UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MAYRA CARRARO DI GREGORIO

**Determinação de biomarcadores de aflatoxina B₁ e aplicabilidade na
avaliação da eficiência de adsorventes em suínos**

Pirassununga

2016

MAYRA CARRARO DI GREGORIO

**Determinação de biomarcadores de aflatoxina B₁ e aplicabilidade na
avaliação da eficiência de adsorventes em suínos**

Versão corrigida

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

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)

D536d Di Gregorio, Mayra Carraro
Determinação de biomarcadores de aflatoxina B1 e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em suínos / Mayra Carraro Di Gregorio ; orientador Carlos Augusto Fernandes Oliveira. -- Pirassununga, 2016.
182 f.

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

1. AFB1. 2. AFB1-lisina. 3. biomarcador. 4. HSCAS. 5. resíduos. I. Oliveira, Carlos Augusto Fernandes, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos que sempre me apoiaram e acreditaram em mim!

À minha família que é a minha estrutura, meu porto seguro.

Ao meu namorado, que pacientemente aguentou e me apoiou em todas as etapas!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades que colocou no meu caminho, por me guiar a fazer as melhores escolhas e sempre me dar forças para superar as dificuldades.

Ao professor Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, por sua disposição em me orientar, confiança e ensinamentos que me fizeram evoluir e amadurecer deixo os meus sinceros agradecimentos.

I thank Dr. George Rotthinghaus, who did much more than just help me realize my dream of going to the US. George helped me in everything that was possible.

À FAPESP, pelos recursos destinados à execução do projeto e bolsas concedidas (processos FAPESP 2010/20895-4 e 2012/12705-6) .

Agradeço à minha família, especialmente meus pais Regina e Nunzio, e minha irmã Thais por sempre me apoiarem independente de qual fosse a minha escolha. Ao meu avô Nicola, aos meus tios e primos, especialmente a minha tia Ana, que sempre me aconselha.

Agradeço ao meu namorado Fábio que, sempre com muito amor, me acompanhou em grande parte desta jornada, sempre me aconselhando e me apoiando nas minhas decisões.

Agradeço à todos que muito contribuíram ao longo de todo o experimento: Polly, Aline, Roseli, Daniel, Alejandro, Rodrigo, Kelly, Natália, Marina, Mariana e também aos que muito me ajudaram no dia do abate José, Roberta, Matheus, Daniele.

Ao pessoal do laboratório, especialmente Roice e as Pós-doutorandas Alessandra Jager e Tânia Petta por toda ajuda e disposição em resolver as dificuldades que apareceram.

Aos diversos amigos que fiz na FZEA, que fizeram ótima a minha vida em Pirassununga e que com certeza farão parte da minha vida por muito tempo, especialmente meus amigos Kelly, Vitor, Polly e Roney.

Agradeço às minhas amigas de república Josiane, Alemã, Aline e Luiza, por todas as risadas que demos e momentos que passamos juntas.

Agradeço ao pessoal da suinocultura do Campus e a Dra. Simone, que sempre com muito boa vontade me prepararam para as coletas de sangue do experimento. Agradeço também aos meninos da fábrica de ração da FZEA que me ajudaram nesta etapa.

Agradeço aos mestres da minha graduação Paula Rosato e Flávio Viani que são os exemplos que me inspiraram para chegar até aqui.

Aos meus amigos que fiz ao longo da vida Talita Antelo, Renata Maturino, Diego Martinelli, João Paulo Soto, Amanda Freitas, Cristina Miranda, Alexandre Baptista, Bruno Viana, entre outros que nem o tempo, nem a distância afastaram do meu coração deixo o meu muito obrigada!

Agradeço ao pessoal do Instituto de Zootecnia, Dr. Fábio, Roseli, Dra. Luciana, Érika, Bruno e Leandro pela amizade e ajuda durante a minha estadia em Nova Odessa.

A todos aqueles que, embora não tiveram seus nome aqui citado, me acompanharam nesta etapa e, de alguma forma, contribuíram para que estes quase 4 anos fossem mais felizes, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”

(Charles Chaplin)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

(Marthin Luther King)

RESUMO

DI GREGORIO, M.C. **Determinação de biomarcadores de aflatoxina B₁ e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em suínos.** 2016. 182 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

A exposição à aflatoxina B₁ (AFB₁) ocorre predominantemente através da ingestão de alimentos contaminados. A AFB₁ é biotransformada por enzimas hepáticas, levando à formação de adutos AFB₁-N⁷-guanina e AFB₁-lisina (AFB₁-Lys), entre outros compostos que podem permanecer como resíduos no fígado, tais como aflatoxina M₁ (AFM₁) e aflatoxicol (AFL). Os produtos de biotransformação da AFB₁ podem ser utilizados como biomarcadores de exposição às aflatoxinas através da dieta. O presente trabalho teve por objetivo verificar a aplicabilidade da determinação de biomarcadores de AFB₁ na avaliação da eficiência de adsorventes em suínos. Foram utilizados 24 suínos machos castrados com 28 dias de idade, que após 21 dias de adaptação foram divididos em 4 tratamentos experimentais, em arranjo fatorial 2 x 2, correspondendo à dois níveis de incorporação de AFB₁ às rações (0 e 1,1 mg/kg) e dois níveis de incorporação (0 e 0,5%) de Aluminossilicato de Cálcio e Sódio Hidratado (HSCAS) por 42 dias. Semanalmente foram analisados parâmetros de desempenho, coletadas amostras de soro e plasma para análises bioquímicas, hematológicas e dosagem de AFB₁-Lys. Nos primeiros dez dias de intoxicação foram coletadas amostras diárias de urina para análise de produtos da biotransformação de AFB₁ incluindo AFB₁-N⁷-guanina. Após este período, as coletas de urina foram semanais. Ao final do experimento, foram coletadas amostras de soro, plasma heparinizado e com EDTA para avaliação de AFB₁-Lys, e os animais foram abatidos para avaliação da carcaça e coleta de órgãos para avaliação do peso relativo, histopatologia e análise de resíduos. O HSCAS foi efetivo na adsorção *in vitro* de AFB₁, cujos percentuais de ligação variaram de 36,83 a 100%, para concentrações do adsorvente entre 0,005 e 10 mg/10 mL. A adição de HSCAS restaurou significativamente (P<0,05) os efeitos deletérios sobre a maioria dos parâmetros avaliados. Em fígado, os níveis de AFB₁, AFB₂ e AFG₁ foram menores (P<0,05) no tratamento com AFB₁ e HSCAS, indicando que houve proteção do adsorvente nos animais deste grupo. Em urina, a AFM₁ consistiu em ~93% do total de aflatoxinas excretadas quantificada. A inclusão de adsorvente nas dietas reduziu (P<0,05) os níveis urinários de AFB₁, AFQ₁ e AFB₁-N⁷-guanina durante todo o experimento. Nos níveis de AFM₁ houve redução significativa entre os dias 1 e 28 de intoxicação. Comparando-se com os resultados obtidos em soro e plasma heparinizado, os níveis de AFB₁-Lys foram fortemente suprimidos em amostras com EDTA devido à interferência deste composto no processo de digestão enzimática. Os níveis semanais de AFB₁-Lys séricos nos animais tratados com AFB₁ e HSCAS foram menores (P<0,05) do que nos animais alimentados somente com AFB₁ durante todo o período de intoxicação. Os dados indicam que níveis de AFB₁, AFM₁, AFQ₁ e AFB₁-N⁷-guanina urinária bem como AFB₁-Lys sérica podem ser utilizados como biomarcadores de exposição para aflatoxinas em suínos. Além disso, as determinações de AFB₁ e AFB₁-N⁷-guanina urinária e AFB₁-Lys sérica podem ser utilizadas para avaliar a capacidade de proteção dos adsorventes como biomarcadores de dose interna de AFB₁, sendo capazes de demonstrar a severidade da intoxicação em cada animal. Outros estudos são necessários para esclarecer a toxicocinética dos biomarcadores avaliados em suínos.

Palavras-chave: AFB₁; AFB₁-lisina; biomarcador; HSCAS; LC-MS/MS; resíduos; suínos.

ABSTRACT

DI GREGORIO, M.C. **Determination of aflatoxin B₁ biomarkers and applicability for the evaluation of adsorbent's efficacy in pigs.** 2016. 182 p. Thesis (PhD) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2016.

Exposure to aflatoxin B₁ (AFB₁) occurs primarily through ingestion of contaminated food. AFB₁ is biotransformed by liver enzymes leading to the formation of adducts AFB₁-N⁷-guanine and AFB₁-lysine (AFB₁-lys), among other compounds which may remain as residue in the liver, such as Aflatoxin M₁ (AFM₁) and aflatoxicol (AFL). The products of AFB₁ biotransformation can be used as exposure biomarkers to aflatoxins through diets. This study aims to verify the applicability of the determination of AFB₁ biomarkers in the evaluation of adsorbents efficiency in swine. Twenty four barrows with 28 days of age were used. After 21 days of adaptation they were divided into 4 experimental treatments in a factorial 2 x 2, corresponding to two AFB₁ incorporation levels to feed (0 to 1.1 mg / kg) and incorporating two levels (0 and 0.5%) of sodium calcium aluminosilicate hydrate (HSCAS) for 42 days. Performance parameters were weekly analyzed, as well the biochemical and hematological, and AFB₁-Lys dosage. Urine samples were collected daily in the first ten days of intoxication to assess biotransformation products of AFB₁, including AFB₁-N⁷-guanine. After this period, the collection of urine samples occurs weekly. At the end of the experiment, serum, heparinized and EDTA plasma samples were collected for AFB₁-Lys evaluation, and the animals were slaughtered to evaluate carcass and collection agencies to assess the relative weight, histopathology and residue analysis. The HSCAS was effective in *in vitro* adsorption of AFB₁ binding percentages that ranged from 36.83 to 100% for the adsorbent concentrations between 0.005 and 10 mg/10 ml. Adding HSCAS restored significantly (P <0.05) the deleterious effects on the majority of the parameters evaluated. In liver, levels of AFB₁, AFB₂ and AFG₁ were lower (P <0.05) in the treatment AFB₁ and HSCAS, indicating that there was protection of the adsorbent in the animals of this group. In urine, AFM₁ consisted of ~ 93% of total aflatoxins excreted and quantified. The inclusion of adsorbent in diets reduced (P <0.05) urinary levels of AFB₁, AFQ₁ and AFB₁-N⁷-guanine throughout the experiment. In AFM₁ levels decreased significantly between days 1 and 28 of poisoning. Compared with the results obtained in serum or heparinized plasma, AFB₁-Lys levels were strongly suppressed in the samples with EDTA interference due to this compound in the enzyme digestion process. Weekly serum levels of AFB₁-Lys in animals treated with AFB₁ and HSCAS were lower (P <0.05) than animals treated with AFB₁ alone during all the poisoning period. The data indicate that the urinary levels of AFB₁, AFM₁, AFQ₁ and AFB₁-N⁷-guanine and serum AFB₁-Lys can be used as biomarkers of exposure to aflatoxins in pigs. Furthermore, the determinations of AFB₁ and AFB₁-N⁷-guanine urinary and serum AFB₁-Lys can be used to evaluate the protective ability of the adsorbent as internal dose biomarkers, being able to demonstrate the severity of toxicity in each animal. Further studies are necessary to provide physiologically based toxicokinetics of the evaluated biomarkers in pigs.

Keywords: AFB₁; residues; AFB₁-lysine; biomarker; HSCAS; LC-MS/MS; swine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , G ₁ , M ₁ , B ₂ , G ₂ e M ₂	26
Figura 2 - Cronologia dos principais progressos dos estudos científicos sobre as aflatoxinas	27
Figura 3 - Safra dos principais países produtores de milho	29
Figura 4 - Principais vias de biotransformação da AFB ₁	36
Figura 5 - Via metabólica para formação dos adutos AFB ₁ -N ⁷ -gua e AFB ₁ -lys a partir do AFBO	39
Figura 6 - Eliminação da Aflatoxina B ₁ em humanos	41
Figura 7- Principais destinos da Carne Suína Brasileira exportada em janeiro de 2013.	49
Figura 8 - Superfície de potencial eletrostático	52
Figura 9 - Mecanismos de ligação entre AFB ₁ e montmorilonita.....	54
Figura 10 - Modelo da aflatoxina nas camadas interlamelares das montmorilonitas	54
Figura 11- Procedimento para extração das aflatoxinas B ₁ , G ₁ , B ₂ e G ₂ de proveniente do material de cultivo ...	57
Figura 12 - Diluição seriada	58
Figura 13 - Procedimentos a que os suínos foram submetidos por ocasião da chegada	60
Figura 14- Procedimento de extração de aflatoxinas em amostras de ração.....	63
Figura 15 - Posicionamento do cachimbo	64
Figura 16 - Procedimento para a coleta de sangue	64
Figura 17 - Suíno urinando por micção espontânea no saco coletor	66
Figura 18 - Processo de extração dos resíduos de aflatoxina (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFP ₁ , AFQ ₁ , AFM ₁ , AFB _{2a} e aflatoxicol) em fígado de suínos.	74
Figura 19 - Procedimento de extração de AFB ₁ -lisina	78
Figura 20- Procedimento de preparação das amostras de urina para determinação de resíduos de aflatoxina	81
Figura 21- Representação gráfica da capacidade de adsorção de aflatoxina B ₁ do HSCAS (A), mg.g ⁻¹	86
Figura 22- Representação gráfica da capacidade de adsorção de aflatoxina B ₁ do HSCAS (B), mg.g ⁻¹	86
Figura 23- Representação gráfica da capacidade de adsorção de aflatoxina B ₁ do HSCAS (C), mg.g ⁻¹	86
Figura 24 - Eficiência de adsorção de aflatoxina B ₁ dos produtos A, B e C em diferentes concentrações	87
Figura 25 - Evolução do peso vivo (BW) dos suínos ao longo do experimento.....	90
Figura 26 - Evolução da média de ganho de peso diário (ADG) dos suínos ao longo do experimento.....	90
Figura 27 - Evolução do consumo diário de ração (ADFI) dos suínos ao longo do experimento	91
Figura 28 - Evolução dos principais parâmetros hematológicos alterados pela exposição à AFB ₁	101
Figura 29 - Evolução dos principais parâmetros bioquímicos alterados pela exposição à AFB ₁	112
Figura 30 - Icterícia cutânea apresentada por animal que veio a óbito após 27 dias de intoxicação com AFB ₁ . 116	
Figura 31 - Icterícia sub-cutânea (seta) apresentada por suíno que veio a óbito após 27 dias de intoxicação com AFB ₁	116

Figura 32 - Alterações macroscópicas apresentadas por suínos que vieram a óbito durante o período de exposição às aflatoxinas	117
Figura 33 - Aumento de volume, bordos arredondados e coloração amarelada de fígado do suíno que veio a óbito após 27 dias de exposição às aflatoxinas.	117
Figura 34 - Cortes histológicos de coração suíno corados por Hematoxilina e Eosina.	119
Figura 35 - Cortes histológicos de pâncreas suíno corados por Hematoxilina e Eosina.	120
Figura 36 - Cortes histológicos de rim suíno corados por Hematoxilina e Eosina.	120
Figura 37 - Cortes histológicos de fígado suíno corados por Hematoxilina e Eosina	121
Figura 38 - Cromatogramas das transições de quantificação AFB _{2a} , AFG ₂ , AFM ₁ , AFG ₁ , AFB ₂ , AFB ₁ , AFP ₁ e aflatoxicol na concentração de 5 ng.mL ⁻¹	123
Figura 39 - Cromatogramas das transições de AFB ₁ -Lys com o eixo vertical vinculado obtidos a partir da injeção do padrão sintético na concentração de 330 ng.mL ⁻¹	127
Figura 40 - Cromatogramas das transições de AFB ₁ -Lys com o eixo vertical vinculado obtidos a partir da injeção de uma amostra contendo de 148 ng.mL ⁻¹	128
Figura 41 - Avaliação dos rendimentos de AFB ₁ -lys em amostras submetidas à diferentes tempos de digestão	130
Figura 42 - Evolução dos níveis semanais de AFB ₁ -lisina encontrado no soro de suínos durante os 42 dias de intoxicação. AFB ₁ : aflatoxina B ₁ ; HSCAS: aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado.	133
Figura 43 - Evolução dos rendimentos semanais de AFB ₁ -lisina no soro de suínos durante os 42 dias de intoxicação. AFB ₁ : aflatoxina B ₁ ; HSCAS: aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado	133
Figura 44 - Cromatogramas das transições de quantificação de AFM ₁ , AFB ₁ -N ⁷ -guanina, AFQ ₁ , AFB ₁ , aflatoxicol e AFP ₁ nas respectivas concentrações de 40, 7.5, 0.5, 5.0, 2.5 e 0.5 ng.mL ⁻¹ , obtidos através da fortificação urina com padrões comerciais.	137
Figura 45 - Cromatogramas das transições de quantificação de AFM ₁ , AFB ₁ -N ⁷ -guanina, AFQ ₁ e AFB ₁ nas respectivas concentrações de 1.71, 0.02, 0.03, 0.02 ng.mg ⁻¹ de creatinina urinária obtidos na urina de um suíno pertencente ao tratamento C, após 5 dias de intoxicação com 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ na dieta.....	138
Figura 46 - Evolução da concentração urinária de AFQ ₁ durante 42 dias de exposição à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS	146
Figura 47- Rendimento semanal de AFQ ₁ urinária em suínos expostos à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS [(pg AFQ ₁ /mg creatinina)/(μg AFB ₁ semanal/kg BW)].....	146
Figura 48 - Evolução da concentração urinária de AFB ₁ durante 42 dias de exposição à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS	147
Figura 49 - Rendimento semanal de AFB ₁ urinária em suínos expostos à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS [(pg AFQ ₁ /mg creatinina)/(μg AFB ₁ semanal/kg BW)].....	147
Figura 50- Evolução da concentração urinária de AFB ₁ -N ⁷ -guanina durante 42 dias de exposição à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS	148
Figura 51- Rendimento semanal do aduto urinário AFB ₁ -N ⁷ -guanina em suínos expostos à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS [(pg AFQ ₁ /mg creatinina)/(μg AFB ₁ semanal/kg BW)].....	148
Figura 52 - Evolução da concentração urinária de AFM ₁ durante 42 dias de exposição à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS	149
Figura 53- Rendimento semanal de AFM ₁ urinária em suínos expostos à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS [(pg AFQ ₁ /mg creatinina)/(μg AFB ₁ semanal/kg BW)].....	149

Figura 54 - Rendimento diário de AFQ ₁ urinária em suínos expostos à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS [(pg AFQ ₁ /mg creatinina)/(μg AFB ₁ diária/kg BW)]	150
Figura 55 - Rendimento diário de AFB ₁ urinária em suínos expostos à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS [(pg AFB ₁ /mg creatinina)/(μg AFB ₁ diária/kg BW)]	150
Figura 56 - Rendimento diário de AFB ₁ -N ⁷ -guanina urinária em suínos expostos à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS [(pg AFB ₁ -N ⁷ -guanina/mg creatinina)/(μg AFB ₁ diária/kg BW)]	151
Figura 57 - Rendimento diário de AFM ₁ urinária em suínos expostos à 1,1 mg.kg ⁻¹ de AFB ₁ com ou sem a adição de 0,5% de HSCAS [(pg AFM ₁ /mg creatinina)/(μg AFB ₁ diária/kg BW)]	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Demanda de milho por segmento (valores em mil toneladas).....	30
Tabela 2 - Ocorrência de aflatoxinas em milho e rações no Brasil.....	31
Tabela 3 - Ocorrência de aflatoxinas em milho e rações no Mundo.....	32
Tabela 4 - Valores de DL_{50} ($mg.kg^{-1}$ de massa corporal) de AFB_1 em diferentes espécies.....	33
Tabela 5 - Distribuição da AFB_1 em fluidos e compartimentos corporais de diferentes espécies.....	42
Tabela 6 - Concentrações de aflatoxinas ($ng.mL^{-1}$) nos padrões utilizados para a construção da curva.....	58
Tabela 7 - Fases de acordo com a idade do leitão.....	61
Tabela 8 - Formulações das rações.....	61
Tabela 9 - Níveis nutricionais calculados das rações.....	62
Tabela 10 - Níveis dos metabólitos de aflatoxina utilizados para a construção da curva de calibração em fígado.....	72
Tabela 11 - Transições utilizadas para determinação das aflatoxinas em fígado, e condições específicas necessárias.....	75
Tabela 12- Eluição das aflatoxinas em fígado com fase móvel em gradiente por UPLC-MS/MS.....	76
Tabela 13 - Eluição da AFB_1 -lisina com fase móvel em gradiente por UPLC-MS/MS.....	79
Tabela 14 - Níveis de fortificação das aflatoxinas ($ng.mL^{-1}$) em urina para determinação dos LODs e LOQs.....	80
Tabela 15 - Níveis dos metabólitos de aflatoxina utilizados na curva de calibração em urina.....	80
Tabela 16 - Eluição das aflatoxinas em urina com fase móvel em gradiente por UPLC-MS/MS.....	82
Tabela 17 - Transições utilizadas para detecção das aflatoxinas em urina e condições específicas necessárias ...	82
Tabela 18 - Avaliação da capacidade de adsorção do HSCAS (A) realizada em pH 3.....	85
Tabela 19 - Avaliação da capacidade de adsorção do HSCAS (B) realizada em pH 3.....	85
Tabela 20- Avaliação da capacidade de adsorção do HSCAS (C) realizada em pH 3.....	85
Tabela 21 - Parâmetros de desempenho avaliados em suínos alimentados com AFB_1 e/ou HSCAS.....	89
Tabela 22 - Parâmetros hematológicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B_1 e/ou HSCAS por 0 dias.....	94
Tabela 23 - Parâmetros hematológicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B_1 e/ou HSCAS por 7 dias.....	95
Tabela 24 - Parâmetros hematológicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B_1 e/ou HSCAS por 14 dias.....	96
Tabela 25 - Parâmetros hematológicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B_1 e/ou HSCAS por 21 dias.....	97
Tabela 26 - Parâmetros hematológicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B_1 e/ou HSCAS por 28 dias.....	98
Tabela 27 - Parâmetros hematológicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B_1 e/ou HSCAS por 35 dias.....	99
Tabela 28 - Parâmetros hematológicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B_1 e/ou HSCAS por 42 dias.....	100

Tabela 29 - Parâmetros bioquímicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS por 0 dias.....	105
Tabela 30 - Parâmetros bioquímicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS por 7 dias.....	106
Tabela 31 - Parâmetros bioquímicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS por 14 dias.....	107
Tabela 32 - Parâmetros bioquímicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS por 21 dias.....	108
Tabela 33 - Parâmetros bioquímicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS por 28 dias.....	109
Tabela 34 - Parâmetros bioquímicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS por 35 dias.....	110
Tabela 35 - Parâmetros bioquímicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS por 42 dias.....	111
Tabela 36– Efeitos da exposição à AFB ₁ e/ou de HSCAS por 42 dias sobre parâmetros de carcaça mensurados	113
Tabela 37 - Efeitos da exposição à AFB ₁ e/ou de HSCAS por 42 dias sobre os parâmetros de carcaça calculados	114
Tabela 38- Efeito da exposição à aflatoxinas e/ou HSCAS durante 42 dias sobre o peso relativo dos órgãos (g/100g BW) em suínos de 91 dias de idade.....	115
Tabela 39 - Nível de lesões (grau de infiltrado inflamatório intersticial e deposição de tecido fibro-conjuntivo) apresentadas por suínos submetidos a exposição à aflatoxinas e/ou HSCAS por 42 dias, (n=6).....	118
Tabela 40 - Parâmetros de desempenho do método para determinação de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFP ₁ , AFQ ₁ , AFM ₁ , AFB _{2a} e aflatoxicol em fígado de suínos	122
Tabela 41 - Níveis de aflatoxinas residuais em fígado de suínos intoxicados por 42 dias	124
Tabela 42 - Parâmetros de desempenho do método de AFB ₁ -Lys em soro, plasma com EDTA e com heparina.	129
Tabela 43 - Concentrações de AFB ₁ -lys (ng.mL ⁻¹ de sangue) nas diferentes matrizes	131
Tabela 44 - Níveis de AFB ₁ -lys (ng.mg ⁻¹ de albumina) em soro de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS, ao longo de 42 dias.....	132
Tabela 45 - Parâmetros de desempenho do método para detecção de resíduos de aflatoxinas em urina de suínos	136
Tabela 46 - Níveis de AFQ ₁ em urina de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS, pg.mg ⁻¹ de creatinina (n=6).....	139
Tabela 47 - Níveis de AFB ₁ detectados em urina de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS, pg.mg ⁻¹ de creatinina (n=6).....	140
Tabela 48 - Níveis de AFB ₁ -N ⁷ -guanina em urina de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS, pg.mg ⁻¹ de creatinina (n=6).....	141
Tabela 49 - Níveis de AFM ₁ em urina de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS, ng.mg ⁻¹ de creatinina (n=6).....	142
Tabela 50 - Proporção metabólito/total de aflatoxinas quantificadas na urina de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxina B ₁ e/ou HSCAS	152

Tabela 51 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido entre parâmetros de bioquímica sérica, desempenho, AFB ₁ -lys e biomarcadores urinários avaliados após 7 dias de intoxicação (n=12).....	155
Tabela 52 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido entre parâmetros de bioquímica sérica, desempenho, AFB ₁ -lys e biomarcadores urinários avaliados após 14 dias de intoxicação (n=12).....	156
Tabela 53 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido entre parâmetros de bioquímica sérica, desempenho, AFB ₁ -lys e biomarcadores urinários avaliados após 21 dias de intoxicação (n=12).....	157
Tabela 54 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido entre parâmetros de bioquímica sérica, desempenho, AFB ₁ -lys e biomarcadores urinários avaliados após 28 dias de intoxicação (n=10).....	158
Tabela 55 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido entre parâmetros de bioquímica sérica, desempenho, AFB ₁ -lys e biomarcadores urinários avaliados após 35 dias de intoxicação (n=10).....	159
Tabela 56 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido entre parâmetros de bioquímica sérica, desempenho, AFB ₁ -lys e biomarcadores urinários avaliados após 42 dias de intoxicação (n=10).....	160
Tabela 57 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido entre parâmetros de bioquímica sérica, desempenho, AFB ₁ -lys, histopatologia e resíduos em fígado após 42 dias de intoxicação (n=10)	161

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ACN	Acetonitrila
ADFI	Consumo médio diário de ração
ADG	Ganho de peso médio diário
AF	Aflatoxina
AFAR	Aflatoxina B ₁ -aldeído redutase
AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₁-lys	Aflatoxina B ₁ -lisina
AFB₁-N⁷-gua	Aflatoxina B ₁ -N ⁷ -guanina
AFB₁-¹³C	Padrão isotópico de aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFB_{2a}	Aflatoxina B _{2a}
AFBO	Aflatoxina-8,9-epóxido
AFBO-endo	Aflatoxina-8,9-endo-epóxido
AFBO-exo	Aflatoxina-8,9-exo-epóxido
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
AFL	Aflatoxicol
AFM₁	Aflatoxina M ₁
AFM₁-¹³C	Padrão Isotópico de aflatoxina M ₁
AFP₁	Aflatoxina P ₁
AFQ₁	Aflatoxina Q ₁
ALB	Albumina
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina amino transferase
AOL	Área de olho de lombo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato amino transferase
BW	Peso vivo corporal
CCD	Cromatografia de camada delgada
CCDAE	Cromatografia de camada delgada de alta eficiência
CHC	Carcinoma hepatocelular

CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-f	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta
Cresc.	Dieta utilizada na fase de crescimento
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo P450
DIC	Dissociação induzida por colisão
dL	Decilitro
DL₅₀	Dose letal 50
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGS	Espessura de gordura de superfície
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ESI	Interfaces eletrospray
EUA	Estados Unidos da América
FB₁	Fumonisina B ₁
g	Gramma
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-S-transferase
h	Hora
HBV	Vírus da hepatite B
HE	Coloração Hematoxilina e Eosina
HSCAS	Aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado
IAC	Coluna de imunoafinidade
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDMS	Cromatografia com espectrometria de massas por diluição isotópica
Inic.	Dieta utilizada na fase Inicial
kg	Quilograma
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas /massas
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LQ	Limite de quantificação
M	Massa molar
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro

mm	Milímetro
MQ	Água Milli-Q
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
ND	Não detectado
ng	Nanograma
NL	Sem alterações histológicas significativas
nm	Nanômetro
OTA	Ocratoxina A
p-AOL	Profundidade de área de olho de lombo
PBS	Solução tampão fosfato
PC	Perda de carcaça no resfriamento
PCF	Peso da carcaça fria
PCQ	Peso da carcaça quente
pg	Picograma
PI	Padrão Interno
PI-1	Dieta utilizada na fase Pré-Inicial 1
PI-2a	Dieta utilizada na fase Pré-Inicial 2a
PI-2b	Dieta utilizada na fase Pré-Inicial 2b
ppb	Partes por bilhão
PR%	Peso relativo do órgão
QCC	Quantidade de carne na carcaça
QCR	Quantidade de carne resfriada
r	Coefficiente de correlação de Pearson
r²	Coefficiente de determinação
R_A	Recuperação aparente
RC	Rendimento de carcaça
RCR	Rendimento de carcaça resfriada
R_E	Recuperação da etapa de extração
RIA	Radioimunoensaio
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo
s	Segundo
S/N	Razão sinal/ruído
SEM	Erro médio padrão
SPE	Extração em fase sólida
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
SSE	Supressão/valorização de sinais

STD	Padrão
TFA	Ácido trifluoroacético
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas /massas
USDA	<i>United States Departament of Agriculture</i>
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1. Micotoxinas	24
2.2. Aflatoxinas: Características Gerais.....	25
2.2.1. Ocorrência de aflatoxinas em rações	28
2.2.2. Toxicidade das aflatoxinas	32
2.2.3. Biotransformação da AFB ₁	34
2.3. Biomarcadores	42
2.4. Métodos de Análise de Biomarcadores de aflatoxinas	44
2.5. Validação de métodos analíticos	46
2.6. Suínos e sua importância	48
2.6.1. Fonte de alimento.....	48
2.6.2. Modelo animal para estudos humanos	49
2.7. Compostos adsorventes de micotoxinas	50
3. OBJETIVOS.....	55
3.1. Objetivo Geral.....	55
3.2. Objetivos Específicos.....	55
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1. Material de cultivo.....	56
4.1.1. Produção de AFB ₁	56
4.1.2. Extração das aflatoxinas	56
4.1.3. Análise em CLAE.....	57
4.1.3.1. Reagentes.....	57
4.1.3.2. Equipamento e condições cromatográficas.....	58
4.1.3.3. Curva de calibração.....	58
4.2. Triagem <i>in vitro</i> dos adsorventes.....	59
4.3. Experimento <i>in vivo</i>	59
4.3.1. Animais e Instalações.....	59
4.3.2. Preparação da ração experimental	60
4.3.3. Confirmação dos níveis de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ e AFG ₂ nas rações.....	63
4.3.4. Coleta de amostras biológicas.....	64
4.3.4.1. Contenção.....	64
4.3.4.2. Amostras de sangue.....	64
4.3.4.3. Amostras de urina.....	65
4.3.4.4. Abate, Pesagem dos órgãos e Coleta de tecidos.....	66
4.3.5. Índices de Produtividade.....	67
4.3.6. Análises complementares.....	68
4.3.6.1. Hemograma.....	68
4.3.6.2. Bioquímica sérica.....	68
4.3.6.3. Bioquímica urinária.....	70
4.3.6.4. Histopatologia.....	70
4.4. Análises de Biomarcadores de aflatoxina.....	70
4.4.1. Reagentes.....	70
4.4.2. Equipamentos	71
4.4.3. Condições cromatográficas.....	71
4.4.4. Avaliação do desempenho analítico.....	71

4.4.5. Determinação de Produtos de Biotransformação de Aflatoxina B ₁ em Fígado.....	72
4.4.5.1. Validação do método.....	72
4.4.5.2. Extração dos resíduos de aflatoxinas de fígado de suínos.....	73
4.4.5.3. Condições do UPLC-MS/MS.....	75
4.4.6. Determinação de AFB ₁ -lisina	76
4.4.6.1. Validação do método.....	76
4.4.6.2. Avaliação do tempo de digestão enzimática.....	77
4.4.6.3. Níveis de AFB ₁ -Lys nas diferentes matrizes.....	77
4.4.6.4. Extração da AFB ₁ -lisina	77
4.4.6.5. Condições do UPLC-MS/MS.....	78
4.4.7. Determinação de Produtos de Biotransformação e Resíduos de Aflatoxina em Urina.....	79
4.4.6.1. Validação do método.....	79
4.4.6.2. Preparação das amostras de urina.....	81
4.4.6.3. Condições do UPLC-MS/MS.....	81
4.5. Análise estatística.....	83
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
5.1. Eficiência de adsorção <i>in vitro</i> dos HSCAS.....	84
5.2. Experimento <i>in vivo</i>	87
5.2.1. Avaliação do desempenho	88
5.2.2. Hemograma	92
5.2.3. Bioquímica sérica	102
5.2.4. Avaliação de carcaça	113
5.2.5. Peso relativo dos órgãos	114
5.2.6. Lesões macroscópicas e microscópicas	116
5.3. Determinação de Produtos de Biotransformação de Aflatoxina B ₁ em Fígado.....	122
5.3.1. Resíduos em fígado	122
5.3.1.1. Validação do método.....	122
5.3.1.2. Resultados das amostras.....	124
5.3.2. Determinação de AFB ₁ -lisina	126
5.3.2.1. Validação do método.....	126
5.3.2.2. Determinação do tempo de digestão.....	130
5.3.2.3. Diferença no nível de AFB ₁ -lys entre matrizes de animais intoxicados.....	130
5.3.2.4. Resultados das amostras semanais.....	132
5.3.3. Determinação de Metabólitos em urina	135
5.3.3.1. Validação do método.....	135
5.3.3.2. Resultados das amostras.....	138
5.4. Correlações.....	153
6. CONCLUSÕES.....	162
7. REFERÊNCIAS.....	164

1. INTRODUÇÃO

A Suinocultura é uma das atividades da agropecuária mais difundida e praticada no mundo, permitindo que a carne suína seja a principal fonte de proteína animal consumida no mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS – ABCS, 2014). Embora o consumo de carne suína no Brasil seja menor que o consumo de carne bovina e de frango, o país tem se destacado no cenário mundial quanto à sua produção e exportação. De acordo com o último relatório divulgado pelo Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (*UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA*, 2016), o Brasil está posicionado em terceiro lugar no ranking de produção e exportação mundial. Alguns elementos, tais como o aprimoramento genético, sanidade, nutrição, bom manejo da granja e produção integrada tem contribuído para o crescimento desta produção.

Dentre os diversos custos envolvidos na suinocultura, a alimentação pode representar até 70% do custo total na produção (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2014). Desta forma, para que a produção seja viável, é necessário que as rações proporcionem a melhor produtividade possível utilizando ingredientes de qualidade adequada, a um mínimo custo.

Na formulação de rações para suínos, os ingredientes utilizados em maiores quantidades são o milho (como fonte energética) e o farelo de soja (como fonte proteica). Segundo Rostagno et al. (2011) o nível de inclusão na dieta pode chegar a 70% para milho e 30% para farelo soja, dependendo da fase de desenvolvimento do animal, isto é, entre 65 a 80% dos custos com alimentação são decorrentes do milho.

O milho, assim como vários outros produtos agrícolas, está sujeito às variações em seu preço decorrente de diferentes causas, tais como sazonalidade da produção, perdas da safra por problemas climáticos ou incidência de pragas ou doenças. Neste sentido, nem sempre a matéria-prima disponível para alimentação animal tem a qualidade ideal.

O clima tropical encontrado no Brasil com elevada umidade e temperatura, ao mesmo tempo em que favorece o cultivo do milho, é adequado para o desenvolvimento de diversos fungos toxigênicos nas diferentes fases dessa cultura.

Dentre o grande número de micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são consideradas as de maior importância no Brasil pela magnitude da contaminação dos alimentos. Esta contaminação acarreta grandes perdas na produtividade animal e gera um impacto econômico, além dos danos causados à saúde humana.

A remoção de aflatoxinas dos alimentos permanece ainda como um dos grandes problemas na agroindústria. A estabilidade desta toxina ao calor e a outras condições físicas limita o uso de diversas formas de inativação (PARLAT; YILDIZ; OGUZ, 1999). Como alternativa, há a possibilidade da adição de substâncias não nutritivas que se ligam às aflatoxinas reduzindo sua absorção no trato gastrointestinal - os adsorventes. Dentre os diferentes adsorventes disponíveis no mercado, os aluminossilicatos de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) têm sido utilizados com sucesso na redução da biodisponibilidade das aflatoxinas em testes *in vitro* e *in vivo* (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). No entanto, os adsorventes podem apresentar grande variabilidade em suas propriedades físicas e químicas, tornando necessário a verificação da eficiência dos mesmos através de estudos experimentais *in vivo*, os quais têm alto custo e são baseados na coleta de diversos dados coletivos de animais alimentados com rações contaminadas com a micotoxina, contendo ou não o adsorvente avaliado.

A exposição humana e animal às aflatoxinas, bem como os efeitos decorrentes desta exposição pode ser avaliada através de biomarcadores, os quais são definidos como indicadores que sinalizam mudanças celulares ou moleculares em um meio biológico as quais fornecem informações a respeito de uma doença ou exposição a uma determinada substância. Diversos biomarcadores para aflatoxinas, tais como AFB₁ residual, AFM₁, AFQ₁, AFP₁, AFB_{2a}, aflatoxicol, AFB₁-lisina e AFB₁-N⁷-guanina, têm sido estudados e alguns validados em estudos epidemiológicos detalhados, a fim de avaliar, dentre outras coisas, a viabilidade do seu uso em amplos estudos populacionais. Deste modo, o emprego de biomarcadores para estimar a eficiência de adsorventes *in vivo* poderia reduzir os custos destes ensaios, além de proporcionar maior praticidade e resultados individuais na avaliação dos adsorventes. Embora diversos estudos em humanos utilizando estes biomarcadores já tenham sido realizados, não há dados na literatura sobre o uso da AFB₁-lisina para avaliar a eficiência de adsorventes em suínos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micotoxinas

As micotoxinas são compostos orgânicos de baixo peso molecular, não imunogênicos, resultantes do metabolismo secundário de diversos fungos. Enquanto alguns metabólitos secundários fúngicos têm propriedades antibióticas, outros demonstram ser tóxicos para os animais (*COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST*, 2003).

Os metabólitos secundários são compostos biossintetizados durante o final da fase exponencial de crescimento e excretados através de um conjunto de vias metabólicas que não são essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo (BETINA, 1989). A incidência de contaminação e a concentração de micotoxinas nos grãos são dependentes da época do ano e área geográfica, sendo que os principais fatores para o desenvolvimento de fungos são temperatura e umidade (COULOMBE, 1991; BHATNAGAR; YU; EHRLICH, 2002).

O desenvolvimento de fungos pertencentes a um gênero potencialmente toxigênico em alimentos não implica necessariamente na presença de micotoxinas, uma vez que a atividade de água e temperatura são normalmente diferentes para seu crescimento e para produção destes compostos (SABINO, 1996). Entretanto, a presença de micotoxinas indica que em algum momento houve desenvolvimento fúngico. A grande estabilidade química destas toxinas frente a elevadas temperaturas permite a sua persistência nos alimentos mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (CHU, 1991).

A sensibilidade e os efeitos variados decorrentes da ingestão de micotoxinas pelos animais são devidos às diferenças presentes nas estruturas químicas destes compostos, diferenças do indivíduo como espécie, raça, sexo e idade, além de condições ambientais, nutricionais e manejo à que os animais são submetidos. Além disso, a possibilidade de ocorrência simultânea de duas ou mais micotoxinas pode acarretar na potencialização dos efeitos tóxicos sobre o organismo susceptível (SORIANO; GONZALEZ; CATALÁ, 2005).

Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, assim como uma única espécie pode ser capaz de produzir mais de um tipo de toxina. Mais de quinhentas micotoxinas são conhecidas atualmente, dentre as quais as principais podem ser divididas em aflatoxinas, que são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*; ocratoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*; e as fusariotoxinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* – e que possui como principais representantes as fumonisinas, zearalenona e os tricotecenos (MALLMANN; DILKIN, 2007).

A presença de altos níveis de micotoxinas na dieta pode levar a problemas agudos de saúde e até à morte. A exposição prolongada a baixos níveis pode levar a manifestações ocultas e insidiosas (imunidade debilitada, atrasos no crescimento, susceptibilidade a doenças), e a problemas crônicos de saúde (CAST, 2003). Este fato suscitou preocupação por parte de diversas organizações internacionais, fazendo com que a Agência Internacional para a Investigação em Câncer (*International Agency for Research on Cancer* – IARC, 1993) classificasse algumas micotoxinas como carcinógenos humanos ou potenciais carcinógenos humanos.

Em fevereiro de 2011 entrou em vigor no Brasil a Resolução RDC Nº 7, que dispõe sobre os limites máximos tolerados de micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, desoxinivalenol e zearalenona) em diversos alimentos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2011).

2.2. Aflatoxinas: características gerais

As aflatoxinas foram descobertas há cerca de 50 anos como a causadora da doença "X" dos perus na Inglaterra, que resultou na morte de milhares de perus, patos e frangos de granjas. Como nenhum agente infeccioso foi identificado, houve a suspeita da origem do problema ser nutricional. Uma partida de torta de amendoim era o fator comum em todos os surtos. Estudos laboratoriais subsequentes usando *Aspergillus flavus* de extratos de amendoim confirmaram a existência de um princípio tóxico capaz de induzir toxicidade aguda no fígado. A elucidação estrutural da aflatoxina B₁ (AFB₁) foi realizada e confirmada pela sua síntese total em 1963. A forte fluorescência destas moléculas sob a luz ultravioleta facilitou o rápido desenvolvimento na década de 1960 de métodos de triagem para grãos e *commodities* que permitiram promulgação subsequente de regulamentos para minimizar a contaminação dos alimentos humanos (FONSECA, 1975; WOGAN et al., 2012).

Várias espécies de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são capazes de produzir aflatoxinas (AF), porém as mais comuns são *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*. Esses fungos apresentam distribuição mundial, cujas condições ideais para o seu desenvolvimento são encontradas no Brasil e em outros países de clima tropical (COULOMBE, 1991; CHU; BHATNAGAR, 2004). Além disso, a utilização de práticas agrícolas inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenagem de grãos e cereais no País favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos de modo geral, particularmente os toxigênicos (SABINO et al., 1988).

O desenvolvimento do *A. flavus* e a produção de aflatoxinas em substratos naturais são influenciados por diversos fatores, como os componentes minerais e a atividade de água do substrato, umidade e temperatura ambiental, além dos danos físicos presentes no substrato (VIQUEZ, 1994). A formação das aflatoxinas pode ocorrer na maioria dos substratos utilizados na alimentação humana e animal, principalmente o milho e amendoim, mas também trigo, sementes de algodão, arroz, entre outros. Diversos compostos similares são conhecidos e designados pelo termo aflatoxina, entretanto, habitualmente este termo refere-se a quatro compostos de interesse médico-sanitário denominados B₁, B₂, G₁ e G₂, além de dois produtos metabólicos - M₁ e M₂ (Figura 1) (COULOMBE, 1991; LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995).

Figura 1 -Estrutura química das aflatoxinas B₁, G₁, M₁, B₂, G₂ e M₂

Uma linha do tempo mostrando os principais progressos das atividades científicas sobre as aflatoxinas encontra-se na Figura 2.

Apesar das semelhanças estruturais, as aflatoxinas apresentam diferentes graus de atividade biológica. A aflatoxina B₁ (AFB₁), além de ser a mais frequentemente encontrada em substratos vegetais, é a que apresenta maior poder toxigênico, enquanto que a toxicidade aguda das aflatoxinas G₁ (AFG₁), B₂ (AFB₂) e G₂ (AFG₂) é cerca de 50, 20 e 10% comparado à AFB₁, respectivamente (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995; CHU; BHATNAGAR, 2004).

As aflatoxinas são conhecidas por serem substâncias tóxicas, mutagênicas, teratogênicas, carcinogênicas e são apontadas como agentes causadores de câncer hepático e outros tipos de câncer em humanos (RUSTOM, 1997).

Figura 2 - Cronologia dos principais progressos dos estudos científicos sobre as aflatoxinas

Fonte: Wogan et al. (2012).

A estrutura química das aflatoxinas apresenta um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide. As aflatoxinas B apresentam anel ciclopentona na molécula, enquanto que as da série G apresentam anel lactona, conforme é observado na Figura 1. Assim como outros compostos heterocíclicos, as aflatoxinas são substâncias fluorescentes com características próprias. As denominações B e G originam-se das fluorescências emitidas, “blue” e “green” respectivamente (GOMPertz et al., 2008), enquanto que a denominação M provém do primeiro isolamento desta toxina ter ocorrido no leite (“milk”) e fluorescem nas cores azul-violeta (M₁), e violeta (M₂) quando submetidos à luz ultravioleta (DAVIDSON, 2002; CAST, 2003).

Além do risco direto relacionado ao consumo de grãos contendo aflatoxinas, resíduos podem ser encontrados em tecidos animais e também serem excretados no leite e ovos de animais que consumiram ração contaminada (HUSSAIN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2000).

A Portaria MA/SNAD/SFA n° 07 de 09/11/1988 do Ministério da Agricultura faz referência aos limites máximos de aflatoxinas recomendados para alimentação animal onde é estipulado que para qualquer matéria prima para alimentação direta ou de componentes das rações destinada ao consumo animal, o limite máximo para aflatoxinas é de 50 µg/kg. Embora esta legislação seja antiga, ainda são encontradas dificuldades para fiscalizar os produtos

destinados à alimentação animal. Como uma ferramenta de “gerenciamento de risco”, com a finalidade de garantir a qualidade do sistema de produção dos alimentos de origem animal ao longo da cadeia produtiva, em 1999 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu as diretrizes do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - Animal (PNCRC/Animal) que visa o monitoramento produtos de origem animal, tais como carnes (suína, bovina, aves e equina), leite, mel, ovos e pescados. O monitoramento da presença de diversos contaminantes, tais como aflatoxinas, seguem recomendações do *Codex Alimentarius*, de forma a prover reconhecimento e garantia internacional.

Em contrapartida, a Resolução RDC Nº 7 de 2011 recomenda que os limites de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ sejam de 1 a 20 µg/kg para diversos tipos de alimentos destinados à alimentação humana, como milho e seus derivados (20 µg/kg), amendoim e alguns derivados (20 µg/kg), cereais e seus produtos (5 µg/kg), castanhas (10 µg/kg) entre outros, além dos limites de AFM₁ em produtos e subprodutos de origem animal (leite e derivados), sendo eles 0.5, 5 e 2.5 µg/kg no leite fluido, leite em pó e queijos, respectivamente, sendo esses limites de aplicação imediata (ANVISA, 2011).

2.2.1. Ocorrência de Aflatoxinas em Rações

A formulação da dieta de suínos é composta basicamente por milho e soja. Dependendo da época do ano e localização geográfica, diversos outros grãos podem ser utilizados como ingredientes tais como sorgo, trigo e arroz. Porém, de forma geral, o milho é o ingrediente mais utilizado na composição de rações, podendo compor até 70% da formulação (ROSTAGNO et al., 2011).

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie da família das gramíneas que apresenta grande importância na economia mundial devido às suas propriedades nutricionais principalmente como fonte energética, tornando-o uma cultura base na alimentação animal. No Brasil, a cultura de milho é a segunda maior cultura, ocupando uma área de 16 milhões de hectares estando atrás somente da soja (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013). Embora o milho em grão não tenha uma grande participação na alimentação da população brasileira, seus derivados constituem parte importante da dieta diária das pessoas de algumas regiões com baixa renda (EMBRAPA, 2014).

Em contrapartida, este ingrediente é muito utilizado na alimentação animal devido às suas qualidades nutricionais. Em média, o milho possui 7.9% de proteína bruta, 3.6% de

gordura, 62.6% de amido e 3.340 kcal/kg de energia metabolizável para suínos (ROSTAGNO et al., 2011).

O constante crescimento da safra de milho brasileira teve como resultado a produção de 85 milhões de toneladas na safra 2014/2015, mantendo o Brasil como o terceiro país produtor mundial de milho, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (EUA) e China (Figura 3) (USDA, 2016).

O consumo interno atingiu 64 mil toneladas, sendo que destas, mais de 49 mil toneladas foram destinadas à alimentação animal (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO - ABIMILHO, 2016). Diversos segmentos da pecuária brasileira vêm aumentando significativamente a sua produção e a consequente demanda por milho. A avicultura é a principal responsável por este aumento na demanda, seguida pela suinocultura e pela bovinocultura conforme demonstrado na Tabela 1.

Figura 3 - Safra dos principais países produtores de milho

Fonte: USDA (2016).

Dentre os diversos fatores determinantes da produção que podem afetar o rendimento da cultura de milho, de 8 a 13% das estimativas de perdas são relacionadas ao ataque de fungos e bactérias (OERKE, 2006). Os principais gêneros fúngicos envolvidos na contaminação do milho são *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Embora estes patógenos possam infectar diferentes partes da planta, quando a infecção ocorre no grão o prejuízo tende a ser maior, pois além da formação de grãos ardidos (grãos que perderam sua cor característica por ação do calor, umidade ou fermentação) pode haver a produção de micotoxinas (RAMOS, 2008). A ocorrência de micotoxinas no milho pode levar a perdas

econômicas tanto pela perda na produtividade animal como pela não aceitação do produto pelo mercado importador. Os prejuízos relacionados à parte nutricional dos grãos, contaminação de produtos agrícolas, custos indiretos em sistemas de controle, gastos na remoção da toxina para recuperar o produto rejeitado também são considerados.

Tabela 1- Demanda de milho por segmento (valores em mil toneladas)

Segmento animal	Ano/Safra									
	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11	11/12	12/13	13/14	14/15	15/16
Aves de corte	15.181	16.079	16.009	16.758	19.127	19.796	21.420	23.520	2.578	25.070
Aves de postura	2.800	3.006	3.068	3.221	3.275	3.390	3.640	3.917	4.074	4.196
Suinocultura	9.700	10.394	10.400	10.902	10.670	10.937	11.626	12.556	13.247	13.644
Bovinocultura	3.500	3.872	3.876	4.033	3.188	3.427	3.688	3.979	4.158	4.324
Outros animais	1.763	1.885	1.878	1.954	2.568	2.748	2.981	3.205	3.970	3.567

Fonte: ABIMILHO (2016).

Nas Tabela 2 e Tabela 3 são apresentados trabalhos mostrando os níveis de contaminação por aflatoxinas encontrados em milho e rações no Brasil e no mundo, respectivamente. Vários destes apresentam níveis superiores aos permitidos tanto pela legislação brasileira (50 µg/kg) quanto pela legislação da União Européia (50 µg/kg para ingredientes e rações completas para ruminantes; 10 µg/kg para rações prontas e 20 µg/kg para rações completas para suínos e aves).

Tabela 2 - Ocorrência de aflatoxinas em milho e rações no Brasil

Alimento	Estado	Contaminado/	AF	Concentração (ppb)	Método	Referência
		Total analisado				
Milho	Bahia	08/80	Total	1 a 5	Fluorimetria	Almeida et al. (2009)
	Bahia	16/200	B ₁	13,7 a 47,8	CCD	Rocha et al. (2009)
	Mato Grosso	20/84	Total	1 a 108,7	CLAE	Bento et al. (2012)
	Mato Grosso	36/200	B ₁	6,8 a 976,1	CCD	Rocha et al. (2009)
	Paraná	77/300	Total	23,4 a 24,1	CCD	Moreno et al. (2009)
	Paraná	4/38	B ₁	ND a 2,31	LC-MS/MS	Souza et al. (2008)
	Paraná	28/300	Total	35,2 a 40,0	CCD	Moreno et al. (2009)
	Paraná	53/74	B ₁	0,5 a 25	LC-MS/MS	Souza et al. (2013)
	Paraná	16/123	Total	4,1 a 13,7	ELISA	Amaral et al. (2006)
	Rio Grande do Sul	28/200	B ₁	13,7 a 1393,0	CCD	Rocha et al. (2009)
	Goiás	12/12	B ₁	0,7 a 277,8	CLAE	Ramos et al. (2008)
	São Paulo	65/72	Total	0,01 a 41,74	CLAE	Cruz (2010)
	São Paulo	04/200	B ₁	2,0 a 34,2	CCD	Rocha et al. (2009)
Rações						
bovinos	São Paulo	12/30	B ₁	1 a 19,5	CLAE	Oliveira et al. (2010)
	Bahia	27/80	Total	1 a 3	CLAE	Simas et al. (2007)
Aves	Paraná	28/36	B ₁	0,8 a 25	LC-MS/MS	Souza et al. (2008)
	Paraná	147/158	B ₁	> 6,0	ELISA/CLAE	Rossi et al. (2012)
	Paraná	114/158	B ₁	1,4 a 604,0	ELISA	Rossi et al. (2013)
caprinos	Bahia	0/80	Total	-	CCD	Batatinha et al. (2008)

AF: Aflatoxina; CCD: Cromatografia de camada delgada; CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência; ELISA: Ensaio imunoenzimático; LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas/massas.

Tabela 3 - Ocorrência de aflatoxinas em milho e rações no Mundo.

Alimento	País	Contaminado/	Concentração		Método	Referência
		total analisado	AF	(ppb)		
Milho	Colômbia	04/33	B ₁	3,9 a 66,1	CLAE	Céspedes; Diaz (1997)
	Croácia	241/633	B ₁	1,1 a 2072,0	ELISA e LC-MS/MS	Pleadin et al. (2014)
	Argentina	264/3246	Total	0,22 a 4,5	CCD e CLAE	Garrido et al. (2012)
	Pasquistão	18/65	B ₁	5 a 850	CCDAE	Khatoon et al (2012)
	Irã	18/51	B ₁	2,61 a 276,3	CLAE	Ghiasian et al. (2011)
	Coréia	09/66	B ₁	0,02 a 0,48	CLAE	Kim et al. (2013)
	Sérvia	137/380	Total	1,01 a 86,1	ELISA	Kos et al. (2013)
	Polônia	02/66	Total	até 0,61	CLAE-UV e LC-MS/MS	Grajewski et al. (2012)
Rações	Polônia	28/204	Total	até 0,23	CLAE-UV e LC-MS/MS	Grajewski et al. (2012)
aves	Camarões	19/20	B ₁	1,2 a 200	LC-MS/MS	Abia et al. (2013)
	Colômbia	12/30	B ₁	1,5 a 23,2	CLAE	Céspedes; Diaz (1997)
suínos	Colômbia	7/16	B ₁	1,7 a 12,3	CLAE	Céspedes; Diaz (1997)
	Rep. Tcheca	18/67	Total	traços a 3500	CCD	Piskac; Drábek (1978)
	Rep. Tcheca	14/104	Total	50 a 350	CCD	Drábek; Piskac (1979)
bovinos	Turquia	74/74	B ₁	0,30 a 70	ELISA	Oruç et al. (2012)
	Irã	42/91	B ₁	1 a 15	ELISA	Azizi et al. (2012)
	Tunísia	49/58	B ₁	<5 a >30	ELISA	Abbes et al. (2012)
	China	84/200	B ₁	0,05 a 3,53	CLAE	Han et al. (2013)
	Paquistão	145/149	B ₁	< 0,1 a 198	CCDAE	Sultana et al. (2012)

AF: Aflatoxina; CCD: Cromatografia de camada delgada; CCDAE: Cromatografia de camada delgada de alta eficiência; CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência; CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta; ELISA: Ensaio imunoenzimático; LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas/massas.

2.2.2. Toxicidade das aflatoxinas

A classificação toxicológica dos produtos químicos, em termos de toxicidade aguda, é baseada no valor da DL₅₀. A determinação da DL₅₀ é dada pela dose, administrada em níveis crescentes a grupos de animais, capaz de causar a morte de 50% dos animais tratados em um determinado período de tempo (WALUM, 1998).

Os efeitos das aflatoxinas são direta ou indiretamente associados com a toxicidade. Bioquimicamente, estas toxinas podem afetar o metabolismo de energia, de carboidratos (diminuição das concentrações de carboidratos), de lipídeos (acúmulo de lipídeos dentro dos hepatócitos) e também dos ácidos nucleicos e proteínas. Os efeitos biológicos são carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, hepatotoxicidade, imunossupressão, redução da taxa de crescimento, da produção de leite ou ovos, da eficiência alimentar, da

reprodução e também pode levar à anemia em uma ampla gama de espécies animais (BAPTISTA, 2005; RAWAL; KIM; COULOMBE-JR, 2010).

As aflatoxinas caracterizam-se pela elevada toxicidade que apresentam a várias espécies domésticas e de experimentação (OSWEILER, 1990; LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais (Tabela 4). Mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, a relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade e composição da dieta (COULOMBE, 1991). Para muitas espécies os machos são mais susceptíveis do que as fêmeas e, em geral, a sensibilidade é acentuadamente maior nos jovens do que nos adultos (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). Em experimentos, a toxicidade também é influenciada pela via de administração da toxina.

Tabela 4 - Valores de DL₅₀ (mg.kg⁻¹ de massa corporal) de AFB₁ em diferentes espécies

Espécie	DL₅₀ (mg.kg⁻¹ de massa corporal)
Patos	0,34 – 0,56
Truta arco-íris	0,81
Coelho	0,30 – 0,50
Gato doméstico	0,55
Suíno	0,62
Cão doméstico	1,00
Rato	5,50 – 17,90
Camundongo	9,00
Hamster	10,20
Frangos de corte	6,50 – 16,50
Ovinos	2,00
Macaco	2,20

DL₅₀: Dose letal 50. Fonte: Patterson (1973).

A intoxicação por AFB₁ pode apresentar efeitos agudos ou crônicos. A síndrome tóxica aguda caracteriza-se pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (OSWEILER, 1990). O fígado apresenta lesões decorrentes de necrose hemorrágica, congestão centrolobular, proliferação das células dos ductos biliares e infiltração gordurosa dos hepatócitos (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995).

Os efeitos de toxicidade crônica são relacionados à genotoxicidade destes compostos. Embora também se caracterizem por lesões hepáticas, estas ocorrem em menor escala e

incluem o câncer hepático e alterações genéticas, além da diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens (OSWEILER, 1990; LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). A carcinogenicidade tem sido demonstrada extensivamente, sobretudo em relação à AFB₁, em muitas espécies animais incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas (BUSBY; WOGAN, 1984). Com base nos estudos disponíveis, a IARC concluiu em 1987 que existiam evidências suficientes para classificar a AFB₁ como pertencente ao grupo 1 (carcinógeno humano) (ROTHSCHILD, 1992).

2.2.3. Biotransformação da Aflatoxina B₁

Biotransformação é o processo pelo qual o organismo transforma as substâncias estranhas (xenobióticos) em novos compostos químicos (metabólitos), ou seja, é um processo em que o composto inicial é modificado para ser rapidamente eliminado do organismo (GUENGERICH, 1999; DIAZ; MURCIA, 2011).

A toxicidade das aflatoxinas está relacionada com a sua biotransformação pelo organismo tornando-as mais hidrofílicas a fim de que sejam excretadas, ou gerando compostos com maior toxicidade. Assim, a AFB₁ é considerada um pró-carcinógeno que requer uma ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (RAWAL; KIM; COULOMBE-JR, 2010).

Após a ingestão, a AFB₁ é eficientemente absorvida por difusão passiva no trato gastrointestinal. Após a absorção, a AFB₁ é rapidamente metabolizada no fígado e biotransformada antes de ser excretada pelas vias urinária e fecal. A AFB₁ absorvida e seus metabólitos são excretados na urina, enquanto as fezes constituem uma via de eliminação para a AFB₁ não absorvida e para os metabólitos liberados através da bile. No caso de lactantes, a excreção também pode ocorrer através do leite materno após o consumo de alimentos contaminados. Estudos em animais demonstraram que em condições normais, 50% da dose oral de AFB₁ administrada é rapidamente absorvida na região duodenal e alcança o fígado através do sistema portal. A AFB₁ não metabolizada é concentrada no fígado, mas pode ser encontrada em quantidades bem menores nos rins e no sangue (JAGER et al., 2011; CORCUERA et al., 2012).

O baixo peso molecular e a característica lipofílica da AFB₁ permite uma difusão passiva através das mucosas em diferentes espécies. Gallo, Moschini e Masoero (2008) realizaram um ensaio em mucosa vaginal de vacas a fim de ratificar a difusão passiva como um mecanismo de regulação da absorção de AFB₁. Neste estudo, AFB₁ e AFM₁ foram

detectadas no plasma a partir de 15 minutos (min) após a administração de AFB₁ e ambas alcançaram a concentração máxima aos 30 min.

Bastaki et al. (2010) relata que quando a toxina é administrada por via oral, menores porcentagens da dose são absorvidas em comparação à administrada intraperitonealmente (IP) ou por via respiratória. A taxa de absorção de AFB₁ calculada a partir do intestino foi de 5,0 µg/min. Entretanto, Helferich et al. (1986) relataram que em seu experimento com ratas e cabras em lactação houve absorção de 97% da AFB₁ fornecida oralmente em dose única. Estas observações confirmam que a absorção e a taxa de biotransformação de AFB₁ podem ser afetadas pela via de administração.

Coulombe e Sharma (1985) descreveram que a AFB₁ em ratos alcançou a máxima concentração plasmática 1h e 3h após da intoxicação por via intratraqueal e oral, com a meia-vida plasmática de 87,7h e 91,8 h, respectivamente. Firmin et al. (2010) relatou que a concentração máxima de AFB₁ foi alcançada 4 h após a administração em ratos, com meia-vida plasmática de 53 h. Estes dados descrevem meias-vidas plasmáticas referente à AFB₁ ou misturada com seus metabólitos. Jubert et al. (2009) observou em humanos uma rápida absorção de AFB₁, cuja meia-vida plasmática foi de 64,4 horas. Entretanto, Corcuera et al. (2012) não conseguiu detectar AFB₁ no plasma de ratos após 30 minutos, nem os seus metabólitos após 24 h, o que sugere uma absorção e metabolização muito rápida. Neste experimento, houve a intoxicação simultânea de AFB₁ e ocratoxina A (OTA), sugerindo que a OTA acelera a metabolização hepática de AFB₁ em compostos mais hidrofílicos que são rapidamente excretados (24 h) através do rim.

De forma geral, esta metabolização ocorre em duas fases conhecidas como Fase I e Fase II. A Fase I consiste principalmente por reações de hidrólise, redução e oxidação mediadas por enzimas, enquanto que a Fase II envolve as reações de conjugação do produto da Fase I. As enzimas da família do citocromo P450 (CYP) são as principais responsáveis pela biotransformação inicial das aflatoxinas absorvidas (Fase I), sendo que a reação que prevalece na metabolização da aflatoxina é a de oxidação. As enzimas de CYP podem hidroxilar, hidratar, O-dimetilar e epoxidar as moléculas (Figura 4

) (DIAZ; MURCIA, 2011; PUCCINELI; GERVASI; LONGO, 2011).

Em humanos, diversas enzimas do CYP (1A1, 1A2, 2A6, 3A4, 3A5, 3A7) têm sido reportadas como envolvidas na biotransformação da AFB₁ em 8,9-epóxido (AFBO). O AFBO é uma mistura de estereoisômeros AFB₁-endo-8,9-epóxido (AFBO-endo) e AFB₁-exo-8,9-epóxido (AFBO-exo), sendo que apenas o último é um metabólito genotóxico (KAMDEM et al., 2006). Embora a expressão hepática destes CYPs seja altamente variável, esta

variabilidade reflete o efeito da composição genética individual e de fatores ambientais sobre a sua transcrição. CYP1A2 e a subfamília CYP3A são as isoformas predominantes neste processo de bioativação de AFB₁ no fígado (LEE et al., 2001; MEISSONNIER; OSWALD; GALTIER, 2005; KAMDEM et al., 2006).

Figura 4 - Principais vias de biotransformação da AFB₁

Fonte: Wong e Hsieh (1980).

Estudos iniciais relataram que a AFB₁ que ocorre em concentrações naturais em grãos e alimentos é bioativada para AFBO primariamente por CYP1A2, enquanto que concentrações mais altas são catalisadas por CYP3A4 (RAWAL; KIM; COULOMBE-JR, 2010). CYP1A2 parece ter uma afinidade maior para AFB₁ e produz AFBO em maior proporção quando comparado ao CYP3A4, e é o único produtor de AFBO-endo. Deste modo, as células que expressam CYP1A2 seriam mais sensíveis do que aquelas que expressam CYP3A4. Doi, Patterson e Gallagher (2002) correlacionaram a formação de adutos AFB₁-proteína *in vitro* com a expressão CYP1A2 em humanos adultos. No entanto, CYP3A4 pode ser expresso a um nível muito mais elevado tanto no fígado (de 71 a 99.5% dos CYP3A e ≈

30% do conteúdo total de CYP) como no intestino delgado, de tal modo que em alguns indivíduos, CYP3A4 pode ser a fonte predominante de AFBO-exo (GALLAGHER et al. 1994; GUENGERICH et al., 1998; LEE et al., 2001; KANDEM et al., 2006; PUCCINELI; GERVASI; LONGO, 2011). A expressão de CYP3A4 é muito baixa durante o desenvolvimento fetal e torna-se a isoforma CYP3A dominante no fígado humano adulto, enquanto o oposto ocorre para CYP3A7 (HERMANN; SKAANILD, 2011). O papel de CYP3A5 foi menos investigado inicialmente por serem pouco expressos. Porém, a sua importância foi recentemente elevada por transformar preferencialmente AFB₁ em AFBO-exo e, em alguns indivíduos, poder compor até 20% do total de CYP3A (YAO et al., 2012). Cerca de 90% dos caucasianos, 67% dos japoneses e 30-45% dos afro-americanos são baixos expressores de CYP3A5 (KANDEM et al., 2006). Também foi observada uma correlação entre CYP3A4/5 de adultos e CYP3A7 de fetos no segundo trimestre com os níveis de expressão de adutos AFB₁-DNA em um painel de fígados humanos (DOI; PATTERSON; GALLAGHER, 2002). Assim, segundo Kandem et al. (2006), a ordem de importância na conversão de AFB₁ para AFBO em humanos é CYP3A4, 3A5, 3A7 e 1A2; e 5 a 37% da AFB₁ é biotransformada em AFBO-exo.

Em contrapartida, a caracterização do perfil toxicogenômico dos suínos permanece pouco explorado. No entanto, não se espera encontrar diferenças significativas para a estrutura primária de enzimas CYP por influência racial dentro da espécie. Considerando apenas os CYPs pertencentes às famílias de 1 a 3 é importante considerar que há uma grande homologia entre CYPs de humanos e de suínos convencionais, e que as diferenças entre as sequências de CYP de suínos convencionais e miniporcos são menores que 1% e devem ser considerados como variantes alélicas. CYP1A2 foi encontrado em diferentes níveis no fígado, pulmão, coração e rins de híbridos Landrace x Large White. No entanto, CYP1A2 somente é expresso a um nível elevado e induzível no fígado. O nível de expressão de CYP1A2 no fígado de suíno é de 3-9% do teor total de CYP, semelhante ao encontrado em fígado humano (cerca de 10 %). O primeiro CYP3A suíno sequenciado e mapeado foi CYP3A29, que resultou em uma proteína de elevada semelhança com a CYP3A4 humana, com similaridades relacionadas também à expressão e atividade. Embora sua ocorrência seja maior no fígado, CYP3A29 também foi encontrado em outros tecidos de híbridos Landrace x Large White (PUCCINELI; GERVASI; LONGO, 2011). Os CYP3A29 e 3A22 são os CYPs mais expressos principalmente no fígado dos suínos, onde CYP3A22 corresponde ao CYP3A4 ou 3A5. A expressão destes no intestino delgado é gradualmente diminuída do duodeno para o íleo (YAO et al., 2012), em concordância à estudos realizados com intestino humano

relacionados ao 3A4 (BERGGREN et al., 2007). CYP2A6 humano tem uma enzima homóloga suína com 87,5% de semelhança (CYP2A19), expressa apenas nos rins e no fígado. A expressão hepática é muito mais elevada do que a renal (PUCCINELI; GERVASI; LONGO, 2011). A atividade de CYP2A6 é variável entre machos e fêmeas, e entre machos castrados e inteiros, sugerindo o envolvimento de esteróides sexuais na regulação desta enzima. CHEN et al. (2008) demonstrou *in vitro* que a androsterona inibe parcialmente a expressão da proteína CYP2A6. Kojima e Degawa (2013) demonstraram que os níveis séricos de andrógenos são determinados por herança autossômica dominante, e propuseram que estes níveis são importantes fatores para regular a expressão de CYP1A1, CYP1A2 e CYP2A19 em fígado de suínos.

Apesar de AFBO-exo ter a meia-vida de apenas 1 segundo em tampão aquoso neutro, é suficientemente estável para migrar do retículo endoplasmático para o DNA no núcleo de forma tão eficiente que são obtidos elevados rendimentos de adutos de DNA (GUENGERICH, 2006). A AFBO-exo pode ser covalentemente ligado ao DNA, formando os adutos AFB₁-N⁷-guanina (AFB₁-N⁷-gua) (ESSIGMANN et al., 1977). A formação da AFB₁-N⁷-gua ocorre através da ligação do AFBO-exo com guaninas da molécula de DNA, na posição N⁷, ao nível do códon 249 do gene supressor de tumores p53. Esta ligação modifica a estrutura do DNA e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando os mecanismos básicos de efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁. Esses adutos formados na molécula de DNA podem ser retirados da molécula após a sua formação, deixando sítios apurínicos na molécula de DNA, que tendem a ser preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina, que promove a substituição de uma arginina por uma serina no produto protéico, um importante ponto de mutação (AGUILLAR; HUSSAIN; CERUTTI, 1993). A AFB₁-N⁷-gua representa a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas (CAST, 2003). A albumina é a única proteína plasmática identificada capaz de formar um aduto derivado da AFB₁ – a AFB₁-lisina (AFB₁-lys). Estes adutos de albumina podem ser formados a partir tanto do AFBO-exo quanto do AFBO-endo, ou ainda a partir de um produto de hidrólise do AFBO-exo – o diidrodiol – que é instável e sofre rearranjo catalisado por base para um dialdeído reativo (Figura 5) (GUENGERICH, 2006; SCHOLL et al., 2006).

Figura 5 - Via metabólica para formação dos adutos AFB₁-N⁷-gua e AFB₁-lys a partir do AFBO

Fonte: Wogan et al. (2012).

As enzimas também oxidam a AFB₁ a vários outros compostos além dos AFBO, como as aflatoxinas M₁ (AFM₁), Q₁ (AFQ₁), P₁ (AFP₁) e uma espécie reduzida, o aflatoxicol (AFL) (Figura 4). Corcuera et al. (2012) detectou compostos mais hidrofílicos que a AFB₁ no plasma, e os considerou como seus metabólitos. Estes possuíam picos máximos aos 10 minutos pós-intoxicação, que diminuíram de forma dependente do tempo até 24 horas, e após tornaram-se indetectáveis.

A AFM₁ é um metabólito hidroxilado conhecida como aflatoxina do leite, que pode também ser excretada através da urina e fezes. É formada imediatamente no fígado através das enzimas de homólogos CYP1A. Dependendo da espécie avaliada, 0,5 a 6% da AFB₁ ingerida é biotransformada em AFM₁. O CYP1A2 é o principal responsável pela conversão imediata de AFB₁ em AFM₁ e AFBO-endo. Em humanos, a relação de conversão em AFM₁ e AFBO é 1:3. A AFM₁ é eliminada rapidamente do organismo (3,0 µg/min), de modo que os níveis de AFM₁ refletem a AFB₁ recentemente metabolizada, proporcional aos níveis de AFB₁ sérica. A alta citotoxicidade reportada para AFM₁ demonstra que é necessário precaução em designá-la como um produto de detoxificação. AFM₁ pode ser ativada para formar AFM₁-8,9-epóxido e se ligar ao DNA, sendo excretada na urina na forma de AFM₁ ou AFM₁-N⁷-guanina. AFM₁ possui um potencial carcinogênico de 2 a 10% da AFB₁. Assim, em 2002 a AFM₁ foi classificada no grupo 1 pela IARC (SHIBAMOTO; BJELDANES, 2009; BASTAKI et al., 2010; RAWAL et al., 2010; EGNER et al, 2003).

A AFQ₁ é formada através da via 3- α -hidroxilação por enzimas da subfamília CYP3A. Kandem et al. (2006) observaram que a AFQ₁ é o principal produto de detoxificação da AFB₁ (63 a 95%), sendo que CYP3A4 é o principal responsável pela sua produção, assim como pela de AFBO. A proporção na produção de AFBO:AFQ₁ variou de 1:1,7 a 1:19. Embora CYP3A7 produza AFQ₁ em quantidades vestigiais na maioria da população, pode contribuir com quase um quarto da produção AFQ₁ em altos expressores humanos (aproximadamente 15% dos caucasianos) (NEAL et al., 1998; KAMDEM et al., 2006; RAWAL et al., 2010).

Assim como a AFQ₁, a AFP₁ (metabólito dimetilado) não é considerada um bom substrato para a epoxidação e, conseqüentemente, possuem genotoxicidade reduzida comparada à AFB₁, sendo considerados produtos de detoxificação. Apesar da AFP₁ contribuir expressivamente para o nível total de metabólitos de aflatoxinas na urina, não há uma correlação significativa entre o consumo de aflatoxinas e a sua excreção urinária (GROOPMAN et al., 1993; YU et al., 1997).

A hidratação da dupla ligação vinil éter de AFB₁ no fígado produz o derivado hemiacetal, também conhecido como AFB₂ α ou AFB_{2a}, que interfere diretamente na síntese de proteínas, levando a quadros de imunossupressão, interferência na coagulação sanguínea e às demais conseqüências das alterações provocadas por estas falhas no metabolismo (PATTERSON et al., 1973; DIAZ; MURCIA, 1995).

O aflatoxicol é gerado através de uma biotransformação alternativa mediada por uma redutase citoplasmática, podendo ser reconvertido em AFB₁ pela ação da desidrogenase. Assim, a importância deste metabólito se dá por ser considerado como um reservatório de AFB₁ em alguns organismos. O aflatoxicol apresenta cerca de 20% do potencial de mutagenicidade da AFB₁ (LEE et al., 2001).

As reações de Fase II são limitadas a conjugação do AFBO-exo com glutathione (GSH) catalisada pela enzima glutathione S-transferase (GST) e a conjugação das AFP₁ com o ácido glucorônico (DIAZ; MURCIA, 2011).

A principal via de eliminação da AFB₁ é decorrente da secreção biliar de seus metabólitos nas fezes (Figura 6) (COULOMBE; SHARMA, 1980; LUTHY; ZWEIFEL; SCHLATTER, 1980; HELFERICH et al., 1986; BASTAKI et al., 2010). Helferich et al. (1986) observou que dos até 69% de compostos radioativos recuperados nas fezes de animais intoxicados oralmente, menos de 2.6% consistia em AFB₁ inalterada.

Embora em menores proporções, a via urinária também é uma importante fonte de excreção da AFB₁ e é bastante utilizada para determinação de biomarcadores (Tabela 5). Jubert et al. (2009) observou que a eliminação em humanos após 24 h da intoxicação foi de

95% da dose através da urina, porém não foi diferenciada AFB₁ de seus metabólitos, demonstrando assim que a excreção é mais intensa neste período. Bastaki et al. (2010) verificou uma constante de eliminação de 3,0 µg/min tanto para a AFB₁ quanto para AFM₁.

Em suínos, apenas cerca de 4% da dose de AFB₁ marcada (14C) recuperada nas fezes e urina eram nas formas de AFB₁ inalterada e AFM₁, com alguns traços de aflatoxicol. No plasma, a maior parte da radioatividade encontrada estava ligada às proteínas, com meia-vida biológica de aproximadamente 6 dias. Análises teciduais demonstraram que as atividades mais elevadas de AFB₁ marcada foram nos dias 1 e 2 pós-exposição no fígado, no rim e pulmão (LUTHY; ZWEIFEL; SCHLATTER, 1980).

Figura 6 - Eliminação da Aflatoxina B₁ em humanos

GST = glutathione-S-transferase; mEH = hidrolase epóxido microsomal; AFAR = aflatoxina B₁-aldeído redutase.

(a) Evidências experimentais e humanas da excreção deste metabólito; (b) Evidência escassa ou nenhuma evidência disponível; (c) Somente evidências experimentais disponíveis (não há dados em humanos). Fonte: Jager et al. (2011).

Tabela 5 - Distribuição da AFB₁ em fluidos e compartimentos corporais de diferentes espécies

Animal	Sexo	V. A.	Via de eliminação (%)					Coleta pós-intoxicação	Eliminação (%)	Referência
			Leite	Urina	Fezes	Fígado	Plasma			
Ratos	Fêmea	IV	2.0	9.5	60.7	7.0	3.7	6 h	82.91	Helferich et al. (1986)
		VO	2.6	8.8	65.0	10.0	5.1		91.47	
	Macho	IV	-	19.1	52.9	6.5	2.2	100 h	80.7	Wong; Hsieh (1980)
Camundongo	Macho	IV	-	24.5	55.6	1.8	0.6	100 h	82.5	Wong; Hsieh (1980)
Caprinos	Fêmea	IV	1.0	22.7	65.3	-	-	120 h	89.01	Helferich et al. (1986)
		VO	1.1	30.1	52.4	-	-		83.4	
Macaco	Macho	IV	-	37.7	35.4	13.6	5.8	100 h	92.5	Wong; Hsieh (1980)
Suíños										
Suínos	Fêmea	VO	-	12.6	58.1	-	-	Durante 9 dias	70.7	Luthy; Zweifel; Schlatter (1980)
		V.A.	Perna	Coração	Moela	Peito	Fígado	Sangue		
Frangos	VO	30.6	4.3	12.5	31.7	9.8	11.0	5h após 14 dias de intox	99.9	Mabee et al. (1973)

V.A.: Via de administração; IV: Intravenoso; VO: via oral.

2.3. Biomarcadores

Biomarcadores são definidos como indicadores que sinalizam mudanças celulares ou moleculares em um meio biológico (tecidos humanos, células ou fluidos). Sendo assim, a detecção de biomarcadores específicos pode auxiliar na identificação, diagnóstico e tratamento de indivíduos que podem estar sob-risco, mas que ainda não exibem sintomas. Os biomarcadores são classificados como marcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade. Biomarcadores de exposição podem ser substâncias xenobióticas, seus metabólitos ou o produto da interação entre a substância e uma molécula ou célula alvo. Os biomarcadores de efeito são definidos como qualquer alteração bioquímica ou fisiológica dentro de um organismo que pode ser quantificável. Biomarcadores de susceptibilidade refletem fatores genéticos ou adquiridos que influenciam na resposta do organismo a uma determinada exposição química (AMORIM, 2003).

Um dos aspectos mais importantes na análise de risco das substâncias químicas é determinar o grau de exposição humana. Para isso, o desenvolvimento de biomarcadores para agentes ambientais (p. ex. aflatoxina) deve ser baseado no conhecimento específico do

metabolismo, formação de produtos e mecanismo geral de ação (GROOPMAN; KENSLER, 1999).

A demonstração do alto potencial carcinogênico e tóxico da AFB₁ tem impulsionado a caracterização do seu metabolismo para compreender os mecanismos moleculares que induzem ao câncer. Diversos biomarcadores de aflatoxina já foram detectados em urina, tais como AFM₁, AFP₁, AFQ₁, aflatoxina-dihydrodiol, aflatoxina-N⁷-guanina e a própria AFB₁ (MYKKANEN et al., 2005; GROOPMAN et al., 1992).

Após diversos estudos epidemiológicos terem indicado uma forte correlação entre a exposição à AFB₁ e o aumento no risco de câncer hepático, vários compostos têm sido validados como biomarcadores de exposição e efeito para as aflatoxinas em estudos detalhados em animais e humanos. A mensuração dos adutos de AFB₁ é de grande interesse, pois são produtos diretos de danos à alvos macromoleculares celulares. A constatação de que AFB₁-N₇-gua é excretada na urina de ratos expostos por Bennett, Essigmann e Wogan (1981) estimulou o interesse na utilização deste metabólito como um possível biomarcador de exposição e risco (WOGAN et al., 2012).

A relação dose-resposta entre os níveis de AFM₁ e AFB₁-N⁷-gua presentes na urina como biomarcadores e incidência de tumor hepático foi primeiramente estabelecida em experimentos também com ratos (GROOPMAN et al., 1992b). As primeiras investigações de dose-resposta conduzidas em humanos foram realizadas em populações com alta incidência de carcinoma hepatocelular (CHC) (China, Gâmbia, África Ocidental), onde foram avaliadas as relações entre a ingestão de aflatoxinas na dieta e os níveis de biomarcadores de aflatoxina urinária. A AFB₁-N₇-gua urinária e AFM₁ mostraram relações lineares dose-dependente entre a ingestão e excreção de aflatoxina. A validação posterior em estudos epidemiológicos avaliaram a variabilidade intrae inter-individual, a relação biomarcador-dose externa e a viabilidade do uso em amplos estudos populacionais (GROOPMAN et al. 1985; 1992a; 1992c; 1993).

Em humanos, quando os metabólitos individuais foram estratificados para a incidência de CHC, a presença de um importante aduto de aflatoxina na urina, a AFB₁-N⁷-gua, sempre resultou em uma elevação entre 200 e 300% no risco em desenvolver o CHC (ROSS et al., 1992; QIAN et al., 1994). Além da exposição através do consumo de AFB₁, a etiologia do CHC também está relacionada a infecções crônicas com vírus da hepatite B (HBV) (MYKKANEN et al., 2005; KAMDEM et al., 2006; WOGAN et al., 2012). Ao avaliar o risco de CHC relacionado à exposição a AFB₁ e HBV, indivíduos que portadores do HBV detectável e com AFB₁-N⁷-gua na urina apresentaram risco mais acentuado, o que apoia

fortemente a relação causal entre a presença dos marcadores químicos e virais específicas e o risco de CHC, e também mostram que os dois fatores de risco agem sinergicamente (WANG et al., 1996; WOGAN et al., 2012).

Groopman et al. (1992c) consideram que ocorre uma significativa excreção de AFB₁-N⁷-gua nas primeiras 24 horas após a exposição à AFB₁. Assim, embora esta seja uma forma de medição não invasiva para estimar os níveis de exposição à AFB₁, possui uma meia-vida relativamente curta (WU et al., 2009). Atualmente, a AFB₁-lys têm sido extensivamente utilizada como biomarcador de exposição em substituição a AFB₁-N⁷-gua urinária e na avaliação da eficiência de estratégias de quimioprevenção, mesmo podendo ser derivada dos dialdeídos e AFBO-endo, além do AFBO-exo (SCHOLL et al., 2006). A vantagem da utilização da AFB₁-lys é devido à meia-vida mais longa deste composto (relacionada com a meia-vida da albumina), o que a torna capaz de fornecer informações sobre a exposição acumulada por um período maior quando comparada ao aduto urinário (WOGAN et al., 2012).

A meia-vida da albumina em diferentes espécies geralmente é calculada através de uma escala alométrica com base no peso dos animais. Por exemplo, no camundongo, rato, coelho e humanos, a meia-vida da albumina tem sido estimada como 0,1, 1,9, 5,55 e 19 dias, considerando os pesos corporais típicos de 0,02, 0,25, 3 e 70 kg respectivamente (NGUYEN et al., 2006). A meia-vida 20 vezes maior da albumina humana em relação aos metabólitos urinários, tais como AFB₁-N⁷-gua, pode, teoricamente, produzir níveis estáveis de AFB₁-lys até 30 vezes maiores (SCHOLL et al., 2006). A meia-vida da albumina em suínos com 20 kg é de 8,2 dias (DICH; NIELSEN, 1963).

Em ratos, a meia-vida de AFB₁-lys é de aproximadamente 2,5 dias (WILD et al., 1986; SABBIONI et al., 1987; SCHOLL et al., 2006; QIAN et al., 2013) e conjuntamente com a AFB₁-N⁷-gua representam 3-4 % de uma dose única de AFB₁. Cerca de 1-2% AFB₁ ingerida é metabolizada em AFB₁-lys. Assim, o uso de AFB₁-lys pode aumentar a probabilidade de detecção da exposição que ocorreu tanto de forma intermitente como de forma crônica, em populações submetidas a baixos níveis de AFB₁ (SCHOLL et al., 2006; QIAN et al., 2013).

2.4. Métodos de análise de biomarcadores de aflatoxinas

Diferentes métodos analíticos estão disponíveis para quantificação de biomarcadores de aflatoxina em amostras biológicas, tais como os métodos cromatográficos (cromatografia em camada delgada - CCD; cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE; cromatografia gasosa - CG), testes imunológicos com anticorpos específicos (ensaio imunoenzimático -

ELISA; radioimunoensaio - RIA e ensaios imuno-histoquímico) e a espectrometria de massas (BANDO et al., 2007). Cada um destes métodos possui vantagens e desvantagens que afetam a sensibilidade e o rendimento inerente das amostras. A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, e é considerada uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo a um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas, tais como obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade (CHIARADIA et al., 2008).

McCoy et al. (2008) comparou os níveis de AFB₁-lys obtidos a partir da análise de amostras idênticas de indivíduos do Quênia envolvidos em um surto de aflatoxicose por diferentes métodos de detecção, sendo eles: ELISA, CLAE com detector de fluorescência (CLAE-f) e CLAE com espectrometria de massas por diluição isotópica (IDMS). IDMS foi a técnica mais sensível e CLAE-f foi o método menos sensível.

A espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas (MS/MS) utiliza dois estágios de espectrometria de massas, onde um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro para estabelecer uma relação entre este íon de interesse e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida. Esta técnica é frequentemente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, acoplada à cromatografia, aumentando a detectabilidade e a quantidade de informação estrutural que se pode obter, e reduzindo a interferência espectral de compostos presentes na matriz (CHIARADIA et al., 2008). O triplo quadrupolo é constituído por três quadrupolos em série, onde o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte -DIC, e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. Na DIC, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia, levando a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. e melhorando a detectabilidade do método (CHIARADIA et al., 2008). Embora existam diversas interfaces, o eletrospray (ESI) é o mais utilizado para determinação de aflatoxinas. A utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e massas/massas (LC-MS/MS) tem sido amplamente relatada na literatura na avaliação de biomarcadores de aflatoxina tanto sanguíneos como urinários (MCCOY et al., 2005;

WALTON et al., 2001; WARTH et al., 2012; SCHOOL et al., 2006; EVERLEY et al., 2007; JOHNSON et al., 2008).

Neste contexto, diversos biomarcadores têm sido validados por diferentes métodos em estudos com humanos e animais para definir parâmetros de confiabilidade, tais como especificidade, linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados à análise.

2.5. Validação de métodos analíticos

A validação analítica é fundamental para avaliar se o método é adequado aos objetivos pretendidos, a fim de fornecer resultados confiáveis (BRITO et al., 2003). De acordo com a Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA, a validação de um método analítico deve ser realizada preferencialmente através de métodos cromatográficos e deve conter ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito matriz e seletividade.

A seletividade é a capacidade do método de distinguir a substância em questão de outros componentes presentes na amostra. No caso de métodos cromatográficos, a seletividade pode ser demonstrada através da ausência de picos no mesmo tempo de retenção do analito de interesse em amostras "branco" e da presença de picos em amostras fortificadas (LANÇAS, 2004). Assim, este parâmetro avalia o grau de interferência de outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes na amostra, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004; CORCUERA et al., 2011; ANVISA, 2012). Efeito de Matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar interferências causadas por substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental. O estudo de efeito matriz é necessário para utilizar uma curva de calibração preparada em solvente, ou seja, com uma curva de calibração não matrizada (BRASIL, 2011 - guia de validação do MAPA).

A linearidade de um método é a capacidade de deduzir resultados de ensaios que são diretamente, ou através de uma dedução matemática simples bem definida, proporcionais à concentração de analito nas amostras dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004). A forma mais simples de observar a linearidade é através da representação gráfica da resposta de uma medida vs a concentração ou quantidade da substância conhecida (curva de calibração) definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004). A estimativa dos coeficientes de uma curva a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser realizada utilizando a regressão

linear e calculando o coeficiente de correlação (r). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI et al., 2004). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90. A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio (BRASIL, 2011), atendendo aos requisitos de precisão e exatidão. RIBANI et al. (2004) relata que os pontos da curva analítica podem ser igualmente espaçados sobre a faixa de concentração de interesse e que esta faixa compreenda 0– 150% ou 50–150% do valor esperado, dependendo de qual destas opções seja mais adequada.

A precisão indica a proximidade dos resultados de ensaios independentes obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz em condições específicas pré-estabelecidas, permitindo avaliar a dispersão dos resultados (ANVISA, 2012). O valor da precisão deve ser expressa em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um coeficiente de variação (CV%). Uma menor precisão é indicada através de um elevado desvio padrão (BARREIRA, 2009). Assim, não devem ser admitidos valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LOQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento).

A exatidão diz respeito à concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão são a utilização de materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação ou adição padrão (RIBANI et al., 2004). A recuperação é definida como a porcentagem do analito de interesse adicionado que foi recuperado após o processo de extração, não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LOQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal. A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Também é importante estabelecer os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). O LOD é a menor concentração do analito presente em uma amostra que o procedimento analítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo (BRASIL, 2003). O LOQ geralmente é calculado pela comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com o branco, estabelecendo-se a concentração mínima ao qual o analito pode ser quantificado (BRITO et al., 2003).

2.6. Suínos e sua importância

2.6.1. Fonte de alimento

A Suinocultura é uma das atividades da agropecuária mais difundida e produzida no mundo. A espécie precursora do suíno moderno (*Sus scrofa domesticus*) foi domesticada provavelmente por povos nômades há 10.000 anos, que em suas mudanças constantes, entenderam como uma vantagem domesticar este animal. Na América foi introduzido por Cristóvão Colombo em 1493, enquanto que no Brasil foram trazidos em 1532 por Martim Afonso de Sousa, quando fundou São Vicente (GERVÁSIO, 2013). Já no Rio Grande do Sul, o início da suinocultura está ligado à chegada dos primeiros imigrantes alemães, no século XIX (MENASCHE, 2007).

A primeira finalidade da criação de suínos foi o abastecimento de banha e carne para a família. A banha, além de ser um importante alimento na dieta dos agricultores e nas populações urbanas, era utilizada na conservação de alimentos perecíveis, em especial as carnes. O crescente aumento na produção de suínos no Brasil entre o final do século XIX e início do século XX estava relacionada à comercialização destes produtos. A banha possuía alto valor de mercado e fácil acondicionamento e transporte. Na década de 1930, a concorrência criada pela entrada de banha americana e dos óleos de origem vegetal no mercado nacional provocou uma forte crise no setor e iniciou a alteração do sistema de criação com a modificação da genética do plantel suinícola para a produção de carne. Apesar da crise, a introdução de nova raça e a consequente alteração de manejo acontecia lentamente. No entanto, na década de 1940, a ocorrência da Peste Suína Clássica (PSC) em território brasileiro representou um marco importante de transição de sistemas, pois grande parte do rebanho teve que ser eliminado e o mercado externo foi fechado. Concomitantemente, surgiam com maior intensidade no mercado nacional os óleos vegetais, que gradualmente alteraram os hábitos alimentares da população e reduziam o consumo de banha (MENASCHE, 2007).

Em 1978, a ocorrência de um surto de peste suína africana aliada aos sucessivos casos de febre aftosa na década de 80, deixou o Brasil fora do mercado internacional por um longo período. Desde o final da década de 1980, quando foi consolidado o melhoramento genético, o avanço sanitário, o manejo nutricional e o acesso ao mercado internacional, a produção brasileira de carne suína vem crescendo praticamente de forma ininterrupta. Embora as barreiras sanitárias impostas por países como Estados Unidos (EUA), Japão, Coreia do Sul e os pertencentes à União Europeia impeçam que o Brasil tenha acesso a 60% do mercado consumidor, a partir de 1990 o país reagiu significativamente iniciando as exportações de

carne suína. No final da década de 90 o Brasil já se apresentava como importante exportador de carne suína e, após o acesso ao mercado da Rússia em 2001, o país se consolidou como o quarto maior exportador mundial. A partir de 2010, embora a Rússia ainda tenha sido o principal comprador da carne suína brasileira, outros países aumentaram sua importância como destino para as exportações, com destaque para Hong Kong e Ucrânia (DIAS et al., 2011), como se verifica na Figura 7.

Figura 7- Principais destinos da Carne Suína Brasileira exportada em janeiro de 2013.

Fonte: ABIPECS (2014).

Como o mercado atual evidencia uma redução significativa nas margens de lucro, produzir de forma economicamente eficiente passou a ser pré-requisito para a sobrevivência da atividade. A alimentação dos suínos representa grande parte do custo total da produção de um sistema de ciclo completo (aproximadamente 70%), o que ressalta a importância do valor de mercado desses insumos. Fatores como quebras de safra, aumento das exportações de grãos e mesmo a concorrência de outras atividades por esses produtos, determinam aumento considerável nos custos de produção (DIAS et al., 2011).

2.6.2. Modelo animal para estudos humanos

O uso de animais para a extrapolação de dados toxicológicos para humanos é conhecido. Esta extrapolação é ótima quando são utilizados nos estudos a espécie mais parecida ao humano. Reconhece-se que muitas vezes é difícil identificar o modelo animal mais relevante para a predição de reações humanas, especialmente quando não há dados disponíveis (BODE et al., 2010). Para que a investigação translacional tenha sucesso, o modelo animal deve ser apropriado para o estudo de condições humanas. A espécie

selecionado deve imitar a fisiopatologia da doença humana, tanto quanto possível (KOOPMANS; SCHUURMAN, 2015).

Neste contexto, é claramente relevante que os suínos (*Sus scrofa*) e humanos (*Homo sapiens*) partilham muitas semelhanças relacionadas à nutrição, anatomia, fisiologia e fisiopatologia. Suínos são considerados uma das principais espécies de animais utilizados na investigação translacional. Ao longo dos últimos 20 anos, os suínos tem sido cada vez mais utilizados como uma alternativa para cães e macacos como espécie não-roedora de escolha em testes toxicológicos pré-clínicos (BODE et al., 2010; FRAUDE et al., 2012; NIELSEN et al., 2014). Muitos órgãos e sistemas suínos mostram analogias e vantagens em relação a outros modelos experimentais (PUCCINELLI et al, 2011; KOOPMANS; SCHUURMAN, 2015). Os mapas comparativos do genoma humano e de suínos mostram uma extensa homologia conservada, incluindo os CYP mais envolvidos na biotransformação xenobióticos (1-4 famílias) (PUCCINELLI et al., 2011).

2.7. Compostos Adsorventes de Micotoxinas

A contaminação dos alimentos com aflatoxinas permanece ainda como um dos grandes problemas na produção animal pelo grande impacto que estas toxinas provocam e a dificuldade em se obter tecnologias efetivas para descontaminação. A eficiência dos procedimentos de descontaminação é dependente do alimento, dos tipos de aflatoxinas presentes, do nível de contaminação e do grau de associação entre as aflatoxinas e os constituintes do alimento, principalmente proteínas (RUSTOM, 1997).

Na tentativa de diminuir a exposição dos animais às aflatoxinas, diversas estratégias foram investigadas a fim de prevenir a formação destes compostos, bem como eliminar, inativar ou reduzir a sua biodisponibilidade nos alimentos contaminados. A alta estabilidade da aflatoxina ao calor e a outras condições físicas limita o uso destas formas de inativação. No intuito de prevenir a contaminação são utilizados métodos de melhoria das práticas agrícolas, agentes antifúngicos, a engenharia genética e o controle das condições de armazenamento. Para eliminar ou inativar (descontaminação) podem ser utilizados métodos físicos, químicos e biológicos. A fim de que estes métodos sejam aplicáveis, estes devem levar à completa inativação, destruição ou remoção da toxina sem produzir ou deixar resíduos tóxicos nos alimentos, preservando seu valor nutritivo e palatabilidade; destruir os esporos e as micelas fúngicas prevenindo a produção ou o reaparecimento da toxina e não modificar as propriedades físicas do alimento significativamente. Além disso, os métodos de detoxificação devem ser práticos e viáveis economicamente para utilização em larga escala. Uma vez que os

métodos atualmente disponíveis para prevenir a formação de micotoxinas, inativá-las ou eliminá-las sem perder a qualidade do produto final são complexos, o uso de eficientes métodos para redução da biodisponibilidade são os mais empregados (PARLAT; YILDIZ; OGUZ, 1999; CAST, 2003; JAYNES et al., 2007).

Como alternativa, há a possibilidade da adição de substâncias não nutritivas que se ligam à aflatoxina, reduzindo sua absorção no trato gastrointestinal (KUBENA et al., 1990). Uma das abordagens mais conhecidas para proteger os animais contra os efeitos nocivos da ração contaminada é o uso de materiais inorgânicos adsorventes – argilas. Estes compostos atuam a partir de uma suspensão aquosa no trato gastrointestinal, onde é formado um complexo toxina-adsorvente – processo conhecido como enteroadsorção – que é eliminado nas fezes. Desta forma, ocorre uma redução significativa na absorção e distribuição da aflatoxina para o sangue e órgãos-alvo, prevenindo assim a aflatoxicose (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995; BOVO; CORASSIN; OLIVEIRA, 2010; KOLOSOVA; STROKA, 2011).

A eficácia do processo de adsorção é dependente tanto da estrutura física e química do adsorvente quanto da micotoxina investigada (JAYNES et al., 2007; BOVO; CORASSIN; OLIVEIRA, 2010). O Aluminossilicato de Cálcio e Sódio Hidratado (*Hydrated Sodium and Calcium Aluminosilicate* - HSCAS) compõe uma classe de compostos inorgânicos normalmente utilizados como aditivo anti-aglomerante na alimentação animal, que inicialmente foi classificado como um tipo de montmorilonita de cálcio, tendo apresentado bons resultados quando utilizado como adsorvente de aflatoxinas em estudos realizados *in vivo* (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA, 2009).

A unidade estrutural básica de argilominerais silicatados consiste na combinação de dois tipos de folhas: a tetraédrica de sílica e a octaédrica de alumínio (ABBÉS et al., 2010; TAPIA-SALAZAR et al., 2010). Nas montmorilonitas, os átomos de oxigênio das folhas tetraédricas são compartilhados com a folha octaédrica central, originando argilas de três camadas (grupo 2:1) (DAKOVIC et al., 2008; LUNA; SCHUCHARDT, 1999).

A eletronegatividade das argilas está relacionada principalmente com a sua capacidade de substituição isomórfica, isto é, a capacidade do tetraedro em substituir Si^{4+} por Al^{3+} , e do octaedro substituir o Al^{3+} por cátions divalentes (Mg^{2+} , Fe^{2+}). A criação de uma deficiência de cargas positivas torna as partículas eletronegativas, que resulta na capacidade de troca catiônica dos argilominerais. Esta carga negativa é compensada por cátions inorgânicos (por exemplo, Na^+ e Ca^{2+}) (DAKOVIC et al., 2003; ROSSETTO et al., 2009; ABBES et al., 2010).

Estas condições permitem a determinação das características globais da argila, como carga, polaridade, expansibilidade, estrutura, capacidade de troca catiônica, pH, tamanho de

partícula, área de superfície, reologia, capacidade de adsorção, entre outras (LUNA; SCHUCHARDT, 1999; TAPIA-SALAZAR et al., 2010).

A maior parte dos aluminossilicatos é eficaz na adsorção das aflatoxinas, embora a sua eficácia com outras micotoxinas tenha pouco sucesso, pois a superfície hidrofílica destes compostos é menos eficiente na adsorção de micotoxinas não-polares (HAUSCHILD et al., 2007).

A estrutura tridimensional da molécula de AFB₁ possui uma configuração co-planar, onde os anéis B, C, D e E, os dois grupos carbonila, e o grupo metoxi estão no mesmo plano. O anel A dihidrofurano projeta-se em direção ao observador na Figura 8. A orientação ótima da AFB₁ na superfície da intercamada HSCAS provavelmente é planar (DENG; SZCZERBA, 2011).

Figura 8 - Superfície de potencial eletrostático

Fonte: Deng; Szczerba (2011).

Vários mecanismos têm sido sugeridos a fim de explicar a adsorção da AFB₁ por HSCAS, dentre eles: modelo doador-receptor de elétrons, quimissorção seletiva, interações íon-dipolo, ligações de hidrogênio e ligações através do anel furano (DENG et al., 2010).

Em relação aos locais de adsorção, Desheng et al. (2005) sugeriram que a AFB₁ é adsorvida na borda da montmorilonita por uma ligação dupla de hidrogênio, e que a molécula de AFB₁ não penetra na área interlamelar deste argilomineral. Entretanto, estudos anteriores indicaram que as aflatoxinas podem reagir em diversos locais, especialmente na região interlamelar, mas também nas bordas e superfícies basais (PHILLIPS, 1999; PHILLIPS; LEMKE; GRANT, 2002). Os mecanismos de adsorção de AFB₁ por superfícies HSCAS podem envolver a quelatação, ou interação de AFB₁ com cátions intercalar (especialmente Ca) ou vários metais encontrados na borda (GRANT; PHILLIPS, 1998; PHILLIPS, 1999;

JAYNES et al., 2007; PHILLIPS et al., 2008). Deng et al. (2010) além de observarem que a AFB₁ poderia de fato ocupar os espaços interlamelares, relatou que os principais mecanismos de ligação em condições de baixa umidade foram interações íon-dipolo/coordenação entre os dois grupos carbonila e os cátions trocáveis (Figura 9a). Em condições úmidas, o principal mecanismo foi de ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila e a água na camada de hidratação dos cátions de troca (Figura 9b).

Deng e Szczerba (2011) confirmaram que os dois oxigênios das carbonilas foram os locais mais importantes de interação com cátions de troca e com a água na região intercalar da montmorilonita (Figura 10).

Entretanto, observa-se que muitos dos adsorventes atualmente encontrados no mercado foram avaliados somente quanto a sua eficácia em ensaios *in vitro*. Considerando a grande variabilidade das propriedades químicas dos adsorventes, existe sempre a necessidade de confirmar a eficiência dos mesmos através de estudos *in vivo*, cujos protocolos experimentais são geralmente caros, pois envolvem a administração de níveis da toxina com e sem o adsorvente para avaliar diversos tipos efeitos sobre a produtividade dos animais, além de dados histopatológicos e clínicos, entre outros. Neste contexto, o emprego de biomarcadores para estimar a biodisponibilidade de AFB₁ em ensaios de eficiência de adsorventes *in vivo* poderia reduzir os custos desses ensaios, além de proporcionar maior praticidade e padronização na condução dos experimentos, além de possibilitar a avaliação dos adsorventes em condições de campo. Contudo, não há referência de estudos sobre a utilização de biomarcadores para avaliar a exposição às aflatoxinas em suínos, com ou sem a inclusão de adsorventes na dieta.

Figura 9 - Mecanismos de ligação entre AFB₁ e montmorilonita

(a) interações íon-dipolo/coordenação entre os dois grupos carbonila e os cátions trocáveis; (b) ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila e a H₂O na camada de hidratação dos cátions de troca. Fonte: Deng et al. (2010).

Figura 10 - Modelo da aflatoxina nas camadas interlamelares das montmorilonitas

Fonte: Deng et al. (2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objeto geral deste projeto foi verificar a aplicabilidade da determinação de produtos de biotransformação de AFB₁ e AFB₁-lisina na avaliação da eficiência de adsorventes em suínos.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar os efeitos da ingestão de AFB₁, administrada na ração com e sem adsorvente, sobre o ganho de peso corpóreo e índices zootécnicos de suínos;
- Avaliar nos suínos intoxicados os parâmetros hematológicos e de bioquímica sérica;
- Avaliar os pesos relativos do fígado, coração, baço, bem como as alterações histopatológicas nos referidos órgãos, decorrentes da exposição dos animais às toxinas através da ração;
- Determinar a concentração de resíduos de AFB₁, AFB_{2a}, AFM₁ e AFL no fígado dos animais intoxicados, bem como de AFB₁-lisina no soro;
- Avaliar a eficiência do método analítico para determinação de AFB₁-lisina no plasma com EDTA e heparina, em comparação ao soro dos animais;
- Determinar a concentração de resíduos de AFB₁, AFB₁-N⁷-guanina, AFM₁, AFL, AFP₁ e AFQ₁ na urina dos animais intoxicados ao longo de todo o período de exposição;
- Verificar a correlação entre a concentração de resíduos de AFB₁, AFB₁-N⁷-guanina, AFM₁, AFL, AFP₁ e AFQ₁, bem como da AFB₁-lisina no soro e as demais variáveis estudadas no experimento com vistas à sua aplicação na avaliação da eficiência de adsorventes em suínos.

6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos, os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- O primeiro e mais consistente sinal de aflatoxicose em suínos é a diminuição da ingestão diária de alimentos e consequente diminuição do ganho de peso;
- Existe uma grande variação individual na resposta dos suínos frente à intoxicação por AFB₁;
- A AFB₁ alterou os valores de ALT, AST, ALP, ALB e ureia, bem como ocasionou eritrocitose, leucocitose e neutrofilia nos suínos;
- Na avaliação de carcaça, foram diminuídos por efeito da AFB₁ o peso de carcaça quente e fria, EGS e AOL;
- A AFB₁ aumentou significativamente o peso relativo do fígado, baço e rins;
- Na avaliação histológica, o fígado apresentou diferença estatística pela interação AFB₁ x HSCAS;
- Foram quantificados AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFM₁ no fígado dos suínos intoxicados. A AFQ₁ e o aflatoxicol foram detectados em níveis abaixo do LOQ;
- Nas análises de AFB₁-Lys, o tempo de digestão necessário é de 4h. Amostras coletadas com heparina proporcionam os mesmos rendimentos deste aduto que as amostras séricas. Amostras coletadas em EDTA não devem ser utilizadas, pois interferem na digestão enzimática.
- Nas urinas dos suínos intoxicados foram quantificados AFB₁, AFM₁, AFQ₁ e AFB₁-N⁷-guanina. Níveis de aflatoxicol foram detectados, porém em níveis abaixo do LOQ.
- O principal metabólito excretado pela urina é a AFM₁. Com a evolução da lesão hepática decorrente da exposição à AFB₁, embora ainda seja o principal metabólito excretado, os níveis de AFM₁ diminuem gradativamente enquanto que os níveis de AFB₁ e AFB₁-N⁷-guanina aumentam;
- Os biomarcadores avaliados apresentaram, de modo geral, diversas correlações com as variáveis analisadas nos animais alimentados com AFB₁,

com ou sem adsorvente, porém a AFB₁-N⁷-guanina apresentou maior número de correlações significativas.

- A adição de 0,5% de HSCAS em dietas contaminadas com 1,1 mg.kg⁻¹ AFB₁ diminuiu os efeitos de negativos sobre a maioria os parâmetros de desempenho, hematológicos, bioquímica sérica, carcaça, peso relativo dos órgãos e lesões histopatológicas;
- A adição de 0,5% de HSCAS em dietas contaminadas com 1,1 mg.kg⁻¹ AFB₁ diminuiu a dose interna de AFB₁ nos suínos, avaliada pelo decréscimo dos níveis de AFB₁-Lys sérica, reduziu as concentrações urinárias de AFB₁, AFM₁, AFQ₁ e AFB₁-N⁷-guanina e de aflatoxinas residuais no fígado dos animais;
- Os biomarcadores AFB₁-Lys sérica e AFB₁, AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina urinárias apresentam potencial para serem aplicadas em estudos que avaliem a exposição de suínos à AFB₁, bem como para verificar a eficácia de adsorventes ou outras estratégias de intervenção nesta espécie.

7. REFERÊNCIAS

- ABBÈS, S.; SALAH-ABBÈS, J.B.; ABDEL-WAHHAB, M.A.; OUSLATI, R.
Immunotoxicological and biochemical effects of aflatoxins in rats prevented by Tunisian montmorillonite with reference to HSCAS. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v.32, n.3, p.514-22, 2010.
- ABBÈS, S.; SALAH-ABBÈS, J.; SHARAFI, H.; NOGHABI, K. A.; OUESLATI, R.
Interaction of *Lactobacillus plantarum* MON03 with Tunisian montmorillonite clay and ability of the composite to immobilize Zearalenone in vitro and counteract immunotoxicity in vivo. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v.34, n.6, p. 944–50, 2012.
- ABIA, W.A.; SIMO, G.N.; WARTH, B.; Sulyok, M.; KRSKA, R.; TCHANA, A.; MOUNDIPA, P.F. Determination of multiple mycotoxins levels in poultry feeds from Cameroon. **Jpn J Vet Res**, v.61, p.S33-S39, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO (ABIMILHO). **Oferta e Demanda do Milho do Brasil**. Disponível em:
<<http://www.abimilho.com.br/estatisticas>>. Acessado em: 11 mar. 2016 às 09h57.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em:
<<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 12 fev. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Acesso em: 15 jan. 2014.
- AGUILLAR, F.; HUSSAIN, S.P.; CERUTTI, P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-T in códon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci**, v.90, p.8586-90, 1993.
- ALMEIDA, A.V.A.F.; BOTURA, M.B.; ABREU, R.D.; BITTENCOURT, T.C.C.; BATATINHA, M.J.M. OCORRÊNCIA de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no estado da Bahia. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.3, p.353-358, 2009.
- AMARAL, K.A.S.; NASCIMENTO, G.B.; SEKIYAMA, B.L.; JANEIRO, V.; JUNIOR, M.M. Aflatoxinas Em Produtos À Base De Milho Comercializados No Brasil E Riscos Para A Saúde Humana. **Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.

- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev Bras Epidemiol**, v.6, supl. 1, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa nacional de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos expostos ao consumo, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA (Abipecs). **Mercado Externo: Principais destinos**. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mercado-externo/destinos.html>>. Acesso em: 10 jan. 2014 às 11h38.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO (ABIMILHO). **Oferta e Demanda do Milho do Brasil**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatistica>>. Acessado em: 05 mar. 2016 às 17h48.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS (ABCS). **Carne suína é destaque em um dos maiores jornais do país**. Disponível em: <http://www.abcs.org.br/informativo-abcs/686-carne-suina-e-destaque-na-folha-de-spaulo>. Acessado em: 29 maio 2014 à 17h16.
- AZIZI, I.G.; GHADI, H.; AZARMI, M. Determination of Aflatoxin B1 Levels of the Feedstuffs in Traditional and Semi-industrial Cattle Farms in Amol, Northern Iran. **Asian J Anim Vet Advanc**, v. 7, p. 528-534, 2012.
- AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; LINDBLADE, K.; GIESEKER, K.; ROGERS, H. S.; KIESZAK, S.; NJAPAU, H.; et al. Case – Control Study of an Acute Aflatoxicosis Outbreak , Kenya , 2004. **Research | Environmental Medicine**, v. 113, n. 12, p. 1779–1783, 2005.
- BANDO, E; GONÇALES, L.N.; TAMURA, N.K.; MACHINSKI-JUNIOR, M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Rev Bras Patol Médica**, v. 43, n.3, p.175–80, 2007.
- BAPTISTA, A.S. **Saccharomyces cerevisiae na redução de aflatoxicoses e o efeito na distribuição e na excreção de radioatividade de AFB1 3H em ratos**. 2005. 94 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BARREIRA, M.J.M.M. **Ocorrência da patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças: otimização e validação do método de análise por SPE-HPLC-UV**. 2009. 250f. Dissertação (Mestrado) - Controle da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2009.
- BASTAKI, S. et al. Toxicokinetics of aflatoxin in pregnant mice. **International Journal of Toxicology**, v.29, n.4, p.425-31, 2010.
- BATATINHA, M. J. M; BOTURA, M. B; SIMAS, M. M. S; MALLMANN, C. A; BITTENCOURT, T.C.B.S.C; SABINO, M. Otimização de método analítico para determinação de aflatoxinas em rações de caprinos e ocorrência no estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.503-505, 2008.

- BEAVER R, WILSON D, JAMES M, HAYDON K.. Distribution of aflatoxins in tissues of growing pigs fed an aflatoxin- contaminated diet amended with a high affinity aluminosilicate sorbent. **Veterinary and Human Toxicology**, 32:16, 1990.
- BENNETT, R.A.; ESSIGMANN, J.M.; WOGAN, G.N. Excretion of an aflatoxin-guanine adduct in the urine of aflatoxin B1- treated rats. **Cancer Res**, v.41, n.2, p.650–4, 1981.
- BENTO LF, CANEPPELE MAB, ALBUQUERQUE MCF, KOBAYASTI L, CANEPPELE C, ANDRADE PDJ. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho Occurrence of fungi and aflatoxins in corn kernels, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 71, n.1, p.44–9, 2012.
- BERGGREN, S. et al. Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. **Molecular pharmaceutics**, v.4, n.2, p.252-7, 2007.
- BETINA, V. **Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects** (Bioactive molecules). Amsterdam: Elsevier, v.9, 1989.
- BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K.C. Toxins of Filamentous Fungi. **Chemical Immunology**, v. 81, p. 167-206, 2002.
- BODE, G.; CLAUSING, P.; GERVAIS, F.; LOEGSTED, J.; LUFTE, J.; NOGUES, V. et al.,. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.62, p. 196–220, 2010.
- BOVO, F.; CORASSIN, C.H.; OLIVEIRA, C.A.F. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. **UNOPAR Cient**, v.12, p.15-21, 2010.
- BRIDI, A.M.; SILVA, C.A. **Avaliação da carne suína**. Londrina: Midiograf, 2009. 120p.
- BRITO, N. M.; AMARANTE JR, O.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação De Métodos Analíticos : Estratégia E Discussão. Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, p. 129–146, 2003.
- BUSBY, W.F.; WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: **Chemical Carcinogenesis**. Washington, D.C: Searle, American Chemical Society, p. 945–1136, 1984.
- CÉSPEDES, A.E.; DIAZ, G.J. Analysis of Aflatoxins in Poultry and Pig Feeds and Feedstuffs used in Colombia. **J AOAC Internat**, v.80, p.1215-1219, 1997.
- CHAYTOR, a C.; SEE, M. T.; HANSEN, J. a; DE SOUZA, a L. P.; MIDDLETON, T. F.; KIM, S. W. Effects of chronic exposure of diets with reduced concentrations of aflatoxin and deoxynivalenol on growth and immune status of pigs. **Journal of animal science**, v. 89, n. 1, p. 124–35, 2011.
- CHEN, G.; CUE, R.; LUNDSTROM, K.; WOOD, J. D.; DORAN, O. Regulation of CYP2A6 Protein Expression by Skatole , Indole , and Testicular Steroids in Primary Cultured Pig Hepatocytes ABSTRACT : v. 36, n. 1, p. 56–60, 2008.

- CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim Nova**, v.31, n.3, p.623–36, 2008.
- CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation research**, v. 259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.
- CHU, F.S.; BHATNAGAR, D. Mycotoxins. In: ARORA, D.K.; BRIDGE, P.D.; BHATNAGAR, D. **Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications**, chap.29, 2004.
- Codex Alimentarius Commission (1998). Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for Codex purposes, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, Do- cumento CX/MAS 98/5
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2013. **Indicadores da Agropecuária**. Brasília, ano XXII, n.12, dez. 2013, p.1-78. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conab/Main.php?MagID=3&MagNo=205>>. Acesso em: 06 jan. 2014 às 20h35.
- CORCUERA, L.A. et al. An approach to the toxicity and toxicokinetics of aflatoxin B1 and ochratoxin A after simultaneous oral administration to fasted F344 rats. **Food Chem Toxicol**, v.50, n.10, p.3440-6, 2012.
- CORCUERA, L.A. et al. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney. **Journal of chromatography B**, v.879, n26, p.2733-40, 2011.
- COULOMBE R.A.; SHARMA, R.P. Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B1 in the rat. **Food and chemical toxicology**, v.23, n.9, p.827-30, 1985.
- COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P.; Salunkhe, D.K. (Ed.). **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, v.1, p.103-143, 1991.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. 1.ed. Ames, USA, 2003.
- CRUZ J V. Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo. **Universidade de São Paulo**. 2010.
- DAKOVIĆ A, TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ M, ROTTINGHAUS G, DONDUR V, MAŠIĆ Z. Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff. **Colloids and Surfaces B**, v.30, n.1-2, p.157–165, 2003.
- DAKOVIĆ A, MATIJASEVIĆ S, ROTTINGHAUS GE, LEDOUX DR, BUTKERAITIS P, SEKULIĆ Z. Aflatoxin B₁ adsorption by natural and copper modified montmorillonite. **Colloids Surfaces B**, v.66, p.20-5, 2008.
- DAKOVIĆ, A.; KRAGOVIĆ, M.; ROTTINGHAUS, G. E.; LEDOUX, D. R.; BUTKERAITIS, P.; VOJISLAVLJEVIĆ, D. Z.; ZARIĆ, S. D.; STAMENIĆ, L.

Preparation and characterization of zinc-exchanged montmorillonite and its effectiveness as aflatoxin B1 adsorbent. *Materials Chemistry and Physics*, v. 137, n. 1, p. 213–220, nov. 2012.

DASH, B., AFRIVIE-GYAWN, E., HUBNER, H.J., PORTER, W., WANG, J.S., JOLLY, P.E., PHILLIPS, T.D. Determinants of the variability of aflatoxin - albumin adduct levels in Ghanaians. **Journal of Toxicology in Environmental Health A**, 70, 58-66, 2007.

DAVIDSON, P.M. Foodborne Diseases in the United States In: HUI, Y.H.; BRUINSMA, L.B.; GORHAM, J.R.; NIP, W.K.; TONG, P.S.; VENTRESCA, P. (Ed.). **Food Plant Sanitation**. New York: CRC Press 2002.

DENG Y, VELÁZQUEZ ALB, BILLES F, DIXON JB. Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. **Appl Clay Sci**, v.50, n.92-98, 2010.

DENG, Y.; SZCZERBA, M. Computational evaluation of bonding between aflatoxin B1 and smectite. **Appl Clay Sci**, v.54, n.1, p.26:33, 2011.

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**, v. 88, n. 7, p. 1444–1451, 2009.

DERSJANT-LI, Y.; VERSTEGEN, M. W. a; GERRITS, W. J. J. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. **Nutrition research reviews**, v. 16, n. 2, p. 223–39, dez. 2003.

DESHENG Q, FAN L, YANHU Y, NIYA Z. Adsorption of Aflatoxin B1 on Montmorillonite. **Pout Sci**, v.84, p.959-61, 2005.

DI GREGORIO, M. C.; NEEFF, D. V. De; JAGER, A. V.; CORASSIN, C. H.; CARÃO, Á. C. D. P.; ALBUQUERQUE, R. De; AZEVEDO, A. C. De; OLIVEIRA, C. A. F. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. **Toxin Reviews**, v. 33, n. 3, p. 125–135, 2014.

DIAS, A.C. et al. **Manual Brasileiro de Boas Práticas Agropecuárias na Produção de Suínos**. Brasília, DF: Associação Brasileira dos Criadores de Suínos (ABCS), MAPA , 140 p., 2011.

DIAZ, G.J.; MURCIA, H.W. Biotransformation of Aflatoxin B1 and Its Relationship with the Differential Toxicological Response to Aflatoxin in Commercial Poultry Species. In: Guevara-Gonzalez, R.G. **Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology**, InTech, 2011.

DICH, J.; NIELSEN, K. Metabolism and Distribution of 131 I-labelled Albumin in the Pig. **Canad J Comp Med Vet Sci**, v.27, n.11, p.269-73, 1963.

DOI, A.M.; PATTERSON, P.E.; GALLAGHER, E.P. Variability in Aflatoxin B1–Macromolecular Binding and Relationship to Biotransformation Enzyme Expression in Human Prenatal and Adult Liver. **Toxicol Appl Pharm**, v.181, p.48–59, 2002.

- DRABEK, J.; PISKAC, A. The occurrence of aflatoxins in some components and complete feed mixtures for pigs. **Vet Med (Praha)**, v.24, p.597-602, 1979.
- EGNER, P.A. et al. Identification of aflatoxin M₁-N⁷-guanine in liver and urine of tree shrews and rats following administration of aflatoxin B₁. **Chem Res Toxicol**, v.16, p.1174-80, 2003.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA, 2014). **Introdução e Importância econômica do Milho**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>>. Acesso em: 07 jan. 2014 às 17h27.
- ESSIGMANN, J.M. et al. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ in vitro. **Proc Natl Acad Sci**, v.74, p.1870-4, 1977.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. **CFP/EFSA/FEEDAP**, 2009.
- EVERLEY, R. A.; CINEP, F.; ZHANG, D.; SCHOLP, P. F.; GROOPMAN, J. D.; CROLEY, T. R.; LABORATORIES, C.; STREET, N. Measurement of Aflatoxin and Aflatoxin Metabolites in Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **J Anal Toxicol**, v. 31, 2007.
- FDA. Guidance for industry bioanalytical method validation guidance for industry bioanalytical method validation. [s.l: s.n.]
- FERNÁNDEZ, A.; BELÍO, R.; RAMOS, J. J.; SANZ, M. C.; SÁEZ, T. Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin-contaminated diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, n. 2, p. 161–168, 1997.
- FIGUEIREDO-FILHO, D.B.; SILVA-JÚNIOR, J.A.D. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Rev Política Hoje**.18(1):115–46, 2009.
- FIRMIN, S. et al. Modification of aflatoxin B₁ and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation. **Food Addit Contam**, v.27, p.1153–1160, 2010.
- FONSECA, H. Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* l.) na região araraquarense, do estado de São Paulo. **Anais da ESALQ**, v. 32, 1975.
- FOWLER, J.; LI, W.; BAILEY, C. Effects of a calcium bentonite clay in diets containing aflatoxin when measuring liver residues of aflatoxin B₁ in starter broiler chicks. **Toxins**, v. 7, n. 9, p. 3455–3464, 2015.
- FU JC, CHEN Q, DU J, SHI BM, SHAN AS. Effectiveness of maifanite in reducing the detrimental effects of aflatoxin B₁ on hematology, aflatoxin B₁ residues, and antioxidant enzymes activities of weanling piglets. **Livestock Science**, 157(1), pp.218–224, 2013.

- FURTADO R.M., PEARSON A.M., HOGBERG M.G., MILLER E.R., GRAY J.I., AUST S.D. Withdrawal time required for clearance of aflatoxins from pig tissues. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 30, 101–106, 1982.
- GALLAGHER, E.P. et al. Role of Human Microsomal and Human Complementary DNA-expressed Cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the Bioactivation of Aflatoxin B1. **Canc Res**, v.54, n.1, p.101-108, 1994.
- GALLO, A.; MOSCHINI, M.; MASOERO, F. Aflatoxins absorption in the gastrointestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows. **Ital J Anim Sci**, v.7, p.53-63, 2008.
- GAMBACORTA, S.; SOLFRIZZO, H.; VISCONTI, a.; POWERS, S.; COSSALTER, a. M.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. Validation study on urinary biomarkers of exposure for aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone in piglets. *World Mycotoxin Journal*, v. 6, n. 3, p. 299–308, 1 ago. 2013.
- GAN LS, SKIPPER PL, PENG XC, GROOPMAN JD, CHEN JS, WOGAN GN, TANNENBAUM SR. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B1 intake and urinary excretion of aflatoxin M1. **Carcinogenesis**. 9:1323–1325. 1988.
- GARRIDO, C.E.; PEZZANI, C.H.; PACIN, A. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays L.*), from 1999 to 2010. **Food Control**, v.25, p. 660-665, 2012.
- GERVÁSIO, E.W. **Suinocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, DERAL - Departamento de Economia Rural, Paraná, 2013.
- GHIASIAN, S.A.; SHEPHARD, G.S.; YAZDANPANA, H. Natural Occurrence of Aflatoxins from Maize in Iran. **Mycophathologia**, v.172, p. 153-160, 2011.
- GOMPERTZ, O.F. et al. Fungos Tóxicos. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: ATHENEU, p. 533-4, 2008.
- GONZÁLEZ PEREYRA, M. L., V. A. ALONSO, R. SAGER, M. B. MORLACO, C. E. MAGNOLI, A. L. ASTORECA, C. A. R. ROSA, S. M. CHIACCHIERA, M. DALCERO, AND L. R. CAVAGLIERI.. Fungi and selected mycotox- ins from pre- and postfermented corn silage. **J. Appl. Microbiol.** 104:1034–1041, 2008.
- GRAJEWSKI, J.; BLAJET-KOSICKA, A.; TWARUZEK, M.; KOSICKI, R. Occurrence of mycotoxins in Polish animal feed in years 2006–2009. **J Anim Physiol Anim Nutr**, v.96, p.870-877, 2012.
- GRANT, P.G.; PHILLIPS, T.D. Isothermal Adsorption of Aflatoxin B1 on HSCAS Clay. **J Agric Food Chem**, v.46, p.599–605, 1998.
- GROOPMAN J.D. et al. Molecular Epidemiology of Aflatoxin Exposures: Validation of Aflatoxin-N⁷-Guanine Levels in Urine as a Biomarker in Experimental Rat Models and Humans. **Env Healt Persp**, v.99, p.107-113, 1993.

- GROOPMAN, J. D.; EGNER, P. a; SCHULZE, K. J.; WU, L. S.-F.; MERRILL, R.; MEHRA, S.; SHAMIM, A. a; ALI, H.; SHAIKH, S.; GERNAND, A.; KHATRY, S. K.; LECLERQ, S. C.; WEST, K. P.; CHRISTIAN, P. Aflatoxin exposure during the first 1000 days of life in rural South Asia assessed by aflatoxin B₁-lysine albumin biomarkers. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 74, p. 184–9, 2014.
- GROOPMAN, J.D. Aflatoxin metabolism in humans, detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. **Proc Natl Acad Sci**, v.82, p.6492-6, 1985.
- GROOPMAN, J.D. et al. Molecular dosimetry in rat urine of aflatoxin-N⁷-guanine and other aflatoxin metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and immunoaffinity/high performance liquid chromatography. **Canc Res**, v.52, p.267-74, 1992b.
- GROOPMAN, J.D. et al. Molecular dosimetry of aflatoxin-N⁷-guanine in human urine obtained in The Gambia - West Africa. **Canc Epid Biom Prev**, v.1, p.221-7, 1992a.
- GROOPMAN, J.D. et al. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. **Canc Res**, v.52, p.45-52, 1992c.
- GROOPMAN, J.D., KENSLER, T.W. The light at the end of the tunnel for chemical- specific biomarkers: daylight or headlight?. **Carcinogenesis**, v.20, p.1–11, 1999.
- GUENGERICH, F.P. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. **Ann Rev Pharm Toxicol**, v.39, p.1-17, 1999.
- GUENGERICH, F.P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. **AAPS J**, v.8, n.1, p.E101–11, 2006.
- GUENGERICH, F.P. et al. Activation and detoxication of aflatoxin B₁. **Mut Res**, v.402, p.121-8, 1998.
- GUIDONI, A.L. Melhoria de Processos para a tipificação e valorização de carcaças suínas no Brasil. In: **CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE A QUALIDADE DE CARNE SUÍNA**, 1., 2000. Concórdia: EMBRAPA -CNSA, 2000. p. 221- 234
- HAN, R.W.; ZHENG, N.; WANG, J.Q.; ZHEN, Y.P.; XU, X.M.; LI, S.L. Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. **Food Control**, v.34, p. 35-39, 2013.
- HARVEY R.B., KUBENA L.F., HUFF W.E., CORRIER D.E., ROTTINGHAUS G.E., PHILLIPS T.D. Effects of treatment of growing swine with aflatoxin and T-2 toxin. **American Journal of Veterinary Research** 51, 1688-1693, 1990.
- HARVEY, R. B., L. F. KUBENA, T. D. PHILLIPS, W. E. HUFF, AND D. E. CORRIER. Prevention of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to the diets of growing barrows. **Am. J. Vet. Res.** 50:416–420, 1989.

- HAUSCHILD L, et al. Digestibilidade e metabolismo de dietas de suínos contendo zearalenona com adição de organoaluminossilicato. **Pesq Agropec Bras**, v.42, p.219-24, 2007.
- HELFERICH W. G. et al. [14C]-Aflatoxin B1 Metabolism in Lactating Goats and Rats. **J Anim Sci**, v.62, p.697-705, 1986.
- HERMANN, M.L.H.; SKAANILD, M.T. Porcine foetal and neonatal CYP3A liver expression. **J Xenob**, v.1, n.1, p.1-5, 2011.
- HINTON, D.M.; MYERS, M.J.; RAYBOURNE, R. A.; FRANCKE-VARROLL, S.; SOTOMAYOR, R. E.; SHADDOCK, J.A.; WARBRITTON, M.W.; CHOUS, Immunotoxicity of aflatoxin B1 in inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. *Toxicological Sciences*; 73: 362–77, 2003.
- HUSSAIN, Z. et al. Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels. **Food Chem Toxicol**, v.48, n.12, p.3304-7, 2010.
- INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO e QUALIDADE INDUSTRIAL). DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003, 35 p.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon (France): IARC, v.56, 245p., 1993.
- JAGER, A. V; TONIN, F. G.; SOUTO, P. C. M. C.; PRIVATTI, R. T.; OLIVEIRA, C. a F. Determination of urinary biomarkers for assessment of short-term human exposure to aflatoxins in São Paulo, Brazil. *Toxins*, v. 6, n. 7, p. 1996–2007, jul. 2014.
- JAGER, A.V. et al. Biomarkers of Aflatoxin Exposure and Its Relationship with the Hepatocellular Carcinoma. In: Guevara-Gonzalez, R.G. **Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology**, 2011.
- JAYNES, W.F. et al. Aflatoxin B₁ adsorption by clays from water and corn meal. **App Clay Sci**, v.36, p.197-205, 2007.
- JIANG, Y.; JOLLY, P. E.; ELLIS, W. O.; WANG, J. S.; PHILLIPS, T. D.; WILLIAMS, J. H. Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. **International Immunology**, v. 17, n. 6, p. 807–814, 2005.
- JOHNSON, D. N.; EGNER, P. A.; OBRIAN, G.; GLASSBROOK, N.; ROEBUCK, B. D.; SUTTER, T. R.; PAYNE, G. A.; KENSLER, T. W.; GROOPMAN, J. D. Quantification of Urinary Aflatoxin B 1 Dialdehyde Metabolites Formed by Aflatoxin Aldehyde Reductase Using Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. p. 752–760, 2008.
- JOLLY, P. E.; SHUAIB, F. M.; JIANG, Y.; PREKO, P.; BAIDOO, J.; STILES, J. K.; WANG, J.-S.; PHILLIPS, T. D.; WILLIAMS, J. H. Association of high viral load and abnormal liver function with high aflatoxin B1-albumin adduct levels in HIV-positive Ghanaians: preliminary observations. **Food additives & contaminants. Part A**,

- Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 28, n. 9, p. 1224–1234, 2011.
- JUBERT, C. et al. Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B(1) pharmacokinetics in human volunteers. **Canc Prev Res**, v.2, n.12, p.1015-22, 2009.
- KAMDEM, L.K. et al. Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B1. **Chem Res Toxicol**, v.19, n.4, p.577-86, 2006.
- KANEKO J.J., HARVEY J.W. & BRUSS M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Academic Press, San Diego, 916p., 2008.
- KEENAN, J.; JOLLY, P.; PREKO, P.; BAIDOO, J.; WANG, J. S.; PHILLIPS, T. D.; WILLIAMS, J. H.; MCGWIN, G. Association between aflatoxin B1 albumin adduct levels and tuberculosis infection among HIV+ Ghanaians. **Archives of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 1–6, 2011.
- KHATOON, S.; HANIF, N.Q.;TAHIRA, I.; SULTANA, N.; SULTANA, K.; AYUB, N. Natural Occurrence of Aflatoxins, Zearalenone and Trichothecenes in Maize Grown in Pakistan. **Pak J Bot**, v.44, p. 231-236, 2012.
- KIM, D.M.; LEE, N.; KIM, S.M.; CHUNG, S.H.; KIM, M.; HAN, S.B.; CHUN, H.S. Occurrence of Aflatoxin and Aflatoxigenic *Aspergillus* Species in Corn Harvested in Korea. **J Korean Soc Appl Biol Chem**, v.56, p. 221-225, 2013.
- KOJIMA, M.; DEGAWA, M. Serum androgen level is determined by autosomal dominant inheritance and regulates sex-related CYP genes in pigs. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 430, n. 2, p. 833–8, 11 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23200834>>. Acesso em: 6 mar. 2014.
- KOLOSOVA, A.; STROKA, J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. **World Mycot J**, v.4, p.225-256, 2011.
- KOOPMANS, S. J.; SCHUURMAN, T. Considerations on pig models for appetite, metabolic syndrome and obese type 2 diabetes: From food intake to metabolic disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 231–239, 2015.
- KOS, J.; MASTILOVIC, J.; HAJNAL, E.J.; SARIC, B. Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009 – 2012. **Food Control**, v.34, p. 31-34, 2013.
- KROGH, P. et al., 1973. Aflatoxin Residues In Bacon Pigs. **Pure and applied chemistry**, 35(3), pp.275–282.
- KUBENA, L.F. et al. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. **Poult Sci**, v.69, p.1078–1086, 1990.
- LANÇAS, F.M. (2004) Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos: Ed. RiMa. 62 p.
- LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. In vitro and in vivo testing of adsorbents for detoxifying mycotoxins in contaminated feedstuffs. In: **Biotechnology in the Feed**

- Industry. Proceedings of the 15th Annual Symposium.** T. P. Lyons and K. A. Jacques, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK , p.369–79, 1999.
- LEE, S. et al. Inhibitory effects of naturally occurring compounds on aflatoxin B1 biotransformation. **J Agric Food Chem**, v.49, n.11, p. 5171-7, 2001.
- LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins.** Guelph: University Books, 1995.
- LEONG, Y. H.; ROSMA, A.; LATIFF, A. a.; IZZAH, a. N. Associations of serum aflatoxin B 1-lysine adduct level with socio-demographic factors and aflatoxins intake from nuts and related nut products in Malaysia. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, n. 3, p. 368–372, 2012.
- LINDEMANN, M. D., BLODGETT, D. J., KORNEGAY, E. T., SCHURIG, G. G. Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine. **J. Anim. Sci.** 71, 171–178, 1993.
- LINDEMANN, M.D., BLODGETT, D.J., HARPER, A.F., KORNEGAY, E.T., DOERR, J.A. Appraisal of the value of selected clays and minerals in diets with and without aflatoxin-contaminated maize to young pigs. **J. Anim. Feed Sci.** 6, 507–519, 1997.
- LUNA, F.J.; SCHUCHARDT, U. (1999). Argilas pilarizadas – uma introdução. **Quim Nova**, v.22, p.104-9.
- LUTHY, J.; ZWEIFEL, U.; SCHLATTER, C. Metabolism and tissue distribution of [C-14-labeled aflatoxin-B1 in pigs. **Food Cosmet Toxicol**, v.18, n.3, p.253-256, 1980.
- MALLMAN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos.** Santa Maria: Sociedade Vicentti Pallotti, 238 p., 2007.
- MARIN, D. E.; TARANU, I.; BUNACIU, R. P.; PASCALE, F.; TUDOR, D. S.; AVRAM, N.; SARCA, M.; CUREU, I.; CRISTE, R. D.; SUTA, V.; OSWALD, I. P. Changes in performance , blood parameters , humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. *Journal of animal science*, v. 80, p. 1250–1257, 2002.
- MCCOY L, SCHOLL P, SCHLEICHER RL, GROOPMAN J, POWERS C, PFEIFFER C. Analysis of aflatoxin B1-lysine adduct in serum using isotope- dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom** 2005;19:2203– 10.
- MCCOY, L. et al. Analysis of aflatoxin B₁-lysine adducts in human serum by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v.19, p.2203-10, 2005.
- MCCOY, L. F.; SCHOLL, P. F.; SUTCLIFFE, A. E.; KIESZAK, S. M.; POWERS, C. D.; ROGERS, H. S.; GONG, Y. Y.; GROOPMAN, J. D.; WILD, C. P.; SCHLEICHER, R. L. Human Aflatoxin Albumin Adducts Quantitatively Compared by ELISA , HPLC with Fluorescence Detection , and HPLC with Isotope Dilution Mass Spectrometry. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. July, p. 1653–1658, 2008.

- MEISSONNIER, G. M.; LAFFITTE, J.; LOISEAU, N.; BENOIT, E.; RAYMOND, I.; PINTON, P.; COSSALTER, A. M.; BERTIN, G.; OSWALD, I. P.; GALTIER, P. Selective impairment of drug-metabolizing enzymes in pig liver during subchronic dietary exposure to aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 11, p. 2145–2154, 2007.
- MEISSONNIER, G. M.; PINTON, P.; LAFFITTE, J.; COSSALTER, A. M.; GONG, Y. Y.; WILD, C. P.; BERTIN, G.; GALTIER, P.; OSWALD, I. P. Immunotoxicity of aflatoxin B1: Impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 231, n. 2, p. 142–149, 2008.
- MEISSONNIER, G.M.; OSWALD, I.P.; GALTIER, P. Aflatoxicosis in swine – A bibliographic review of clinical cases and experimental data. **Revue de Médecine Veterinaire**, v.156, n.12, p.591-605, 2005.
- MENASCHE, R. **Agricultura familiar à mesa**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2007.
- MILLER DM, WILSON DM, WYATT RD, MCKINNEY JK, CROWELL WA, STUART BP. High performance liquid chromatographic determination and clearance time of aflatoxin residues in swine tissues. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 65:1–4; 1982.
- MILLER, D. M., B. P. STUART, AND W. A. CROWELL. Experimental aflatoxicosis in swine: Morphological and clinical pathological results. **Can. J. Comp. Med.** 45:343–351, 1981.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Portaria MA/SNAD/SFA nº 07 de 09/11/1988**. Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 – Seção I, página 21.968, 1988.
- MITCHELL, N. J.; XUE, K. S.; LIN, S.; MARROQUIN-CARDONA, A.; BROWN, K. A.; ELMORE, S. E.; TANG, L.; ROMOSER, A.; GELDERBLUM, W. C. A.; WANG, J. S.; PHILLIPS, T. D. Calcium montmorillonite clay reduces AFB1 and FB1 biomarkers in rats exposed to single and co-exposures of aflatoxin and fumonisin. *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, n. 7, p. 795–804, 2014.
- MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, É.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 220–226, set. 2009.
- MYKKANEN, H. et al. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B1 metabolites (AFQ1, AFM1 and AFB-N7-guanine) in young Chinese males. **Int J Canc**, v.115, p.879–884, 2005.
- NEAL, G.E. et al. Metabolism and toxicity of aflatoxins M₁ and B₁ in human-derived in vitro systems. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.151, p.152-8, 1998.
- NEEFF, D. V; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; BERMUDEZ, A. J.; DAKOVIC, A.; MURAROLLI, R. A.; OLIVEIRA, C. A. F. In vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B1. **Poultry science**, v. 92, n. 1, p. 131–7, jan. 2013.

- NEFF, G.L.; EDDS, G.T., 1981. Aflatoxins B1 and M₁; Profiles Tissue Residues and Feed in Young Growing Pigs. **Food and Cosmetics Toxicology**, 19(6), pp.739–742.
- NGUYEN, A. et al. The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin. **Protein engineering, design & selection**, v.19, n.7, p.291-7, 2006.
- NIELSEN, K. L.; HARTVIGSEN, M. L.; HEDEMANN, M. S.; LRÆKE, H. N.; HERMANSEN, K.; BACH KNUDSEN, K. E. Similar metabolic responses in pigs and humans to breads with different contents and compositions of dietary fibers: A metabolomics study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 4, p. 941–949, 2014.
- OBUSEH, F.; JOLLY, P. E.; JIANG, Y.; SHUAIB, F. M. B.; WATERBOR, J.; ELLIS, W. O.; PIYATHILAKE, C. J.; DESMOND, R. a; AFRIYIE-GYAWU, E.; PHILLIPS, T. D. Aflatoxin B1 albumin adducts in plasma and aflatoxin M1 in urine are associated with plasma concentrations of vitamins A and E. **International journal for vitamin and nutrition research**, v. 80, n. 6, p. 355–68, 2010.
- OERKE, E-C. Centenary review: crop losses to pests. **J Agric Sci**, v.144, p.31-43, 2006.
- OLIVEIRA, C.A.F. et al. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. **Food Addit Cont**, v.17, n.6, p.459- 462, 2000.
- OLIVEIRA, M. S. Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina m₁ e sua ocorrência. 2010. 2010.
- ORUÇ, H.H.; SORUCU, A.; TURKMEN, I.I.; ARSLAN, E. Determination of various mycotoxin concentrations in the feedstuffs and feed produced by a feed manufacturer in Turkey. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v.18, p. 633-638, 2012.
- OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses?. **Vet Med**, v.85, p.89-94, 1990.
- PARLAT, S.S.; YILDIZ, A.Ö.; OGUZ, H. Effect of clinoptilolite on performance of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during experimental aflatoxicosis. **Brit Poult Sci**, v.40, n.4, p.495-500, 1999.
- PATTERSON, D.S.P. Metabolism as a Factor in Determining the Toxic Action of the Aflatoxins in Different Animal Species. **Cosmet toxicol**, v.11, p.287-94, 1973.
- PHILLIPS TD. Dietary Clay in the Chemoprevention of Aflatoxin-Induced Disease. **Toxicol Sci**, v.52, p.118-126, 1999.
- PHILLIPS, T.D. et al. Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: A review. **Food Addit Contam**, v.25, n.2, p.134-145, 2008.
- PHILLIPS, T.D.; LEMKE, S.L.; GRANT, P.G. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. **Adv Exp Med Biol**, v.504, p.157-71, 2002.
- PISKAC, A.; DRABEK, J. Occurrence of aflatoxins in pig feed. **Vet Med (Praha)**, v.23, p.437-446, 1978.

- PLEADIN, J.; VULIC, A.; PERSI, N.; SKRIVANKO, M.; CAPEK, B.; CVETNIC, Z. Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. **Food Control**, v.40, p.286-291, 2014.
- PUCCINELLI, E.; GERVASI, P. G.; LONGO, V. Xenobiotic metabolizing cytochrome P450 in pig, a promising animal model. **Current drug metabolism**, v.12, n.6, p.507–25, 2011.
- QIAN, G. et al. Physiologically based toxicokinetics of serum aflatoxin B1-lysine adduct in F344 rats. **Toxicology**, v.303, p.147-51, 2013.
- QIAN, G.S. et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. **Canc Epid Biom Prev**, v.3, p.3-10, 1994.
- RAISUDDIN, S., SINGH, K.P., ZAIDI, S.I., SAXENA, A.K., RAY, P.K.. Effects of aflatoxin on lymphoid cells of weanling rat. **J. Appl. Toxicol.** 10, 245. (Abstr.), 1990.
- RAMOS A.J., HERNANDEZ E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. **Animal Feed Science and Technology** 65, 197-206, 1997.
- RAMOS, A. T. M. **Levantamento da microflora de grãos ardidos de milho e avaliação da resistência genética à *Fusarium verticillioides***. Piracicaba, 2008. Dissertação mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- RAWAL, S.; KIM, J.E.; COULOMBE-JR, R. Aflatoxin B₁ in poultry: toxicology, metabolism and prevention. **Res Vet Sci**, v.89, p.325-31, 2010.
- REDZWAN, S. M.; ROSITA, J.; MOHD SOKHINI, a M.; NURUL 'AQILAH, a R.; WANG, J.-S.; KANG, M.-S.; ZURAINI, A. Detection of serum AFB1-lysine adduct in Malaysia and its association with liver and kidney functions. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 217, n. 4-5, p. 443–51, 2014.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B. G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova**, v.27, n. 5, p.771-780, 2004.
- ROCHA, L. O.; NAKAI, V. K.; BRAGHINI, R.; REIS, T. a; KOBASHIGAWA, E.; CORRÊA, B. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 11, p. 5090–103, nov. 2009.
- ROSS, R.K. et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v.339, p.943-6, 1992.
- ROSSETTO, E. et al. Caracterização de argilas, bentonitas e diatomitas e sua aplicação como adsorventes. **Quim Nova**, v.32, p.2064-7, 2009.
- ROSSI, C. N.; TAKABAYASHI, C. R.; ONO, M. A.; BORDINI, J. G.; KAWAMURA, O.; VIZONI, E.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Assessment of exposure of broiler chicken in Brazil to mycotoxins through naturally contaminated feed. **Food Security**, v. 5, n. 4, p. 541–550, 12 jul. 2013.

- ROSSI, C. N.; TAKABAYASHI, C. R.; ONO, M. A.; SAITO, G. H.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 2211–2216, jun. 2012.
- ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, DZO, 252 p., 2011.
- ROTHSCHILD, L.J. IARC classes AFB₁ as class 1 human carcinogen. **Food Chem. News**, v.34, p.62-6, 1992.
- RUSTEMEYER, S. M.; LAMBERSON, W. R.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; SHAW, D. P.; COCKRUM, R. R.; KESSLER, K. L.; AUSTIN, K. J.; CAMMACK, K. M. Effects of dietary aflatoxin on the health and performance of growing barrows. *Journal of animal science*, v. 88, n. 11, p. 3624–30, nov. 2010.
- RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation, and inactivation by physical methods. **Food Chem**, v.59, n.1, p.57-67, 1997.
- SABBIONI G. Chemical and physical properties of the major albumin adduct of aflatoxin B₁ and their implications for the quantification in biological samples. *Chem Biol Interact* 1990;75:1–15.
- SABINO, M. et al. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.48, p.81-5, 1988.
- SAKISAKA S, WATANABE M, TATEISHI H, HARADA M, SHAKADO S, MIMURA Y, et al. Erythropoietin production in hepatocellular carcinoma cells associated with polycythemia: immunohistochemical evidence. **Hepatology**,18:1357–62, 1993.
- SAS Institute. SAS® User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC., 1992
- SASS, D.C., JAGER, A.V., TONIN, F.G., ROSIM, R.E., CONSTANTINO, M.G., OLIVEIRA, C.A.F., 2015. Synthesis and purification of AFB₁-lysine adduct. **Toxin Rev.** 34, 53–59
- SCHELL, T. C.; LINDEMANN, M. D.; KORNEGAY, E. T.; BLODGETT, D. J. Effects of feeding aflatoxin-contaminated diets with and without clay to weanling and growing pigs on performance, liver function, and mineral metabolism. *Journal of animal science*, v. 71, n. 5, p. 1209–18, maio 1993.
- SCHOLL, P.F. et al. Quantitative analysis and chronic dosimetry of the aflatoxin B₁ plasma albumin adduct Lys-AFB₁ in rats by isotope dilution mass spectrometry. **Chem Res Toxicol**, v.19, n.1, p.44-9, 2006.
- SCHOLL, P.F., GROOPMAN, J.D., 2004. Synthesis of 5,5,6,6-D₄-l-lysine-aflatoxin B₁ for use as a mass spectrometric internal standard. **J. Labelled Compd. Radiopharm.**47, 807–815.

- SCOTT, P.M. Natural poisons. In: Helrich, K. (Ed). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), p.1184-213, 1990.
- SHEABAR FZ, GROOPMAN JD, QIAN G-S, WOGAN GN. Quantitative analysis of aflatoxin-albumin adducts. **Carcinogenesis** 1993;4:1203 –8.
- SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. **Introduction to Food Toxicology**, 2.Ed, London: Academic Press, 2009.
- SHIRIMA, C. P.; KIMANYA, M. E.; KINABO, J. L.; ROUTLEDGE, M. N.; SREY, C.; WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Dietary exposure to aflatoxin and fumonisin among Tanzanian children as determined using biomarkers of exposure. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 10, p. 1874–81, out. 2013.
- SHOTWELL O.L. et al. Production of aflatoxin on rice. **Appl Microb**, v.15, n.3, p.425-428, 1966.
- SIMAS, M. M. S.; BOTURA, M. B.; CORREA, B.; SABINO, M.; MALLMANN, C. a.; BITENCOURT, T. C. B. S. C.; BATATINHA, M. J. M. Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 404–408, maio 2007.
- Sisk, D. B., W. W. Carlton, and T. M. Curtin. 1968. Experimental aflatoxicosis in young swine. **Am. J. Vet. Res.** 29:1591–1602.
- SKIPPER, P. L.; TANNENBAUM, S. R. Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. n. 4, p. 507–518, 1990.
- SOLFRIZZO, M.; GAMBACORTA, L.; LATTANZIO, V. M. T.; POWERS, S.; VISCONTI, A. Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M 1, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B 1 in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 9, p. 2831–2841, 2011.
- SONG, S.; EDIAGE, E. N.; WU, A.; DE SAEGER, S. Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1292, p. 111–20, 31 maio 2013.
- SORIANO, J.M.; GONZALEZ, L.; CATALÁ, A.I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. **Progress in Lipid Research**, v. 44, n.6, p.345-356, 2005.
- SOUTHERN, L. L., CLAWSON, A. J. Effects of aflatoxins on finishing swine. **J. Anim. Sci.** 49:1006–1011, 1979.
- SOUZA, M. de L. M. de; SULYOK, M.; COSTA, S. S.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICOTOXINAS EM MILHO E RAÇÃO NO BRASIL POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS. **Rev. Ciên. Vida. Seropédica**, v. 28, p. 86–88, 2008.

- SOUZA, M. de L. M. De; Sulyok, M.; FREITAS-SILVA, O.; COSTA, S. S.; BRABET, C.; JUNIOR, M. M.; SEKIYAMA, B. L.; VARGAS, E. A.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Cooccurrence of Mycotoxins in Maize and Poultry Feeds from Brazil by Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry. **The ScientificWorld Journal**, v. 2013, p. 1–9, 2013.
- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Fundamentos de patologia clínica veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed, 744p., 2011.
- SULTANA, N.; RASHID, A.; TAHIRA, H.U.; HANIF, N.Q. Distribution of Various Mycotoxins in Compound Feed, Total Mix Ration and Silage. **Pakistan Vet J**, v.33, p.200-204, 2013.
- SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/ tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 20, p. 2649–2659, 2006.
- SUN, Z.; LU, P.; GAIL, M. H.; PEE, D.; ZHANG, Q.; MING, L.; WANG, J.; WU, Y.; LIU, G.; ZHU, Y. Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis who have detectable urinary aflatoxin metabolite M1. *Hepatology* (Baltimore, Md.), v. 30, n. 2, p. 379–83, ago. 1999.
- TAPIA-SALAZAR, M. et al. **Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura**. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. 2010.
- THIEU, N. Q.; OGLE, B.; PETTERSSON, H. Efficacy of bentonite clay in ameliorating aflatoxicosis in piglets fed aflatoxin contaminated diets. **Tropical animal health and production**, v. 40, n. 8, p. 649–56, dez. 2008.
- THIEU, NQ; PEETTERSSON, H. Zearalenone, deoxynivalenol and aflatoxin B₁ and their metabolites in pig urine as biomarkers for mycotoxin exposure. **Mycotoxin research**, 2009, v.25, n.2, 59-66.
- TURNER, P. C.; LOFFREDO, C.; KAFRAWY, S. El; EZZAT, S.; EISSA, S. A. L.; DALY, M. El; NADA, O.; ABDEL-HAMID, M. Pilot survey of aflatoxin-albumin adducts in sera from Egypt. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, v. 25, n. 5, p. 583–7, 2008.
- TURNER, P. C.; MENDY, M.; WHITTLE, H.; FORTUIN, M.; HALL, a J.; WILD, C. P. Hepatitis B infection and aflatoxin biomarker levels in Gambian children. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, v. 5, n. 12, p. 837–41, dez. 2000.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11169271>>.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. Disponível em:
<<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acessado em: 22/03/2016 as 5h29.

- WALKER, J.M., SWEENEY, P.J. **Production of Protein Hydrolysates Using Enzymes**. In Walker, J.M. (ed), *The Protein Protocols Handbook*, 2nd edition, Chapter 82. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 563–566, 2002.
- WALTON, M.; EGNER, P.; SCHOLL, P. F.; WALKER, J.; KENSLER, T. W.; GROOPMAN, J. D. Liquid Chromatography Electrospray-Mass Spectrometry of Urinary Aflatoxin Biomarkers : Characterization and Application to Dosimetry and Chemoprevention in Rats. **Chemical research in toxicology**, v. 14, p. 919–926, 2001.
- WALUM, E. Acute Oral Toxicity. **Envir Health Persp**, v.106, suppl.2, p.497-503, 1998.
- WANG J-S, QIAN G-S, ZARBA A, et al. Temporal patterns of aflatoxin- albumin adducts in hepatitis B surface antigen-positive and antigen- negative residents of Daxin, Qidong County People's Republic of China. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1996;5:253 – 61.
- WANG, J. et al. Temporal patterns of aflatoxin-albumin adducts in hepatitis B surface antigen-positive and antigen-negative residents of Daxin, Qidong County, People's Republic of China. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v.5, p.253-61, 1996.
- WANG, P.; AFRIYIE-GYAWU, E.; TANG, Y.; JOHNSON, N. M.; XU, L.; TANG, L.; HUEBNER, H. J.; ANKRAH, N.; OFORI-ADJEI, D.; ELLIS, W.; JOLLY, P. E.; WILLIAMS, J. H.; WANG, J.-S.; PHILLIPS, T. D. NovaSil clay intervention in Ghanaians at high risk for aflatoxicosis: II. Reduction in biomarkers of aflatoxin exposure in blood and urine. **Food additives & contaminants. Part A**, v. 25, n. 5, p. 622–34, maio 2008.
- WARTH, B.; SULYOK, M.; FRUHMANN, P.; MIKULA, H.; BERTHILLER, F.; SCHUHMACHER, R.; HAMETNER, C.; ABIA, W. A.; ADAM, G.; FRÖHLICH, J.; KRŠKA, R. Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, v. 26, n. 13, p. 1533–40, 2012.
- WILD, C.P. et al. Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. **Carcinogenesis**, v.7, p.853–8, 1986.
- WOGAN, G.N. et al. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. **Food Addit Cont**, v.29, n.2, p.249-57, 2012.
- WONG, Z.A.; HSIEH, D.P.H. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in the monkey, rat and mouse. *Toxicol Appl Pharm*, v.55, p.115-25, 1980.
- WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metab Rev**, v.41, n.1, p.1-7, 2009.
- YAO, M. et al. mRNA expression profiles of P450 3A enzymes in the liver and small intestine of the domestic pig. **Res Vet Sci**, v.93, n.1, p.360-5, 2012.
- YU, M-W. et al. Effect of aflatoxin metabolism and DNA adduct formation on hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers in Taiwan. **J Hepatol**, v.27, p.320–30, 1997.

- ZAGHINI, A. et al., 2005. Residues of aflatoxins B1 and M1 in different biological matrices of swine orally administered aflatoxin B1 and *Saccharomyces cerevisiae*. **Italian Journal of Animal Science**, 4(SUPPL. 2), pp.488–490.
- ZHU, J.Q.; ZHANG, L.S.; HU, X.; XIAO, Y.; CHEN, J.S.; XU, Y.C.; FREMY, J.; CHU, F.S. Correlation of dietary aflatoxin B1 levels with excretion of aflatoxin M1 in human urine. **Cancer Research**, Vol.47, No.7, (April 1987), pp.1848-1852, 1987.
- ZLOTOWSKI, P.; MENDES, A.; CORRÊA, R.; ROZZA, D. B.; DRIEMEIER, D.; AUGUSTO, C.; ADEMIR, F. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 4, p. 207–210, 2004.