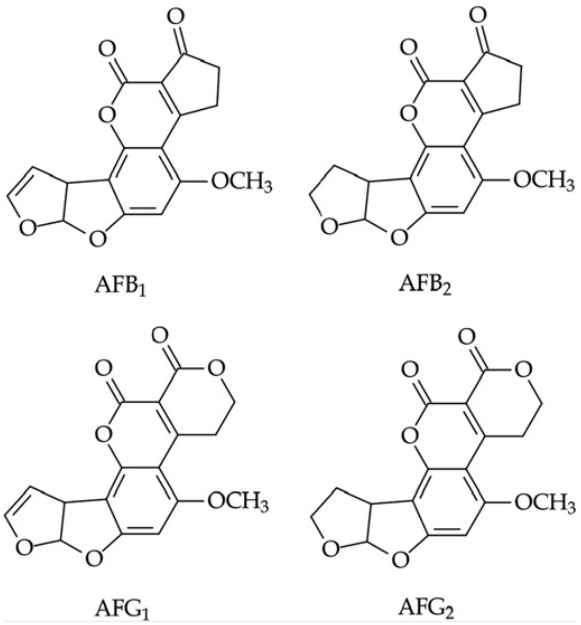
Aspergillus spp. cresce em uma grande variedade de substratos, e a maioria dos alimentos e rações é susceptível a invasão por cepas aflatoxigênicas, em qualquer estágio de produção, processamento, transporte e/ou estocagem. Esse fato é particularmente importante para grãos e cereais, como milho e trigo,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

A ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* e de suas toxinas, principalmente as aflatoxinas, em alimentos e rações animais, apresentam distribuição mundial, com predomínio nas regiões de clima tropical e subtropical. A ocorrência, entretanto, pode apresentar variabilidade sazonal, sendo mais frequente em períodos com alta temperatura e umidade pois essas condições favorecem o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas. A atividade de água, pH e composição nutricional do produto são outros importantes fatores que afetam o crescimento fúngico (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014).

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 (DL_{50}) da aflatoxina em frangos é de 6,5-16,5 mg/kg (BATATINHA; SIMAS; GÓRNIAK, 2008).

As principais formas de aflatoxinas incluem B_1, B_2, G_1 e G_2, sendo a aflatoxina B_1 o componente biologicamente ativo mais comum de ser encontrado (HSIEH; ATKINSON, 1991). As aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 foram classificadas como agentes carcinogênicos (grupo 1), para humanos, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002).

Figura 1. Estruturas químicas das aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2.



Fonte: RAWAL et al., 2010.

Essas toxinas resultam do metabolismo fúngico, entretanto algumas são produtos da biotransformação hepática, como aflatoxicol, $AFB_{2\alpha}$, AFM_1, AFM_2, AFP_1 e AFQ_1 (BATATINHA; SIMAS; GÓRNIAK, 2008). Essa biotransformação da AFB_1 é considerada como passos de desintoxicação, pois a toxicidade e a carcinogenicidade desses metabólitos são menores quando comparados com a da AFB_1 (CAMPBELL; HAYES, 1976).

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrintestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microssomais do sistema de funções oxidases mistas, associadas ao citocromo P-450 (HSIEH; ATKINSON, 1991). A AFB_1 necessita, porém, sofrer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (IARC, 2012; BIEHL; BUCK, 1987; CHU, 1991; HSIEH; ATKINSON, 1991; WOGAN, 1992). A forma ativada da AFB_1 é o composto identificado como 8,9-epóxido de AFB_1, ou AFB_1-epóxido. Esse epóxido pode ligar-se com macromoléculas celulares, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido

ribonucléico (RNA) e proteínas (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014; HSIEH; ATKINSON, 1991).

A inibição da formação da AFB_1-epóxido (através da ruptura do sistema do citocromo P-450) e/ou a formação de aduto são estratégias importantes para a prevenção destas mutações prejudiciais. Em modelos animais, a detoxificação metabólica da AFB_1-epóxido é facilitada pela indução da glutationa S-transferase (GST). Essa enzima catalisa a reação que liga a glutationa à AFB_1-epóxido tornando-a não carcinogênica. Os camundongos, que são resistentes à carcinogênese causada pela aflatoxina, possuem níveis de atividade de GST de 3 a 5 vezes maior que ratos, que são susceptíveis, e humanos possuem menor atividade de GST que ratos (MURPHY et al, 2006).

Sinais de aflatoxicose também incluem anemia, inibição da função imune, hepatotoxicose, mutagênese, teratogênese, carcinogênese e hemorragias (SET; ERKMEN, 2010; PARLAT et al., 1999). Outro sinal característico é a diminuição da síntese protéica (TUNG et al., 1975). 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).

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e tempo de exposição, determinando assim a intoxicação aguda ou crônica. A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com altas concentrações de aflatoxinas e os efeitos são observados em um curto período de tempo (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014).

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. Essa é a forma mais comum de intoxicação em condições naturais, porém de difícil diagnóstico, causando grandes perdas econômicas na produção animal (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).

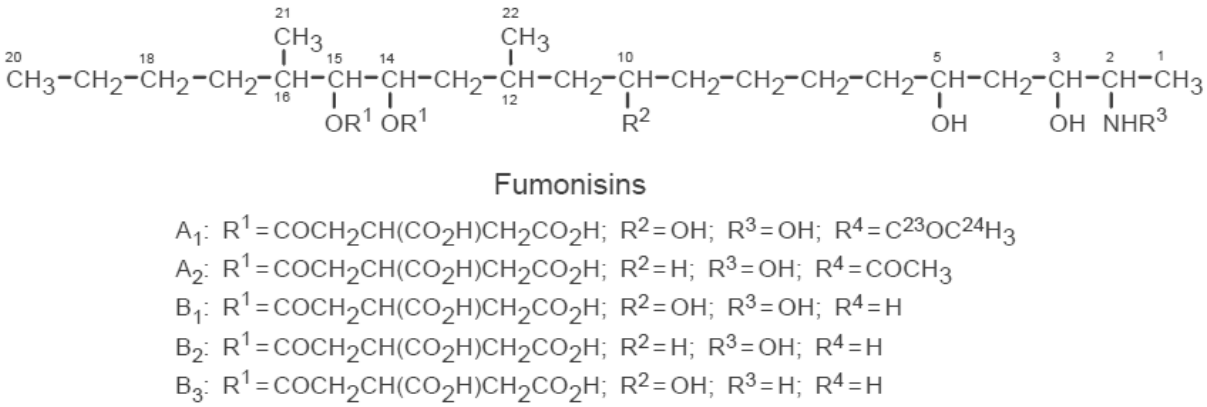
Na aflatoxicose não ocorrem erosões de moela, apesar de muitas aves com lesões características desta micotoxicose também apresentarem esse tipo de alteração. Isso parece ser um paradoxo, mas de acordo com Wyatt (1991), cerca de 36% das linhagens de *Aspergillus flavus*, além de produzirem aflatoxinas, 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).

3.2 Fumonisinas

Desde sua descrição original, em 1904, fungos do gênero *Fusarium* foram relacionados com doenças em humanos e animais, e mostrou uma ampla variedade de efeitos tóxicos em experimentos com animais em laboratório. Em 1988, as fumonisinas foram descobertas por Gelderblom et al. e caracterizadas quimicamente por Bezuidenhout et al. Elas são produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*. O principal produtor é o *Fusarium verticillioides* (anteriormente chamado de *F. moniliforme*) (IARC, 2002; NELSON

et al., 1991; SHEPHARD et al., 1992), porém também pode ser produzido pelas cepas de *F. proliferatum* e *F. nygamai* (CAST, 2003), sendo a fumonisina B_1 (FB_1) a forma molecular predominante. As fumonisinas B_2 e B_3 são metabólitos intimamente relacionados e que podem co-ocorrer em concentrações mais baixas que a FB_1. Outras fumonisinas análogas previamente conhecidas são as séries A, C e P. As fumonisinas são compostos fortemente polares, solúveis em água, apresentando maior solubilidade em acetonitrila-água e insolúveis em solventes orgânicos e são relativamente estáveis ao calor (SCOTT, 2012; LEESON et al., 1995).

Figura 2. Estrutura química das fumonisinas.



Fonte: CAST, 2003.

A FB_1 é conhecida por ser agente causador de diversas doenças em animais. A indução do câncer em fígado de rato está associada com uma resposta citotóxica/proliferativa, como estudos têm indicado que a hepatotoxicidade induzida por FB_1 é um pré-requisito para a iniciação do câncer, enquanto o câncer de fígado se desenvolve em um contexto de hepatite tóxica crônica. As alterações associadas com a hepatotoxicidade induzida por FB_1 poderia levar indiretamente a eventos que estão envolvidos no processo de indução de câncer (ABEL; GELDERBLOM, 1998).

De acordo com Wang et al. (1991), a FB_1 causa interferência na biossíntese e degradação de esfingolipídeos, devido à similaridade da molécula de FB_1 com o complexo amino álcool esfingosina, que é um dos trinta amino-álcoois de cadeia longa encontrados nos esfingolipídeos de várias espécies animais. Os esfingolipídios mais encontrados nos tecidos animais são a esfingosina e os glicoesfingolipídeos (ABBAS et al., 1993).

O sítio específico de ação da FB_1 parece ocorrer nas enzimas esfinganina e esfingosina N-acetiltransferase, que é responsável pela biossíntese dos esfingolipídeos ou “turnover” da esfingosina (MERRIL et al., 1997) A inibição desta via metabólica resulta na diminuição do complexo esfingolipídeo, aumento intracelular de concentração de esfinganina livre e um aumento dos produtos de clivagem. A causa primária da toxicidade das fumonisinas é o acúmulo das bases esfingóides (POZZI et al., 2002).

Os fungos do gênero *Fusarium* são comumente encontrados no solo, sendo capazes de contaminar grãos, que podem ser usados em rações destinadas à nutrição de aves domésticas (KUBENA et al., 1999). A contaminação de alimentos e rações, com fumonisinas, tem sido associada a várias doenças que podem afetar a saúde em animais e humanos. São hepatotóxicas e nefrotóxicas para a maioria das espécies animais testadas (GIROLAMO et al., 2001). As fumonisinas são extremamente tóxicas para equídeos e suínos, porém a maioria das aves domésticas demonstra grande resistência a essas toxinas. Apesar dessa relativa resistência à FB_1, os frangos apresentam desempenho piorado, aumento do peso de órgãos (rim e fígado principalmente), mudanças patológicas em níveis elevados de FB_1, aumento da relação esfinganina e esfingosina (SA:SO) e aumento da concentração de hemoglobina (LEDOUX et al., 2003; WEIBKING et al., 1993).

Em frangos de corte, Ledoux et al. (1992) demonstraram que 100 mg/kg de fumonisina B_1 na dieta podem causar diminuição no ganho de peso, aumento no tamanho do fígado, proventrículo e moela, causando atrofia tímica, necrose hepática multifocal e hiperplasia das células do ducto biliar.

Qureshi et al. (1992) citam que as fumonisinas podem afetar o sistema imunológico das aves, resultando em aumento na susceptibilidade a infecções. Estudos realizados por Li et al. (1999) com frangos de corte, utilizando níveis de 200 mg/kg de fumonisina, demonstraram que ocorreram efeitos de imunossupressão nas aves, com diminuição na imunidade humoral e na supressão de linfócitos.

3.3 Antioxidantes

O consumo de oxigênio relativo ao crescimento de células conduz à geração de uma série de espécies reativas de oxigênio (ERO). Eles são produzidos continuamente pelo uso

normal de oxigênio do corpo, tal como a respiração e algumas funções imunes mediadas por células. ERO incluem radicais livres, tais como radicais ânion superóxido (O_2•−), radicais hidroxil (OH•) e espécies radicais não livres como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1O_2$) (AK; GÜLÇIN, 2008). ERO, como o ânion superóxido e o óxido nítrico, produzidos dentro da célula ou por fagócitos ativados presentes durante a inflamação, têm sido propostos por desempenhar um papel importante no processo multicelular da carcinogênese, provavelmente por danificar e alterar células alvo (ABEL; GELDERBLOM, 1998).

ERO são produzidos continuamente durante eventos fisiológicos normais e podem facilmente dar início à peroxidação de lipídios da membrana, conduzindo à acumulação de peróxidos lipídicos. ERO também são capazes de danificar biomoléculas cruciais, como os ácidos nucléicos, lipídios, proteínas e carboidratos, e podem causar danos ao DNA que podem levar a mutações. Se as ERO não são efetivamente eliminadas por constituintes celulares, elas podem ocasionar doenças, sendo implicadas em mais de 100 doenças (AK; GÜLÇIN, 2008).

A indução da peroxidação lipídica tem sido implicada como a causa principal de morte celular causada por vários hidrocarbonetos halogenados, estando também associada à indução de câncer pela dieta deficiente em colina no fígado de rato. A este respeito, a peroxidação lipídica nuclear e alterações subsequentes ao DNA têm sido consideradas importantes durante a fase de iniciação do câncer pela dieta deficiente em colina. Além de lesões genéticas devido a danos oxidativos, alterações envolvendo a composição lipídica da membrana celular pode alterar a resposta das células aos processos relacionados com o crescimento e, subsequentemente, contribuir para a indução da carcinogênese (ABEL; GELDERBLOM, 1998).

As fumonisinas tem mostrado interromper, *in vitro* e *in vivo*, a biossíntese lipídica em fígado de rato, com alterações ocorrendo nas principais frações fosfolipídicas da membrana celular e de seu conteúdo de ácido graxo. Dependendo do nível dietário, mudanças *in vivo* incluem a acumulação de fosfolipídio da membrana, fosfatidiletanolamina e aumento dos níveis de colesterol livre. O esfingolipídeo, esfingomielina, diminui enquanto a base esfingóide, esfinganina, aumenta como resultado da ruptura induzida por FB_1 da biossíntese dos esfingolipídeos (ABEL; GELDERBLOM, 1998). As análises de ácidos graxos de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina indicaram que o total de ácidos graxos ômega 6 e ácidos graxos poliinsaturados foram significativamente reduzidos. Estudos *in vitro* em hepatócitos primários de rato mostraram um aumento no nível de ácido linoleico e ácido

araquidônico nos principais fosfolipídios e o lipídio neutro, triacilglicerol. Em contraste com os estudos *in vivo*, os ácidos graxos poliinsaturados aumentaram e os níveis de colesterol diminuíram em estudos *in vitro* (ABEL; GELDERBLOM, 1998). A concentração de fosfatidiletanolamina também aumentou, tal como no estudo *in vivo*. As mudanças induzidas pela FB_1 na biossíntese de fosfolipídios e ácidos graxos podem ter uma mudança importante nos efeitos citotóxicos das fumonisinas por ruptura da integridade e função das membranas de hepatócitos (ABEL; GELDERBLOM, 1998).

Todos os organismos aeróbios possuem defesas antioxidantes, incluindo enzimas antioxidantes e componentes alimentares antioxidantes, para remover ou reparar as moléculas danificadas. Os compostos antioxidantes podem eliminar os radicais livres e aumentar a vida de prateleira retardando o processo de peroxidação lipídica, sendo uma das principais razões para a deterioração de produtos alimentícios e farmacêuticos durante o processamento e armazenamento (AK; GÜLÇIN, 2008). Substâncias naturais que podem prevenir a toxicidade da AFB_1 seriam úteis para a saúde humana e animal, com um custo mínimo em alimentos e rações. Plantas medicinais tradicionais foram usadas por alguns autores devido à sua atividade antifúngica, anti-aflatoxigênica e antioxidante (ABDULMAJEED, 2011).

Antioxidantes podem proteger o corpo humano de radicais livres e dos efeitos de ERO, retardando o progresso de muitas doenças crônicas, assim como a peroxidação lipídica. Assim, a necessidade de identificação de fontes seguras e naturais alternativas de alimentos antioxidantes foi criada, e a busca por antioxidantes naturais, principalmente de origem vegetal, aumentou notavelmente nos últimos anos (AK; GÜLÇIN, 2008).

Os antioxidantes têm sido amplamente utilizados como aditivos alimentares para proporcionar proteção contra a degradação oxidativa de alimentos. Também são conhecidos por inibir o crescimento fúngico e produção de micotoxina associada para várias espécies de *Fusarium* toxigênicas. Os antioxidantes mais comumente utilizados, no presente momento, são o hidroxianisolo butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propil galato e terc butil hidroquinona (TBHQ). Entre os antioxidantes sintéticos, ésteres de ácido parahidroxibenzóico (parabeno) e BHA reduziram o crescimento fúngico do *F. verticillioides* e *F. proliferatum* e diminuíram a produção de fumonisina, enquanto o BHT foi menos efetivo em cepas do gênero *Aspergillus*. Entretanto o BHA e o BHT foram suspeitos de ser responsáveis por danos ao fígado e carcinogênese. Por esse motivo, existe um interesse crescente em antioxidantes naturais e seguros (AK; GÜLÇIN, 2008; COMA et al., 2010; FARNOCHI et al., 2005).

Carotenoides são pigmentos naturais encontrados em plantas e microrganismos caracterizados por uma ampla variedade de funções na natureza, desempenhando papel importante devido a sua propriedade antioxidante. Existem mais de 600 carotenoides na natureza, que são classificados como carotenos, xantofilas e licopeno. Os carotenoides tem mostrado uma variedade de funções na prevenção contra vários problemas de saúde, incluindo câncer, doença metabólica e, possivelmente, doença cardiovascular (JOMOVA; VALKO, 2013).

Há evidências, a partir de estudos epidemiológicos e intervenções clínicas em animais, que indicam que carotenoides podem melhorar a função imunológica. Galos novos alimentados com β-caroteno e cantaxantina produziram quantidades significativamente maiores de títulos de anticorpos em resposta à vacina contra a doença de NewCastle quando comparadas com as aves controle. Frangos alimentados com dietas contendo 5 mg/kg de aflatoxina e cantaxantina podem produzir alguns efeitos positivos a respeito de certos componentes sanguíneos, como a proteína total, colesterol e ácido úrico. Diversas atividades bioquímicas dos carotenoides têm sido observadas na prevenção de doenças, como a atividade da provitamina A, atividade antioxidante e o reforço da junção *gap* ou comunicante (CHENG et al., 2001).

Infusões de chá são utilizadas como agente terapêutico, levando em conta a sua disponibilidade imediata e custo-benefício. O chá é conhecido por conter níveis elevados de flavonóides e polifenóis. Relatos mostraram que os polifenóis do chá inibem a síntese de DNA da leucemia e do carcinoma de pulmão e atribuiu aos flavonóides do chá uma grande atividade antioxidante. Acredita-se que o consumo de chá verde oferece mais efeitos benéficos à saúde em comparação com o chá preto devido à presença de catequinas que são convertidas em teaflavinas e tearubiginas através da fermentação durante o processo de transformação. No entanto, muitos estudos confirmaram o efeito positivo do chá preto em uma série de agentes carcinógenos e tóxicos. O chá preto mostrou proteger significativamente contra danos oxidativos induzidos por um número de agentes como o peróxido de hidrogênio, primaquina e fenilhidrazina em células do glóbulo vermelho (JHA et al., 2013).

Jha et al. (2013) contaminaram camundongos machos com aflatoxina (750 e 1500 µg/kg de peso vivo) e utilizaram infusão de chá preto (2%) na água de bebida. Os resultados revelaram significativa restauração, pela infusão de chá preto, dos danos induzidos pela aflatoxina no peso corporal, peso dos órgãos, bioquímica sérica e histopatologia dos camundongos.

A geleia real, um alimento produzido pelas glândulas hipofaringeal e mandibular de abelhas operárias (*Apis mellifera* Linne), contém diversos compostos importantes com atividade biológica, tais como aminoácidos livres, proteínas, açúcares, ácidos graxos, minerais (principalmente ferro e cálcio) e vitaminas (principalmente tiamina, niacina, riboflavina). A geleia real possui propriedades imunomoduladoras, estimula a produção de anticorpos e proliferação de células imunocompetentes em camundongos (EL-NEKEETY et al., 2007).

Ratos alimentados com dieta contaminada com 200 mg/kg de fumonisina e 150 mg/kg de geleia real tiveram uma melhora significativa em todos os parâmetros testados (ganho de peso, ingestão alimentar, glutationa peroxidase, superóxido dismutase, ALT, AST, triglicerídeos, colesterol, HDL, LDL, creatinina, ácido úrico e histologia e histoquímica do fígado e rim), quando comparados som os animais alimentados somente com fumonisina. A fumonisina induz um estresse oxidativo e a geleia real fez com que houvesse uma melhora significativa na capacidade antioxidante, mostrando que a geleia real possuiu efeito protetor contra a toxicidade da fumonisina (EL-NEKEETY et al., 2007).

A vitamina E é o mais efetivo antioxidante solúvel em lipídio de ruptura de cadeia nas membranas biológicas e protege estruturas celulares contra danos causados por radicais livres de oxigênio e produtos reativos da peroxidação lipídica (SODHI et al., 2008). Ela é conhecida por suas propriedades antioxidantes e tem mostrado modular funções imune em várias espécies (HE et al., 2013).

O selênio é um constituinte da enzima citosólica glutationa peroxidase, e facilita a ação da vitamina E na redução de radicais peróxidos (SODHI et al., 2008). A levedura selênio mostrou aliviar alguns efeitos de micotoxinas em suínos e aves através da ligação de micotoxinas, tornando-as indisponíveis no trato gastrintestinal (HE et al., 2013).

Em frangos, a absorção da vitamina E é prejudicada pela severa deficiência de selênio e o selênio alivia as deficiências de vitamina E, permitindo que maiores níveis de vitamina E sejam absorvidos. A maior parte dos estudos a respeito dessa suplementação concentra-se nas propriedades preventivas e curativas em doenças de aves. Além disso, estudos mostraram que esses nutrientes aliviam a toxicidade de metais e de micotoxinas (SODHI et al., 2008).

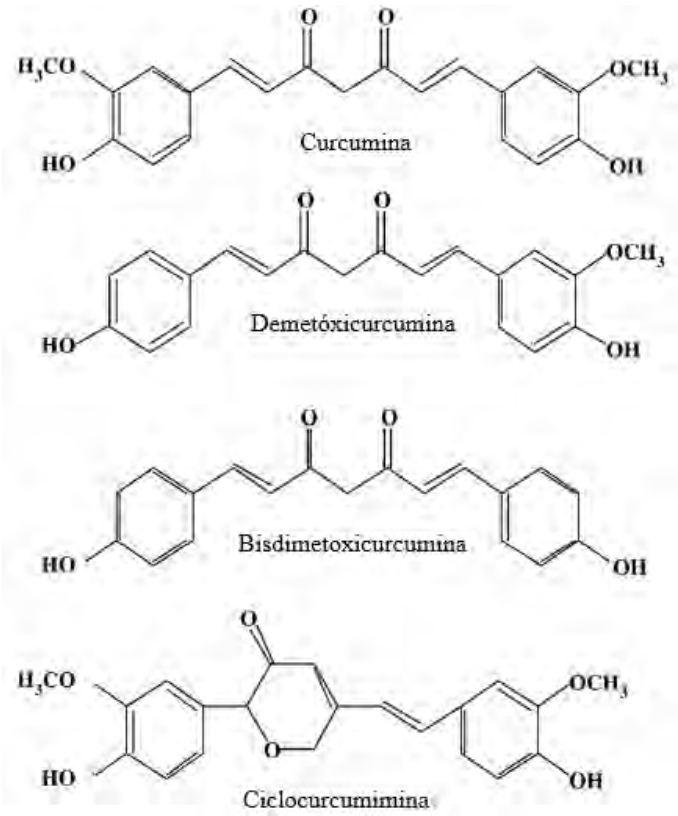
He et al. (2013) utilizaram milho contaminado naturalmente com aflatoxina B_1 para avaliar os efeitos, em patos, da vitamina E e da levedura selênio. A suplementação com vitamina E e levedura selênio aumentou significativamente a conversão alimentar durante os dias 0 e 14, porém diminuiu o consumo médio diário de ração dos 15 aos 28 dias e de 0 a 28

dias. A proliferação de linfócitos foi diminuída, durante todo o experimento, pela inclusão de AFB_1 nas dietas contaminadas, porém a suplementação de vitamina E e levedura selênio foi benéfica. As dietas contendo vitamina E e levedura selênio melhoraram os níveis de interleucina 2 e 6 ao longo do experimento.

3.4 Curcumina e Curcuminóides Totais

A curcumina é um dos constituintes encontrados na especiaria cúrcuma, sendo um dos principais ingredientes do curry em pó. A cúrcuma, uma planta medicinal nativa do subcontinente asiático, é preparada a partir da raiz e rizoma secos da planta *Curcuma longa*, um membro da família do gengibre. O ingrediente ativo presente na curcumina é o diferuloimetano, um polifenol hidrofóbico, que apresenta cor amarela característica (EPSTEIN et al., 2010; GOWDA et al., 2009; NAYAK; SASHIDHAR, 2010).

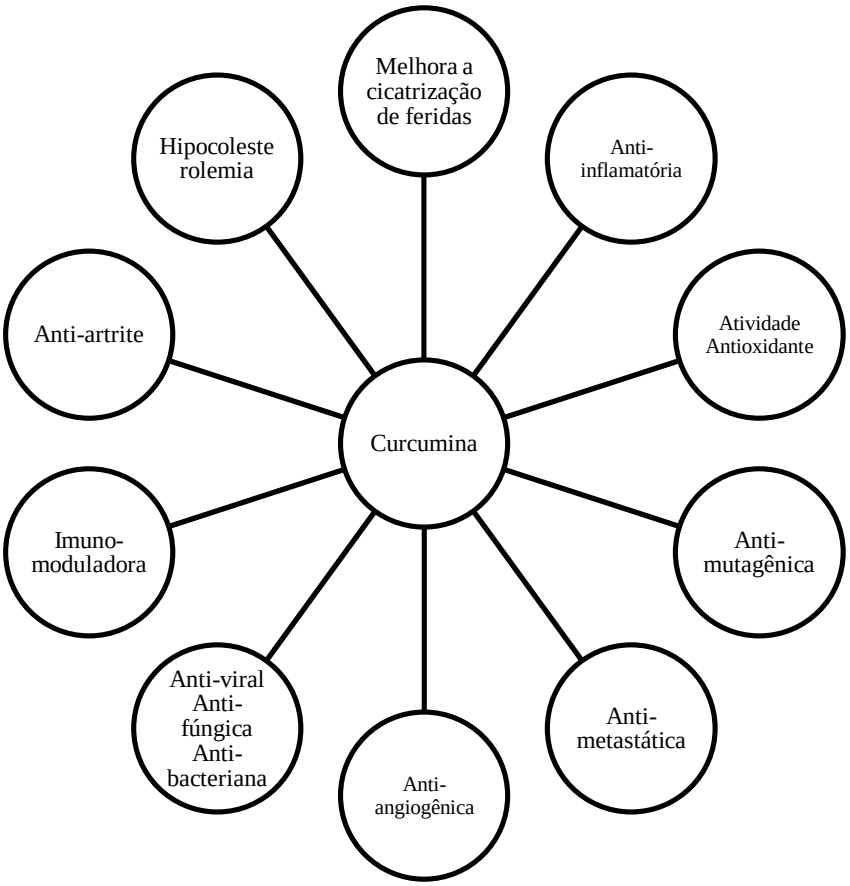
Figura 3. Estrutura química dos curcuminóides curcumina, demetóxicurcumina, bisdimetóxicurcumina e ciclocurcumina.



Fonte: SRIVASTAVA et al., 2011.

A curcumina vem sendo utilizada, por seus benefícios medicinais, há séculos, porém o primeiro caso documentado de seu uso como uma droga surgiu apenas em 1937, quando foi utilizada para tratar doença biliar (SRIVASTAVA et al., 2011). Desde então seu potencial terapêutico vem sendo explorado em doenças inflamatórias, neoplásicas, cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, fibrose cística e outros distúrbios (SRIVASTAVA et al., 2011; MAHESHWARI et al., 2006). Em revisão feita por Epstein et al. (2010) encontram-se diversos estudos que mostram as principais ações da curcumina, como ação anti-inflamatória, antioxidante, pro-apoptótica, anti-cancerígena e anti-angiogênica (Figura 4). Devido a um vasto número de alvos biológicos e praticamente nenhum efeito colateral, a curcumina alcançou um interessante potencial terapêutico para curar doenças imune, metabólicas e câncer (SRIVASTAVA et al., 2011).

Figura 4. Esquema mostrando as várias funções biológicas da curcumina.



Fonte: Adaptado de MAHESHWARI et al., 2006.

A segurança, tolerabilidade e não toxicidade da curcumina em altas doses é bem estabelecida em humanos e, no FDA (*Food and Drug Administration*), a curcumina é classificada como 'Geralmente Reconhecida como Segura' (EPSTEIN et al., 2010).

Os efeitos negativos causados pela AFB_1 incluem dano celular, liberação de radicais livres e peroxidação lipídica (SURAI, 2002). Os curcuminóides totais apresentaram efeitos antioxidantes e protetores contra a AFB_1, e como a peroxidação lipídica desempenha um papel importante na toxicidade pela aflatoxina, um efeito protetor através do uso de antioxidantes é possível de ser conseguido (SONI et al., 1997; GALVANO et al., 2001). Compostos de plantas como as cumarinas, flavonóides e curcuminóides possuem ação inibitória na biotransformação da aflatoxina aos seus derivados epóxido ativos (LEE et al., 2001).

Algumas micotoxinas, como a AFB_1, FB_1, ocratoxina, toxina T-2 e desoxinivalenol, são conhecidas por causar dano à membrana celular através do aumento da peroxidação lipídica (GALVANO et al., 2001) e, por esse motivo, as propriedades de substâncias antioxidantes têm sido investigadas. A curcumina, o selênio, algumas vitaminas (A, C e E) e seus precursores, cumarinas, clorofila e seus derivados, aspartame, piperina, ciproeptadina e sulfetos alílicos possuem propriedades antioxidantes que atuam como sequestradores de radicais ânion superóxido (GALVANO et al., 2001; MAHESHWARI et al., 2006). A curcumina apresenta uma forte atividade antioxidante quando comparada com as vitaminas C e E (TODA et al., 1985)

Gowda et al. (2008) avaliaram que houve aumento na ingestão de alimento, dos níveis de proteína total e colesterol, e melhora significativa no ganho de peso de frangos de corte alimentados com 0,5% de cúrcuma em pó e 1,0 mg/kg de AFB_1, quando comparados com os frangos alimentados somente com AFB_1.

Em estudo conduzido por Yarru et al. (2009), verificou-se que a adição de 0,5% de cúrcuma em pó, contendo 74 mg/kg de curcuminóides totais, à dieta com adição de 1,0 mg/kg de AFB_1, melhorou significativamente os efeitos negativos da AFB_1 no desempenho do crescimento e no peso do fígado de frangos de corte.

Gowda et al. (2009) verificaram que a adição de 74 e 222 mg/kg de curcuminóides totais na dieta contendo 1,0 mg/kg de AFB_1 não teve efeito significativo na ingestão de alimento, porém apresentou aumento significativo no ganho de peso e melhor conversão alimentar quando comparado com frangos de corte alimentados somente com AFB_1. Também verificaram que a suplementação de 222 mg/kg de curcuminóides totais na dieta contendo 1,0

mg/kg de AFB_1 teve melhora significativa nos valores do soro da proteína total, albumina, globulina, gama-glutamil transferase e aspartato aminotransferase, quando comparado com aves alimentadas somente com AFB_1.

3.5 Aspectos do Sistema Imune de Aves

O sistema imune é dividido em duas partes que interagem, a imunidade não específica e imunidades específica. A defesa inespecífica é a primeira barreira contra os agentes infecciosos e refere-se ao processo de fagocitose por macrófagos fixos ou circulantes e por resposta inflamatória. Células *natural killer* também fazem parte da resposta imune não específica, providenciando os mecanismos de vigilância contra cânceres e tumores. Já a defesa específica refere-se a respostas imunes específicas que são induzidas, específicas a antígenos particulares e possuem memória. Através desse tipo de resposta imune que a vacinação dos animais fornece proteção contra subsequente exposição a microrganismos patógenos. A imunidade específica caracteriza-se pela imunidade humoral (anticorpo) e imunidade celular (FAIRBROTHER et al., 2004).

Respostas imunes mediadas por células atuam através do desenvolvimento e proliferação de células T, que regulam a função da imunidade humoral, assim como de respostas imune não específicas. As células T são desenvolvidas no timo e podem aumentar a resposta imune (*helper cells*) ou suprimir a resposta (*supressor cells*) (FAIRBROTHER et al., 2004). Células T e macrófagos comunicam-se através da liberação de citocinas que são proteínas solúveis, como o interferon ou prostaglandinas (TIZARD, 2014; FAIRBROTHER et al., 2004).

A resposta a imunidade humoral é caracterizada pela produção de anticorpos, que são glicoproteínas com receptores específicos para se ligar a patógenos particulares. Os anticorpos são produzidos pelas células B, que se desenvolvem na bursa de Fabricius (em mamíferos, na medula óssea). As células B usam a superfície das imunoglobulinas como receptores de antígenos e se diferenciam em células plasmáticas para secretar anticorpos. Diferentes tipos de anticorpos são produzidos dependendo da função, localização dentro do corpo e o tempo de percurso da infecção. As aves possuem apenas três classes de anticorpos: imunoglobulina (Ig) M (anticorpo primário), IgG (resposta secundária, também chamada de IgY) e IgA (anticorpos nas mucosas). Anticorpos são responsáveis, primariamente, por neutralizar vírus,

revestir bactérias ou outras partículas tornando-as mais fáceis de fagocitar, ligar a células T alvo ou ativar do sistema complementar para aumentar a lise celular (FAIRBROTHER et al., 2004; SHARMA, 1999).

Respostas primárias são geradas por células B simples na primeira vez que elas encontram um antígeno. As células B se tornam ativadas e se diferenciam em anticorpos secretores de células plasmáticas que produzem, principalmente, imunoglobulinas que se ligam a membranas (IgM) específicas para o antígeno. Ao mesmo tempo, um clone expandido de células B de memória é gerado. Quando o mesmo anticorpo é encontrado no futuro, essas células de memória rapidamente se proliferam e diferenciam, produzindo grandes quantidades de anticorpos específicos para o antígeno (IgG). A resposta secundária desenvolve-se mais rapidamente que a primária e gera grandes quantidades de anticorpos que vivem por mais tempo (FAIRBROTHER et al., 2004).

A sensibilidade do sistema imune para a imunossupressão induzida por micotoxinas surge da vulnerabilidade das células continuamente em proliferação e diferenciação que participam nas atividades imuno-mediadas e regulam a complexa rede de comunicação entre os componentes celular e humoral. Imunossupressão induzida por micotoxinas pode ser manifestada como reduzida atividade de linfócitos T ou B, produção de imunoglobulinas e anticorpos suprimidas, atividade de interferon reduzido e função celular de macrófagos-efetores prejudicada (CORRIER, 1991).

As aflatoxinas causam atrofia do timo e bursa de Fabricius em frangos e perus. Aflatoxinas, em aves, possuem efeitos tóxicos nas respostas imunológicas, causando inibição da síntese de proteína e, consequentemente, uma diminuição na produção de anticorpos. Esses efeitos tóxicos estão relacionados a uma diminuição da resposta vacinal e ocorrência de doenças inespecíficas (CORRIER, 1991; GIAMBRONE et al., 1978). Fumonisinas também apresentaram efeito tóxico nas respostas imunológicas, diminuindo a imunidade humoral e causando supressão de linfócitos em frangos de corte alimentados com 200 mg/kg de FB_1 (LI et al., 1999).

3.6 Resíduos de Aflatoxina e Fumonisina

O processo da biotransformação ocorre quando o organismo do animal transforma substâncias estranhas, chamadas de xenobióticos, em novos compostos químicos. Esse processo de modificação do composto inicial ocorre para que os metabólitos produzidos sejam eliminados pelo sistema biológico (GUENGUERICH, 1999).

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 AFM_1 no leite, AFM_1 e AFB_1 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 AFB_1 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 AFB_1 (BATATINHA; SIMAS; GÓRNIAK, 2008).

Após a 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 AFB_1 tenham sido observadas no trato gastrintestinal, sobretudo a moela, no estudo efetuado por Obioha et al. (1986).

As micotoxinas são normalmente metabolizadas no fígado, rins e por microrganismos do trato digestivo. Como consequência, é muito difícil derivar a estrutura química e toxicidade associada dos resíduos de toxina excretados pelos animais ou encontrá-los em seus tecidos pois eles diferem das moléculas precursoras (RATCLIFF, 2002).

Neeff et al. (2013) alimentaram frangos de corte com 2,5 mg AFB_1/kg de ração durante 21 dias e verificaram a presença de aflatoxinas residuais presentes no fígado. As concentrações encontradas para essas aflatoxinas foram: AFM_1 = 0,21 µg/kg, AFB_1 = 8,32 µg/kg, AFB_2 = 0,48 µg/kg, AFL = 2,34 µg/kg, AFG_1 = 3,95 µg/kg, AFG_2 = 0,03 µg/kg. A

adição de 0,5% de aluminosilicato de cálcio e sódio hidratado à dieta contendo AFB_1 foi capaz de reduzir os resíduos de AFB_1, AFB_2, AFL e AFG_1, porém não teve efeito sobre AFM_1 e AFG_2.

A excreção de AFB_1 residual, AFM_1 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 AFB_1 na ração de poedeiras, os ovos apresentaram níveis de 0,2 a 3,3 μg/kg de AFB_1. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Trucksess et al. (1977), cuja taxa de conversão (nível de AFB_1 na ração dividido pelo nível de AFB_1 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 AFB_1 na ração, para AFB_1 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).

A investigação de possíveis biomarcadores para a exposição à fumonisinas requer entendimento de toxicocinética, toxicodinâmica, ação bioquímica e metabolismo potencial da toxina (SHEPHARD et al., 2007). A toxicocinética da FB_1 foi estudada em algumas espécies animais como ratos de laboratório (SHEPHARD et al., 1992), macacos (SHEPHARD et al. 1994, 1995), poedeiras (VUDATHALA et al., 1994) e suínos (PRELUSKY et al., 1994). Em todas as espécies acima citadas, níveis plasmáticos de FB_1 após a administração gástrica foram muito baixas. Com base na ausência de metabólitos mensuráveis, a FB_1 em si tem sido sugerida como um biomarcador e métodos analíticos para sua determinação em uma variedade de amostras fisiológicas vem sendo desenvolvidas (SHEPHARD et al., 2007).

Em geral, a fumonisina é rapidamente absorvida após sua administração intravenosa ou intraperitoneal e é eliminada nas fezes e urina. Seus níveis são indetectáveis 24 horas após sua aplicação em quase todas as espécies e concentrações residuais significantes não foram encontradas no músculo, leite ou ovos. Após administração via oral pouca FB_1 é encontrada no soro dos animais, indicando baixa biodisponibilidade (SMITH, 2012). Estudos sugerem que a eliminação de FB_1 é mais rápida em frangos de corte e patos quando comparados com perus (GUERRE, 2015).

3.7 Métodos Analíticos para Micotoxinas em Alimentos

Um método de análise de micotoxinas deve ser simples, rápido, robusto, preciso e seletivo para permitir a determinação simultânea. Acima de tudo, os baixos níveis de tolerância para rações e alimentos exigem métodos sensíveis. Os resultados analíticos devem se enquadrar ao propósito e o método deve ser escolhido em conformidade. Os métodos analíticos para a determinação de micotoxinas geralmente possuem as seguintes etapas: amostragem, homogeneização, extração, e limpeza que pode incluir a concentração da amostra. A separação final e detecção de compostos de interesse é geralmente alcançada por técnicas cromatográficas seguidas por vários métodos de detecção, ou por métodos imunoquímicos. Enquanto os métodos imunoquímicos contam com anticorpos específicos para cada micotoxina, técnicas cromatográficas podem separar um grande número de analitos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tornou-se o principal método para análise de micotoxinas. Juntamente com uma grande variedade de detectores, praticamente todas as micotoxinas foram separadas e detectadas por CLAE (RAHMANI et al, 2009).

A análise cromatográfica baseia-se na separação de misturas, no qual os componentes a serem separados encontram-se em uma das duas fases: fase móvel e fase estacionária. CLAE é uma técnica quantitativa adequada para a limpeza contínua do extrato da amostra e pode ser combinada a diferentes detectores. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, cheias de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (RAHMANI et al, 2009; GUIMARÃES; COLLINS, 1998).

CLAE com detector de fluorescência é um bom método de análise, pois apresenta colunas com baixa e alta resolução, sensibilidade dos detectores de fluorescência e potencial para automação. Nesse método é necessária uma limpeza eficaz do extrato bruto para purificação dos analitos (RAHMANI et al, 2009). Esse método é muito comum para a detecção e quantificação de aflatoxina, sendo muito específico e um dos mais sensíveis para compostos que fluorescem (GUIMARÃES; COLLINS, 1998). Os detectores mais usados consistem de detectores de fluorescência multi-comprimento de onda. Este tipo de detector usualmente consiste de dois monocromatores. Um dos monocromatores provê o comprimento

de onda selecionado para a excitação e o outro, o comprimento de onda selecionado para emissão (SCOTT, 1999). Algumas micotoxinas, como as fumonisinas, não são fluorescentes, portanto a derivatização destes compostos se faz necessária para que possam ser analisadas (CALDAS; SILVA, 2007).

Métodos de análise mais sensíveis e confiáveis são necessários para garantir a qualidade dos produtos com relação às micotoxinas em geral (SHEPHARD et al., 2011). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM/EM) tornou-se uma ferramenta analítica de grande importância, pois permite a análise de várias micotoxinas simultaneamente (SHEPHARD et al., 2007).

Para o acoplamento da técnica de CLAE com a espectrometria de massa (EM), é necessária a ionização das moléculas de interesse. Basicamente, o primeiro componente do espectrômetro de massa é a unidade de entrada de amostra, que traz a amostra do ambiente laboratorial (1 atm de pressão) para a pressão mais baixa do espectrômetro de massa, que podem ir de poucos milímetros de mercúrio em uma fonte de ionização química até alguns micrômetros de mercúrio nas regiões do analisador de massa e do detector do instrumento. A unidade de entrada de amostras leva até a fonte de íons, onde as moléculas da amostra são transformadas em íons em fase gasosa. Os íons são, então, acelerados por um campo eletromagnético. A seguir, o analisador de massa separa os íons da amostra baseado em sua razão massa/carga (*m/z*). Os íons são, então, contados pelo detector, e o sinal é registrado e processado pelo sistema de dados, em geral um computador pessoal. O produto do sistema de dados é o espectro de massa, um gráfico de número de íons detectados como uma função de sua razão *m/z* (PAVIA et al, 2010). Para se ter quantificação e identificação ao mesmo tempo, um triplo quadrupolo é necessário (SPANJER et al., 2008).

Quando comparada com outros métodos analíticos descritos na literatura, como os métodos para análise de micotoxinas que necessitam de derivatização, a CLAE-EM/EM oferece alta sensibilidade, seletividade e permite rápida análise da presença de micotoxinas, com identificação precisa e confirmação estrutural, conduzido para diferentes estratégias de extração e detecção do analito (LATTANZIO et al., 2011)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micotoxinas

4.1.1 Cultivo do Fungo e Produção de Aflatoxinas

A cepa de *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 foi fornecida pelo "United States Departament of Agriculture" (USDA) na forma de um pellet liofilizado acondicionado em uma ampola de vidro. Para reativação do fungo, o pellet foi mantido por um período de 24 horas em temperatura ambiente em um tubo contendo água peptonada previamente esterilizada. O cultivo dos fungos foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (LMMA/FZEA/USP), com o objetivo de produzir aflatoxinas para serem adicionadas em rações experimentais.

O procedimento utilizado para produção de aflatoxina B_1 foi o preconizado por Shotwell et al., (1966), utilizando-se a referida cepa de *A. parasiticus* cultivado em arroz. Para este fim, grãos de arroz foram inoculados com determinada cepa *Aspergillus* em frascos de 1 litro e colocados num agitador a 250 rpm durante 7 dias em temperatura ambiente. Depois de 1 semana, adiciona-se clorofórmio aos frascos deixando-se em repouso por 1 noite para inativar o fungo. O material de cultura é, então, seco, moído, homogeneizado e armazenado a -20ºC. O detalhamento dos procedimentos realizados encontra-se descrito abaixo.

Material:

a) cepa de *Aspergillus*

b) Autoclave

c) Capela de fluxo laminar

d) Erlenmeyer (1 L) com tampão de algodão

e) Arroz

f) Moinho

g) Baldes com tampas de polietileno de alta densidade

h) Mesa agitadora

i) Placas com meio PDA – Dissolver 39 g ágar batata dextrose (PDA) em 1 L de água e

aqueça até ebulição. Esterilizar em autoclave por 15 minutos. Resfriar e dispensar em placas de Petri (~15 ml por placa). Deixar placas testemunhas para verificar se há contaminação.

Procedimento:

- Ligar o fluxo laminar e a lâmpada UV no mínimo com 30 minutos de antecedência. Semear o fungo em placas de Petri grandes contendo o meio de cultura PDA e deixar crescer por 1 semana no escuro ou até a placa estar coberta de fungos. Deixar o fluxo ligado por mais 30 minutos e limpar toda a superfície com etanol 70 %.

- Pesar 76 g de arroz em cada um dos erlenmeyers e adicionar 30 ml de água destilada. Tampar e deixá-los por, no mínimo, 2 horas em temperatura ambiente para embeber os grãos.

- Verificar o nível de água da autoclave e completar se necessário. Colocar os erlenmeyers, tampar a autoclave e girar o botão até o máximo, deixando o registro da saída de vapor aberto. Quando começar a sair vapor pela saída, fechar o registro e aguardar a temperatura e a pressão subirem. Atingida a temperatura de 121ºC, colocar o botão no sentido "médio" e aguarde 15 minutos (tempo de esterilização). Passado o tempo, desligar o botão e deixar a pressão cair até 0 para abrir a saída de vapor e então abrir a autoclave.

- Soltar o arroz autoclavado que está aderido às paredes do erlenmeyer batendo-os cuidadosamente sob uma superfície macia até soltar os grãos.

- Ligar o fluxo laminar e limpar toda a superfície com etanol 70 % e ligar a lâmpada UV com mínimo 30 minutos de antecedência.

- Colocar os erlenmeyers autoclavados e uma placa de Petri com a cultura de *Aspergillus* no fluxo laminar. Ligar a chama, esterilizar uma espátula e cortar uma pequena porção do material de cultura, transferindo para o erlenmeyer. Tampar o erlenmeyer e agitar. Quando terminar, limpar o fluxo laminar com etanol 70% deixa-lo ligado com a lâmpada UV por 30 minutos.

- Autoclavar a cultura não utilizada e a espátula por 20 minutos para inativar o fungo.

- Após a semeadura, deixar os erlenmeyers em repouso por 24 horas a 27ºC no escuro. Colocá-los na mesa agitadora a 250 rpm, em temperatura ambiente e no escuro por 1 semana. Depois de 1 semana, os grãos tornam-se marrons dourados.

- Para parar o crescimento do fungo, adicionar cerca de 40 mL de clorofórmio, molhando os tampões de algodão e as paredes do erlenmeyer. Agitar cada erlenmeyer

vigorosamente por alguns segundos para distribuir o clorofórmio, deixando uma noite para inativar o fungo. Evaporar o clorofórmio dos frascos em capela de exaustão.

- Colocar o material à base de arroz em estufa de ar forçado a 40ºC por uma noite para secar. Depois de seco, o material de cultura deve ser moído, homogeneizado e examinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação das concentrações de aflatoxinas.

- O material de cultura seco deve ser estocado em recipientes plásticos dentro de freezers a -20 ºC.

4.1.2 Extração e Quantificação da Aflatoxinas no Material de Cultivo

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

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

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

Padrão de Aflatoxina B_1:

Para identificar o pico correspondente ao da AFB_1 é necessário saber o tempo de retenção deste composto. Para isso, uma amostra padrão liofilizada de 1 mg de AFB_1 Sigma-Aldrich® foi dissolvida em 1 mL de tolueno:acetonitrila (9:1). A solução de trabalho utilizada foi obtida através da mistura de 1 µL desta em 1 mL de tolueno:acetonitrila (9:1). Após a quantificação em CLAE, a concentração foi estabelecida em 1,0053 µg/mL (⇔1005,3 ng/mL).

Curva de Calibração de Aflatoxina B_1:

A fim de possibilitar a quantificação de AFB_1, foi necessária a construção de uma curva no sistema CLAE. A curva padrão foi construída a partir da injeção de padrões de AFB_1 em quatro concentrações, sendo elas 10 ng/mL (padrão-1); 40 ng/mL (padrão-2); 160 ng/mL (padrão-3) e 640 ng/mL (padrão-4). Para isso, a fim de se obter inicialmente o padrão-4, foram separados 637 µL da solução de trabalho em um vial, seco e ressuspenso em 1 mL da fase móvel metanol:água (1:1, v/v). O padrão-3 foi obtido através da combinação de 250 µL do padrão-4 e 750 µL de fase móvel. O padrão-2 foi obtido através de 250 µL do padrão-3 e 750 µL de fase móvel e o padrão-1 foi obtido através de 250 µL do padrão-2 e 750 µL de fase móvel. A curva resultante de AFB_1 obteve um r = 0,998 para AFB_1.

4.1.3 Extração e Quantificação da Fumonisinas no Material de Cultivo

A FB_1 estava contida em material de cultivo preparado e enviado pelo Veterinary Medical Diagnostic Laboratory / University of Missouri-Columbia (USA), tendo sido produzida a partir do cultivo de cepa toxigênica de *Fusarium verticillioides* em milho, conforme os procedimentos descritos por Ross et al. (1990). A extração e quantificação de

fumonisinas foram realizadas através de CLAE (SHEPHARD et al., 1998) e estão descritos abaixo.

1. Pesar 25 g de amostra (moída e homogeneizada) em um Erlenmeyer;
2. Adicionar 50 mL de metanol:água (3:1);
3. Extrair em agitador orbital (240 rpm) durante 30 minutos;
4. Filtrar em papel de filtro (Whatman nº 4);
5. Pré-condicionar coluna SAX com 8 mL de metanol seguido por 8 mL de metanol:água (3:1);
6. Passar 2 mL do filtrado na coluna SAX (500 mg/6 mL);
7. Lavar com 8 mL de metanol:água (3:1) e 3 mL de metanol;
8. Eluir com 14 mL de metanol + 0,5% de ácido acético, recolhendo em Becker de 20 mL;
9. Secar o eluato com auxílio de concentrador de amostras;
10. Ressuspender o resíduo em 1 mL de metanol + 0,5% de ácido acético. Transferir para seringa de vidro de 3 mL;
11. Lavar o Becker com 1 mL de metanol + 0,5% de ácido acético. Transferir para seringa de vidro de 3 mL;
12. Filtrar em membrana de PTFE de 0,45 µm (Millex, Millipore®), recolhendo em um vial de 4 mL;
13. Secar o filtrado em concentrador de amostras a 60°C até secagem;
14. Ressuspender o resíduo em 200 µL de acetonitrila:água (1:1);
15. No momento da análise, transferir 100 µL para um frasco contendo 200 µL do reativo OPA[1];
16. Aguardar 2 minutos e injetar ~40 µL da mistura no cromatógrafo líquido.

[1]Preparo do reativo: Diluir 40 mg de o-Ftalaldeído (Sigma) em 1 mL de metanol, adicionar 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol. O reativo é estável durante 1 semana em temperatura ambiente e protegido da luz.

[2]Condições para a corrida cromatográfica em CLAE: Detector de fluorescência (excitação: acima de 335 nm e emissão: acima de 440 nm); coluna Phenomenex® ODS Sil 6x250 mm, diâmentro de poro de 5 µm; pré-coluna ODS 4x10 mm, diâmentro de poro de 5

µm; loop de 20 µL; fase móvel: acetronitrila:água:ácido acético (50:50:1, v/v); fluxo de 1,2 mL/minuto, ajustado para otimizar a separação. Tempo de corrida de 30 minutos, aproximadamente. Fase móvel: A: 1000 mL de água + 20 mL de ácido acético. B: acetonitrila.

4.2 Cúrcuma

A cúrcuma foi adquirida a granel no estabelecimento Kampo de Ervas. A análise dos curcuminóides totais presentes na cúrcuma encontra-se abaixo.

Brevemente, 10 gramas do pó de cúrcuma serão extraídos com 50 mL de hexano. Após a extração, o hexano será descartado e o pó de cúrcuma será seco e finamente moído. Um grama do pó extraído com hexano será extraído novamente com 20 mL de metanol, durante 2 horas. Uma alíquota do extrato será transferida para um tubo de microcentrífuga e centrifugada a 26.450 x g, durante 5 minutos. Um mililitro (1 mL) do sobrenadante será removido e diluído com 4 mL de metanol. A determinação do conteúdo dos curcuminóides totais (curcumina, bisdemetóxicurcumina e demetóxicurcumina) presente na cúrcuma foi determinada através de CLAE (GOWDA et al., 2008).

4.3 Animais e Instalações

Foram adquiridos 200 frangos de corte de um dia de vida, provenientes de matrizes comerciais de frango de corte, linhagem comercial Cobb 500, machos e vacinados no incubatório contra as doenças de Marek e Gumboro. As aves foram distribuídas aleatoriamente em 8 tratamentos com 5 boxes em replicata de 5 aves alojadas por box, recebendo água e ração *ad libitum*, e mantidas durante 42 dias. A intoxicação dos animais foi iniciada a partir do dia 8 de vida. As dietas basais foram formuladas para estar em acordo com os requerimentos nutricionais para frangos de corte, como o recomendado por Rostagno (2011).

As aves foram alojadas em boxes, em um mesmo galpão do Setor de Avicultura do *Campus* Administrativo da Universidade de São Paulo, em Pirassununga/SP. A disposição

dos boxes no galpão foi de acordo com o vento predominante, ou seja, o vento fluía das dietas não contaminadas para as contaminadas.

4.4 Preparo das Rações Experimentais

A AFB_1, FB_1 e Cúrcuma (contendo os curcuminóides totais curcumina, bisdemetóxicurcumina e demetóxicurcumina) foram adicionados à ração basal (em lotes de 100 kg) em proporções adequadas, de maneira a obter, na ração final, os seguintes níveis calculados:

Dieta 1: 0 de AFB_1 + 0 de FB_1 + 0 de Cúrcuma contendo curcuminóides totais (CMT)

Dieta 2: 0 de AFB_1 + 0 de FB_1 + 222 mg/kg de CMT

Dieta 3: 0 de AFB_1 + 20 mg/kg de FB_1 + 0 de CMT

Dieta 4: 0 de AFB_1 + 20 mg/kg de FB_1 + 222 mg/kg de CMT

Dieta 5: 0,5 mg/kg de AFB_1 + 0 de FB_1 + 0 de CMT

Dieta 6: 0,5 mg/kg de AFB_1 + 0 de FB_1 + 222 mg/kg de CMT

Dieta 7: 0,5 mg/kg de AFB_1 + 20 mg/kg de FB_1 + 0 de CMT

Dieta 8: 0,5 mg/kg de AFB_1 + 20 mg/kg de FB_1 + 222 mg/kg de CMT

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

A preparação das rações contaminadas foi realizada em etapas, no decorrer do experimento. Nestas ocasiões, foram comprovados os níveis de AFB_1 e FB_1 nas rações prontas, retirando-se 1 amostra de 1 kg de cada ração preparada contendo toxina. A confirmação da concentração de aflatoxina nas amostras de ração foi efetuada através de CLAE, de acordo com Oliveira et al. (2008). Os níveis de FB_1 foram determinados através de CLAE com detecção por fluorescência, segundo Shephard et al. (1990). Os níveis de curcuminóides totais foram determinados através de CLAE, conforme Gowda et al. (2008).

A composição nutricional das dietas experimentais pode ser vista a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais.

	Ração Inicial[1]	**Ração de Crescimento[2]**	**Ração de Terminação[3]**
Ingrediente	**1-21 dias**	**22 - 35 dias**	**36-42 dias**
Macro Ingredientes			
Farelo de Soja 45%	35,974	31,823	27,627
Milho 7,88%	57,107	60,995	65,747
Óleo de Soja	2,538	3,431	3,241
Sal Comum	0,350	0,350	0,350
Bicarbonato de Sódio	0,204	0,157	0,138
Fosfato Bicálcico	1,620	1,337	1,071
Calcário Calcítico	1,014	0,822	0,768
L-Lisina	0,175	0,145	0,175
DL-Metionina	0,301	0,253	0,236
Treonina	0,068	0,037	0,046
CMT/Caulim	222	222	222
AFB_1/Caulim	0,500	0,500	0,500
FB_1/Caulim	20	20	20
Micro Ingredientes			
Premix Vitamínico-Mineral	0,400	0,400	0,400
Níveis Nutricionais			
Matéria Seca (%)	88,7069	88,6887	88,6200
Proteína Bruta (%)	21,1500	19,5000	18,0000
Gordura (%)	5,2199	6,1816	6,0950
Fibra Bruta (%)	2,8946	2,7418	2,6016
Cinzas (%)	6,1296	5,4159	5,0930
Cálcio (%)	0,8825	0,7320	0,6380
Fósforo Digestível Verdadeiro (%)	0,3560	0,3130	0,2730
Energia Metabolizável Aves (kcal/kg)	2988	3100	3150
Lisina Digestível Aves (%)	1,2080	1,0780	1,0100
Metionina + Cistina Digestível (%)	0,8705	0,7870	0,7370
Treonina Digestível Aves (%)	0,7860	0,7010	0,6560
Triptofano Digestível Aves (%)	0,2372	0,2151	0,1931
Sódio (%)	0,2125	0,2000	0,1950
Cloro (%)	0,2609	0,2611	0,2619
Potássio (%)	0,8239	0,7592	0,6962
Acido Linoléico (%)	2,7450	3,2520	3,2056

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

ração): vitamina A 6000,000 U.I., vitamina D3 2000,000 U.I., vitamina E 10000 U.I., vitamina K3 1600mg, vitamina B1 1400mg, vitamina B2 4000mg, vitamina B6 2000mg, vitamina B12 10000 mcg, niacina 30000mg, ácido pantotênico 11000mg, ácido fólico 0,600mg, cobre 0,100g, ferro 0,050 g, manganês 0,070g, zinco 0,050g, iodo 1200mg, selênio 0,200mg, hidróxido de sódio 30000mg.[3]Composição do Premix Vitamínico-Mineral da ração de terminação (níveis/kg de ração): vitamina A 5000,000 U.I., vitamina D3 1000,000 U.I., vitamina E 8000 U.I., vitamina K3 1600mg, vitamina B2 2000mg, vitamina B12 5000 mcg, niacina 20000mg, ácido pantotênico 9000mg, cobre 8000mg, ferro 0,050 g, manganês 0,070g, zinco 0,050 g, iodo 1200mg, selênio 0,200mg.

4.5 Avaliação dos Índices de Produtividade

O ganho de peso foi avaliado semanalmente, assim como o consumo de ração e o cálculo da conversão alimentar. Essas avaliações semanais foram feitas para chegar a avaliação final, de 1 a 42 dias.

Foi determinada, também, a viabilidade dos animais, expressa em porcentagem, 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.

4.6 Bioquímica Sérica e Fósforo

Ao final do experimento, foi coletada amostra de sangue por punção da veia ulnar de 10 frangos (5 replicatas de 2 aves) de cada tratamento, que foram usadas para análises de:

- Proteínas séricas: albumina (ALB), globulina (GBL) e proteína total (PT);
- Enzimas séricas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil transferase (GGT), ácido úrico e lactato desidrogenase (LDH).

As concentrações de globulinas foram obtidas por meio das diferenças entre as concentrações de proteína total e de albumina ([GBL] = [PT] – [ALB]). As metodologias utilizadas para as análises foram seguidas de acordo com as indicações do fabricante dos *kits* comerciais utilizados (Bioclin®, Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil).

Para realização da dosagem da concentração de fósforo inorgânico sérico o método UV de ponto final – Fósforo UV K068® foi utilizado (Bioclin®, Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil).

4.7 Hemograma

Aos 21 e aos 42 dias de idade, 5 aves de cada tratamento tiveram sangue coletado com anticoagulante (EDTA – etileno diaminotetraacético de sódio ou potássio) por meio da punção da veia da asa para realização de hemograma, o qual constou de:

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

- Contagem de Eritrócitos ($x10^6/mm^3$ de sangue): com auxílio de câmara de Neubauer e solução para coloração de Natt-Herrik, de acordo com Natt e Herrik (1952);

- Dosagem de Hemoglobina (g/dL): com auxílio de aparelho espectrofotômetro pela Metodologia da Cianometahemoglobina (Hemoglobina K023® - Bioclin® - Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil);

- Contagem Total de Leucócitos ($x10^3/mm^3$ de sangue): com auxílio de câmara de Neubauer e diluente para contagem de Natt-Herrik, de acordo com Natt e Herrik (1952);

- Contagem Diferencial de Leucócitos (%): linfócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos, com auxílio da Técnica de Coloração de Rosenfeld (1947), de acordo com Noriega (2000);

- VCM (Volume Corpuscular Médio) (fentolitros): os valores são obtidos de acordo com a seguinte equação: VCM = (Hematócrito em % x 10)/ Número de Eritrócitos/mm^3;

- HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) (picogramas): os valores são determinados com auxílio da equação: HCM = ([Concentração de hemoglobina em g/dL] / [Número de Eritrócitos/mm^3]) x 10;

- CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) (%): são estabelecidas por meio do uso da equação: CHCM = (Concentração de hemoglobina em g/dL / Hematócrito em %) x 100.

4.8 Vacinação das Aves e Análise Imunológica

As aves foram vacinadas contra a doença de NewCastle aos 14 dias de idade pela via ocular com vacina comercial (liofilizada) com vírus vivo, cepa La Sota (Biovet). As doses vacinais foram produzidas de acordo com as recomendações do fabricante. As vacinas serão diluídas em diluente na proporção de 30mL/1000 doses vacinais/1000 pintos, o que corresponde a 0,03mL de dose vacinal ocular.

Aos 14 (antes da vacinação), 27, 34 e 41 dias de idade das aves, foram colhidas amostras de sangue (cerca de 5 mL) de 5 aves de cada tratamento através de punção ulnar que, após a separação do soro através de centrifugação, foram submetidas ao teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para avaliar títulos médios de anticorpos contra a doença de NewCastle.

A análise de ELISA para doença de Newcastle encontra-se abaixo, sendo executado de acordo com os procedimentos descritos no kit da IDEXX®.

Preparo das amostras

- As amostras de soro a serem testadas para as doenças de NDV foram diluídas na proporção de 1:500.
- Em microtubos específicos foram dispensados 500µl de diluente.
- Adicionou-se a cada tubo 1µl de amostra de soro a ser testada, seguindo a ordem descrita na template.
- As amostras foram testadas em duplicata.
- Utilizou-se a placa revestida com o antígeno específico para o vírus da Doença de Newcastle.
- Distribuir 100µl de controle negativo não diluído nas cavidades A1 e B1.
- Distribuir 100µl de controle positivo não diluído nas cavidades C1 e D1.
- Distribuir 100µl de amostra diluída nas cavidades subsequentes.
- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar cada cavidade com água destilada ou deionizada 3-5 vezes.
- Distribuir 100µl de conjugado em cada uma das cavidades.

- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar cada cavidade com água destilada ou deionizada 3-5 vezes
- Distribuir 100µl de solução de substrato TMB em cada cavidade.
- Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Distribuir 100µl de solução de interrupção (stop solution) em cada cavidade para parar a reação.
- Após colocar a solução ("stop") deve ser realizada a leitura da placa no máximo em 1 hora.
- Realizar a leitura da microplaca em espectofotômetro, com valores de absorbância a 650nm, A (650).

Critérios de Aceitação e Interpretação dos Resultados para NDV (Idexx Laboratories)

Os critérios de aceitação para os ensaios de NDV:

- Diferença entre a média do controle positivo e a média do controle negativo (PCx-NCx) deve ser maior ou igual a 0,075 e a absorbância (A) média do controle negativo deve ser menor ou igual a 0,150.
- Amostras de soro com coeficientes S/P menores ou iguais a 0,2 devem ser consideradas negativas e coeficientes maiores que este valor (com títulos maiores do que 396) são considerados positivos (indicando vacinação ou exposição ao agente investigado).

- Os resultados são obtidos através da utilização das seguintes fórmulas:

$$\text{Média do controle negativo (NCx)}: \frac{\text{orifício A1(650nm) + orifício A2 (650nm)}}{2}$$

$$\text{Média do controle positivo (PCx)}: \frac{\text{orifício A3(650nm) + orifício A4 (650nm)}}{2}$$

$$\text{Coeficiente S/P}: \frac{\text{média da amostra – NCX}}{\text{PCx- NCx}}$$

Cálculo do título: Log10Título= 1,09x (Log10 S/P) + 3,36

4.9 Análises Histopatológicas e Biometria de Órgãos

Aos 42 dias, as mesmas 10 aves foram sacrificadas por deslocamento cervical e submetidas à necropsia para observação de lesões macroscópicas em vísceras. Em seguida, foram removidos e pesados individualmente os seguintes órgãos: fígado, rins, bursa de Fabricius e coração, que foram utilizados para a biometria, determinando a porcentagem de peso correspondente ao peso do animal vivo. Fragmentos representativos destes órgãos de 5 aves foram recolhidos em frascos contendo formalina a 10% e posteriormente encaminhados para exame histopatológico (LUNA, 1968 com escore semi-quantitativo adaptado), realizada no Laboratório de Patologia Hepática da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

4.10 Análises de Resíduos de Aflatoxinas

As análises de resíduo de aflatoxinas, realizadas no fígado e músculo peitoral de 5 aves necropsiadas de cada tratamento, foram feitas de acordo com a metodologia proposta por Neeff et al., 2013, com modificações. O fluxograma de análise encontra-se abaixo.

Os procedimentos de análise de resíduos de aflatoxinas, em fígado e músculo, com descrição completa encontram-se a seguir.

Primeira Etapa da Dupla Extração

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

↓

Adicionar 4 mL de solução de metanol 80% (v/v) grau CLAE

↓

Adicionar os padrões internos (10 µL, [$^{13}C_{17}$]-AFB_1 a 25 ng/mL e [$^{13}C_{17}$]-AFM_1 a 100 ng/mL)

↓

Agitar a mistura em vórtex durante 5 minutos

↓

Submeter a mistura a aparelho de ultrassom durante 5 minutos

↓

Deixar extraindo *overnight* (12 horas, aproximadamente)

↓

Agitar a mistura em vórtex durante 5 minutos

↓

Submeter a mistura a aparelho de ultrassom durante 5 minutos

↓

Centrifugar a mistura a 5000 rpm durante 5 minutos

↓

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

↓

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

↓

Passar o volume total da mistura por coluna de imunoafinidade

AflaTest® wb (Vicam®)

Segunda Etapa da Dupla Extração

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

↓

Agitar a mistura em vórtex durante 5 minutos

↓

Submeter a mistura à aparelho de ultrassom durante 5 minutos

↓

Centrifugar a mistura a 5000 rpm durante 5 minutos

↓

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

↓

Submeter a nova mistura a centrifugação a alta velocidade para remoção da gordura, se necessário

↓

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

↓

Lavar a coluna com 10 mL de solução tampão

↓

Lavar a coluna com 1 mL de água ultrapura (Mili Q)

↓

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

↓

Aguardar 5 minutos

↓

Recolher o eluato em um *vial* de 4 mL (âmbar)

↓

Submeter à secagem em condensador de amostras

↓

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

↓

Filtrar a solução em filtro de membrana PTFE (Politetrafluoretileno) (diâmetro do filtro de 13mm, poro 0,22 µm)

↓

Transferir a ressuspensão para um *vial* de 2 mL com *insert* e submeter a corrida cromatográfica

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

As análises foram conduzidas em um sistema de UPLC Acquity I-Class (Waters Corp®.; Milford, MA, EUA) com sistema de bomba binária e injetor automático acoplado a um espectrômetro de massas Xevo TQ-S com fonte de ionização por eletrospray (*ESY*) equipado com Z-*spray* ortogonal (Waters Corp®, Milford, MA, EUA). O gás de nebulização e dessolvatação utilizado foi o nitrogênio, o qual tinha temperaturas de 150ºC e 500ºC, respectivamente, para cada função. Os fluxos dos gases usados para o cone e a dessolvatação foram de 150 e 500 l/h, respectivamente. A voltagem do capilar foi de 0,75 kV. A separação cromatográfica foi feita com auxílio de coluna Acquity® UPLC BEH C18 com 2,1 mm x 50 mm (diâmetro x comprimento) para partículas de até 1,7µm, a qual foi associada a uma pré-

coluna Van Guard® 3/Pk, ambas da Waters® (Waters Corp®., Milford, MA, EUA). A obtenção dos dados foi feita com uso do Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) com ionização positiva por *electrospray* (ES^+). Foram acompanhados dois canais afim de se determinar o composto correto e sua confirmação (íon pai e íon filho). Os dados referentes ao íon precursor (pai), íon produto (filho), a voltagem do cone, a energia de colisão e o tempo de retenção para cada composto encontram-se na Tabela 2. A aquisição de dados e seu processamento foram feitos com auxílio do software Masslynx versão 4.1 (Waters Corp.® Milford, MA, EUA, 2005). A fase móvel da corrida cromatográfica foi um gradiente entre uma solução de água:ácido fórmico 0,1% (Solvente A) e outra de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (Solvente B). O gradiente está descrito na Tabela 3. O fluxo foi de 0,6mL/min. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 2,5 minutos, porém apenas o intervalo compreendido entre 1 e 2 minutos teve íons analisados pelo espectrômetro de massas, sendo os fluxos anterior e posterior a este tempo destinados a descarte. A temperatura da coluna foi de 40ºC. Alíquotas de 10 µL de amostra foram usadas para injeção.

As amostras foram quantificadas através de padronização interna, dessa forma as perdas na extração dos resíduos de aflatoxina foram corrigidas pelo padrão interno.

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

A curva de calibração foi feita utilizando as seguintes concentrações de aflatoxinas como pontos: 2 ng/mL, 1 ng/mL, 0,75 ng/mL, 0,5 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,05 ng/mL e 0,01 ng/mL, com Coeficiente de Correlação igual a 0,99.

Tabela 2. Relação massa/carga (m/z) dos íons precursores e produtos, voltagem do cone, energia de colisão e tempo de retenção para os resíduos de aflatoxina.

Composto	**Íon Precursor (*m/z*)**	**Íon Produto (*m/z*)**	**Voltagem do Cone (V)**	**Energia de Colisão (eV)**	**Tempo de Retenção (min.)**
Aflatoxina B_1	312,71	284,90 (Q)*	94,0	22,0	1,22
Aflatoxina B_1	312,71	241,07 (C)**	94,0	36,0	
Aflatoxina B_2	314,79	287,04 (Q)	2,0	26,0	1,17
Aflatoxina B_2	314,79	259,02 (C)	2,0	28,0	
Aflatoxina G_1	328,90	243,02 (Q)	2,0	26,0	1,16
Aflatoxina G_1	328,90	199,85 (C)	2,0	38,0	
Aflatoxina G_2	330,91	245,03 (Q)	56,0	28,0	1,12
Aflatoxina G_2	330,91	188,98 (C)	56,0	40,0	
Aflatoxina M_1	328,90	229,04 (Q)	52,0	38,0	1,12
Aflatoxina M_1	328,90	273,06 (C)	52,0	24,0	
Aflatoxicol	296,91	114,99 (Q)	40,0	58,0	1,27
Aflatoxicol	296,91	268,65 (C)	40,0	20,0	
Aflatoxina $B_{2\alpha}$	331,30	285,03 (Q)	6,0	24,0	1,13
Aflatoxina $B_{2\alpha}$	331,30	241,23 (C)	6,0	38,0	
Aflatoxina P_1	299,27	271,01 (Q)	56,0	22,0	1,14
Aflatoxina P_1	299,27	215,12 (C)	56,0	30,0	
Aflatoxina Q_1	329,28	177,22 (Q)	60,0	24,0	1,12
Aflatoxina Q_1	329,28	206,08 (C)	60,0	34,0	

*Canal de Quantificação; **Canal de Confirmação.

Tabela 3. Gradiente entre a solução de água:ácido fórmico 0,1% (Solvente A) e a de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (Solvente B) ao longo da corrida cromatográfica de 2,5 minutos para determinação de resíduos hepáticos de aflatoxinas.

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

4.11 Análises de Resíduos de Fumonisinas

As análises de resíduo de fumonisina, realizadas no fígado (5 aves por tratamento) e músculo peitoral (3 aves por tratamento) de aves com 42 dias de vida, foram feitas de acordo com a metodologia proposta por Meyer et al., 2003, com modificações. Os procedimentos de análise encontram-se abaixo.

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

↓

Adicionar 10 mL de solução de metanol (grau CLAE):água (Mili Q) (3:1)

↓

Adicionar o padrão interno de $[^{13}C_{34}]$-FB_1 (10µL, com concentração de 50 ng/mL)

↓

Agitar a mistura em vórtex durante 5 minutos

↓

Submeter a mistura a aparelho de ultrassom durante 5 minutos

↓

Deixar extraindo *overnight* (12 horas, aproximadamente)

↓

Agitar a mistura em vórtex durante 5 minutos

↓

Submeter a mistura a aparelho de ultrassom durante 5 minutos

↓

Centrifugar a mistura a 5000 rpm durante 5 minutos

↓

Transferir 5 mL do sobrenadante para um Falcon de 50 mL e adicionar 25 mL de solução tampão (PBS), homogeneizando (ou transferir 8 mL do sobrenadante e add 40 mL PBS)

↓

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

↓

Passar o volume total da mistura por coluna de imunoafinidade

FumoniTest® wb (Vicam®)

↓

Lavar a coluna com 10 mL de solução tampão (PBS)

↓

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

↓

Aguardar 5 minutos

↓

Recolher o eluato em um *vial* de 4 mL (âmbar)

↓

Submeter à secagem em condensador de amostras

↓

Ressuspender em 500 µL de solução de Água Mili Q: Acetonitrila (9:1)

↓

Filtrar a solução em filtro de membrana PTFE (Politetrafluoretileno) (diâmetro do filtro de 13mm, poro 0,22 µm)

↓

Transferir a ressuspensão para um *vial* de 1 mL com *insert* e submeter a corrida cromatográfica

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

As condições cromatográficas utilizadas para a análise de fumonisina, foram as mesmas usadas para a aflatoxina (ver item 4.10). O gradiente está descrito na Tabela 3. Alíquotas de 3 µL de amostra foram usadas para a injeção.

As amostras foram quantificadas através de padronização interna, dessa forma as perdas na extração dos resíduos de fumonisina foram corrigidas pelo padrão interno.

Tabela 4. Relação massa/carga (m/z) dos íons precursores e produtos, voltagem do cone, energia de colisão e tempo de retenção para os resíduos de fumonisina.

Composto	Íon Precursor (*m/z*)	Íon Produto (*m/z*)	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão (eV)	Tempo de Retenção (min.)
FB_1	722,5	334,0 (Q)*	50	40	1,19
FB_1	722,5	352,1 (C)**	50	30	
$[^{13}C_{34}]$-FB_1	756,6	374,4	50	30	1,19
FB_2	706,5	336,2	50	35	1,37

*Canal de Quantificação; **Canal de Confirmação.

Os padrões de fumonisina (Sigma-Aldrich®) encontram-se dissolvidos em metanol, etanol ou acetonitrila puros (grau CLAE), conforme o tipo. Após a calibração, foram transferidos volumes apropriados de cada padrão para um *vial*, evaporados até a secura com auxílio de concentrador de amostras e ressuspendidos em volumes convenientes de solução de água: metanol grau CLAE (v:v; 50:50), de maneira a obter soluções de trabalho contendo aproximadamente 1,0 µg/mL. Após, foi confeccionado um mix das 2 fumonisinas na concentração 1 µg/mL de cada toxina. Estas soluções foram utilizadas no preparo dos padrões da curva de calibração.

A curva de calibração, para o fígado, foi feita utilizando as seguintes concentrações de fumonisinas como pontos: 300 ng/mL, 200 ng/mL, 130 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 20

ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL e 1 ng/mL, com Coeficiente de Correlação igual a 0,99. A curva de calibração, para o músculo, foi feita utilizando as seguintes concentrações de fumonisinas como pontos: 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2 ng/mL, 1 ng/mL, 0,75 ng/mL, 0,5 ng/mL, 0,1 ng/mL e 0,05 ng/mL, com Coeficiente de Correlação igual a 0,99.

4.12 Análise dos Resultados

O experimento foi inteiramente casualizado com 5 boxes em replicata, cada box com 5 aves, atribuídos a cada um dos 8 tratamentos, com um delineamento experimental em esquema fatorial 2 x 2 x 2. Os resultados do experimento foram submetidos à análise de variância, de acordo com os procedimentos estabelecidos no procedimento MIXED do SAS® (SAS Institute, 1992) com a opção PDIFF usada para separar a média dos mínimos quadrados, e as diferenças foram avaliadas usando o teste de Fisher, protegido ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises de Aflatoxinas e Fumonisinas nos Grãos Utilizados nas Dietas Experimentais e dos Curcuminóides Totais presentes na Cúrcuma

As concentrações de aflatoxina e fumonisina presentes no milho e soja utilizados como matéria prima para o preparo da ração experimental encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Análises micotoxicológicas dos farelos de milho e soja utilizados na ração.

Amostra	**AFB_1**	**AFB_2**	**AFG_1**	**AFG_2**	**FB_1**	**FB_2**
	(µg/kg)	**(µg/kg)**	**(µg/kg)**	**(µg/kg)**	**(mg/kg)**	**(mg/kg)**
Milho	1,403	0,098	0,668	0,083	4,34	2,991
Soja	0,190	0,010	0,030	0,0	0,015	0,003

As concentrações das aflatoxinas (AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2) analisadas no milho foram abaixo de 1,41 µg/kg, sendo a AFB_1 a de maior concentração entre elas (1,403 µg/kg). A Resolução RDC Nº 7 de 2011 da ANVISA, estabelece, para milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolas de milho o limite máximo tolerado de 20 µg/kg de aflatoxinas (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2). Para a soja, o limite máximo tolerado é de 5 µg/kg, sendo a maior concentração de 0,190 µg/kg, encontrada na AFB_1 (BRASIL, 2011).

Para fumonisinas (FB_1 e FB_2), o limite máximo tolerado, segundo a Resolução RDC Nº 7 de 2011 da ANVISA, é de 5000 µg/kg (ou 5 mg/kg) para milho em grão para posterior processamento (BRASIL, 2011).

A média dos curcuminóides totais (bisdemetóxicurcumina, demetóxicurcumina e curcumina) presentes na cúrcuma utilizada no experimento foi de 259,7 mg/g.

5.2 Análise de Aflatoxina, Fumonisina e Curcuminóides Totais nas Rações

As concentrações das aflatoxinas, fumonisinas e curcuminóides totais nas rações experimentais, podem ser encontradas na tabela 6.

Tabela 6. Quantificação das aflatoxinas, fumonisinas e curcuminóides totais presentes nas dietas experimentais.

	INICIAL	CRESCIMENTO	TERMINAÇÃO
AFB_1 (µg/kg)	422,58 ± 33,35	259,64 ± 40,70	364,86 ± 17,76
AFG_1 (µg/kg)	69,50 ± 10,25	53,86 ± 11,29	64,92 ± 4,51
AFB_2 (µg/kg)	2,15 ± 1,43	4,32 ± 2,03	0,99 ± 0,40
AFG_2 (µg/kg)	1,68 ± 1,00	86,59 ± 6,22	0,91 ± 0,17
FB_1 (mg/kg)	11,59 ± 0,83	13,36 ± 0,74	16,18 ± 0,88
FB_2 (mg/kg)	6,19 ± 0,35	6,90 ± 0,47	7,98 ± 0,51
CMT (mg/kg)	218,24 ± 15,22	210,71 ± 8,74	201,76 ± 4,34

AFB_1 = aflatoxina B_1; FB_1 = Fumonisina B_1; CMT = Curcuminóides Totais.

Como pode-se observar na tabela 6, as concentrações de AFB_1 ficaram próximas de 500 µg/kg nas dietas experimentais da fase inicial e de terminação. As concentrações da fase de crescimento apresentaram valores abaixo do esperado, porém pôde-se observar efeitos nos frangos alimentados com aflatoxinas.

A concentração de fumonisina B_1 encontrada na ração de terminação, tiveram valores próximos do desejado (20 mg/kg), enquanto que as rações inicial e de crescimento apresentaram valores um pouco abaixo do desejado. Porém, a soma das fumonisinas B_1 e B_2 apresentaram valores próximos ou acima do esperado.

Os resultados acima mostram que a concentração dos curcuminóides totais presentes na cúrcuma em pó adicionada ficaram próximos dos 222 mg/kg propostos, exceto na ração de terminação (AFB_1+FB_1+CMT) que ficou com um valor um pouco abaixo do esperado.

5.3 Índices de Produtividade

O resultado de desempenho dos frangos encontra-se a seguir (Tabela 7).

Tabela 7. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma no desempenho de frangos alimentados com dietas experimentais.

Dietas Experimentais	Variáveis				
	Mortalidade (%)	**Consumo de Ração (kg)**	**Peso Médio (kg)**	**Ganho de Peso (kg)**	**Conversão Alimentar (kg/kg)**
Controle	0	4,68	2,96	2,73	1,72
CMT	0	4,62	2,93	2,69	1,71
FB_1	0	4,62	2,90	2,66	1,74
FB_1 + CMT	4	4,57	2,91	2,57	1,79
AFB_1	36	3,25	2,22	1,59	2,06
AFB_1 + CMT	32	3,16	2,01	1,60	2,01
AFB_1 + FB_1	44	3,32	2,07	1,55	2,17
AFB_1 + FB_1 + CMT	32	3,25	2,04	1,63	2,01
EPM	6,8557	0,1167	0,0661	0,0759	0,1101
P-valor[2]					
CMT	0,5373	0,3937	0,1783	0,8971	0,5764
FB_1	0,5373	0,8618	0,2706	0,3593	0,5096
FB_1 + CMT	0,8366	0,9378	0,2448	0,9411	0,8586
AFB_1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0003
AFB_1 + CMT	0,3068	0,8712	0,2532	0,3407	0,4108
AFB_1 + FB_1	0,8366	0,4272	0,8569	0,4087	0,9492
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,5373	0,9760	0,4536	0,5680	0,6203

[1]Os dados representam são médias de 5 boxes em replicata, cada box com 5 frangos.
[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
[a-c] Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05).
AFB_1 = aflatoxina B_1, FB_1 = Fumonisina B_1, CMT = Curcuminóides Totais, EPM = Erro Padrão Médio.

Não houve interação de todos os fatores (AFB_1, FB_1 e CMT) para os dados de desempenho.

Aflatoxina (AFB_1) obteve p-valor significativo para mortalidade (<0,0001), consumo de ração (<0,0001), peso médio (<0,0001), ganho de peso (<0,0001) e conversão alimentar (0,0003). Para a mortalidade, a média dos tratamentos com AFB_1 (36%) foram maiores que os sem AFB_1 (1). Para o consumo de ração, a média dos tratamentos com AFB_1 (3,25 kg) foram menores que os sem AFB_1 (4,62). Para o peso médio, a média dos tratamentos com AFB_1 (2,09 kg) foram menores que os sem AFB_1 (2,92 kg). Para o ganho de peso, a média dos tratamentos com AFB_1 (1,59 kg) foram menores que os sem AFB_1 (2,66 kg). Para a conversão alimentar, a média dos tratamentos com AFB_1 (2,06 kg) foram maiores que os sem AFB_1 (1,74 kg).

Resultados similares para o consumo de ração e ganho de peso foram descritos anteriormente em frangos de corte que receberam 1 mg/kg de AFB_1 na ração (YARRU et al., 2009; GOWDA et al., 2009). Ledoux et al. (2003) observaram que animais alimentados com 100 ou 200 mg/kg de FB_1 não apresentaram diferença estatística com os frangos de corte do tratamento controle.

Yarru et al. (2009) verificaram aumento significativo no ganho de peso de frangos alimentados com AFB_1 (1 mg/kg) e 0,5% de cúrcuma em pó, contendo 74 mg/kg de curcuminóides totais.

Gowda et al. (2009) observaram que frangos alimentados com AFB_1 (1 mg/kg) e curcuminóides totais (74 e 222 mg/kg) não apresentaram efeito no consumo de ração, porém verificaram aumento significativo no ganho de peso e melhora na conversão alimentar, quando comparados com aves alimentadas somente com AFB_1.

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

Os efeitos tóxicos produzidos pela AFB_1 estavam de acordo com estudos anteriores (HUFF et al., 1986; GOWDA et al., 2009; YARRU et al., 2009; SHI et al., 2006; DENLI et al., 2009), reduzindo o consumo de ração e o ganho de peso corporal, e aumentando a conversão alimentar e a mortalidade.

Tessari et al. (2006a) realizaram experimento com 9 tratamentos (0, 50 e 200 µg/kg de AFB_1 e/ou 0, 50 e 200 mg/kg de FB_1), em frangos de corte, durante o período de 8 a 41 dias. Todos os tratamentos com micotoxina tiveram menor ganho de peso quando comparado com o tratamento controle.

Broomhead et al. (2002) relataram que o consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar de frangos não foi afetada pela fumonisina B_1 (25 ou 50 mg/kg). O mesmo ocorreu no presente experimento (20 mg/kg de FB_1), não havendo nenhuma diferença significativa entre os tratamentos com e sem fumonisina para as variáveis de desempenho analisadas.

Outros autores verificaram efeitos deletérios da fumonisina quando usaram concentrações mais altas. Ledoux et al. (1992b) observaram que níveis de 100 a 400 mg/kg foram prejudiciais no desempenho de frangos de 21 dias. Rauber et al. (2013) verificaram diminuição significativa sobre o ganho de peso e consumo de ração em frangos de corte alimentados com fumonisina (100 e 200 mg/kg).

Tardieu et al. (2009), realizaram um estudo em patos machos, com alimentação forçada de diferentes concentrações de fumonisinas (0, 5, 10 e 20 mg/kg de FB_1+FB_2) durante 12 semanas. Mortalidade e sinais de toxicidade foram observados apenas na dieta contendo 20 mg/kg de fumonisinas, diferentemente do presente trabalho.

Frangos de corte possuem tolerância relativamente grande à fumonisina, sendo que níveis relativamente altos dessa micotoxina são necessários para que sejam observados efeitos negativos (CHI; BROOMHEAD, 2008).

5.4 Bioquímica Sérica e Fósforo

Os resultados da bioquímica sérica podem ser encontrados na tabela 8.

Tabela 8. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na bioquímica sérica, níveis de enzimas e fósforo de frangos alimentados com dietas experimentais.

Dietas Experimentais	**Variáveis**								
	AST (U/L)	**ALT (U/L)**	**GGT (U/L)**	**LDH (U/L)**	**PT (g/dL)**	**ALB (g/dL)**	**GLOB (g/dL)**	**AU (mg/dL)**	**P (mg/dL)**
Controle	673,00[ab]	10,50	11,00	901,10[ab]	5,12	2,64	2,48	8,74	11,00
CMT	831,00[a]	11,40	9,60	1053,50[ab]	5,25	2,69	2,56	8,55	9,94
FB_1	682,00[ab]	14,00	11,60	1201,40[a]	5,07	2,52	2,55	7,54	10,74
FB_1 + CMT	531,00[b]	15,90	10,40	1205,80[a]	4,33	2,14	2,19	7,29	9,80
AFB_1	266,00[c]	8,50	13,10	788,10[bc]	3,07	1,63	1,44	7,64	10,00
AFB_1 + CMT	253,20[c]	8,80	10,60	589,70[c]	2,98	1,67	1,31	7,22	9,03
AFB_1 + FB_1	189,00[c]	5,90	11,00	541,70[c]	2,83	1,32	1,51	6,30	9,80
AFB_1 + FB_1 + CMT	292,80[c]	5,00	11,50	816,30[bc]	3,02	1,29	1,73	6,58	9,23
EPM	65,2829	1,6852	1,5592	111,04	0,2668	0,0891	0,2003	0,5785	0,4866
P-valor[2]									
CMT	0,5732	0,6480	0,3059	0,4475	0,4806	0,1729	0,7263	0,7256	0,0157
FB_1	0,0664	0,7396	0,9642	0,1635	0,1136	<0,0001	0,7634	0,0114	0,7735
FB_1 + CMT	0,2726	0,9668	0,4741	0,2917	0,4257	0,0374	0,8775	0,6951	0,7084
AFB_1	<0,0001	<0,0001	0,4212	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0121	0,0192
AFB_1 + CMT	0,6290	0,4816	0,8928	0,7918	0,3360	0,1485	0,5162	0,8596	0,7407
AFB_1 + FB_1	0,1514	0,0053	0,5602	0,1295	0,3025	0,9310	0,1767	0,7714	0,7735
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,0196	0,6480	0,5307	0,0495	0,1283	0,1269	0,1789	0,6459	0,8403

[1]Os dados representam são médias de 5 boxes em replicata, cada box com 5 frangos.
[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
[a-c] Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05).
AFB_1 = aflatoxina B_1, FB_1 = Fumonisina B_1, CMT = Curcuminóides Totais, AST = aspartato aminotransferase, ALT = alanina aminotransferase, GGT = gama-glutamiltransferase, LDH = lactato-desidrogenase, PT = proteína total, ALB = albumina, GLOB = globulinas, AU = ácido úrico, P = fósforo.

A AST e LDH foram as únicas variáveis significativas para a interação de todos os fatores (AFB_1, FB_1 e CMT), com p-valores de 0,0196 e 0,0495, respectivamente.

Curcuminóides totais (CMT) obteve um p-valor (0,0157) significativo para o fósforo. A média para os tratamentos com a adição de CMT foi de 9,50 e para os tratamentos sem CMT de 10,39.

Fumonisina (FB_1) obteve um p-valor (<0,0001) significativo para a albumina (ALB), com média para os tratamentos com FB_1 de 1,82 e sem FB_1 de 2,16.

Fumonisina adicionada de curcuminóides totais (FB_1+CMT) obteve um p-valor (0,0374) significativo para albumina. As médias dos tratamentos sem FB_1, com ou sem CMT (2,14 e 2,18, respectivamente), foram maiores que as médias dos tratamentos com FB_1, com ou sem CMT (1,92 e 1,72, respectivamente).

Aflatoxina (AFB_1) obteve p-valor significativo para AST (<0,0001), ALT (<0,0001), LDH (<0,0001), PT (<0,0001), ALB (<0,0001), GLOB (<0,0001), AU (0,0121) e P (0,0192).

Aflatoxina adicionada de curcuminóides totais (AFB_1+CMT) obteve um p-valor (0,0053) significativo para alanina aminotransferase (ALT). As médias dos tratamentos sem AFB_1, com ou sem CMT (13,65 e 12,25, respectivamente), foram maiores que as médias dos tratamentos com AFB_1, com ou sem CMT (6,90 e 7,20, respectivamente).

No experimento de Gowda et al. (2008), frangos machos de 3 semanas foram alimentados com dietas contendo AFB_1 (1,0 mg/kg) e/ou cúrcuma em pó (contendo 1,48% de curcuminóides totais), e verificou-se que a adição da cúrcuma em pó na dieta contendo AFB_1 aumentou os níveis da proteína total e do colesterol quando comparado com frangos alimentados somente com AFB_1. Os frangos alimentados somente com AFB_1 tiveram redução significativa dos níveis de proteína total, albumina, colesterol e cálcio, enquanto que o ácido úrico, GGT e fósforo não houve diferença significativa para as diferentes dietas testadas.

Gowda et al. (2009) observaram que frangos alimentados com dietas contendo 1 mg/kg de aflatoxina tiveram os níveis de proteína total, albumina, globulina e cálcio significativamente diminuídos e aumento das atividades de GGT, AST e ácido úrico. A adição de 222 mg/kg de curcuminóides totais à dieta com aflatoxina melhorou significativamente os valores da proteína total, alumina, globulina, GGT e AST, comparado com frangos

alimentados somente com AFB_1 ou AFB_1 adicionada de 74 ou 444 mg/kg de curcuminóides totais

Em experimento com frangos de corte alimentados com diferentes concentrações de cúrcuma em pó (0,25, 0,5 e 0,75%), do nascimento aos 49 dias, os autores concluíram que a cúrcuma pode ter efeito positivo nas enzimas hepáticas, pela redução da atividade da ALT e fosfatase alcalina que, diretamente ou indiretamente, refletem um fígado mais saudável em aves (EMADI; KERMANSHAHI, 2007).

Ledoux et al. (1992) verificaram que a medida que a concentração de fumonisina foi aumentada nas dietas experimentais (0, 100, 200, 300 ou 400 mg/kg de FB_1) de frangos, por 21 dias, o AST apresentou um aumento linear ($P<0,05$), colesterol, glicose e cálcio apresentaram aumento quadrático ($P<0,05$) e albumina apresentou aumento cúbico ($P<0,05$). LDH, proteína e fósforo não foram afetados pelas dietas com fumonisina.

Nenhum efeito significativo foi observado, nos tratamentos com FB_1 (100 e 200 mg/kg), para albumina, proteína total, glicose, gama-glutamiltransferase e asparato aminotransferase (LEDOUX et al., 2003).

Níveis reduzidos de proteína total, albumina, globulina, cálcio e níveis aumentados de gama-glutamiltransferase, asparato aminotransferase e ácido úrico são indicativos de efeitos tóxicos da AFB_1 no tecido hepático e renal (GOWDA et al., 2008; GOWDA et al., 2009; MAJID et al., 2015).

5.5 Hemograma

Os resultados do hemograma dos 21 e 42 dias podem ser encontrados nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma no hemograma de frangos de 21 dias.

Dietas Experimentais	Hemogl. (g/dL)	Hemat. (%)	VCM (fL)	HCM (pgr)	CHCM (%)	Eritrócitos ($10^6/mm^3$)	Leucócitos ($10^3/mm^3$)	Monócitos	Linfócitos	Basófilos	Heterófilos	Eosinófilos
										(mm^3)		
Controle	7,74	30,00	132,03	2,59	25,90	2,36	34,20	2152,00	17782	834,00	13210	222,00
CMT	7,21	29,40	125,28	2,45	24,53	2,36	33,40	176,00	19128	420,00	13610	66,00
FB_1	7,76	30,00	121,48	2,59	25,89	2,49	28,20	1022,00	15010	654,00	11514	0,00
FB_1 + CMT	7,72	30,80	132,30	2,51	25,07	2,34	39,40	1438,00	20814	1186,00	15902	60,00
AFB_1	7,56	28,40	127,79	2,66	26,59	2,30	32,20	528,00	16422	580,00	14670	0,00
AFB_1 + CMT	6,71	28,40	118,52	2,37	23,72	2,40	34,20	0,00	16302	260,00	17568	70,00
AFB_1 + FB_1	7,69	30,20	140,03	2,55	25,53	2,22	30,20	716,00	15734	862,00	12888	0,00
AFB_1 + FB_1 + CMT	7,59	30,20	126,60	2,51	25,14	2,40	30,80	318,00	16658	862,00	12962	0,00
EPM	0,2869	0,9937	8,4506	0,0856	0,8546	0,1495	4,3626	452,70	2768,69	226,11	1912,33	55,00
P-valor[2]												
CMT	0,0707	0,9401	0,4374	0,0272	0,0276	0,7638	0,2925	0,0623	0,3097	0,7545	0,1625	0,8586
FB_1	0,0673	0,0682	0,4834	0,7236	0,7082	0,9505	0,6593	0,6222	0,8550	0,0292	0,2934	0,0488
FB_1 + CMT	0,1400	0,5995	0,5750	0,2067	0,2085	0,8599	0,3892	0,0588	0,4801	0,0577	0,8312	0,3215
AFB_1	0,2872	0,2647	0,9385	0,8529	0,8580	0,6038	0,5250	0,0177	0,3302	0,4143	0,4823	0,0649
AFB_1 + CMT	0,6395	0,9401	0,2672	0,6617	0,6540	0,3138	0,5250	0,6244	0,4161	0,4991	0,7396	0,2608
AFB_1 + FB_1	0,5555	0,4110	0,3216	0,9462	0,9475	0,6715	0,6593	0,7724	0,9226	0,6448	0,2072	0,2840
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,7509	0,5995	0,3661	0,4116	0,4177	0,5906	0,2782	0,0882	0,6604	0,3360	0,2183	0,0579

[1]Os dados representam médias de 5 boxes em replicata, cada box com 5 frangos.

[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

Não houve nenhuma variável significativa para a interação de todos os fatores avaliados (AFB_1, FB_1 e CMT), para o hemograma completo aos 21 dias.

Curcuminóides totais (CMT) obteve p-valor significativo para HCM (0,0272) e CHCM (0,0276). Para HCM, a média para os tratamentos com a adição de CMT foi de 2,46 e para os tratamentos sem CMT de 2,60. Para CHCM, a média para os tratamentos com a adição de CMT foi de 24,61 e para os tratamentos sem CMT de 25,98.

Fumonisina (FB_1) obteve um p-valor significativo para basófilos (0,0292) e eosinófilos (0,0488). Para basófilos, a média para os tratamentos com FB_1 de 891,00 e sem FB_1 de 523,50. Para eosinófilos, a média para os tratamentos com FB_1 de 15,00 e sem FB_1 de 89,50.

Aflatoxina (AFB_1) obteve um p-valor (0,0177) significativo para monócitos, com média para os tratamentos com AFB_1 de 390,50 e sem AFB_1 de 1197,00.

Os índices de Wintrobe (WINTROBE, 1933) que são a hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e volume corpuscular médio (VCM), detectam a presença de anemia e avaliam a capacidade que a medula óssea tem de produzir hemácias de tamanho e capacidade metabólica normais, assim como o conteúdo de hemoglobina.

Tessari et al. (2006a) verificaram um aumento significativo ($P<0,05$) de HCM e VCM em aves alimentadas com 200 µg/kg de AFB_1 + 50 mg/kg de FB_1 e 200 µg/kg de AFB_1 + 200 mg/kg de FB_1, também havendo aumento do VCM para os tratamentos com 50 µg/kg de AFB_1 + 200 mg/kg de FB_1 e 200 µg/kg de AFB_1, quando comparados com valores obtidos pelo grupo controle. O CHCM foi reduzido ($P<0,05$) em todos os tratamentos, exceto nos tratamentos com 50 mg/kg de FB_1 (T2) e 50 µg/kg de AFB_1 + 50 mg/kg de FB_1 (T5). Esses resultados mostram que houve anemia decorrente da intoxicação por AFB_1 e FB_1 (TUNG et al., 1975; JAVED et al., 1995).

Tabela 10. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma no hemograma de frangos de 42 dias.

Dietas Experimentais	Hemogl. (g/dL)	Hemat. (%)	VCM (fL)	HCM (pgr)	CHCM (%)	Eritrócitos ($10^6/mm^3$)	Leucócitos ($10^3/mm^3$)	Monócitos	Linfócitos	Basófilos	Heterófilos	Eosinófilos
								(mm^3)				
Controle	6,68	29,20	125,20	2,30	22,97	2,37	22200[ab]	32,00	9610,00[abc]	296,00[a]	12198	64,00
CMT	6,99	30,20	125,60	2,33	23,30	2,58	26000[a]	108,00	11744,00[a]	718,00[a]	12988	442,00
FB_1	6,69	30,80	104,00	2,17	21,72	3,05	26800[a]	130,00	10404,00[ab]	728,00[a]	14748	790,00
FB_1 + CMT	6,62	30,00	120,60	2,22	22,19	2,57	22200[ab]	0,00	9482,00[abc]	0,00[ab]	12660	58,00
AFB_1	6,18	28,60	116,60	2,18	21,77	2,65	27200[a]	212,00	8978,00[abc]	212,00[ab]	17664	134,00
AFB_1 + CMT	5,70	28,20	128,00	2,02	20,20	2,32	18000[b]	42,00	6414,00[c]	0,00[ab]	10954	590,00
AFB_1 + FB_1	7,02	30,00	113,00	2,37	23,69	2,68	23000[ab]	76,00	7578,00[bc]	202,00[ab]	14844	300,00
AFB_1 + FB_1 + CMT	5,43	28,80	120,20	1,88	18,80	2,41	24200[a]	0,00	9674,00[abc]	284,00[a]	13430	812,00
EPM	0,2760	1,1916	12,4673	0,1126	1,1260	0,2516	2162,17	68,6859	1293,72	166,23	1636,65	201,55
P-valor[2]												
CMT	0,0271	0,6810	0,3213	0,0758	0,0751	0,2099	0,1471	0,1338	0,8299	0,3474	0,0514	0,2906
FB_1	0,7918	0,3217	0,2954	0,5495	0,5530	0,2617	0,6389	0,3415	0,9099	0,9792	0,6881	0,2109
FB_1 + CMT	0,0656	0,4469	0,7362	0,3091	0,3088	0,3671	0,7373	0,5689	0,6438	0,0711	0,6055	0,0751
AFB_1	0,0020	0,1832	0,9462	0,0758	0,0724	0,4685	0,4229	0,7597	0,0183	0,0299	0,3611	0,4050
AFB_1 + CMT	0,0060	0,5975	0,9641	0,0245	0,0250	0,6393	0,2327	0,3315	0,6282	0,7026	0,1515	0,0279
AFB_1 + FB_1	0,2347	0,8600	0,6779	0,3529	0,3579	0,4325	0,8404	0,3945	0,3404	0,2299	0,5838	0,9363
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,3564	0,7689	0,5675	0,2693	0,2678	0,2826	0,0035	0,1338	0,0326	0,0037	0,0883	0,0503

[1]Os dados representam médias de 5 boxes em replicata, cada box com 5 frangos.

[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
[a-c] Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05).
VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

Leucócitos, linfócitos e basófilos foram as únicas variáveis significativas para a interação de todos os fatores (AFB_1, FB_1 e CMT) para hemograma completo aos 42 dias, com p-valores de 0,0035, 0,0326 e 0,0037, respectivamente.

Curcuminóides totais (CMT) obteve p-valor significativo para hemoglobina (0,0271), com média para os tratamentos com a adição de CMT de 6,19 e para os tratamentos sem CMT de 6,64.

Aflatoxina (AFB_1) obteve um p-valor significativo para hemoglobina (0,0020), linfócitos (0,0183) e basófilos (0,0299). Para hemoglobina, a média para os tratamentos com AFB_1 de 6,08 e sem AFB_1 de 6,75. Para linfócitos, a média para os tratamentos com AFB_1 de 8161,00 e sem AFB_1 de 10310,00. Para basófilos, a média para os tratamentos com AFB_1 de 174,50 e sem AFB_1 de 435,50.

Aflatoxina adicionada de curcuminóides totais (AFB_1+CMT) obteve um p-valor significativo para hemoglobina (0,0060), HCM (0,0245), CHCM (0,0250) e eosinófilos (0,0279). As médias dos tratamentos sem AFB_1, para hemoglobina, com ou sem CMT (6,81 e 6,68, respectivamente), foram maiores que as médias dos tratamentos com AFB_1, com ou sem CMT (5,56 e 6,60, respectivamente). HCM apresentou médias dos tratamentos sem AFB_1, com ou sem CMT foram de 2,27 e 2,23, respectivamente, e as médias dos tratamentos com AFB_1, com ou sem CMT de 1,95 e 2,27, respectivamente. As médias dos tratamentos sem AFB_1, para CHCM, com ou sem CMT (22,75 e 22,35, respectivamente), foram maiores que as médias dos tratamentos com AFB_1, com ou sem CMT (19,50 e 22,73, respectivamente). Para eosinófilos as médias dos tratamentos sem AFB_1, com ou sem CMT foram de 250,00 e 427,00, respectivamente, e as médias dos tratamentos com AFB_1, com ou sem CMT de 701,00 e 217,00, respectivamente.

O sistema imunológico das aves atua de acordo com os mesmos princípios do sistema imunológico dos mamíferos (SHARMA, 1984). Os monócitos, macrófagos, heterófilos e linfócitos constituem os componentes celulares das respostas imunológicas nas aves (MORGULIS, 2002).

Os leucócitos polimorfonucleares (heterófilos e eosinófilos), os trombócitos, as células endoteliais, os monócitos e basófilos atuam como células efetoras na mediação dos processos inflamatórios (MONTASSIER, 1998). Os leucócitos possuem um papel importante na resposta inflamatória, pois são os apresentadores da defesa a uma infecção (KOKOSHAROV, 1998).

Os linfócitos são os responsáveis pela imunidade específica e iniciam as reações de adaptação. Morfologicamente, os linfócitos são semelhantes ao dos mamíferos e também existem tipos principais: linfócitos T (LT), linfócitos B (LB) e células plasmáticas. Os LT desenvolvem-se no timo e os LB desenvolvem-se na medula óssea e diferenciam-se na bolsa de Fabricius. Dividem-se em células plasmáticas, secretando glicoproteínas, que são os anticorpos que ajudam os fagócitos (heterófilos e monócitos) a reconhecerem os antígenos (NORIEGA, 2000).

A hemoglobina, intervem no transporte de CO_2 desde os tecidos até os alvéolos pulmonares, mantendo desta maneira o pH do sangue e a entrada de oxigênio nas células. A concentração da hemoglobina é importante para determinar a capacidade de oxigenação tissular que prevalece nos seres vivos (NORIEGA, 2000) e também é importante para classificar um processo anêmico (STURKIE , 1976).

5.6 Títulos de Anticorpos para Doença de Newcastle

Os dados dos títulos de anticorpos para doença de Newcastle encontram-se na tabela 11.

Tabela 11. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma nos títulos de anticorpos de frangos para doença de Newcastle.

Dietas Experimentais	**Idade (dias)**			
	14	**27**	**34**	**41**
Controle	115	872	1312	1387
CMT	286	811	782	353
FB_1	152	498	439	732
FB_1 + CMT	229	555	193	196
AFB_1	181	375	146	605
AFB_1 + CMT	235	2186	220	468
AFB_1 + FB_1	381	651	396	637
AFB_1 + FB_1 + CMT	172	180	310	385
EPM	88,83	570,50	209,41	376,56
P-valor[2]				
CMT	0,7187	0,4103	0,1943	0,0766
FB_1	0,6428	0,1507	0,0682	0,4242
FB_1 + CMT	0,1655	0,1863	0,8357	0,7230
AFB_1	0,4620	0,6847	0,0094	0,5959
AFB_1 + CMT	0,1196	0,4076	0,2069	0,2772
AFB_1 + FB_1	0,5361	0,4968	0,0051	0,4806
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,5057	0,1441	0,4581	0,5698

Não houve diferença estatística para a interação dos três fatores analisados.

Aflatoxina (AFB_1) obteve um p-valor significativo para os 34 dias (0,0094). A média para os tratamentos com AFB_1 foi de 268 e sem AFB_1 de 682.

Aflatoxina adicionada de fumonisina (AFB_1+ FB_1) obteve um p-valor significativo para os 34 dias (0,0051). As médias dos tratamentos sem AFB_1, com ou sem FB_1, foram de 316 e 1047, respectivamente, e as médias dos tratamentos com AFB_1, com ou sem FB_1, foram de 353 e 183, respectivamente.

Os dados acima, para títulos de anticorpos, ficaram abaixo dos valores esperados e podem ser explicados de algumas formas. Podem ter ocorrido falhas vacinais (vacinação

ineficaz por parte do manejador, vacina viva pode ter sido inativada por armazenamento inadequado), a temperatura ambiente estava alta no dia da vacinação, o que pode ter diminuído a qualidade da vacina apesar dela estar armazenada em gelo quando não estava sendo utilizada e/ou qualidade ruim da vacina utilizada (diferentes lotes e métodos de preparo dos antígenos, quantidade insuficiente de antígeno na vacina). Apesar disso, pôde-se observar, em geral, menores valores de títulos de anticorpos para os tratamentos contendo aflatoxina e/ou fumonisina, sugerindo um efeito das mesmas sobre a resposta imunológica humoral das aves.

Títulos persistentes de anticorpos podem indicar proteção, embora sem garantia, especialmente se os mecanismos de imunidade mediada por células forem importantes para a proteção. Do mesmo modo, animais com títulos de anticorpos séricos baixos ou indetectáveis ainda podem estar protegidos devido à persistência de linfócitos B e T de memória, capazes de responder rapidamente a uma infecção (TIZARD, 2014).

A dose imunotóxica da AFB_1 é considerada, geralmente, menor que a dose necessária para causar redução no desempenho das aves. Vários trabalhos mostram que a dose limiar de AFB_1, para causar efeitos negativos na imunidade mediada por célula e na imunidade humoral é de 0,4 e 1 mg/kg, respectivamente (YUNUS et al., 2011). Giambrone et al. (1985) observaram um aumento nos títulos de doença de Newcastle com o aumento do teor de AFB_1 de zero para 0,5 mg/kg.

Tessari et al. (2006a) verificaram que aos 35 dias de idade, todos os frangos dos tratamentos que continham micotoxina apresentaram títulos de anticorpos reduzidos ($P < 0,05$). Aves dos grupos alimentados com AFB_1 e FB_1 (50 µg/kg AFB_1+50 mg/kg FB_1, 200 µg/kg AFB_1+50 mg/kg FB_1 e 200 µg/kg AFB_1+200 mg/kg FB_1) tiveram menores valores ($P < 0,05$) quando comparados com os outros grupos que estavam recebendo AFB_1 e FB_1 isoladamente ou combinados. Os efeitos negativos das mesmas dietas citadas acima também foram observados aos 41 dias de vida dos frangos. O efeito imunossupressor pode estar relacionado a inibição da síntese de proteína, incluindo uma diminuição nos títulos de IgG e IgA, redução do número de linfócitos e efeitos na bursa de Fabricius.

5.7 Histopatologia

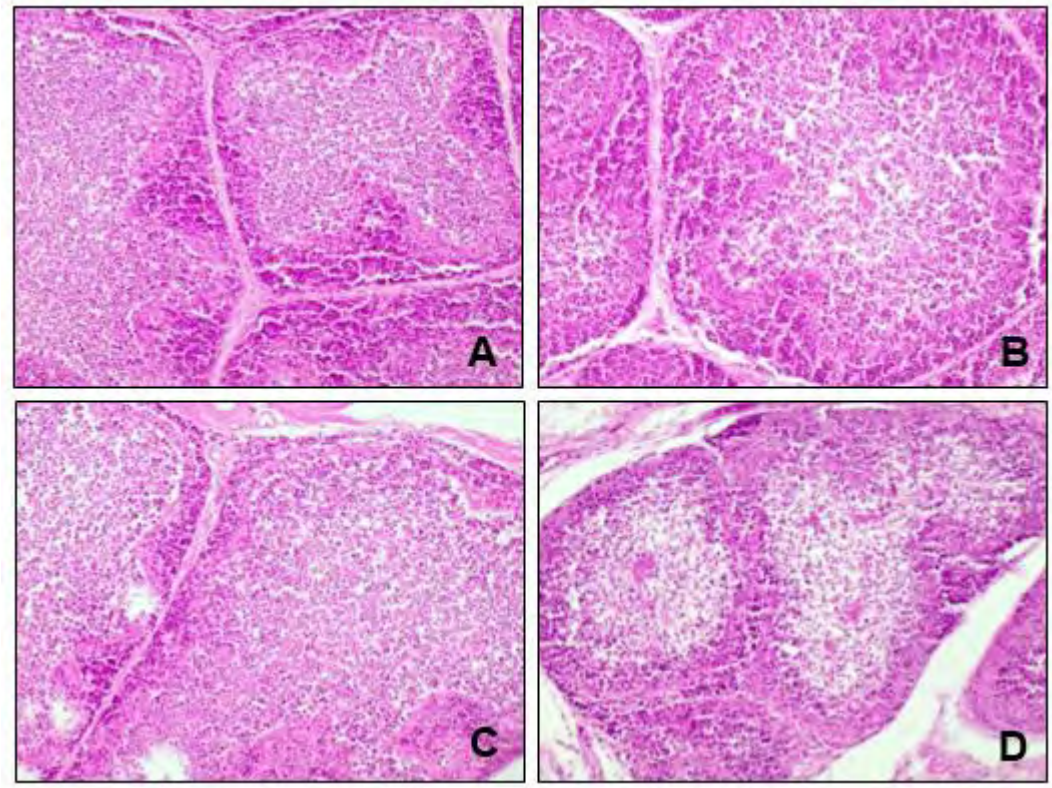
Os escores histopatológicos para os órgãos analisados encontram-se na tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros histopatológicos de frangos de corte alimentados com aflatoxina, fumonisina e cúrcuma.

Tratamento	**Fígado**					**Rim**					**Coração**					**Bursa de Fabricius**				
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CMT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FB_1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FB_1 + CMT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AFB_1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
AFB_1 + CMT	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
AFB_1 + FB_1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3
AFB_1 + FB_1 + CMT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3

0 = sem mudança significativa; 1 = Suave; 2 = Moderada; 3 = Severa.
AFB_1 = aflatoxina B_1; FB_1 = Fumonisina B_1; CMT = Curcuminóides Totais.

Os resultados de histopatologia da bursa de Fabricius encontram-se abaixo.



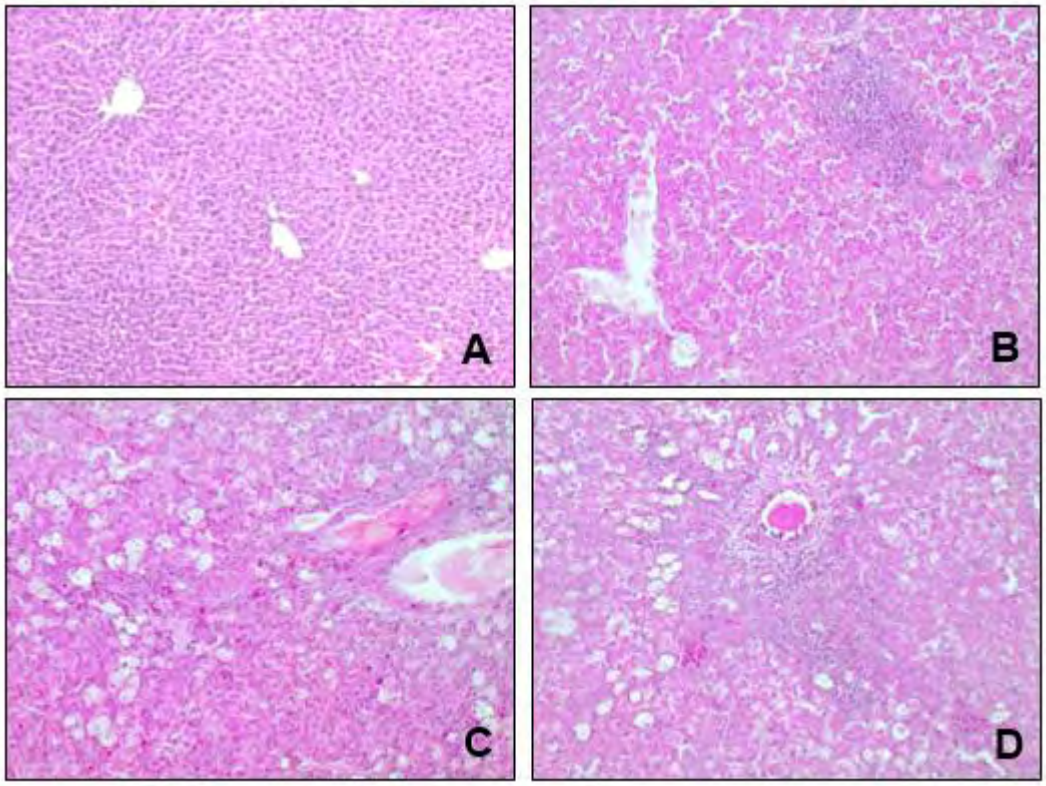
A- Bursa de Fabricius com arquitetura preservada, sem consumo ou ativação de linfócitos (tratamentos T1 e T2);

B- Bursa de Fabricius com arquitetura discretamente distorcida, com discreta ativação de linfócitos (tratamentos T3 e T4);

C- Bursa de Fabricius com arquitetura distorcida, com ativação e proliferação de linfócitos (tratamentos T5 e T6);

D- Bursa de Fabricius com arquitetura distorcida, com ativação e consumo de linfócitos (tratamentos T7 e T8).

Os resultados de histopatologia do fígado encontram-se abaixo.



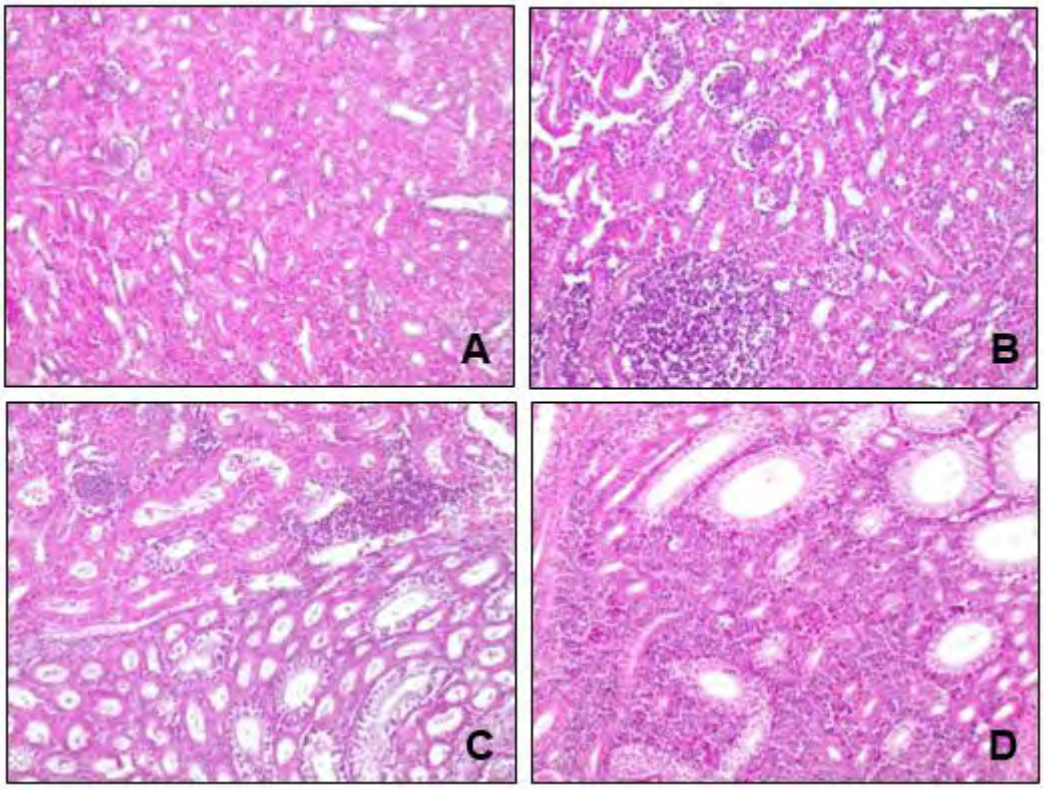
A- Fígado com arquitetura preservada, sem proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração hepatocelular (grupos T1 e T2);

B- Fígado com arquitetura preservada, com proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração hepatocelular (grupos T3 e T4);

C- Fígado com arquitetura pouco distorcida, com proliferação/ativação de linfócitos e degeneração hepatocelular (grupos T5 e T6);

D- Fígado com arquitetura distorcida, moderada proliferação/ativação de linfócitos e intensa degeneração hepatocelular (grupos T7 e T8).

Os resultados de histopatologia do rim encontram-se abaixo.



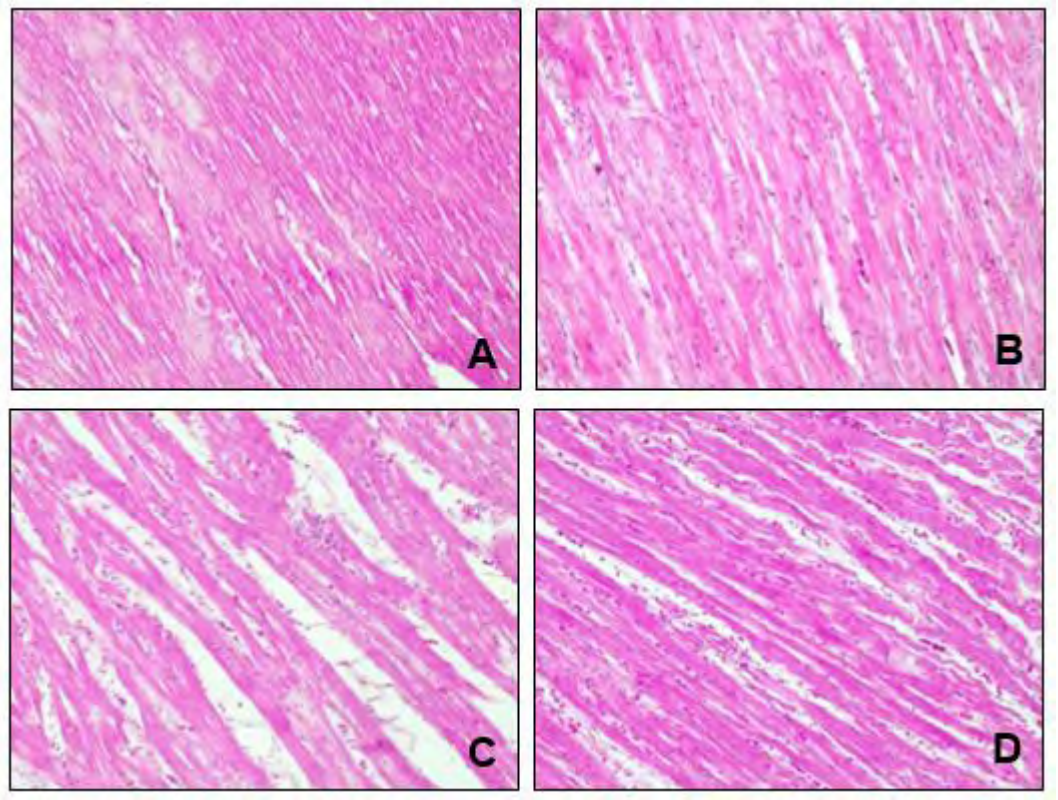
A- Rim com glomérulos preservados, sem proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração tubular (grupos T1 e T2);

B- Rim com glomérulos preservados, com proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração tubular (grupos T3 e T4);

C- Rim com glomérulos preservados, com proliferação/ativação de linfócitos e degeneração tubular (grupos T5 e T6);

D- Rim com glomérulos preservados, intensa proliferação/ativação de linfócitos e degeneração tubular (grupos T7 e T8).

Os resultados de histopatologia do coração encontram-se abaixo.



A- Coração com arquitetura preservada, sem proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração de fibras (grupos T1 e T2);

B- Coração com arquitetura preservada, com discreta proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração de fibras (grupos T3 e T4);

C- Coração com arquitetura preservada, com discreta proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração de fibras (grupos T5 e T6);

D- Coração com arquitetura preservada, com discreta proliferação/ativação de linfócitos e sem degeneração de fibras (grupos T7 e T8).

Todos os animais dos tratamentos 1 e 2 foram classificados no grupo A para todas as análises histopatológicas de todos os órgãos (bursa de Fabricius, fígado, rim e coração), assim como os animais dos tratamentos 3 e 4 foram classificados no grupo B, os animais dos tratamentos 5 e 6 foram classificados no grupo C e os animais dos tratamentos 7 e 8 foram classificados no grupo D.

A partir dos resultados histopatológicos dos órgãos analisados, verifica-se que não houve diferença entre os tratamentos com e sem cúrcuma, portanto os curcuminóides totais presentes na cúrcuma não foram eficazes em diminuir os efeitos negativos provocados pela aflatoxina e fumonisina nos órgãos (bursa de Fabricius, fígado, rim e coração) de frangos de corte. As lesões no fígado, rim e bursa de Fabricius foram aumentando gradualmente do tratamento controle até o tratamento contendo adição de aflatoxina e fumonisina, com ou sem cúrcuma, sendo que o efeito mais severo foi observado nos órgãos desses tratamentos, mostrando que houve efeito aditivo da aflatoxina e da fumonisina para os dados histopatológicos.

Diferentemente do experimento em questão, Gowda et al. (2008) observaram redução na severidade das lesões histopatológicas do fígado com a adição de cúrcuma em pó (74 mg/kg de curcuminóides totais) em dieta contendo aflatoxina (1 mg/kg).

Tessari et al. (2006a) verificaram lesões histológicas significativas nos fígados de frangos, em todas as dietas contendo aflatoxina e/ou fumonisina. Nos rins, foram observadas lesões histológicas significativas apenas no tratamento com 200 µg/kg de AFB_1+200 mg/kg de FB_1.

Del Bianchi et al. (2005) encontraram, no fígado, áreas focais de necrose e presença de infiltrado inflamatório em aves alimentadas com 50 e 2450 µg/kg de AFB_1. Aves recebendo 10 mg/kg FB_1 apresentaram hiperplasia do duto biliar com fibrose e um infiltrado mononuclear acompanhado por desarranjo trabecular. Em todos os tratamentos com adição de FB_1 observou-se degeneração vacuolar hepática.

Ledoux et al. (1998) observaram lesões moderadas de aflatoxicose em todos os frangos alimentados com AFB_1, que apresentaram vacuolação citoplasmática periportal moderada a severa (mudança gordurosa) do hepatócito, com infiltração heterofílica periportal moderada.

Ledoux et al. (2003) observaram lesões associadas à FB_1 (100 ou 200 mg/kg) no fígado. Foram evidentes leve a moderada hematopoiese extramedular periportal e necrose hepática focal leve em frangos alimentados com dietas contendo FB_1.

5.8 Biometria de Órgãos

Os dados da biometria de órgãos estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Biometria de órgãos de frangos de corte de 42 dias.

Tratamentos	Peso Relativo (g/100g)[1]			
	Fígado	**Rim**	**Coração**	**Bursa de Fabricius**
Controle	2,0318	0,4924	0,5548	0,1746
CMT	1,8224	0,5566	0,5378	0,2084
FB_1	1,9202	0,5198	0,5858	0,1776
FB_1 + CMT	2,0298	0,5126	0,5962	0,1782
AFB_1	4,0280	1,0608	0,7826	0,2078
AFB_1 + CMT	3,7540	0,9670	0,7510	0,1996
AFB_1 + FB_1	3,8282	0,9720	0,8558	0,1646
AFB_1 + FB_1 + CMT	3,6430	1,0886	0,7584	0,1666
EPM	0,1974	0,0644	0,0410	0,0201
P-valor[2]				
CMT	0,3253	0,6460	0,2522	0,6237
FB_1	0,7031	0,9256	0,1539	0,0796
FB_1 + CMT	0,4712	0,4254	0,7431	0,6888
AFB_1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,9972
AFB_1 + CMT	0,5250	0,8437	0,3003	0,4810
AFB_1 + FB_1	0,4725	0,7759	0,9401	0,3960
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,6832	0,1122	0,4284	0,4515

[1]Valores referentes à média de 5 repetições de 1 ave cada (5 aves).
[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
AFB_1 = aflatoxina B_1; FB_1 = Fumonisina B_1; CMT = Curcuminóides Totais.

Não houve nenhuma variável significativa para a interação de todos os fatores avaliados (AFB_1, FB_1 e CMT), para a biometria dos órgãos aos 42 dias.

Aflatoxina (AFB_1) obteve p-valor significativo para fígado (<0,0001), rim (<0,0001) e coração (<0,0001). Para o fígado, a média para os tratamentos com a adição de AFB_1 foi de 3,8133 e para os tratamentos sem AFB_1 de 1,9511. Para o rim, a média para os tratamentos

com a adição de AFB_1 foi de 1,0221 e para os tratamentos sem AFB_1 de 0,5203. Para o coração, a média para os tratamentos com a adição de AFB_1 foi de 0,7870 e para os tratamentos sem AFB_1 de 0,5687.

Ledoux et al. (1992) verificaram que a medida que a concentração de fumonisina aumentava, o peso absoluto do fígado, proventrículo e moela aumentaram linearmente ($P<0,05$). Os pesos do rim, coração, baço, pâncreas e bursa de Fabricius não foram afetados ($P>0,10$) pelas dietas com fumonisina.

Tessari et al. (2006a) realizaram experimento com 9 tratamentos (0, 50 e 200 µg/kg de AFB_1 e/ou 0, 50 e 200 mg/kg de FB_1), em frangos de corte, durante o período de 8 a 41 dias. Houve aumento ($P<0,05$) do peso relativo do coração de todos os grupos que receberam dietas com AFB_1 e/ou FB_1 (exceto para o tratamento com 200 µg/kg de AFB_1+50 mg/kg de FB_1) quando comparado com o tratamento controle. O peso relativo do fígado aumentou ($P<0,05$) apenas em aves alimentadas com 200 mg/kg de FB_1, combinada ou não com AFB_1. O peso relativo da bursa de Fabricius aumentou significativamente em alguns tratamentos com AFB_1 + FB_1 (50 µg/kg de AFB_1+50 mg/kg de FB_1, 200 µg/kg de AFB_1+50 mg/kg de FB_1 e 200 µg/kg de AFB_1+200 mg/kg de FB_1) e em tratamentos que receberam 50 µg/kg de AFB_1 ou 200 mg/kg de FB_1. Não houve diferença no peso relativo do baço.

Um dos sinais mais importantes da toxicidade por aflatoxina, em frangos de corte, é a mudança nos órgãos, sendo que o fígado, baço e rim aumentam de tamanho enquanto que a bursa de Fabricius e o timo diminuem (OSWEILER, 1990; SUR; CELIK, 2003).

5.9 Resíduos de Aflatoxina e Fumonisina no Fígado e Músculo Peitoral

Os valores de resíduo de aflatoxina e fumonisina encontrados no fígado de frangos de corte podem ser vistos na tabela 14.

Tabela 14. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de aflatoxina e fumonisina, no fígado de frangos alimentados com dietas experimentais[1].

Dietas Experimentais	**Resíduos (ng/g)**					
	AFB_1	**AFG_1**	**AFB_2**	**AFCol**	**FB_1**	**FB_2**
Controle	0	0	0	0	0	0^{c}
CMT	0	0	0	0	0	0^{c}
FB_1	0	0	0	0	159,04	$3,24^{b}$
FB_1 + CMT	0	0	0	0	221,90	$15,10^{a}$
AFB_1	0,2650	0,0468	0,0180	0,0452	0	0^{c}
AFB_1 + CMT	0,3154	0,0534	0,0216	0,0472	0	0^{c}
AFB_1 + FB_1	0,3696	0,0192	0,0158	0,0094	103,48	$5,70^{b}$
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,6558	0,0570	0,0768	0,0216	123,56	$4,40^{b}$
EPM	0,1329	0,0157	0,0227	0,0131	16,0227	1,2724
P-valor[2]						
CMT	0,3806	0,2248	0,2238	0,5294	0,0317	0,0011
FB_1	0,2490	0,5074	0,3160	0,0490	<0,0001	<0,0001
FB_1 + CMT	0,5375	0,3902	0,2783	0,8162	0,0317	0,0011
AFB_1	0,0002	<0,0001	0,0170	0,0001	0,0003	0,0083
AFB_1 + CMT	0,3806	0,2248	0,2238	0,7087	0,2522	0,0001
AFB_1 + FB_1	0,2490	0,5074	0,3160	0,0282	0,0003	0,0081
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,5375	0,3902	0,2783	0,6252	0,2522	0,0001

[1]Os dados representam médias de 5 boxes em replicata, cada box com 5 frangos.
[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
[a-c]Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05).
AFB_1 = aflatoxina B_1, AFB_2 = aflatoxina B_2, AFG_1 = aflatoxina G_1, AFCol = Aflatoxicol, FB_1 = Fumonisina B_1, FB_2 = Fumonisina B_2, CMT = Curcuminóides Totais.

Os dados acima, do fígado, e os dados do músculo peitoral foram divididos em tratamentos com presença de aflatoxina (para os dados de resíduo de aflatoxina) e presença de fumonisina (para os dados de resíduo de fumonisina), e analisados separadamente (tabelas 15, 16, 17 e 18).

Tabela 15. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de aflatoxina, no fígado de frangos alimentados com dietas experimentais[1].

Dietas Experimentais	**Resíduos (ng/g)**			
	AFB_1	**AFG_1**	**AFB_2**	**AFCol**
AFB_1	0,2650	0,0468	0,0180	0,0452
AFB_1 + CMT	0,3154	0,0534	0,0216	0,0472
AFB_1 + FB_1	0,3696	0,0192	0,0158	0,0094
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,6558	0,0570	0,0768	0,0216
EPM agrupado	0,1755	0,0166	0,0241	0,0142
P-valor[2]				
FB_1	0,2462	0,8054	<0,0001	0,0503
CMT	0,5110	0,4698	0,9959	0,3851
FB_1 + CMT	0,5761	0,5326	0,9959	0,4665

[1]Os dados representam médias de 5 fígados, por tratamento, em duplicata.
[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
[a-b] Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05).
AFB_1 = aflatoxina B_1, AFG_1 = aflatoxina G_1, AFB_2 = aflatoxina B_2, AFCol = aflatoxicol, CMT = Curcuminóides Totais, FB_1 = fumonisina B_1.

Não houve diferença estatística para a interação dos fatores analisados. Somente fumonisina B_1 (FB_1) obteve um p-valor (<0,0001) significativo para o resíduo de aflatoxina B_2 (AFB_2), com média para os tratamentos com FB_1 de 0,0463 e sem FB_1 de 0,0198.

Tabela 16. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de fumonisina, no fígado de frangos alimentados com dietas experimentais[1].

Dietas Experimentais	**Resíduos (ng/g)**	
	FB_1	**FB_2**
FB_1	159,04	3,24[b]
FB_1 + CMT	221,90	15,10[a]
AFB_1 + FB_1	103,48	5,70[b]
AFB_1 + FB_1 + CMT	123,56	4,40[b]
EPM	16,9947	1,3502
P-valor[2]		
AFB_1	0,0003	0,0329
CMT	0,0267	0,0059
AFB_1 + CMT	0,2262	0,0058

[1]Os dados representam médias de 5 fígados, por tratamento, em duplicata.
[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
[a-b] Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05).
AFB_1 = aflatoxina B_1, FB_1 = Fumonisina B_1, FB_2 = Fumonisina B_2, CMT = Curcuminóides Totais.

O resíduo de FB_2 foi a única variável significativa para a interação de todos os fatores para os resíduos de fumonisina no fígado, com p-valor de 0,0058.

Aflatoxina B_1 (AFB_1) obteve um p-valor significativo para os resíduos de FB_1 (0,0003) e FB_2 (0,0329). As médias dos tratamentos sem AFB_1 para resíduo de FB_1 (190,47) e FB_2 (9,17), foram maiores que as médias dos tratamentos com AFB_1 para resíduo de FB_1 (113,52) e FB_2 (5,05).

Curcuminóides totais (CMT) obteve um p-valor significativo para os resíduos de FB_1 (0,0267) e FB_2 (0,0059). As médias dos tratamentos sem CMT para resíduo de FB_1 (131,26) e FB_2 (4,47), foram menores que as médias dos tratamentos com CMT para resíduo de FB_1 (172,73) e FB_2 (9,75).

Tabela 17. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de aflatoxina, no músculo peitoral de frangos alimentados com dietas experimentais[1].

Dietas Experimentais	**Resíduos (ng/g)**		
	AFB_1	**AFG_1**	**AFB_2**
AFB_1	0,7880	0,0590	0^{c}
AFB_1 + CMT	0,7372	0,0720	0^{c}
AFB_1 + FB_1	0,2824	0,0142	$0,0234^{b}$
AFB_1 + FB_1 + CMT	0,3726	0,0882	$0,0944^{a}$
EPM	0,2993	0,0337	0,0152
P-valor[2]			
FB_1	0,3060	0,6940	<0,0001
CMT	0,9355	0,2874	0,0247
FB_1 + CMT	0,6723	0,1748	0,0247

[1]Os dados representam médias de 5 músculos peitorais, por tratamento, em duplicata.
[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
[a-c] Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05).
AFB_1 = aflatoxina B_1, AFG_1 = aflatoxina G_1, AFB_2 = aflatoxina B_2, CMT = Curcuminóides Totais.

Os valores do aflatoxicol apresentaram valores abaixo do limite de quantificação, no músculo peitoral e, por esse motivo, não foram apresentados.

O resíduo de AFB_2 foi a única variável significativa para a interação de todos os fatores para os resíduos de aflatoxina no músculo peitoral, com p-valor de 0,0247.

Fumonisina B_1 (FB_1) obteve um p-valor (<0,0001) significativo para o resíduo de AFB_2, com média para os tratamentos com FB_1 de 0,0589 e sem FB_1 de 0.

Curcuminóides totais (CMT) obteve um p-valor significativo para o resíduo de FB_2 (0,0247), com média para os tratamentos com CMT de 0,0472 e sem CMT de 0,0117.

Tabela 18. Efeitos da aflatoxina, fumonisina e cúrcuma na concentração dos resíduos de fumonisina, no músculo peitoral de frangos alimentados com dietas experimentais[1].

Dietas Experimentais	**Resíduos (ng/g)**	
	FB_1	**FB_2**
FB_1	2,7100	1,4420
FB_1 + CMT	3,2660	1,8140
AFB_1 + FB_1	2,8140	1,0540
AFB_1 + FB_1 + CMT	3,4840	1,0900
EPM	1,6055	0,7207
P-valor[2]		
AFB_1	0,9214	0,6996
CMT	0,7076	0,8979
AFB_1 + CMT	0,9721	0,9256

[1]Os dados representam médias de 3 músculos peitorais, por tratamento, em duplicata.
[2]P-valor para os efeitos de tratamento dentro de colunas.
[a-c] Médias dentro de colunas sem sobrescritos em comum são significativamente diferentes (P<0,05).
AFB_1 = aflatoxina B_1, FB_1 = Fumonisina B_1, FB_2 = Fumonisina B_2, CMT = Curcuminóides Totais.

Não houve nenhuma variável significativa para a interação dos fatores e para os fatores individuais, para os resíduos de fumonisina no músculo peitoral.

As concentrações dos resíduos de aflatoxina e fumonisina foram maiores no fígado quando comparados com as concentrações encontradas no músculo. Esse resultado já era esperado pois o fígado é o principal órgão alvo dessas micotoxinas.

Iqbal et al. (2014), analisaram 38 amostras de frangos de corte, sendo 15 dessas amostras (asas, peito, pernas e fígado) positivas para aflatoxinas. Os valores de AFB_1 para asa, peito, perna e fígado foram de 1,24 ± 0,91, 1,19 ± 0,45, 0,90 ± 0,11 e 2,64 ± 0,58, respectivamente.

Hussain et al. (2010), conduziram 3 experimentos com frangos de corte de 7, 14 e 28 dias de vida, alimentadas com 0, 1,6, 3,2 e 6,4 mg/kg de AFB_1, por 7 dias, e então voltavam a alimentar as aves com dieta basal, sem adição de aflatoxina. Em frangos de 28 dias de idade, alimentadas com 1,6, 3,2 e 6,4 mg/kg de AFB_1 por 7 dias, foram detectados resíduos de AFB_1, no fígado, no dia 3 (3,2 e 6,4 mg/kg) e no dia 5 (1,6 mg/kg) de administração da aflatoxina. Os maiores valores encontrados foram observados no último dia de intoxicação (dia 7), sendo 2,87 ± 0,13, 3,03 ± 0,15 e 3,48 ± 0,11 ng/g para 1,6, 3,2 e 6,4 mg/kg de AFB_1,

respectivamente. Para o músculo, aos 28 dias de idade, foram detectados resíduos de AFB_1 no dia 2 (6,4 mg/kg), no dia 3 (3,2 mg/kg) no dia 5 (1,6 mg/kg) de administração da aflatoxina. No dia 7 de intoxicação os níveis encontrados foram de 0,41 ± 0,05, 0,49 ± 0,01 e 1,90 ± 0,03 ng/g para 1,6, 3,2 e 6,4 mg/kg de AFB_1, respectivamente. Os autores verificaram que aves mais velhas tinham menores concentrações de resíduos de AFB_1 no tecido, quando comparadas com aves mais jovens, sugerindo que aves mais velhas desenvolveram um mecanismo mais eficiente para metabolizar AFB_1. Outra possibilidade seria a de que tenha ocorrido uma diluição no tecido devido ao maior tamanho da ave.

Tardieu et al. (2008), realizaram um estudo com perus alimentados com diferentes concentrações de fumonisinas (0, 5, 10 e 20 mg/kg de FB_1+FB_2) durante 9 semanas. O fígado e rim apresentaram os maiores níveis de FB_1, ao passo que o músculo não apresentou FB_1 detectável. A média das concentrações de FB_1 encontradas no fígado foram de 117, 44 e 32 µg/kg em perus alimentados, respectivamente, com 20, 10 e 5 mg FB_1+FB_2/kg de ração. Esse valor encontrado de resíduo de fumonisina (117 µg/kg ou ng/g), para 20 mg/kg de fumonisinas, foi menor que o encontrado no presente trabalho para as dietas contendo FB_1 (159,04 ng/g), AFB_1+CMT (221,90 ng/g) e AFB_1+FB_1+CMT (123,56 ng/g).

Tardieu et al. (2009), realizaram um estudo semelhante em patos machos, alimentados (alimentação forçada) com diferentes concentrações de fumonisinas (0, 5, 10 e 20 mg/kg de FB_1+FB_2) durante 12 semanas. Apesar da ingestão total de fumonisinas ter sido maior em patos quando comparada com a dos perus, a persistência foi menor. A média de FB_1, no fígado, foi de 16 e 20 ng/g nos animais alimentados com as dietas contendo 10 e 20 mg/kg de FB_1+FB_2, respectivamente, e abaixo do limite de detecção nos animais alimentados com a dieta contendo 5 mg/kg de FB_1+FB_2. A FB_1 estava abaixo do limite de detecção no músculo e no rim de todas as dietas experimentais.

Fernández et al. (1994), alimentaram frangos de corte com uma dieta contendo 2,5 mg/kg de AFB_1 durante 32 dias e a média dos resíduos de aflatoxina encontrados no fígado foram 0,23 µg/kg AFB_1, 0,23 µg/kg AFL e 0,16 µg/kg AFG_1. Os valores do resíduo de AFB_1 foram menores quando comparados aos resultados encontrados no presente trabalho, porém os resíduos de aflatoxicol e de AFG_1 foram maiores que os do presente trabalho.

Bintvihok e Kositcharoenkul (2006), alimentaram frangos de corte com dietas contendo AFB_1 e AFB_1 adicionado de propionato de cálcio (PC) durante três dias e encontraram resíduos de AFB_1 de 0,05 ± 0,03 µg/kg e 0,13 ± 0,05 µg/kg em fígados de aves

alimentadas com 50 µg/kg AFB_1 e 100 µg/kg AFB_1, respectivamente. No músculo, encontraram resíduo de AFB_1 (0,02 ± 0,01 µg/kg) em aves alimentadas com 100 µg/kg AFB_1.

Leblanc et al. (2005) analisaram, na França, alimentos consumidos por pessoas adultas, crianças e vegetarianos. A concentração média de FB_1 encontrada em três amostras de fígado de ave (50% das amostras de fígado analisadas) foi de 52,5 µg/kg.

Weibking et al. (1994) verificaram que os efeitos combinados da AFB_1 e FB_1, em frangos e perus, podem ser mais severos do que quando as toxinas estão presentes separadamente.

5.10 Correlações entre os Resíduos e as Variáveis Estudadas

A correlação mede a força ou grau de relacionamento entre duas variáveis, podendo ser positiva ou negativa. O valor zero indica que não há correlação, +1 indica uma correlação perfeita e -1 indica uma correlação perfeita negativa (ADLER; PARMRYD, 2010).

As correlações de Pearson entre os resíduos encontrados no fígado e músculo peitoral e as demais variáveis estudadas encontram-se abaixo.

5.10.1 Desempenho e Resíduos

Na tabela 19 encontra-se a correlação entre o desempenho zootécnico e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no fígado de frangos de corte.

Tabela 19. Coeficiente de correlação[1] entre o desempenho e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte.

	Mortalidade	Consumo de Ração	Peso Médio	Ganho de Peso	Conversão Alimentar
AFB_1	0,27	**-0,44**	**-0,52**	**-0,45**	0,24
AFG_1	**0,52**	**-0,67**	**-0,68**	**-0,67**	**0,41**
AFB_2	0,34	**-0,47**	**-0,54**	**-0,49**	0,34
AFCol	0,25	**-0,60**	**-0,60**	**-0,54**	0,18
FB_1	-0,18	0,26	0,20	0,21	-0,07
FB_2	-0,08	0,22	0,17	0,13	0,06

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

A mortalidade apresentou correlação positiva moderada apenas com a AFG_1, ou seja, quanto maior a mortalidade, nos tratamentos com aflatoxina, maior foi o resíduo de AFG_1 no fígado. O consumo de ração, o peso médio e o ganho de peso tiveram correlação negativa moderada com a AFB_1, AFG_1, AFB_2 e AFCol. Isso quer dizer que quanto menor o consumo, o peso e o ganho de peso, maior é o valor dos resíduos (AFB_1, AFG_1, AFB_2 e AFCol) no fígado. Já a conversão alimentar apresentou correlação positiva moderada apenas para a AFG_1.

Na tabela 20 encontra-se a correlação entre o desempenho zootécnico e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no músculo peitoral de frangos de corte.

Tabela 20. Coeficiente de correlação[1] entre o desempenho e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte.

	Mortalidade	Consumo de Ração	Peso Médio	Ganho de Peso	Conversão Alimentar
AFB_1	**0,33**	**-0,59**	**-0,55**	**-0,53**	0,18
AFG_1	**0,36**	**-0,67**	**-0,66**	**-0,59**	0,18
AFB_2	**0,42**	**-0,42**	**-0,49**	**-0,43**	0,29
FB_1	0,03	0,04	-0,09	-0,02	0,08
FB_2	-0,11	0,16	0,04	0,10	-0,01

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

A mortalidade apresentou correlação positiva baixa com a AFB_1, AFG_1 e moderada com a AFB_2. O consumo de ração, o peso médio e o ganho de peso tiveram correlação negativa moderada com a AFB_1, AFG_1 e AFB_2.

Esses dados mostram os efeitos deletérios que as aflatoxinas exercem sobre o desempenho zootécnico de frangos de corte. As fumonisinas não apresentaram correlação significativa sobre o desempenho dos frangos.

A hepatoxicidade da AFB_1 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 resultar em efeito negativo no desempenho dos frangos.

5.10.2 Bioquímica Sérica e Resíduos

Na tabela 21 encontra-se a correlação entre a bioquímica sérica e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no fígado de frangos de corte.

Tabela 21. Coeficiente de correlação[1] entre a bioquímica sérica e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte.

	AST	ALT	GGT	Lactato	PT	Albumina	GLOB	AU	Fósforo
AFB_1	**-0,46**	**-0,46**	-0,13	-0,30	**-0,53**	**-0,56**	**-0,44**	-0,28	-0,25
AFG_1	**-0,62**	**-0,49**	0,03	**-0,44**	**-0,67**	**-0,69**	**-0,58**	-0,27	-0,30
AFB_2	**-0,46**	**-0,45**	-0,17	-0,27	**-0,62**	**-0,64**	**-0,52**	-0,30	-0,29
AFCol	**-0,49**	-0,32	-0,01	**-0,38**	**-0,45**	**-0,41**	**-0,44**	-0,02	-0,07
FB_1	0,05	**0,34**	-0,01	**0,35**	0,12	-0,04	0,26	-0,15	0,10
FB_2	-0,05	**0,38**	-0,06	0,26	0,02	-0,08	0,12	-0,19	0,01

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

A AST apresentou correlações negativas moderadas com os resíduos de AFB_1, AFG_1, AFB_2 e AFCol. A ALT apresentou correlações negativas moderadas com os resíduos de AFB_1, AFG_1 e AFB_2, e correlações positivas baixas com a FB_1 e FB_2. O lactato teve correlação negativa moderada com a AFG_1, correlação negativa baixa com o AFCol e positiva baixa com a FB_1. A PT, a Albumina e a GLOB apresentaram correlações negativas moderadas com os resíduos de AFB_1, AFG_1, AFB_2 e AFCol.

Na tabela 22 encontra-se a correlação entre a bioquímica sérica e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no músculo peitoral de frangos de corte.

Tabela 22. Coeficiente de correlação[1] entre a bioquímica sérica e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte.

	AST	ALT	GGT	Lactato	PT	Albumina	GLOB	AU	Fósforo
AFB_1	**-0,42**	-0,24	0,003	-0,31	**-0,42**	**-0,37**	**-0,42**	-0,15	-0,08
AFG_1	**-0,54**	**-0,48**	-0,09	**-0,43**	**-0,46**	**-0,52**	-0,35	-0,09	-0,17
AFB_2	**-0,34**	**-0,46**	-0,05	-0,30	-0,28	**-0,52**	-0,04	-0,23	-0,08
FB_1	-0,06	0,26	-0,06	0,17	-0,05	-0,22	0,10	-0,26	-0,01
FB_2	0,06	**0,43**	-0,02	0,28	0,08	-0,06	0,20	-0,15	0,02

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

A AST apresentou correlações negativas moderadas com os resíduos de AFB_1, AFG_1 e correlação negativa baixa com a AFB_2. A ALT apresentou correlações negativas moderadas com os resíduos de AFG_1 e AFB_2, e correlação positiva moderada com a FB_2. O lactato teve correlação negativa moderada com a AFG_1. A PT apresentou correlação negativa com os resíduos de AFB_1, AFG_1. A albumina apresentou correlação negativa baixa com o resíduo de AFB_1, e correlações negativas moderadas com os resíduos de AFG_1 e AFB_2. A globulina apresentou correlação negativa moderada com a AFB_1.

A aflatoxina pode causar degranulação do retículo endoplasmático rugoso e inibir a síntese de DNA, RNA e de proteína, o que pode explicar a redução na concentração da albumina e da proteína total no soro (THERON et al., 1965; YU, 1977; HUFF et al., 1986) e o aumento das atividades no soro da GGT, AST e ALP foram reportadas como sendo indicadores sorológicos sensíveis da toxicidade no fígado e rim (HUFF et al., 1986; SHI et al., 2006). Denli et al. (2009), observaram que a AFB_1 (1 mg/kg) aumentou a atividade da fosfatase alcalina e AST, e a concentração de ácido úrico, e diminuiu a proteína total e a albumina.

Andretta et al. (2012) realizaram pesquisa de meta-análise seguindo três análises sequenciais (gráfico, correlação e variância-covariância) usando dados de 98 artigos, totalizando 37371 frangos de corte. Algumas conclusões do trabalho foram que as micotoxinas reduziram (P <0,05) o ácido úrico (-31%), triglicérides (-39%), albumina (-17%),

globulina (-1%), cálcio (-5%), e fósforo inorgânico (-12%). As micotoxinas também alteraram (P <0,05) as concentrações de fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. A concentração de proteína total no sangue foi 18% menor (P <0,05) em frangos desafiados por aflatoxinas comparada com os que não foram desafiados. A inclusão de aditivos anti-micotoxina em dietas com aflatoxinas alteraram (P <0,05) algumas variáveis (ácido úrico, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, e gama-glutamil transferase) em relação ao grupo que recebeu dieta com a micotoxina e sem o aditivo.

5.10.3 Hemograma e Resíduos

Na tabela 23 encontra-se a correlação entre o hemograma aos 21 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no fígado de frangos de corte.

Tabela 23. Coeficiente de correlação[1] entre o hemograma aos 21 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte.

	Leucócito	Monócito	Linfócito	Basófilo	Heterófilo	Eosinófilo	Eritrócito	Hemogl.	Hemat.	VCM	HCM	CHCM
AFB_1	-0,19	-0,26	-0,27	-0,20	0,06	-0,21	-0,02	0,07	-0,03	0,03	0,13	0,13
AFG_1	-0,16	-0,34	-0,25	-0,19	0,11	-0,20	0,01	-0,09	-0,18	-0,08	0,06	0,06
AFB_2	-0,13	-0,26	-0,22	-0,20	0,11	-0,16	0,08	-0,05	-0,02	-0,04	-0,06	-0,06
AFCol	0,06	-0,27	-0,09	**-0,36**	**0,36**	0,02	-0,14	**-0,51**	-0,29	-0,01	**-0,40**	**-0,40**
FB_1	0,02	0,26	-0,009	**0,42**	-0,04	-0,18	0,14	**0,36**	**0,38**	0,05	0,08	0,08
FB_2	0,25	0,27	0,18	**0,51**	0,18	-0,12	-0,08	0,23	0,20	0,19	0,10	0,10

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

O basófilo apresentou correlação negativa baixa com o resíduo de AFCol e positiva moderada com os resíduos de FB_1 e FB_2. Heterófilo teve correlação positiva baixa somente com AFCol. A hemoglobina apresentou correlação negativa moderada com AFCol e positiva baixa com FB_1. Hematócrito teve correlação positiva com FB_1. HCM e CHCM apresentaram correlação negativa moderada com o resíduo de AFCol.

Na tabela 24 encontra-se a correlação entre o hemograma aos 21 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no músculo peitoral de frangos de corte.

Tabela 24. Coeficiente de correlação[1] entre o hemograma aos 21 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte.

	Leucócito	Monócito	Linfócito	Basófilo	Heterófilo	Eosinófilo	Eritrócito	Hemogl.	Hemat.	VCM	HCM	CHCM
AFB_1	0,08	-0,21	-0,02	-0,03	0,28	0,11	-0,19	**-0,34**	-0,16	0,12	-0,28	-0,28
AFG_1	-0,21	-0,33	-0,25	-0,28	0,02	-0,21	0,004	-0,13	-0,33	-0,24	0,27	0,27
AFB_2	-0,16	-0,14	-0,12	0,14	-0,15	-0,16	0,11	0,07	0,15	-0,02	-0,06	-0,05
FB_1	-0,15	0,04	-0,23	0,14	-0,04	-0,22	0,05	0,31	0,30	0,14	0,08	0,08
FB_2	-0,16	0,12	-0,22	0,13	-0,09	-0,22	0,06	**0,39**	**0,39**	0,17	0,10	0,10

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

A hemoglobina apresentou correlação negativa baixa para AFB_1 e positiva baixa para FB_2. Hematócrito teve correlação positiva baixa para FB_2.

Os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no fígado aos 21 dias de vida dos frangos apresentaram mais correlações, com a bioquímica sérica, quando comparado com os resíduos no músculo.

Na tabela 25 encontra-se a correlação entre o hemograma aos 42 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no fígado de frangos de corte.

Tabela 25. Coeficiente de correlação[1] entre o hemograma aos 42 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte.

	Leucócito	Monócito	Linfócito	Basófilo	Heterófilo	Eosinófilo	Eritrócito	Hemogl.	Hemat.	VCM	HCM	CHCM
AFB_1	-0,04	-0,06	-0,27	-0,22	0,16	0,19	0,002	-0,13	0,14	0,04	-0,22	-0,22
AFG_1	-0,16	-0,06	**-0,45**	-0,29	0,12	0,16	-0,03	-0,29	-0,07	0,006	-0,21	-0,21
AFB_2	-0,10	-0,13	-0,34	-0,19	0,12	0,16	-0,08	-0,21	0,15	0,10	-0,29	-0,29
AFCol	-0,15	0,12	**-0,37**	-0,20	0,11	-0,16	-0,23	**-0,41**	-0,12	0,16	-0,31	-0,31
FB_1	0,05	-0,19	0,03	-0,06	0,05	0,09	0,11	0,05	0,22	-0,09	-0,11	-0,10
FB_2	-0,10	-0,13	-0,09	-0,23	-0,03	-0,10	-0,01	0,14	0,09	-0,02	0,08	0,08

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

O linfócito apresentou correlação negativa moderada para AFG_1 e negativa baixa AFCol. A hemoglobina apresentou correlação negativa moderada para AFCol.

Na tabela 26 encontra-se a correlação entre o hemograma aos 42 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no músculo peitoral de frangos de corte.

Tabela 26. Coeficiente de correlação[1] entre o hemograma aos 42 dias e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte.

	Leucócito	Monócito	Linfócito	Basófilo	Heterófilo	Eosinófilo	Eritrócito	Hemogl.	Hemat.	VCM	HCM	CHCM
AFB_1	-0,03	-0,02	-0,30	-0,22	0,22	-0,02	-0,20	**-0,37**	-0,07	0,21	-0,31	-0,31
AFG_1	-0,001	0,23	-0,31	-0,20	0,21	0,28	-0,02	**-0,47**	-0,17	-0,05	-0,33	-0,33
AFB_2	0,09	-0,19	-0,12	-0,09	0,16	**0,43**	-0,09	-0,32	0,01	0,03	-0,32	-0,32
FB_1	0,16	-0,17	-0,07	0,02	0,25	0,20	0,05	0,11	0,07	-0,08	0,07	0,07
FB_2	0,19	-0,19	0,06	0,02	0,21	0,11	0,10	0,14	0,13	-0,11	0,05	0,05

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

Eosinófilo obteve correlação positiva moderada para AFB_2. Hemoglobina apresentou correlação negativa baixa para AFB_1 e negativa moderada para AFG_1.

Frangos de corte com 42 dias de vida não apresentaram diferenças significativas (P<0,05) para hematócrito, hemoglobina, leucócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos. Os linfócitos (50 µg/kg AFB_1 com 10 mg/kg FB_1, 350 µg/kg AFB_1 e 2450 µg/kg de AFB_1) e heterófilos (50 µg/kg AFB_1 com 10 mg/kg FB_1, 2450 µg/kg de AFB_1 e 2450 µg/kg de AFB_1 e 10 mg/kg FB_1) tiveram diferença significativa para algumas dietas (DEL BIANCHI et al., 2005).

Tessari et al. (2006b) observaram que aves alimentadas com aflatoxina e/ou fumonisina apresentaram redução (P<0,05) nos valores de hematócrito, hemoglobina e número de hemácias, com exceção do tratamento que recebeu somente 50 mg/kg de FB_1, que apresentou número de hemácias semelhante ao controle. Os índices hematimétricos HCM e VCM apresentaram um aumento significativo (P<0,05), quando comparado com o grupo controle, nas aves dos tratamentos de associação (200 µg/kg AFB_1 com 50 mg/kg FB_1 e 200 µg/kg AFB_1 com 200 mg/kg FB_1), sendo que o VCM também apresentou aumento significativo (P<0,05) em outros dois tratamentos (50 µg/kg AFB_1 com 200 mg/kg FB_1 e 200 µg/kg AFB_1). O CHCM apresentou redução (P<0,05) em todos os tratamentos, exceto nos tratamentos 50 mg/kg FB_1 e 50 µg/kg AFB_1 com 50 mg/kg FB_1.

Andretta et al. (2012) verificaram que as micotoxinas reduziram (P <0,05) o hematócrito (-5%), hemoglobina (-15%), leucócitos (-25%), heterófilos (-2%), e linfócitos (-2%).

5.11.4 Títulos de Anticorpos e Resíduos

Na tabela 27 encontram-se as correlações entre os títulos de anticorpos contra Newcastle e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no fígado de frangos de corte.

Tabela 27. Coeficiente de correlação[1] entre a títulos de anticorpos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte.

	Títulos de Anticorpos contra a Doença de Newcastle			
	16 dias	27 dias	34 dias	41 dias
AFB_1	0,03	0,01	-0,21	0,05
AFG_1	0,12	0,11	-0,31	-0,002
AFB_2	0,02	-0,20	-0,21	-0,003
AFCol	-0,11	-0,08	-0,26	0,002
FB_1	0,02	-0,17	-0,15	-0,10
FB_2	0,04	-0,07	-0,13	-0,07

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

Não houve correlação significativa entre os títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado.

Na tabela 28 encontram-se as correlações entre os títulos de anticorpos contra Newcastle e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no músculo peitoral de frangos de corte.

Tabela 28. Coeficiente de correlação[1] entre a títulos de anticorpos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte.

	Títulos de Anticorpos contra a Doença de Newcastle			
	16 dias	27 dias	34 dias	41 dias
AFB_1	-0,01	0,05	-0,25	0,14
AFG_1	-0,07	0,08	-0,18	-0,07
AFB_2	-0,12	-0,14	-0,05	-0,14
FB_1	0,28	-0,17	-0,16	-0,18
FB_2	0,28	-0,17	-0,17	-0,18

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

Não houve correlação significativa entre os títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral.

A imunossupressão causada pela aflatoxina é resultado da inibição de tecidos imunológicos específicos e da inibição da síntese de imunoglobulinas específicas (THAXTON et al., 1974).

5.10.5 Histopatologia e Resíduos

Na tabela 29 encontra-se a correlação entre a histopatologia dos órgãos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no fígado de frangos de corte.

Tabela 29. Coeficiente de correlação[1] entre a histopatologia e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte.

	Fígado	Rim	Coração	Bursa de Fabricius
AFB_1	**0,60**	**0,60**	0,32	**0,60**
AFG_1	**0,73**	**0,73**	**0,41**	**0,73**
AFB_2	**0,65**	**0,65**	0,29	**0,65**
AFCol	**0,39**	**0,39**	0,31	**0,39**
FB_1	0,14	0,14	**0,48**	0,14
FB_2	0,11	0,11	**0,38**	0,11

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

Fígado, rim e bursa de Fabricius apresentaram correlações positivas moderadas para AFB_1 e AFB_2, positivas altas para AFG_1 e positivas baixas para AFCol. Isso quer dizer que quanto maior a concentração dos resíduos, principalmente da AFB_1, AFG_1 e AFB_2, maior será o efeito negativo nos órgãos. O coração obteve correlação positiva moderada para AFG_1 e FB_1 e positiva baixa FB_2.

Na tabela 30 encontra-se a correlação entre a histopatologia dos órgãos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no músculo peitoral de frangos de corte.

Tabela 30. Coeficiente de correlação[1] entre a histopatologia e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte.

	Fígado	Rim	Coração	Bursa de Fabricius
AFB_1	**0,35**	**0,35**	0,28	**0,35**
AFG_1	**0,59**	**0,59**	0,34	**0,59**
AFB_2	**0,58**	**0,58**	0,22	**0,58**
FB_1	**0,36**	**0,36**	**0,38**	**0,36**
FB_2	0,21	0,21	**0,36**	0,21

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

Fígado, rim e bursa de Fabricius apresentaram correlações positivas baixas para AFB_1 e FB_1 e positivas moderadas para AFG_1 e AFB_2. O coração obteve correlação positiva baixa para FB_1 e FB_2.

As correlações encontradas nos resíduos do fígado apresentaram correlações mais fortes com a histopatologia dos órgãos quando comparado com os resíduos do músculo.

Denli et al. (2009), verificaram que o fígado de frangos alimentados com 1,0 mg/kg de AFB_1 apresentaram degeneração vacuolar dos hepatócitos, inflamação perilobular, hiperplasia do ducto biliar e hipertrofia. Tessari et al. (2006a) verificaram mudanças histopatológicas leves a severas nos fígados de todos os tratamentos com aflatoxina (0, 50 e 200 µg/kg) e/ou fumonisina (0, 50 e 200 mg/kg).

5.11.6 Biometria de Órgãos e Resíduos

Na tabela 31 encontra-se a correlação entre a biometria dos órgãos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no fígado de frangos de corte.

Tabela 31. Coeficiente de correlação[1] entre a biometria e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado de frangos de corte.

	PR Fígado	PR Rim	PR Coração	PR Bursa de Fabricius
AFB_1	**0,46**	**0,46**	**0,40**	0,07
AFG_1	**0,64**	**0,64**	**0,59**	0,11
AFB_2	**0,55**	**0,57**	**0,43**	0,05
AFCol	**0,47**	**0,41**	0,28	0,16
FB_1	-0,28	-0,21	-0,08	-0,20
FB_2	-0,24	-0,25	-0,11	-0,18

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

Peso relativo (PR) de fígado e rim apresentaram correlações positivas moderadas para AFB_1, AFG_1, AFB_2 e AFCol. O peso relativo do coração obteve correlação positiva moderada para AFB_1, AFG_1 e AFB_2.

Na tabela 32 encontra-se a correlação entre a biometria dos órgãos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no músculo peitoral de frangos de corte.

Tabela 32. Coeficiente de correlação[1] entre a biometria e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte.

	PR Fígado	PR Rim	PR Coração	PR Bursa de Fabricius
AFB_1	**0,38**	**0,42**	0,30	0,11
AFG_1	**0,59**	**0,62**	**0,55**	-0,03
AFB_2	**0,33**	**0,47**	**0,40**	-0,23
FB_1	0,005	0,03	0,07	-0,35
FB_2	-0,10	-0,09	-0,02	-0,31

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

Peso relativo de fígado apresentou correlação positiva baixa para AFB_1 e AFB_2 e positiva moderada para AFG_1. Peso relativo de rim apresentou correlação positiva moderada para AFB_1, AFG_1 e AFB_2. O peso relativo do coração obteve correlação positiva moderada para AFG_1 e AFB_2.

Del Bianchi et al. (2005) não encontraram diferença estatística (P<0,05) para a média do peso relativo dos órgãos coletados (coração, fígado, bursa de Fabricius, timo, pâncreas, proventrículo e rins) em nenhum dos tratamentos com AFB_1 (0, 50, 350 ou 2450 µg/kg) e/ou FB_1 (0 ou 10 mg/kg). Já Denli et al. (2009) observaram aumento (P<0,05) do peso relativo do fígado de aves alimentadas com aflatoxina (1 mg/kg) e não observaram diferença para o peso do baço.

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) e, portanto, também apresenta aumento de peso.

5.11.7 Resíduos de Aflatoxina e Fumonisina no Fígado e Músculo

Na tabela 33 encontram-se as correlações entre os resíduos de aflatoxina e fumonisina presentes no fígado e músculo de frangos de corte.

Tabela 33. Coeficiente de correlação[1] entre a títulos de anticorpos e os resíduos de aflatoxina e fumonisina no músculo peitoral de frangos de corte.

	Resíduos de Aflatoxina e Fumonisina no Músculo				
	AFB_1	AFG_1	AFB_2	FB_1	FB_2
AFB_1 fígado	0,15	**0,59**	**0,49**	**0,39**	0,16
AFG_1 fígado	0,32	**0,61**	**0,41**	0,25	0,01
AFB_2 fígado	0,23	**0,59**	**0,52**	**0,48**	0,19
AFCol fígado	**0,74**	**0,41**	0,04	-0,12	-0,20
FB_1 fígado	-0,27	-0,16	0,26	**0,68**	**0,75**
FB_2 fígado	-0,20	-0,19	0,09	**0,52**	**0,56**

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

O resíduo de AFB_1, no músculo, teve correlação positiva alta com o resíduo de AFCol, no fígado. O resíduo de AFG_1, no músculo, apresentou correlação positiva moderada com os resíduos de AFB_1, AFG_1, AFB_2 e AFCol, no fígado. O resíduo de AFB_2, no músculo, obteve correlação positiva moderada com os resíduos de AFB_1, AFG_1, AFB_2, no fígado. O resíduo de FB_1, no músculo, teve correlação positiva baixa com o resíduo de AFB_1, e positiva moderada para AFB_2, FB_1 e FB_2, no fígado. O resíduo de FB_2, no músculo, apresentou correlação positiva alta com o resíduo de FB_1 e positiva moderada com FB_2, no fígado.

Denli et al. (2009) verificaram que dietas contendo somente aflatoxina (1,0 mg/kg) apresentaram 0,166 µg/kg de resíduo de AFB_1 no fígado de frangos de corte.

As aves são geralmente consideradas como resistentes às fusariotoxinas, entre elas as fumonisinas. Essa resistência pode ser explicada tanto pela baixa sensibilidade aos mecanismos de toxicidade das fusariotoxinas ou pelas diferentes propriedades toxicocinéticas. De fato, é geralmente aceito que a absorção das fusariotoxinas pelas aves seja limitada e que

sua eliminação seja rápida, reduzindo assim o risco de toxicidade e persistência nos tecidos. Consequentemente, a exposição humana a essas micotoxinas através do consumo de carne e ovos de aves é considerada insignificante se comparada com a exposição através do consumo de cereais (GUERRE, 2015).

Há um crescente aumento na preocupação com os resíduos de micotoxinas presentes em produtos de origem animal pois, ao serem ingeridos, podem causar efeitos negativos, geralmente de médio a longo prazo, no consumidor final.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos do trabalho, tem-se que:

- Não houve efeito de interação entre os fatores estudados (AFB_1 + FB_1 + CMT), para as variáveis do desempenho zootécnico.
- A AST e LDH foram as únicas variáveis significativas para a interação de todos os fatores para a bioquímica sérica e fósforo. As proteínas séricas foram afetadas pela presença de aflatoxina, mostrando que não houve melhora com a adição da cúrcuma.
- Não houve diferença para os parâmetros histopatológicos do fígado, rim, coração e Bursa de Fabricius entre os tratamentos com e sem cúrcuma. Também não houve nenhuma variável significativa para a interação de todos os fatores avaliados, para a biometria dos órgãos aos 42 dias. O uso da cúrcuma não foi eficaz na redução do tamanho dos órgãos estudados.
- Não houve nenhuma variável significativa para a interação de todos os fatores avaliados, para o hemograma aos 21 dias. Para o hemograma aos 42 dias, leucócitos, linfócitos e basófilos foram as únicas variáveis significativas para a interação de todos os fatores.
- Resíduos de AFB_1 não metabolizada, AFG_1, AFB_2, aflatoxicol, FB_1 e FB_2 apresentaram níveis quantificáveis no fígado. Para o músculo peitoral, somente os resíduos de AFB_1 não metabolizada, AFG_1, AFB_2, FB_1 e FB_2 foram quantificados.
- No fígado, somente o resíduo de FB_2 foi significativo para a interação dos fatores e no músculo peitoral somente o resíduo de AFB_2, demonstrando que que não houve melhora dos níveis residuais das micotoxinas no fígado e músculo peitoral, com a adição da cúrcuma na ração.
- As concentrações dos resíduos de aflatoxinas e fumonisinas nos tecidos foram baixos, porém o consumo de fígado e/ou músculo contendo os níveis encontrados é preocupante pois podem contribuir para a ingestão total de micotoxinas pelos consumidores.
- Os dados dos títulos de anticorpos para a doença de Newcastle sugerem a ocorrência de falhas vacinais, pois os valores dos títulos ficaram abaixo do esperado, mesmo para os tratamentos controle e somente com adição de

cúrcuma. Mesmo assim, títulos menores de anticorpos foram observados para os tratamentos contendo aflatoxina e/ou fumonisina, indicando um efeito das mesmas sobre a resposta imunológica humoral das aves.

- As concentrações de resíduos de aflatoxinas e fumonisinas no fígado ou músculo peitoral apresentaram correlações positivas com as variáveis analisadas na histopatologia, biometria de órgãos e resíduos, e negativas para parâmetros do hemograma aos 42 dias, no fígado. Correlações positivas e negativas foram observadas no desempenho, bioquímica sérica e hemograma, para os resíduos de aflatoxina e fumonisina no fígado e músculo.
- A utilização do antioxidante (cúrcuma), na concentração utilizada no presente experimento, não ocasiou melhora significativa nos parâmetros estudados. É possível, portanto, que a concentração da cúrcuma a ser adicionada deva ser maior para produzir um efeito benéfico do antioxidante, porém não tão alta a ponto de ocorrer ação pró-oxidante, que é indesejável na ração dos frangos.
- Outros estudos são necessários para avaliar a quantidade ideal de cúrcuma a ser adicionada, observando-se as concentrações de curcuminóides totais presentes nessa cúrcuma, principalmente de curcumina, responsável pelo efeito antioxidante.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, H.K.; DUKE, S.O.; TANAKA, T. Phitotoxicity of fumonisin and related compounds. **Journal of Toxicology** – Toxin Reviews, New York, v.12, p.225-251, 1993.

ABDEL-WAHHAB, M.A.; HASSAN, N.S.; EL-KADY, A.A.; KHADRAWY, Y.A.; EL-NEKEETY, A.A.; MOHAMED, S.R.; SHARAF, H.A.; MANNAA, F.A. Red ginseng extract protects against aflatoxin B_1 and fumonisins-induced hepatic pre-cancerous lesions in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.733-742, 2010.

ABDULMAJEED, N.A. Therapeutic ability of some plant extracts on aflatoxin B_1 induced renal and cardiac damage. **Arabian Journal of Chemistry**, v.4, p.1-10, 2011.

ABEL, S.; GELDERBLOM, W.C.A. Oxidative damage and fumonisin B_1-induced toxicity in primary hepatocytes and rat liver in vivo. **Toxicology**, Amsterdam, v.131, p.121-131, 1998.

ADLER, J.; PARMRYD, I. Quantifying colocalization by correlation: The Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. **Journal of the International Society for Advancement of Cytometry**, v.77A, p. 733-742, 2010.

AK, TUBA; GÜLÇIN, ILHAMA. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemo-Biological Interactions**, Amsterdam, v.174, p.27-37, 2008.

ANDRETTA, I.; KIPPER, M.; LEHNEN, C.R.; LOVATTO, P.A. Meta-analysis of the relationship of mycotoxins with biochemical and hematological parameters in broilers. **Poultry Science**, v.91, p.376-382, 2012.

ARAFA, A.S.; BLOOMER, R.J.; WILSON, H.R.; SIMPSON, C.F.; HARMS, R.H. Susceptibility of various poultry species to dietary aflatoxin. **British Poutry Science**, v.52, p.431-36, 1981.

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

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.; 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 B_1. **Toxicon**, Oxford, v.47, p.41-46, 2006.

BOUTIGNY, A.L.; BARREAU, C.; ATANASOVA-PENICHON, V.; VERDAL-BONNIN, M.N.; PINSON-GADAIS, L.; RICHARD-FORGET, F. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. **Mycological Research**, Amsterdam, v.113, p.746–753, 2009.

BROOMHEAD, J.N.; D.R. LEDOUX; A.J. BERMUDEZ; G.E. ROTTINGHAUS. Chronic effects of fumonisin B_1 in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. **Poultry Science**, Champaign, 81: 56-61, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 07/2011**, de 22 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Estabelece limites para micotoxinas em alimentos, principalmente em grãos. Portal da Anvisa de 22 de fevereiro de 2011.

CALDAS, E.D.; SILVA, A.C. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.7974–80, 2007.

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.

CHENG, Y.H.; SHEN, T.F.; PANG, V.F.; CHEN, B.J. Effects of aflatoxin and carotenoids on growth performance and immune response in mule ducklings. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, Amsterdam, v.128, p.19-26, 2001.

CHI, F.; BROOMHEAD, J. Mycotoxins and Poultry: A Review for Poultry Producers. **Amlan International**, Chicago, p. 312-321, 2008.

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

COMA, V.; PORTES, E.; GARDRAT, C.; RICHARD-FORGET, F.; CASTELLAN, A. *In vitro* inhibitory effect of tetrahydrocurcuminoids on *Fusarium proliferatum* growth and fumonisin B_1 biosynthesis. Food Additives and Contaminants, v.28, p.218-225, 2011.

CORRIER, D.E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.30, p.73-87, 1991.

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

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

DALVI, R.R.; ADEMOYERO, A.A. Toxic effects of aflatoxin B_1 in chickens given feed contaminated with *Aspergillus flavus* and reduction of the toxicity by activated charcoal and some chemical agents. **Avian Diseases**, v.28, p.61–69, 1984.

DE LIGUORO, M.; PETTERINO, C.; MEZZALIRA, G.; TENTI, S.; RAVAROTTO, L. Field observations in pigs exposed to fumonisin B_1 contaminated feed. **Veterinary Human Toxicology**, v.46, p.303-05, 2004.

DEL BIANCHI, M.; OLIVEIRA, C.A.F.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J.L.; CORREA, B. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B_1 and fumonisin B_1 in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.84, p.1835-1840, 2005.

DENLI, M.; BLANDON, J.C.; GUYNOT, M.E.; SALADO, S.; PEREZ, J.F. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and

aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B_1. **Poultry Science**, Champaign, v.88, p.1444-1451, 2009.

EL-NEKEETY, A.A.; EL-KHOLY, W.; ABBAS, N.F.; EBAID, A.; AMRA, A.A.; ABDEL-WAHHAB, M.A. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. **Toxicon**, v.50, p.256-269, 2007.

EMADI, M.; KERMANSHAHI, H. Effects of turmeric rhizome powder on the activity of some blood enzymes in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.6, p.48-51, 2007.

EPSTEIN, J.; SANDERSON, I.R.; MACDONALD, T.T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from *in vitro*, animal and human studies. **British Journal of Nutrition**, v.103, p.1545-1557, 2010.

FAIRBROTHER, A.; SMITS, J.; GRASMAN, K.A. Avian immunotoxicology. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B**, v.7, p.105-37, 2004.

FARNOCHI, M.C.; TORRES, A.M.; MAGAN, N.; CHULZE, S.N. Effect of antioxidants and competing mycoflora on *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* populations and fumonisin production on maize grain. **Journal of Stored Products Research**, v.41, p.211-219, 2005.

FERNANDEZ, A.; VERDE, M.T.; GASCON, M. 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.

GALVANO, F.; PIVA, A.; RITIENI, A.; GALVANO, G. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. **Journal of Food Protection**, v.64, p.120-131, 2001.

GELDERBLOM, W. C. A., K. JASKIEWICZ, W. F. O. MARASAS, P. G. THIEL, R. M. HORAK, R. VLEGGAAR, and N. P. J. KRIEK. Fumonisins: Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1806–1811, 1988.

GIAMBRONE, J.J.; DIENER, U.L.; DAVIS, N.D.; PANANGALA, V.S.; HOERR, F.J. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. **Poultry Science**, v.64, p.1678-1684, 1985.

GIAMBRONE, J.J.; EWERT, D.L.; WYATT, R.D.; EIDSON, C.S. Effect of aflatoxin on the humoral and cell-mediated immune systems of the chicken. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 39, p.305-308, 1978.

GIROLAMO, A.; SOLFRIZZO, M.; HOLST, C.; VISCONTI, A. Comparison of different extraction and clean-up procedures for the determination of fumonisins in maize and maize-based food products. **Food Additivies and Contaminants**, v. 18, p. 59-67, 2001.

GOWDA, N.K.S.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; BERMUDEZ, A.J.; CHEN, Y.C. Efficacy of Turmeric (*Curcuma longa*), containing a known level of curcumin, and a

hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the adverse effects of aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.87, p.1125-1130, 2008.

GOWDA, N.K.S.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; BERMUDEZ, A.J.; CHEN, Y.C. Antioxidant efficacy of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) powder in broiler chickens fed diets containing aflatoxin B_1. **British Journal of Nutrition**, v.102, p.1629-1634, 2009.

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.

GUENGERICH, F.P. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. **Annual Review of Pharmacology Toxicology**, v.39, p.1-17, 1999.

GUERRE, P. Fusariotoxins in avian species: Toxicokinetics, Metabolism and Persistence in tissues. **Toxins**, v.7, p.2289-2305, 2015.

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

HE, J.; ZHANG, K.Y.; CHEN, D.W.; DING, X.M.; FENG, G.D.; AO, X. Effects of vitamin E and selenium yeast on growth performance and immune function in ducks fed maize naturally contaminated with aflatoxin B_1. **Livestock Science**, v.152, p.200-207, 2013.

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

HUFF, W.E.; L.F. KUBENA; R.B. HARVEY; D.E. CORRIER; H.H. MOLLENHAUER. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v.65, p.1891–1899, 1986.

HUSSAIN, Z.; KHAN, M. Z.; KHAN, A.; JAVED, I.; SALEEMI, M. K.; MAHMOOD, S.; ASI, M. R. Residues of aflatoxin B_1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B_1 levels. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.48, p.3304-3307, 2010.

[IARC] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – World Health Organization. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, v.100F, 2012.

[IARC] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – World Health Organization. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, v.82, p.601, 2002.

IQBAL, S.Z.; NISAR, S.; ASI, M.R.; JINAP, S. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. **Food Control**, v.43, p. 98-103, 2014.

JACOBSON, W.C.; WISEMAN, H.G. The transmission of aflatoxin B_1 into eggs. **Poutry Science**, Champaign, v.53, p.1743-5, 1974.

JAVED, T.; DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; RICHARD, J.L.; BENNET, G.A.; COTE, L.M.; BUCK, W.A. Serohematologic alterations in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or fumonisin B_1 and moniliform. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.520-526, 1995.

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

JHA, A.; KRITHIKA, R.; MANJEET, D.; VERMA, R.J. Protective effect of black tea infusion on aflatoxin-induced hepatotoxicity in mice. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v.3, p.29-36, 2013.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.70, p.102-110, 2013.

KLICH, M. A.; TANG, S.; DENNING, D. W. Aflatoxin and Ochratoxin production by *Aspergillus* species under ex vivo conditions. **Mycopathologia**, v.168, p.185–191, 2009.

KOKOSHAROV, T. Changes in the White blood cells and specific phagocytosis in chicken with experimental acute fowl typhoid. **Veterinarski Arhiv**, v.68, p.33-38, 1998.

KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, T.S.; BAILEY, R.H.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of long-term feeding of diets containing monififormin, supplied by *Fusarium fujikuori* culture material, and fumonisin, supplied by *Fusarium moniliforme* culture material, to laying hens. **Poultry Science**, Champaign, v.78, n.12, p.1499-1505, 1999.

LATTANZIO, V.M.T.; DELLA GATTA, S.; SUMAN, M.; VISCONTI, A. Development and in house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction – LC-MS/MS method for the quantitative determination of aflatoxins B_1, B_2, G_1, G_2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal based foods. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v.25, p.1–12, 2011.

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

LEBLANC, J.C.; TARD, A.; VOLATIER, J.L.; VERGER, P. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French total diet study. Food Additives & Contaminants, v.22, p.652-672, 2005.

LEDOUX D.R.; BROOMHEAD, J.N.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS G.E. Individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B_1 and moniliformin in broiler chicks. **Avian Diseases**, v.47, p.1368-1375, 2003.

LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G. E.; BERMUDEZ, A. J.; ALONSO-DEBOLT, M. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. **Poutry Science**, Champaign, v.77, p.204-210, 1998.

LEDOUX, D.R.; WEIBKING, T.S.; ROTTINGHAUS, G.E.; BROWN, T.P. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B_1 on turkey poults. **Poutry Science**, Champaign, v.71 (Suppl. 1), p.162 (abstr), 1992.

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

LEE, S.E.; CAMPBELL, B.C.; RUSSEL, J.; et al. Inhibitory effects of naturally occurring compounds on aflatoxin B_1 biotransformation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.5171-5177, 2001.

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

LI, Y.C.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; FRITSCHE, K.L.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of fumonisin B_1 on selected immune responses in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.78, p.1275-1282, 1999.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 3rd edn, pp. 12-46 (New York, McGraw-Hill), 1968.

MAHESHWARI, R.K.; SINGH, A.K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C**.** Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences**, v.78, p.2081-2087, 2006.

MAJID, G.A.; RANGSAZ, N.; AZIZI, S. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) effect on biochemical and pathological parameters of liver and kidney in chicken aflatoxicosis. **Pharmaceutical Biology**, p.1-8, 2015.

MARQUARDT, R.R; FROHLICH, A.A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3969-3988, 1992.

MERRIL, A.H.; SCHMELZ, E.M.; DILLEHAY, D.L.; SPIEGEL, S.; SHAYMAN, J.A.; SCHROEDER, J.J.; RILEY, R.T.; VOSS, K.A.; WANG, E. Sphingolipidids - the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.142, p.208-225, 1997.

MEYER, K.; MOHR, K.; BAUER, J.; HORN, P.; KOVÁCS, M. Residue formation of fumonisin B_1 in porcine tissues. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.7, p.639-647, 2003.

MONTASSIER, H.J. Importância da imunidade em pintos na primeira semana de vida. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 1998, Campinas. Anais. Campinas, p.99-120, 1998.

MORGULIS, M.S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds.). Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 375p., 2002.

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

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food mycotoxins: An update. **Journal of Food Science**, v.71, p.R51-R65, 2006.

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

NAYAK, S.; SASHIDHAR, R.B. Metabolic intervention of aflatoxin B1 toxicity by curcumin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.641-644, 2010.

NEEFF, D.V.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; BERMUDEZ, A.J.; DAKOVIC, A.; MURAROLLI, R.A.; OLIVEIRA, C.A. In vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B1. **Poultry Science**, Champaign, v.92, p.131–7, 2013.

NELSON, P.E.; PLATTNER, R.D.; SHACKELFORD, D.D.; DESJARDIN, A.E. Production of fumonisins by Fusarium moniliforme strains from various substrates and geographic areas. **Applied and Environmental Microbiology.** v.57, p.2410-2412. 1991.

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

NORRED, W.P.; VOSS, K.A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human oesophageal cancer. **Journal of Food Protection**, v.57, p.522-527, 1994.

OBIOHA, W.I.; STAHR, H.M.; FRAFT, A.A. Distribution and effects of aflatoxin in chicken tissues after feeding radiolabelled (^{14}C) aflatoxin B_1. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.49, p.799-805, 1986.

OLIVEIRA, C.A.F.; CORASSIN, C.H. Aflatoxins. In: Duarte, S.C.; Pena, A.L.S.; Lino, C.M. (Org.). Mycotoxins and their implications in food safety. 1 ed. London, UK: Future Medicine Ltd., v.1, p.6-19, 2014.

OLIVEIRA, C.A.F.; CORASSIN, C.H.; CORRÊA, B.; OSWALD, I.P. Animal Health: Mycotoxins. In: Neal K. Van Alfen. (Org.). Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, 2nd Edition. 2 ed. Oxford, UK: Elsevier Limited, v.4, p.358-377, 2014.

OLIVEIRA, C.A.F.; JAGER, A. V.; CORASSIN, C. H.; BOVO, F.; REDDY, K. R. Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M. (Ed.). **Aflatoxins:** recent advances and futures prospects. Rijeka, Croatia: InTech, p. 59-92, 2013.

OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIAO, L. S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 1, p. 147-152, 2008.

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 Appied Science, Amsterdam, p.473-82, 1986.

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

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

POZZI, C.R.; ARCARO, J.R.P.; ARCARO Jr., I.; FAGUNDES, H., CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural,** Santa Maria, v.32, n.5, p.901-907, 2002.

PRELUSKY, D.B.; TRENHOLM, H.L.; ROTTER, B.A.; MILLER, J.D.; SAVARD, M.E.; YEUNG, J.M.; SCOTT, P.M. Biological fate of fumonisin B_1 in food producing animals. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.392, p.265-278, 1996.

PRELUSKY, D.B.; TRENHOLM, H.L.; SAVARD, M.E. Pharmacokinetic fate of ^{14}C-labelled fumonisin B_1 in swine. **Natural Toxins**, v.2, p.73-80, 1994.

QURESHI, M.A.; HANGLER Jr., W.M. Effect of fumonisin B_1 on chicken macrophage functions *in vitro*. **Poultry Science**, Champaign, v.71, p.102-104, 1992.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.8, p.202-251, 2009.

RATCLIFF, J. The Role of Mycotoxins in Food and Feed Safety. Animal Feed Manufacturers Association, South Africa. 2002.

RAUBER, R.H.; OLIVEIRA, M.S.; MALLMANN, A.O.; DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; GIACOMINI, L.Z.; NASCIMENTO, V.P. Efeitos da fumonisina B_1 sobre respostas biológicas e desempenho de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p.1081-1086, 2013.

RAWAL, S.; KIM, J.E.; COULOMBE Jr., R. Aflatoxin B_1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, London, v.89, p.325-331, 2010.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, I.D.; OSWEILLER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *F.proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3225-3226, 1990.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição dos alimentos e exigências nutricionais**. 3ª Edição. Viçosa: UFV. 252p., 2011.

SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H.; GIANNATTASIO, C.M.P. Ocorrência de aflatoxina B_1 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.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O.; GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins in maize in Brasil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, London, v.6, p.327-31, 1989.

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

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**, v.52, p.465–473, 1973.

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

SCOTT, P.M. Recent research on fumonisins: a review. Food Additives and Contaminants, v.29, p. 242-248, 2012.

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

SET, E., ERKMEN, O. The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, 2010.

SHARMA, J.M. Introduction to poultry vaccines and immunity. **Advances in Veterinary Medicine**, v.41, p.481-94, 1999.

SHARMA. J.M. Effected of infectious bursal disease virus on protection against Marek's disease by turkey herpesvirus vaccine. **Avian Diseases**, v.28, p.629-640, 1984.

SHEPHARD, G.S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, v.815, n.1, p.31. 1998.

SHEPHARD, G.S.; SYDENHHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLOM, W.G.A. Quantitative determination of fumonisins B_1 and B_2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, p.2077-87, 1990.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. Initial studies on the toxicokinetics of fumonisin B_1 in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.30, p.277-279, 1992.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; ALBERTS, J.F. Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B_1 in a non-human primate. **Toxicon**, v.32, p.735-741, 1994.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SAVARD, M.E. Fate of a single dose of ^{14}C-labelled fumonisin B_1 in vervet monkeys. **Natural Toxins**, v.3, p. 145-150, 1995.

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

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

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

SHOTWEEL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; STUBBLEFIELD, R. D.; SORENSON, W. G. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology**, Washington, v. 14, p. 425-428, 1966.

SIRANIDOU, E.; KANG, Z.; BUCHENAUER, H. Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defense response in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. **Phytopathology**, v.92, p.200–208, 2002.

SMITH, G.W. **Fumonisins**. In: GUPTA, R.C. Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles. Second Edition, Academic Press: Elsevier, California, 2012.

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

SODHI, S.; SHARMA, A.; BRAR, A.P.S.; BRAR, R.S. Effect of α tocopherol and selenium on antioxidant status, lipid peroxidation and hepatopathy induced by malathion in chicks. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.82-86, 2008.

SONI K.B.; LAHIRI, M.; CHACKRADEO, P. et al. Protective effect of food additives on aflatoxin-induced mutagenicity and hepatocarcinogenicity. **Cancer Letters**, v.115, p.129-133, 1997.

SPANJER, M.C.; RENSEN, P.M.; SCHOLTEN, J.M. LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.25, p.472-489, 2008.

SRIVASTAVA, R. M.; SINGH, S.; DUBEY, SHIV. K. et al. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. **International Immunopharmacology**. v. 11, p. 331-341, 2011.

STURKIE, P.D. Blood: physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. In: STURKIE, P.D. (ED.). Avian physiology. New York: Springer-Verlag, p.53-75, 1976.

SUR, E.; CELIK, I. Effects of aflatoxin B_1 on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken, **British Poultry Science**, London, v.44, p. 558-566, 2003.

SURAI, P.F. Natural antioxidants and mycotoxins. In: **Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction**, 1st ed., pp. 455-509. Nottingham: Nottingham University Press, 2002.

TARDIEU, D.; BAILLY, J.D.; SKIBA, F.; GROSJEAN, F.; GUERRE, P. Toxicokinetics of fumonisin B_1 in turkey poults and tissue persistence after exposure to a diet containing the maximum European tolerance for fumonisins in avian feeds. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3213-3218, 2008.

TARDIEU, D.; BAILLY, J.D.; BENLASHEHR, I.; AUBY, A.; JOUGLAR, J.Y; GUERRE, P. Tissue persistence of fumonisin B_1 in ducks and after exposure to a diet containing the maximum European tolerance for fumonisins in avian feeds. Chemico-Biological Interactions, v.182, p.239-244, 2009.

THAXTON, J.P.; TUNG, H.T.; HAMILTON, P.B. Immunosuppression in chickens by aflatoxin. **Poultry Science**, Champaign, v.53, p.721-725, 1974.

TESSARI, E.N.C.; OLIVEIRA, C.A.F; CARDOSO, A.L.S.P.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of aflatoxin B_1 and fumonisin B_1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. **British Poultry Science**, London, v.47, p.357-364, 2006a.

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

THERON, J.J.; LIEBENBERG, N; JOUBERT, H.J.B. Histochemistry and electron microscopy of acute liver lesions induced by aflatoxin B_1 in ducklings. **Nature**, London, v.206, p.908-909, 1965.

TIZARD, I.R. O uso de Vacinas. In: TIZARD, I.R. (Ed.). **Imunologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 272-282, 2014.

TODA, S.; MIYASE, T.; ARICHI, H. et al. Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 1725-1728, 1985.

TRUCKSESS, M.W.; STOLOFF, L.; PONS, W.A. Jr; CUCULLU, A.F.; LEE, L.S.; FRANZ, A.O. Jr. Thin layer chromatographic determination of aflatoxin B_1 in eggs. **Journal of Association of Analytical Chemists**, Arlington, v.60, p.795-8, 1977.

TRUCKSESS, M.W.; STOLOFF, L.; YOUNG, K. Aflatoxicol and aflatoxins B_1 and M_1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. **Poutry Science**, Champaign, v.62, p.2176-82, 1983.

TUNG, H.T.; WYATT, R.D.; THAXTON, P.; HAMILTON, P. B. Impairment of kidney function during aflatoxicosis. **Poultry Science.** Champaign, v.52, p.873-78, 1973.

TUNG, H.T.; COOK, F. W.; WYATT, R.D.; HAMILTON, P. B. The anemia caused by aflatoxin. **Poultry Science.** Champaign, v.54, p.1962-69, 1975.

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

VICAM, L.P. **Aflatest® instruction manual**. Watertown, MA, USA: Vicam, 1999.

VUDATHALA, D.K.; PRELUSKY, D.B.; AYROUD, M.; TRENHOLM, H.L.; MILLER, J.D. Pharmacokinetic fate and pathological effects of ^{14}C-fumonisin B_1 in laying hens. **Natural Toxins**, v.2, p.81-88, 1994.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRILL, A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.266, p.14486-90, 1991.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of feeding Fusarium moniliforme culture material, containing know levels of fumonisin B_1, on the young broiler chick. **Poultry Science**, Champaign, v.72, p.456-66, 1993.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of feeding Fusarium moniliforme culture material, containing know levels of fumonisin B_1, and aflatoxin B_1 in the young turkey poult. **Poultry Science**, Champaign, v.73, p.1517–1525, 1994.

WINTROBE, M.M. Macroscopic examination of the blood: discussion of its value and description of the use of a single instrument for the determination of sedimentation rate, volume of packed red cells, leukocytes and platelets, and of icterus index. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.185, p.58–71, 1933.

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

WOLZAK, A. PEARSON, A.M.; COLEMAN, T.H.; PESTKA, J.J; GRAY, J.I. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.23, p.1057-61, 1985.

WYATT, R.D. **Poultry**. In: SMITH, J.E.; HENDENSON, 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. **Poutry Science**, Champaign, v.66, p.1901-04, 1987.

YARRU, L.P.; SETTIVARI, R.S.; GOWDA, N.K.S.; ANTONIOU, E.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems of broiler chicks fed aflatoxin. **Poultry Science**, Champaign, v.88, p.2620-2627, 2009.

YU, F.L. Mechanism of aflatoxin B_1 inhibition of rat hepatic nuclear RNA synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.252, p.3245-3251, 1977.

YUNUS, A.W.; RAZZAZZI-FAZELI; BOHM, J. Aflatoxin B_1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues. **Toxins**, Basel, v.3, p.566-590, 2011.

APÊNDICE

CAPÍTULO 13

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

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

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

RESUMO

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