

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ROICE ELIANA ROSIM

**Determinação de aflatoxina B₁-lisina sérica para avaliação da
exposição de frangos de corte e suínos à aflatoxina B₁**

Pirassununga

2017

ROICE ELIANA ROSIM

**Determinação de aflatoxina B₁-lisina sérica para avaliação da
exposição de frangos de corte e suínos à aflatoxina B₁**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2017

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

RR819d Rosim, Roice Eliana Determinação de aflatoxina B₁-
lisina sérica para avaliação da exposição de frangos
de corte e suínos à aflatoxina B₁ / Roice Eliana
Rosim; orientador Carlos Augusto Fernandes Oliveira.
-Pirassununga, 2017.

52 f.

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

1. Aflatoxinas. 2. Aflatoxina B₁-lisina. 3.
Biomarcadores. 4. Frangos de corte. 5. Suínos. I.
Oliveira, Carlos Augusto Fernandes, orient. II.
Título.

Agradecimento

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, meu orientador, pela convivência a 16 anos... sinto-me privilegiada e sou especialmente grata.

Agradeço ao Prof. Dr. Daniel E. Faria Filho, professor do Departamento de Zootecnia - FZEA, funcionário Claudio da Silva do setor de Avicultura - FZEA, funcionários Agnaldo A. Bueno da Silva, Paulo Selarin e Mário Ferrarezi, do setor de Suinocultura PUSP - FC. Aos alunos de pós-graduação Amanda, Ana Paula, Julian, Thiago, Rafael, Bárbara e Diane por toda a ajuda recebida na coleta de dados deste trabalho.

Agradeço à Danielle Passarelli pela colaboração nas análises bioquímicas.

Agradeço a Dra. Tânia Petta pela disponibilidade em ajudar na instrumentação analítica.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin pela convivência diária e a todos os alunos e estagiários que já passaram pelo Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia - LMMA, desde o ano de 2001... Sempre fica algo de bom.

Obrigada Deus pelo dom da vida!

Obrigada Família!

Obrigada Amigos!

“A verdadeira sabedoria consiste em saber como aumentar o bem-estar do mundo.”
Benjamin Franklin.

RESUMO

ROSIM, R. E. **Determinação de aflatoxina B₁-lisina sérica para avaliação da exposição de frangos de corte e suínos à aflatoxina B₁**. 2017. 52 f. – Dissertação de Mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

As aflatoxinas são compostos carcinogênicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, que contaminam alimentos antes e após o processamento, causando riscos à saúde humana e perdas econômicas na produção animal. A exposição à aflatoxina B₁ (AFB₁), principal metabólito com maior toxicidade produzido pelo fungo, ocorre predominantemente através da ingestão de alimentos contaminados, sobretudo milho, amendoim e derivados. Após absorção e biotransformação da AFB₁ por enzimas hepáticas microssomais, a toxina biotransformada liga-se com macromoléculas originando adutos tais como AFB₁-lisina. A AFB₁-lisina indica a dose interna de AFB₁ que foi efetivamente absorvida através de alimentos contaminados. Os objetivos deste estudo foram determinar a concentração dos níveis séricos de AFB₁-lisina em frangos de corte e suínos, e verificar a correlação entre os parâmetros bioquímicos séricos (aspartato aminotransferase [AST] e gama glutamiltransferase [GGT], proteína total [PT], albumina [Alb] e globulina [Glob]) e a concentração de AFB₁-lisina em soro dos referidos animais. Para isto, foram realizados dois experimentos independentes, sendo um com frangos de corte (N = 40) subdivididos em dois grupos iguais (ração controle e ração contendo 222,17 µg/kg AFB₁) alimentados com as dietas experimentais durante 14 dias, e outro com suínos (N = 20) alimentados com ração normal utilizada rotineiramente em um *Campus* universitário, sem qualquer intervenção. As rações foram analisadas quanto à presença de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), enquanto que a AFB₁-lisina no soro foi determinada através de CLAE acoplada a espectrômetro de massas (EM/EM). A AFB₁ no nível testado não causou sinais visíveis de intoxicação. Os níveis das enzimas séricas (AST e GGT), PT e Glob não apresentaram diferenças (p>0,05) entre os tratamentos, nem entre os dias, exceto no 42º dia, quando GGT foi menor (p<0,05) que nos dias 28 e 35. Os valores de Alb foram menores (p<0,05) no tratamento com AFB₁ aos 42 dias. A AFB₁-lisina foi detectada no soro de todos os frangos do tratamento com AFB₁, em níveis de 56.52 a 77.83 ng/mg Alb nos dias 35 e 42 de idade, respectivamente. Esses valores indicam a dose interna de AFB₁ nas aves, a qual se correlacionou negativamente (p<0,05) com os níveis de PT, Alb e Glob. No experimento com suínos, a dieta apresentou níveis não detectáveis ou muito baixos de AFB₁; portanto, a AFB₁-lisina não foi detectada nas amostras de soro dos suínos. Os dados indicam que a AFB₁-lisina apresenta potencial como biomarcador específico e sensível para a avaliação da exposição de aflatoxinas na dieta, bem como para fins de diagnósticos.

Palavras-chave: AFB₁; biotransformação; AFB₁-lisina; biomarcador; frangos de corte; suínos.

ABSTRACT

ROSIM, R. E. **Determination of serum aflatoxin B₁-lysine for exposure evaluation of broilers and pigs to aflatoxin B₁**. 2017. 52 p. M. Sc. Dissertation. School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga.

Aflatoxins are carcinogenic compounds produced by fungi of the genus *Aspergillus* that contaminate food before and after processing, resulting in risks to human health and economic losses in animal production. Exposure to aflatoxin B₁ (AFB₁), the main metabolite with greater toxicity produced by the fungus, occurs predominantly through ingestion of contaminated food, especially maize, groundnuts and derivatives. After absorption and biotransformation of AFB₁ by hepatic microsomal enzymes, the biotransformed toxin binds to macromolecules thus originating adducts such as AFB₁-lysine. The AFB₁-lysine adduct indicates the internal AFB₁ dose that was actually absorbed through contaminated food. The objectives of this study were to determine the serum AFB₁-lysine levels in broiler chicks and pigs, and check the correlation between the serum biochemistry parameters (aspartate aminotransferase [AST] e gamma-glutamyl transferase [GGT], total protein [TP], albumin [Alb] and globulin [Glob]) and the concentration of AFB₁-lysine in the serum of those animals. To this end, two independent experiments were conducted, one with broiler chicks (N = 40) subdivided into two equal groups (control feed, and feed containing 222,17 µg/kg AFB₁) fed the experimental diets during 14 days, and the other with pigs (N = 20) fed normal diets routinely prepared in an University *Campus*, without any intervention. Feeds were analyzed for aflatoxins by high performance liquid chromatography (HPLC), while serum AFB₁-lysine was determined by HPLC coupled to mass spectrometry (MS/MS). AFB₁ at the level tested did not cause any sign of intoxication. The levels of serum enzymes (AST and GGT), TP and Glob did not show any difference (p>0.05) between treatments, or at different days, except for GGT on the 42nd day, which was lower (p<0.05) than concentrations on days 28 and 35. AFB₁-lysine levels were detected in serum of all broilers fed the AFB₁-contaminated diet, at mean levels of 56.52 to 77.83 ng/mg Alb on days 35 and 42 of age, respectively. These values indicated the internal dose of AFB₁ in the birds, which negatively correlated (p<0.05) with the TP, Alb and Glob levels. In the experiment with pigs, non detectable or very low levels of AFB₁ were found in the diets; therefore no AFB₁-lysine was detected in the pig serum samples. Data indicated that AFB₁-lysine shows the potential to be a sensitive and specific biomarker for the evaluation of broiler exposure to dietary aflatoxin, as well as for use in diagnostic purposes.

Keywords: AFB₁. Biotransformation. AFB₁-lysine. Biomarker. Broilers. Pigs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , G ₁ , B ₂ e G ₂	15
Figura 2 - Mapas de risco de contaminação por aflatoxinas em milho em três diferentes cenários climáticos na Europa.....	17
Figura 3 - Principais vias de biotransformação da aflatoxina B ₁	20
Figura 4 - Produção de aflatoxina B ₁	28
Figura 5 - Marcha analítica para determinação de aflatoxinas em rações de frangos e suínos.....	31
Figura 6 - Identificação dos frangos.	32
Figura 7- Identificação dos suínos.....	32
Figura 8 - Marcha analítica para determinação de AFB ₁ -lisina em soro.....	34
Figura 9 - Cromatogramas (transições de quantificação) de aflatoxina B ₁ -lisina em: A) Padrão (100,0 ng/mL); B) Amostra contendo 85,4 ng/mL, coletado de frango alimentado com 220,17 µg/kg AFB ₁	43
Figura 10 - Concentrações de AFB ₁ -lisina sérica aos 35 e 42 dias de vida de frangos alimentados com ração experimental contendo AFB ₁	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enfermidades historicamente associadas à contaminação de alimentos com micotoxinas ¹	12
Tabela 2 - Ocorrência de aflatoxinas em milho e rações no Brasil nos últimos 10 anos (2008-2017).....	17
Tabela 3 - Efeitos tóxicos de aflatoxinas em frangos de corte e suínos.....	21
Tabela 4 - Composição da ração de frangos de corte.....	27
Tabela 5 - Composição da ração de suínos.....	29
Tabela 6 - Concentração de aflatoxinas B ₁ , G ₁ , B ₂ e G ₂ encontradas nas rações dos frangos dos tratamentos controle e alimentados com aflatoxinas.....	36
Tabela 7 - Bioquímica sérica de frangos de corte.....	38
Tabela 8 - Concentração de aflatoxinas encontradas nas rações de suínos.....	39
Tabela 9 - Bioquímica sérica de suínos.....	39
Tabela 10 - Desempenho do método analítico para determinação de AFB ₁ -lisina em amostras de soro de frango ¹	40
Tabela 11 - Valores de AFB ₁ -lisina em ng/mL e em ng/mg de albumina aos 35 e 42 dias de vida, 7 e 14 dias de intoxicação, respectivamente.....	42
Tabela 12 – Coeficientes de correlação (r) entre AFB ₁ -lisina (ng/mg de albumina) e os respectivos níveis de parâmetros de bioquímica sérica de frangos alimentados com ração contendo AFB ₁ durante 42 dias.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	FUNGOS TOXIGÊNICOS E MICOTOXINAS	11
2.2	PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DAS AFLATOXINAS.....	13
2.3	OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA EM MATÉRIAS PRIMAS ALIMENTARES E RAÇÕES.....	15
2.4	BIOTRANSFORMAÇÃO DA AFLATOXINA B ₁	19
2.5	EFEITOS TÓXICOS DA AFLATOXINA B ₁ EM FRANGOS DE CORTE E SUÍNOS	20
2.6	BIOMARCADORES E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO À AFLATOXINA B ₁	22
2.7	METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS	24
3	OBJETIVOS	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
4.1.1	<i>Experimento 1: Frangos de Corte</i>	26
4.1.2	<i>Experimento 2: Suínos</i>	29
4.2	COLETA E ANÁLISE DE RAÇÕES	30
4.3	COLETA DE SANGUE E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SORO.....	31
4.4	ANÁLISES DE AFLATOXINA B ₁ -LISINA NO SORO	33
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS, RAÇÕES E BIOQUÍMICA SÉRICA	36
5.1.1	<i>Frangos de Corte</i>	36
5.1.2	<i>Suínos</i>	39
5.2	DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA AFB ₁ -LISINA	39
5.3	AFB ₁ -LISINA NO SORO	41
6	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Dentre o grande número de micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são consideradas as de maior importância no Brasil pela magnitude da contaminação dos alimentos. A utilização de práticas agrícolas inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenagem de cereais e grãos, somadas ao clima tropical do país, favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos de modo geral, particularmente os toxigênicos. Esta contaminação acarreta grandes perdas na produtividade animal, gerando impacto econômico, além de danos à saúde humana (SABINO, 2008). Neste contexto, as aflatoxinas, produzidas por algumas espécies do gênero *Aspergillus*, destacam-se por serem micotoxinas de elevada toxicidade e pela ocorrência frequente em produtos alimentícios e rações no Brasil.

Os efeitos decorrentes da exposição humana e animal às aflatoxinas podem ser avaliados através de biomarcadores, que 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 (JAGER et al., 2011). 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.

Após a ingestão oral, a aflatoxina B₁ (AFB₁), que é a mais frequentemente encontrada em substratos vegetais e que apresenta maior poder toxigênico, é eficientemente absorvida e biotransformada antes da excreção pelas vias urinária e fecal. A AFB₁ é encontrada principalmente no fígado (WOGAN; EDWARD; SHANK, 1967).

A biotransformação das aflatoxinas é realizada por enzimas que convertem a AFB₁ para a sua forma carcinógena, AFB-8,9-epóxido, que é covalentemente ligada ao DNA formando o aduto AFB₁-N7-guanina, excretado pela urina, e à albumina do soro, formando o aduto AFB₁-lisina (ESSIGMANN et al., 1977; SABBIONI et al., 1987). O aduto AFB₁-lisina tem sido utilizado como um importante biomarcador de exposição à AFB₁ em longo prazo na dieta (MCCOY et al., 2005).

Diferentes métodos analíticos estão disponíveis para quantificação de biomarcadores de aflatoxinas 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 utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) e massas/massas (CL-EM/EM) tem sido amplamente relatada na literatura na avaliação de biomarcadores de aflatoxina em animais de laboratório e humanos, tanto sanguíneos como urinários (MCCOY et al., 2005). Em estudo recente, Di Gregorio et al. (2017) utilizaram com sucesso a AFB₁-lisina como biomarcador para avaliar a eficiência de um adsorvente para aflatoxinas em suínos. Carão (2016) também avaliou preliminarmente um adsorvente para aflatoxinas em frangos de corte utilizando AFB₁-lisina como biomarcador. No entanto, não há dados na literatura sobre o uso da AFB₁-lisina como biomarcador para avaliar a exposição de frangos de corte em condições experimentais, ou de animais de produção em condições de campo, às aflatoxinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos Toxigênicos e Micotoxinas

Diversos fungos que se desenvolvem em alimentos são capazes de produzir metabólitos tóxicos, quando existem fatores biológicos e ambientais favoráveis; estes metabólitos secundários são chamados de micotoxinas. Grande parte das perdas de alimento no mundo se deve à presença de fungos e contaminação por micotoxinas. É quase impossível determinar os custos econômicos devido às perdas. Somente nos Estados Unidos, a média anual de perdas de culturas devido às micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas, deoxinivalenol) é estimada em U\$ 932 milhões (CAST, 2003), sendo que a contaminação pode ocorrer pré ou pós-colheita, especialmente em regiões de clima tropical. Estas substâncias podem causar desde uma simples náusea, alucinações, dermatites, carcinomas até a morte. Apesar de que já são conhecidas centenas de micotoxinas, somente algumas delas têm sido estudadas visando à saúde da população humana e animal, porém não se exclui a possibilidade de outras micotoxinas presentes no ambiente apresentarem riscos para a saúde. Os principais fungos implicados em casos de micotoxicoses pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, mas existem também espécies de fungos toxigênicos em outros gêneros (SABINO, 2008).

As micotoxinas, presentes na atividade humana desde a idade mais remota, tornaram-se mais conhecidas após o acidente econômico ocorrido em 1960 na Inglaterra quando, devido à alimentação contaminada, morreram mais de 100 mil perus (SABINO, 2008). A Tabela 1 apresenta as algumas das enfermidades historicamente relacionadas às micotoxinas em alimentos ao redor do mundo.

Tabela 1 – Histórico de contaminações de alimentos e enfermidades associadas às micotoxinas¹.

Data	Local	Alimento	Micotoxina	Enfermidade/espécie	Fungo ²
Século XI-XII	Europa	cereais	Ergotamina *	Gangrena/humanos	<i>Claviceps purpúrea</i> (Fr.) Tul. 1853
Século XIX-XX	Japão	arroz	Citreoviridina	Cardiopatia/humanos	<i>Penicillium</i> Link 1809
1900	Rússia	pão	(Tricotecenos, Zearalenona, Fumonisinias)*	humanos	<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe 1839
1910	Brasil	castanhas	Afatoxina *		<i>Aspergillus flavus</i> Link 1809
1927	EUA	milho	Zearalenona *	Hiperestrogenismo/suínos	<i>Fusarium</i> Link 1809
1928	EUA	trigo	(Tricotecenos, Zearalenona, Fumonisinias)*	Vômito, recusa alimentar/suínos	<i>Fusarium</i> Link 1809
1941-1945	Europa		Tricotecenos*	Aleucia tóxica alimentar/humanos	<i>Fusarium</i> Link 1809
1960	Inglaterra	torta de amendoim	Afatoxina *	Doença X/perus	<i>Aspergillus flavus</i> Link 1809
1972	Japão		Tricotecenos (vomitoxina ou desoxinivalenol)	Aleucia tóxica alimentar/humanos	<i>Fusarium</i> Link 1809
1988	África do Sul		Fumonisinias	Câncer esofágico/animais domésticos	<i>Fusarium verticillioides</i> Nirenberg 1976

¹ Dados compilados de Sabino (2008).

² www.gbif.org

* Designação posterior ao fato ocorrido.

Os diferentes fungos produtores de micotoxinas são encontrados em todas as regiões do mundo e podem crescer em uma grande variedade de substratos e sob várias condições de umidade, pH e temperatura. Assim, os alimentos estão sujeitos à invasão por fungos e contaminação com micotoxinas no campo durante e após a colheita, no processamento, no transporte e na estocagem, em condições deficientes de manuseio (SABINO, 2008).

A produção de toxinas importantes em sanidade animal e saúde pública dependem de variáveis que interferem diretamente com o processo microbiológico e fisiológico do fungo e de seus metabólitos. Nem todas as amostras de fungos

conhecidamente toxigênicas são produtoras de toxinas; cerca de 50 % dos isolados de *A. flavus* produzem aflatoxinas B₁ e B₂, enquanto *A. parasiticus* produz B₁, B₂, G₁ e G₂. O isolamento de fungos toxigênicos a partir de alimentos, principalmente grãos, estocados em condições recomendadas, não significa risco imediato para consumo; não ocorre produção de toxinas de *A. flavus* isolado em milho armazenado se a umidade percentual dos grãos variar entre 12 e 14%. O não desenvolvimento de fungos toxigênicos em alimentos, no entanto, não significa ausência de micotoxinas. A maioria das micotoxinas são termorresistentes, mantendo a toxicidade mesmo após o processamento; aflatoxinas podem resistir até a 250 °C. Por serem moléculas de baixo peso molecular, as micotoxinas não são antigenicamente eficientes, animais expostos não adquirem, portanto, imunidade. Uma mesma toxina pode ser produzida por gêneros diferentes de fungos (*Penicillium verrucosum* e *Aspergillus ochraceus* produzem ocratoxinas), por espécies diferentes do mesmo gênero (*A. flavus* e *A. parasiticus* produzem aflatoxinas) e ainda, uma única espécie pode originar mais de uma toxina (aflatoxina e ácido ciclopiazônico por *A. flavus*) (MALLMANN; DILKIN, 2007; SABINO et al., 1988).

2.2 Propriedades Físicas e Químicas das Aflatoxinas

Dentre os tipos de micotoxinas, as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* são um dos mais potentes agentes mutagênicos e carcinogênicos conhecidos. A aflatoxina B₁ (AFB₁) é hepatotóxica e genotóxica, além de ser considerada carcinógeno humano (grupo I) (IARC, 1993; WANG et al., 2008).

As espécies capazes de produzir aflatoxinas são: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* (IARC, 1993). *A. flavus* e *A. parasiticus* são responsáveis pela maior proporção de aflatoxinas encontradas em alimentos no mundo. Esses fungos apresentam distribuição mundial, com condições ideais de desenvolvimento entre 80-85% de umidade relativa e em temperatura ambiente ao redor de 30°C (COULOMBE, 1991). O termo aflatoxina é devido a este composto ter sido caracterizado pela primeira vez em amendoins contaminados com *Aspergillus flavus*.

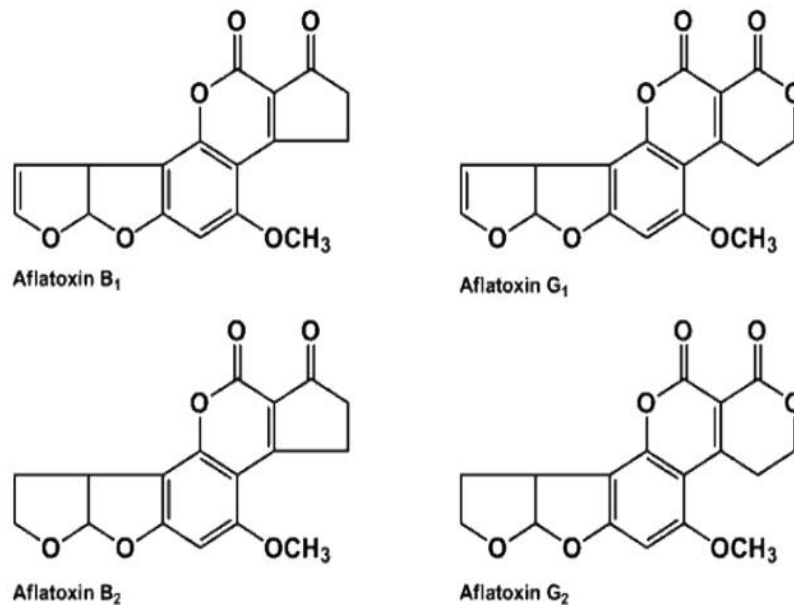
O Brasil, devido à prevalência de clima tropical, apresenta condições ideais para o desenvolvimento desses fungos. Atualmente são conhecidos 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂ (COULOMBE, 1991).

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% quando comparada à AFB₁, respectivamente (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). Devido à importância das aflatoxinas, *A. flavus* tornou-se o fungo o mais estudado capaz de provocar doenças transmitidas por alimentos (IARC, 1993).

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 (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).

Em relação à solubilidade, são compostos muito pouco solúveis em água; insolúveis em solventes apolares; muito solúveis em solventes orgânicos polares (clorofórmio e metanol, por exemplo) e especialmente em dimetil sulfóxido. Além da produção natural, as aflatoxinas também podem ser produzidas para fins de pesquisa através da fermentação de *A. flavus* ou *A. parasiticus* em meios de cultura em laboratório, extraídas com o uso de solventes e purificadas por cromatografia (IARC, 1993).

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



2.3 Ocorrência de Aflatoxina em Matérias Primas Alimentares e Rações

Os principais alimentos contaminados por *A. flavus* são milho, amendoim e semente de algodão. Alguns temperos também podem conter aflatoxinas, além de nozes e castanhas (IARC, 1993). Em relação à alimentação animal, sabe-se que a dieta de aves e 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).

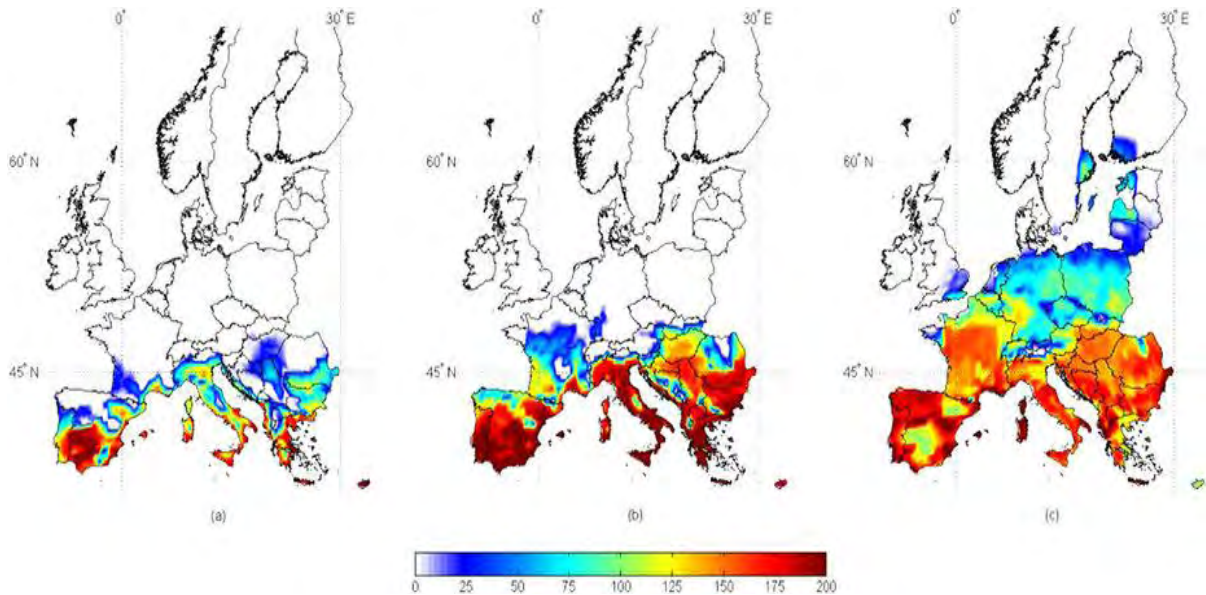
Dentre os diversos fatores determinantes da produção que podem afetar o rendimento da cultura de milho, de 8 a 13% das estimativas de perdas são relacionadas ao ataque de fungos e bactérias (OERKE, 2006). Outros fatores que podem contribuir para a infecção do milho por micotoxinas são: genótipo, condições ambientais, momento de colheita, danos mecânicos, tempo entre colheita, secagem e armazenamento e condições de armazenagem (PATERSON;

LIMA, 2010). 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. 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 consideráveis. A contaminação por micotoxinas resulta em perdas anuais na colheita de mais de 900 milhões de dólares e mais de 400 milhões de dólares são investidos como forma de prevenir e reduzir a contaminação (CAST, 2003).

Boas práticas agrícolas são as melhores formas de evitar o crescimento fúngico e a possível produção de micotoxinas. Ainda assim, os grãos armazenados em condições inadequadas podem apresentar contaminação.

As mudanças climáticas têm gerado grande preocupação em relação aos problemas de segurança alimentar ao redor do mundo e a presença de micotoxinas tem um papel importante neste cenário. Battilani et al. (2016), realizaram um estudo de modelagem, prevendo a contaminação em culturas de milho e trigo na Europa nos próximos 100 anos em três cenários: temperatura atual, mais 2° C e mais 5 °C. A simulação foi feita com base em dados diários de clima (temperaturas mínima e máxima, chuvas e radiação solar) obtidos de pontos georreferenciados na Europa, relacionados com a fenologia das espécies cultivadas. Foi determinado o índice de risco de aflatoxina de cada ponto coletado, indicando um aumento considerável do risco de contaminação de produtos alimentícios com aflatoxinas com o aumento da temperatura, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Mapas de risco de contaminação por aflatoxinas em milho em três diferentes cenários climáticos na Europa.



A escala 0–200 refere-se ao índice de risco de aflatoxina. (a): presente, (b): +2°C, (c): +5°C. Mapas criados usando Mathworks, Matlab. Computer Program, 2012. Disponível em: <<http://it.mathworks.com/>>. Fonte: Battilani et al. (2016).

Com relação ao Brasil, a Tabela 2 apresenta os estudos realizados nos últimos 10 anos sobre os níveis de contaminação por aflatoxinas em milho e rações. Nesses trabalhos, várias amostras desses produtos apresentam níveis superiores aos recomendados tanto pela legislação brasileira quanto pela legislação da União Européia. A Portaria nº 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 50,0 µg/kg. Os níveis permitidos pela legislação da União Européia são de 50,0 µg/kg para ingredientes e rações completas para ruminantes; 10,0 µg/kg para rações prontas e 20,0 µg/kg para rações completas para suínos e aves (EFSA, 2009).

Tabela 2 - Ocorrência de aflatoxinas em milho e rações no Brasil nos últimos 10 anos (2008-2017).

Estado	N / n *	Aflatoxina	Concentração (µg/kg)	Método	Referência
Milho					
Bahia	08/80	Total	1,0 a 5,0	Fluorimetria	Almeida et al. (2009)
Paraná	8/90**	Total	5,0 a 54,0	CCD	Moreno et al. (2009)
	10/60***	Total	10,0 a 56,0	CCD	
Bahia	16/200	B ₁	13,7 a 47,8	CCD	Rocha et al. (2009)
Mato Grosso	36/200	B ₁	6,8 a 976,1	CCD	
Rio Grande do Sul	28/200	B ₁	13,7 a 1393,0	CCD	São Paulo
	04/200	B ₁	2,0 a 34,2	CCD	
São Paulo	8/24	Total	0,5 a 3,9	CLAE	Oliveira et al. (2016)
Mato Grosso	20/84	Total	1,0 a 108,7	CLAE	Bento et al. (2012)
Paraná	11/74	Total	0,6 a 3,0	CL-EM/EM	Souza (2013)
Minas Gerais	28/36	Total	2,0 a 7,3	Imunoensaio	Carvalho et al. (2016)
Goiás	7/7	Total	1,0 a 12,0	CCD	Reges et al. (2016)
Paraná	11/57	Total	0,4 a 17,0	CL-EM/EM	Oliveira et al. (2017)
Santa Catarina	4/40	Total	0,5 a 50,0	CL-EM/EM	
Rio Grande do Sul	23/51	Total	0,7 a 35,0	CL-EM/EM	
Rações					
Bahia	27/80	Total	1,0 a 3,0	CLAE	Simas et al. (2007)
Paraná	28/36	B ₁	0,8 a 25,0	CL-EM/EM	Souza et al. (2008)
São Paulo	12/30	B ₁	1,0 a 19,5	CLAE	Oliveira et al. (2010)
Paraná	33/36	Total	2,9 a 96,8	ELISA	Rossi, et al. (2012)
	33/36	Total	1,03 a 91,04	CLAE	
	30/34	Total	2,2 a 60,45	ELISA	
	30/34	Total	0,79 a 60,8	CLAE	
Rio de Janeiro	24/100	B ₁	1,2 a 9,0	ELISA	Queiroz et al. (2013)
São Paulo	89/288	Total	1,7 a 194	CLAE	Motta et al. (2015)

* Número de amostras analisadas / número de amostras positivas.

Legenda: AF: Aflatoxina; CCD: Cromatografia de camada delgada; CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência; ELISA: Ensaio imunoenzimático; CL-EM/EM: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas/massas;

** milho na recepção; ***milho na pré secagem.

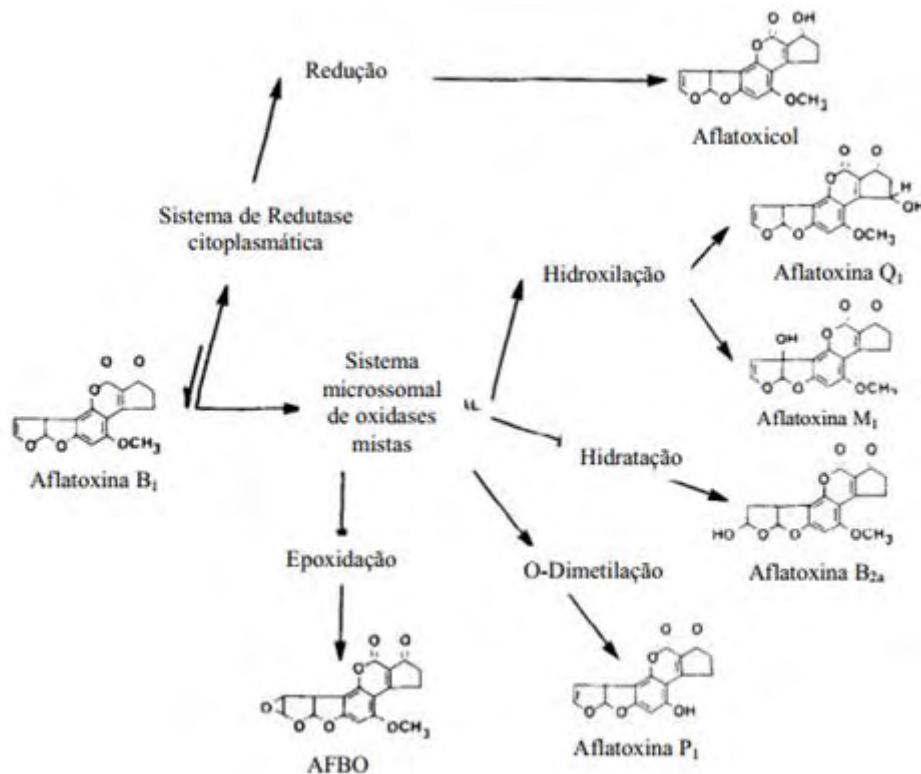
2.4 Biotransformação da Aflatoxina B₁

Biotransformação é toda alteração que ocorre na estrutura química de uma substância química estranha ao organismo (xenobiótico). Esse processo é catalisado por enzimas inespecíficas, que metabolizam substâncias endógenas que também devem sofrer biotransformação para sua renovação. De forma geral, a biotransformação 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, conferindo polaridade aos xenobióticos, expondo ou inserindo grupamentos que resultam em aumento da hidrofiliabilidade. Os metabólitos formados podem conferir maior toxicidade que o composto original (bioativação). A Fase II envolve as reações de incorporação de fatores endógenos ao produto da Fase I (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2008).

Após a ingestão oral, a AFB₁ é eficientemente absorvida e biotransformada antes da excreção pelas vias urinária e fecal. Estudos em animais demonstraram que em condições normais, 50 % da dose oral de AFB₁ administrada é rapidamente absorvida na região duodenal do intestino delgado, entrando no fígado através do sistema portal (WILSON et al., 1985). A AFB₁ é concentrada no fígado e em menor quantidade nos rins, sendo também encontrada no sangue venoso mesentérico como AFB₁ livre ou como metabólitos solúveis em água (WOGAN; EDWARD; SHANK, 1967).

As enzimas da família do citocromo P450 (CYP) são as principais responsáveis pela biotransformação inicial das aflatoxinas absorvidas (Fase I), os metabólitos principais dessa fase são AFM₁ e AFQ₁, produtos da hidroxilação, o produto de demetilação AFP₁ e o produto de redução aflatoxicol, além da AFB_{2α}, produto da hidratação (Figura 3). As enzimas também convertem a AFB₁ em AFBO e daí para sua forma carcinógena, AFB-8,9-epóxido. Essa é a forma ativa que se liga covalentemente ao DNA formando o aduto AFB₁-N7-guanina e também à albumina do soro via base de Schiff (ESSIGMANN et al., 1977; SABBIONI et al., 1987). Neste último caso, o epóxido sofre hidrólise na presença de água formando AFB₁-8,9-diol e AFB₁-8,9-dialdeído em equilíbrio, sendo que este último reage com resíduos de lisina na molécula de albumina, formando o aduto AFB₁-lisina (SASS et al., 2013).

Figura 3 - Principais vias de biotransformação da aflatoxina B₁.



Fonte: Wong e Hsieh (1980)

2.5 Efeitos Tóxicos da Aflatoxina B₁ em Frangos de Corte e Suínos

A classificação toxicológica dos produtos químicos é baseada no valor da DL₅₀ (em relação à toxicidade aguda). 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. No caso de hepatocarcinogênese, existe ampla variação na susceptibilidade das espécies. Para frangos de corte, o valor da DL₅₀ é entre 6,50 e 16,50 mg/kg de massa corporal no caso de suínos o valor é de 0,62 mg/kg de massa corporal (PATTERSON, 1973). Bioquimicamente, as aflatoxinas 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 (BAPTISTA, 2005; RAWAL; KIM; COULOMBE-JR, 2010). As aflatoxinas causam danos no fígado, diminuição a produção de leite e ovos e supressão da resposta imune em animais que consomem baixas concentrações na dieta. Embora animais jovens

sejam mais suscetíveis, todas as idades são afetadas. Sinais clínicos incluem disfunções no sistema gastrointestinal, diminuição na reprodução, redução da eficiência alimentar, anemia e icterícia (CAST, 2003). 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.

A aflatoxicose em animais monogástricos como frangos e suínos é um problema relevante devido ao impacto econômico relacionado à mortalidade, baixa conversão alimentar, aumento dos custos de produção e efeitos negativos na saúde pública, relacionados ao consumo de resíduos nas vísceras de animais expostos. (OLIVEIRA et al., 2014). A Tabela 3 mostra dados referentes aos efeitos tóxicos de aflatoxina B₁ em frangos de corte e suínos.

Tabela 3 - Efeitos tóxicos de aflatoxinas em frangos de corte e suínos.

Animal	AFB₁ (µg/kg)	Efeito	Autor, ano
Frangos de corte	2500 a 5000	Aumento nos níveis de gama glutamiltransferase	Fernandez et al. (1994)
	800	Decréscimo do consumo de ração e da taxa de crescimento.	Tedesco et al. (2004)
	1000	Diminuição da concentração de proteína total, aumento de atividade da fostatase alcalina e aumento significativo do fígado.	Denli et al. (2009)
	50	Aumento nos níveis de aspartato aminotransferase e discreta degeneração vacuolar	Tessari et al. (2010)
	2500	Redução do ganho de peso e consumo de ração diários, lesões hepáticas, aumento do peso relativo do fígado e rim, alterações bioquímicas	Neeff et al. (2013)
Suínos	500	Aumento dos níveis de aspartato aminotransferase, gama glutamiltransferase e fosfatase alcalina no sangue	Harvey et al (1990)
	922	Redução do ganho de peso diário, no consumo diário de ração e na eficiência alimentar	Schell et al. (1993)
	280	Redução no ganho de peso médio diário	Marin et al. (2002)
	250 e 500	Diminuição do consumo de ração, alterações bioquímicas	Rustemeyer et al. (2010)
	1100	Aumento do peso relativo de órgãos, icterícia, alterações histopatológicas e bioquímicas.	Di Gregorio et al. (2017)

2.6 Biomarcadores e Avaliação da Exposição à Aflatoxina B₁

Um dos mais importantes aspectos da análise de risco de substâncias químicas é o estabelecimento do grau de exposição do organismo humano (WHO, 2002). Os biomarcadores medem uma mudança celular, biológica ou molecular em um meio biológico (tecidos humanos, células ou fluidos) que fornece informação a respeito de uma doença ou exposição a uma determinada substância (JAGER et al., 2011). Biomarcadores são utilizados para medir ou indicar um processo biológico, e, portanto, a detecção de biomarcadores específicos pode auxiliar na identificação, no diagnóstico e no tratamento de indivíduos afetados que podem estar sob risco, mas ainda não exibem os sintomas. O desenvolvimento de biomarcadores para agentes ambientais deve ser baseado no conhecimento específico do metabolismo, formação de produtos e mecanismo geral de ação (GROOPMAN; KENSLER, 1999). Características próprias de um indivíduo determinam a susceptibilidade à exposição, como a habilidade de ativação/detoxificação de carcinógenos, a habilidade em reparar uma alteração no DNA, o estado nutricional e imunidade, idade, sexo e status sócio-econômico, no caso de humanos (WHO, 1993).

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. Diferentes biomarcadores de aflatoxinas já foram detectados em urina, tais como AFM₁, AFP₁, AFQ₁, aflatoxina-dihydrodiol e de AFB₁-N7-guanina (GROOPMAN et al., 1992a; MYKKANEN et al., 2005).

Groopman et al. (1992b) consideram que ocorre uma significativa excreção de de AFB₁-N7-guanina 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 meia-vida curta (WU et al., 2009).

O aduto AFB₁-lisina tem sido utilizado como um importante biomarcador de exposição à AFB₁ a longo prazo na dieta (MCCOY et al., 2005). Este aduto liga-se à albumina no soro sanguíneo, após a biotransformação da AFB₁. Di Gregorio et al. (2017) avaliaram a presença de AFB₁-lisina no sangue de suínos, no entanto a maior parte dos estudos foi feita com humanos (TURNER, 2008).

Diversos estudos relataram a presença das aflatoxinas, metabólitos e biomarcadores no soro e em urina nas últimas décadas. Em um estudo realizado na província de Guangxi, o aduto AFB₁-lisina foi determinado em amostras de soro de 42

habitantes e comparado com a ingestão de AFB₁ e excreção de AFM₁ na urina (GAN et al., 1988). Coeficientes de correlação significativos foram encontrados entre a concentração de AFB₁-lisina no soro e AFM₁ na urina e também entre AFB₁-lisina no soro e a exposição à AFB₁ através da dieta. Estimou-se que de 1,4 a 2,3 % da AFB₁ ingerida é covalentemente ligada à albumina. Wild et al. (1992) realizaram um estudo com 20 indivíduos moradores de Gâmbia, África Ocidental, e também confirmaram a validade da AFB₁-lisina como biomarcador. A avaliação paralela dos mesmos participantes deste estudo por Groopman et al. (1992a) na determinação de AFB₁-N7-guanina na urina, confirmou não apenas a correlação deste metabólito com ingestão de AFB₁, mas também demonstrou a correlação entre os níveis de AFB₁-lisina no soro e os níveis urinários de AFB₁-N7-guanina.

Os níveis dos adutos AFB₁-N7-guanina na urina (GROOPMAN et al., 1992a; GROOPMAN et al., 1992b) e AFB₁-lisina no sangue (GAN et al., 1988) refletem a dose biologicamente efetiva da aflatoxina a que um indivíduo tem sido exposto. A concentração de AFB₁-N7-guanina na urina reflete a exposição à AFB₁ em um período de 1 a 2 dias, enquanto os níveis de AFB₁-lisina no soro indicam a exposição em um período de entre 2 a 3 meses (WILD et al., 1992).

No Brasil, os estudos relacionados à determinação de aflatoxinas e metabólitos em fluidos biológicos são escassos. Scussel et al. (2006) avaliaram a presença do aduto AFB₁-lisina em amostras de sangue de 50 indivíduos coletadas em 1999 na cidade de São Paulo. O aduto AFB₁-lisina foi detectado em 62% das amostras, com concentração variando entre 0,0 – 57,3 pg AFB₁-lisina/mg de albumina sanguínea, sendo a concentração média para as amostras positivas de 14,9 pg/mg. No entanto, Jager et al. (2016) não encontraram amostras positivas para AFB₁-lisina em indivíduos adultos de um *Campus* universitário do Estado de São Paulo, indicando baixa exposição à AFB₁ através dos alimentos na área relatada.

Recentemente, Di Gregorio (2017) validou metodologia para determinação de AFB₁-lisina no soro de suínos, abrindo novas perspectivas para a aplicação deste biomarcador para fins de diagnóstico de aflatoxicoses e avaliação da exposição desses animais às aflatoxinas na dieta.

2.7 Metodologias Analíticas para Determinação de Aflatoxinas

Desde a descoberta das aflatoxinas e de suas propriedades tóxicas e carcinogênicas na década de 60, o campo das ciências analíticas na determinação dessas e de outras micotoxinas fez grandes avanços. O desenvolvimento de métodos precisos e reprodutíveis é indispensável para a determinação de analitos presentes em alimentos, rações ou outras matrizes complexas em níveis de $\mu\text{g}/\text{kg}$. Procedimentos laboratoriais como extração, purificação e concentração do analito são fundamentais para uma detecção sensível após a separação dos compostos de interesse dos interferentes da matriz. A cromatografia em Camada Delgada (CCD), já bem desenvolvida em 1960 foi a primeira técnica cromatográfica a ser aplicada em análises de micotoxinas e ainda continua a desempenhar seu papel na rotina de análises, com a melhoria das fases estacionárias. Posteriormente a Cromatografia Gasosa (GC) desempenhou papel importante existindo métodos para a maioria das micotoxinas. O desenvolvimento de colunas capilares resultou em maior eficiência na separação cromatográfica. Embora a maioria das micotoxinas seja de compostos polares e não voláteis, a derivatização da amostra anterior à análise permite o uso dessa técnica (SHEPARD, 2000). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) surge também na mesma década de 60 como a aplicação de cromatografia líquida às teorias e instrumentações desenvolvidas originalmente para GC. A diferença entre CL e CLAE é a utilização de fases estacionárias com micropartículas esféricas, que por serem menos permeáveis necessitam de bombas para a eluição da fase móvel (CASS; DEGANI, 2001).

O grande avanço na técnica de detecção e confirmação tem sido o acoplamento de Espectrômetro de Massas (EM) aos sistemas cromatográficos. A espectrometria de massas oferece a técnica de confirmação ideal via detecção de íons moleculares (EM) em tempos de retenção específicos e pela geração de compostos específicos devido à fragmentação da molécula (EM-EM). Os problemas técnicos do acoplamento de fluxo líquido a partir de CLAE e o vácuo requerido pelo EM foi resolvido com técnicas de ionização à pressão atmosférica (ESI) ou ionização química à pressão atmosférica (APCI) (SHEPARD, 2000).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi determinar os níveis séricos de AFB₁-lisina, visando sua utilização como biomarcador de exposição de frangos de corte e suínos à AFB₁. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- 1) Determinar a concentração de AFB₁-lisina no soro de frangos de corte alimentados com ração artificialmente contaminada com AFB₁;
- 2) Determinar a concentração de AFB₁ na ração, bem como de AFB₁-lisina no soro de suínos encaminhados para abate em Matadouro-Escola localizado em um *Campus* universitário do Estado de São Paulo;
- 3) Determinar as concentrações séricas de enzimas (aspartato aminotransferase e gama-glutamilttransferase), proteína total, albumina e globulina dos frangos e suínos;
- 4) Verificar a correlação entre as concentrações de AFB₁-lisina nos frangos de corte e suínos e os respectivos valores de bioquímica sanguínea avaliados nesses animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

O trabalho foi constituído por 2 experimentos independentes, sendo um com frangos submetidos à ração contaminada experimentalmente com aflatoxinas, e outro, com suínos alimentados com ração comum em condições de campo, ou seja, sem inclusão ou exclusão de qualquer variável.

4.1.1 Experimento 1: Frangos de Corte

No experimento com frangos foram utilizados 60 pintos de um dia de idade, machos, provenientes de matrizes comerciais de frangos de corte, linhagem Cobb, adquiridos da empresa Pluma AgroAvícola, com sede em Descalvado, SP. As aves foram alojadas em galpão aviário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, distribuídas aleatoriamente em dois boxes (1 e 2) recebendo água e ração à vontade. As dietas basais foram formuladas de acordo com a fase de vida (1 a 14 dias, 15 a 28 dias e 29 a 42 dias), com a finalidade de atender os requerimentos nutricionais para frangos de corte e preparadas na Fábrica de Rações do Campus Fernando Costa (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição da ração de frangos de corte.

Ingrediente	Fase de vida		
	0-14	15-28	29-42
Milho 7,88 (%)	55,45	58,19	61,68
Soybean meal 45,2 (%)	37,38	34,68	31,02
Óleo de soja (%)	3,02	3,33	3,82
Calcário (%)	0,919	0,898	0,824
Fosfato dicálcico (%)	1,631	1,402	1,182
Sal (%)	0,491	0,472	0,452
DL-Metionina (pureza: 99,0%) (%)	0,301	0,266	0,242
L-Lisina HCl (pureza: 78,4%) (%)	0,196	0,170	0,174
Premix (kg/ton)	0,5 ^a	0,5 ^b	0,5 ^c
Caulim (%)	0,1	0,1	0,1
Total (%)	100,0	100,0	100,0
Energia metabolizável (kcal/kg)	2983	3042	3121
Proteína bruta (%)	21,3	20,3	18,9
Fósforo disponível (%)	0,42	0,37	0,32
Cálcio (%)	0,85	0,78	0,69
Sódio (%)	0,21	0,21	0,20
Lisina digestível (%)	1,22	1,13	1,05
Metionina+Cistina digestível (%)	0,88	0,82	0,77

a: Composição por kg de premix: ferro 9525 mg; cobre 3000 mg; manganês 13,50 g; zinco 12,54 g; iodo 265 mg; selênio 80 mg; vitamina A 2406000 UI; vitamina D3 591000 UI; vitamina E 4250 UI; vitamina K3 875 mg; vitamina B1 550 mg; vitamina B2 1400 mg; niacina 7773 mg; ácido pantotênico 3185 mg; vitamina B6 613 mg; ácido fólico 250 mg; biotina 18,90 mg; vitamina B12 3750 mcg; colina 69.60 mg; nicarbazina+niarasina 12,50 g + 12,50 g; clorohidroxiquinolina 7500 mg.

b: Composição por kg de premix: ferro 9525 mg; cobre 3000 mg; manganês 13,50 g; zinco 12,54 g; iodo 254,40 mg; selênio 75,65 mg; vitamina A 2044800 UI; vitamina D3 508360 UI; vitamina E 3825 UI; vitamina K3 688,40 mg; vitamina B1 494,80 mg; vitamina B2 1260 mg; niacina 6996 mg; ácido pantotênico 2866,5 mg; vitamina B6 551,25 mg; ácido fólico 200 mg; biotina 17 mg; vitamina B12 3380 mcg; colina 60 g; salinomicina 16,50 g; halquinol 7500 mg.

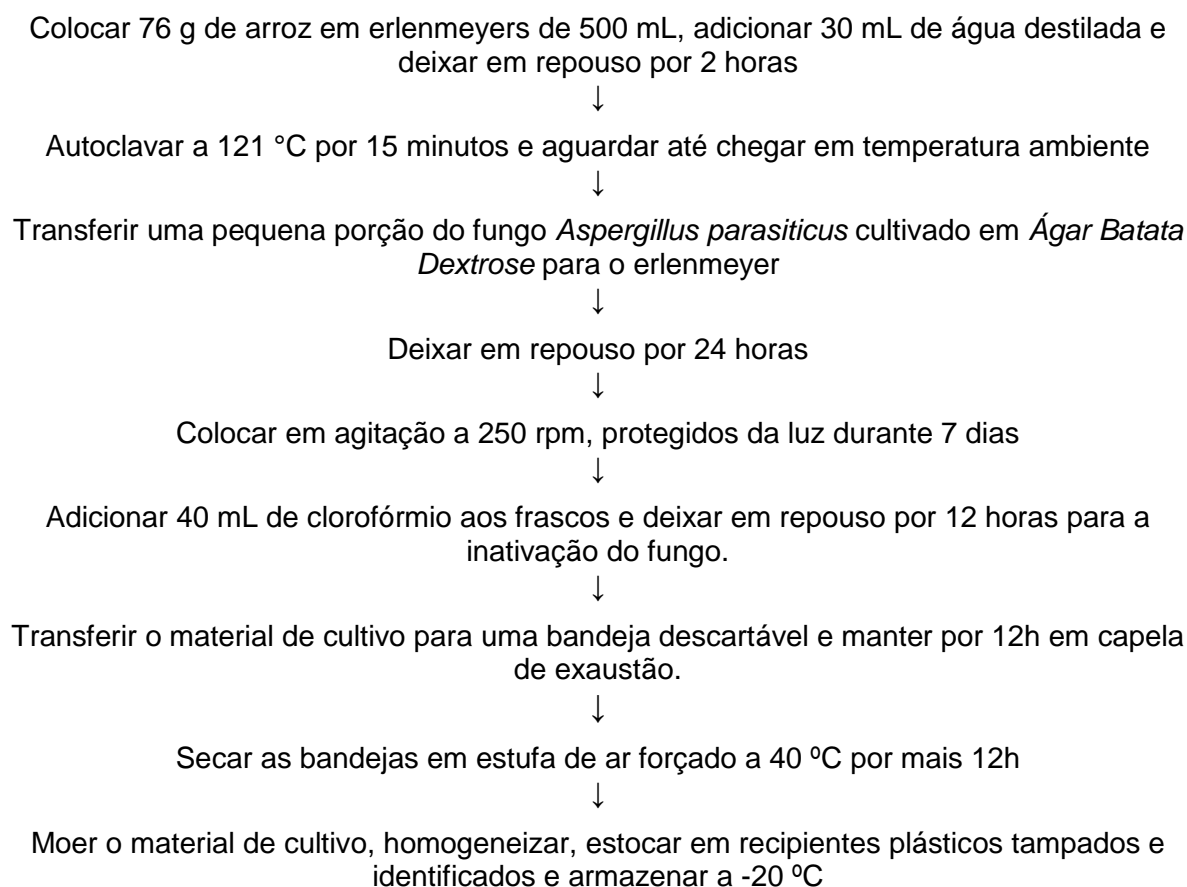
c: Composição por kg de premix: ferro 19,05 g; cobre 6000 mg; manganês 27 g; zinco 25,08 g; iodo 500 mg; selênio 150 mg; vitamina A 3000000 UI; vitamina D3 900,000 UI; vitamina E 5,000 UI; vitamina K3 750 mg; vitamina B1 800 mg; vitamina B2 2,000 mg; niacina 9552 mg; ácido pantotênico 4410 mg; vitamina B6 250 mg; ácido fólico 200 mg; vitamina B12 5000 mcg; colina 60 g; clorohidroxiquinolina 15 g.

Até os 28 dias, as aves dos dois boxes consumiram o mesmo tipo de ração. A partir do 29º dia, durante 14 dias, as aves do box 2 foram alimentadas com a ração experimental contendo AFB1.

Para o preparo da ração experimental de frangos foi utilizado material de cultivo contendo AFB₁, preparado de acordo com o preconizado por Shotwell et al. 1966 (Figura 4) e adicionado à ração basal das aves do box 2 na última fase de vida (29^o a 42^o dia), de modo a obter uma concentração final na ração em torno de 0,5 mg AFB₁ por quilo de ração.

A ração experimental foi homogeneizada por aproximadamente 10 minutos em misturador horizontal/helicoidal, e armazenada em local apropriado até a sua utilização.

Figura 4 - Produção de aflatoxina B₁.



O material foi analisado por CLAE e quantificado. Com base na quantidade de AFB₁ presente foi adicionado parte desse material à ração de forma a obter a concentração desejada de AFB₁ por quilo de ração.

4.1.2 Experimento 2: Suínos

No experimento com suínos foi utilizado um lote com 24 animais provenientes de matrizes do Setor de Suinocultura do Campus Fernando Costa. Foram utilizados animais, entre machos e fêmeas, nascidos entre os dias 31/01/2017 e 03/02/2017 da raça Landrace - Large White. Os animais ficaram alojados em uma única baia, recebendo ração balanceada e água à vontade.

As rações foram preparadas na Fábrica de Rações do Campus de acordo com a fase de vida dos animais e com a finalidade de atender os requerimentos nutricionais para suínos. A Tabela 5 mostra a composição da ração nas fases de crescimento e terminação, coletadas durante o experimento.

Tabela 5 - Composição da ração de suínos.

Ingrediente	Fase de vida	
	crescimento	terminação
Milho 7,5 (kg)	700,0	740,0
Farelo de soja 46% (kg)	280,0	240,0
UNIMIX 01.555 ^a (kg)	20,0	20,0
UNIMIX 01.556 ^b (kg)	0,1	0,1
Total (kg)	1000	1000
Energia metabolizável (kcal/kg)	3220,72	3227,56
Proteína bruta (%)	18,13	16,59
Fósforo total (%)	0,4432	0,3752
Cálcio (%)	0,6344	0,6590
Sódio (%)	0,1716	0,1756
Lisina (%)	0,9552	0,8371

a: níveis de garantia por quilograma de produto: ác. fólico (mín) 9,6 mg; ác. pantotênico (mín) 410,2 mg; biotina (mín) 3,9 mg; cálcio (mín – máx) 173,6-250,4 g; cobre (mín) 5.964,7 mg; colina (mín) 7.569,0 mg; ferro (mín) 1.606,6 mg; fitase (mín) 30.000,0 FTU; fósforo (mín) 46,6 g; iodo (mín) 75,9 mg; lisina (mín) 8,4 g; manganês (mín) 3.536,2 mg; matéria mineral (máx) 374,7 g; niacina (mín) 590,4 mg; selênio (mín) 14,0 mg; sódio (mín) 64,1 g; vitamina A (mín) 400.000,0 UI; vitamina B1 (mín) 79,5 mg; vitamina B12 (mín) 795,2 mcg; vitamina B2 (mín) 158,9 mg; vitamina B6 (mín) 59,6 mg; vitamina D3 (mín) 80.000,0 UI; vitamina E (mín) 800,0 UI; vitamina K3 (mín) 81,6 mg; zinco (mín) 5.358,1 mg

b: níveis de garantia por quilograma de produto): ác. fólico (mín) 7,3 mg; ác. pantotênico (mín) 310,5 mg; biotina (mín) 3,0 mg; cálcio (mín – máx) 175,9-263,9 g; cobre (mín) 5.693,9 mg; colina (mín) 4.875,5 mg; ferro (mín) 1.603,7 mg; fitase (mín) 30.000,0 FTU; fósforo (mín) 23,7 g; iodo (mín) 75,9 mg; lisina (mín) 1,6 g; manganês (mín) 3.529,8 mg; matéria mineral (mín) 294,2 g; niacina (mín) 447,0 mg; selênio (mín) 12,6 mg; sódio (mín) 61,7 g; vitamina A (mín) 250.000,0 UI; vitamina B1 (mín) 60,2 mg; vitamina B12 (mín) 602,1 mcg; vitamina B2 (mín)

120,3 mg; vitamina B6 (mín) 45,2 mg; vitamina D3 (mín) 50.000,0 UI; vitamina E (mín) 500,0 UI; vitamina K3 (mín) 51,0 mg; zinco (mín) 5.348,4 mg

4.2 Coleta e Análise de Rações

A coleta de amostras de ração dos frangos foi feita no início e final de cada período de desenvolvimento, em duplicata (0,5 kg cada). A determinação de aflatoxinas foi feita nas seguintes amostras:

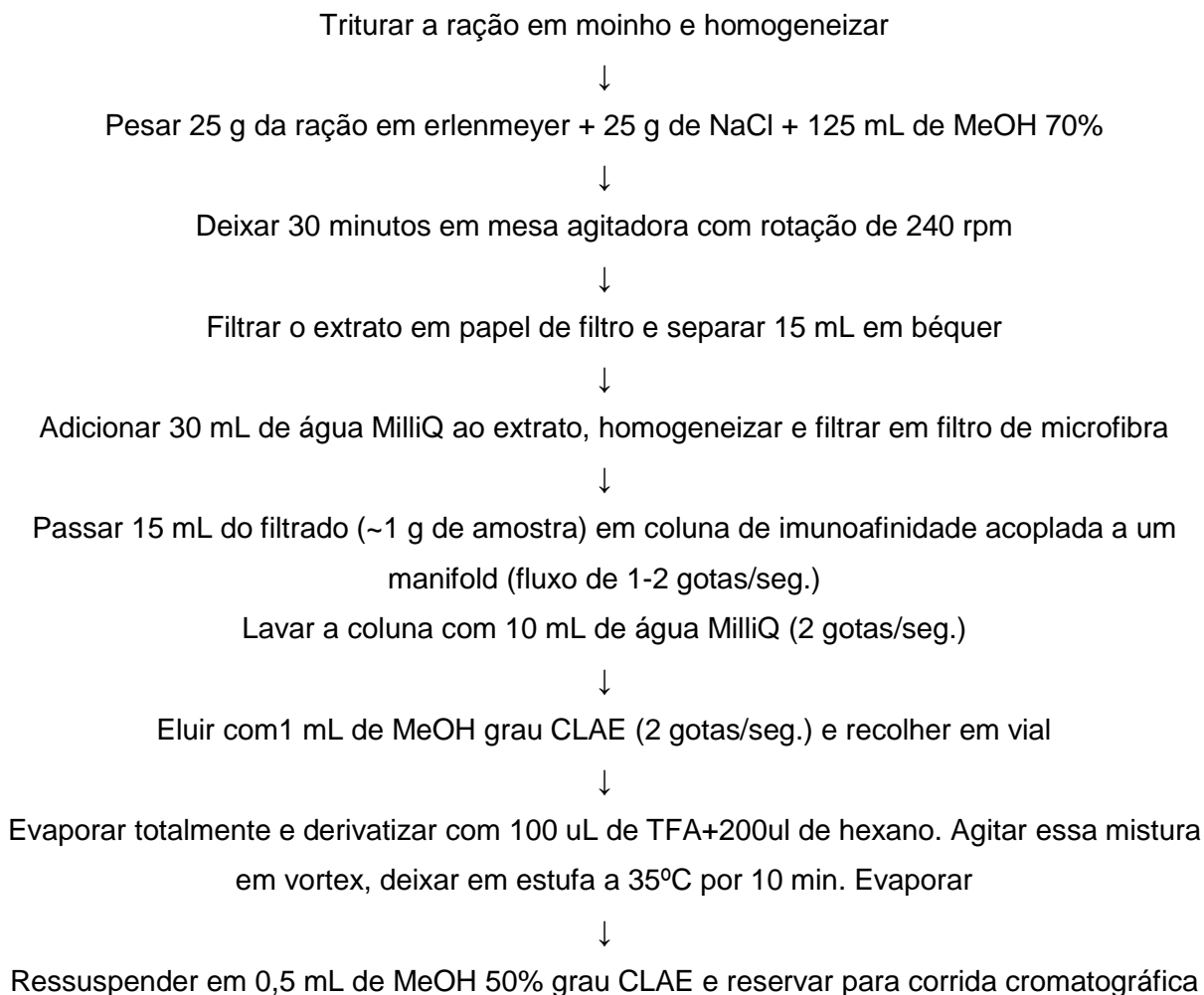
- milho utilizado como matéria prima no preparo das rações,
- rações prontas (das diferentes fases de vida) e
- ração experimental adicionada de AFB₁.

No caso dos suínos foi feita a coleta de amostras de ração pronta, um dia antes da coleta de sangue dos animais, em duplicata (0,5 kg cada).

Em ambos os casos as amostras foram homogeneizadas e mantidas em sacos de polietileno a -20 °C até o momento das análises. As análises de AFB₁ nas rações foram feitas utilizando colunas de imunoafinidade Aflatest®, e seguiram o preconizado pela empresa fabricante, Vicam, com pequenas modificações. A determinação dos níveis de AFB₁ nas rações foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com metodologia já validada, preconizada pela AOAC (SCOTT, 1990) (Figura 5).

Para todas as análises de rações, o sistema CLAE utilizado incluiu um modelo de bomba Shimadzu® LC, detector de fluorescência Shimadzu® RF-10AXL (excitação: 360 nm; emissão: 440 nm), amostrador automático Shimadzu® SIL-10AF com software Labsolutions. A coluna de separação utilizada foi da marca Phenomenex® ODS (5 µm) 4,6 x 150 mm Hyperclone C18, pré-coluna Shim-pack (5 µm) 4x10 mm, injeção de 20,0 µL, fase móvel composta de água:acetoneitrila:metanol (60:20:20), modo isocrático e fluxo de 1,0 mL/min.

Figura 5 - Marcha analítica para determinação de aflatoxinas em rações de frangos e suínos.



4.3 Coleta de Sangue e Análises Bioquímicas do Soro

A coleta de sangue dos frangos para obtenção de soro foi feita em três dias:

- dia 28 (antes do início da intoxicação),
- dia 35 (7º dia de intoxicação) e
- dia 42 (14º de intoxicação).

Foram utilizados 20 animais de cada boxe, identificados por abraçadeiras numeradas colocadas na pata, de modo que o sangue do mesmo animal pudesse ser coletado nos 3 dias (Figura 6). A coleta foi feita por punção na jugular direita das aves, coletando-se por volta de 3,0 mL de sangue em tubos com ativador de coágulo.

Figura 6 – Identificação dos frangos.

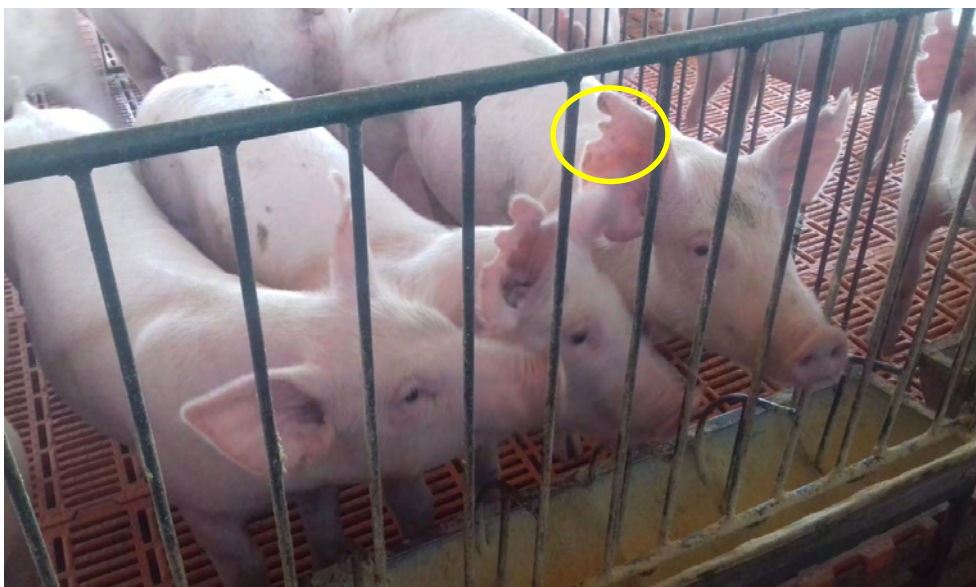


Fonte: Própria autoria

A coleta de sangue dos suínos foi feita via veia jugular, de 20 animais identificados por marcas na orelha (Figura 7). Foram coletados cerca de 5,0 mL em tubos quando os animais estavam com idades entre:

- 80 a 83 dias (fase de crescimento)
- 105 a 108 dias (fase de terminação)
- 130 a 137 dias (fase de terminação)

Figura 7– Identificação dos suínos.



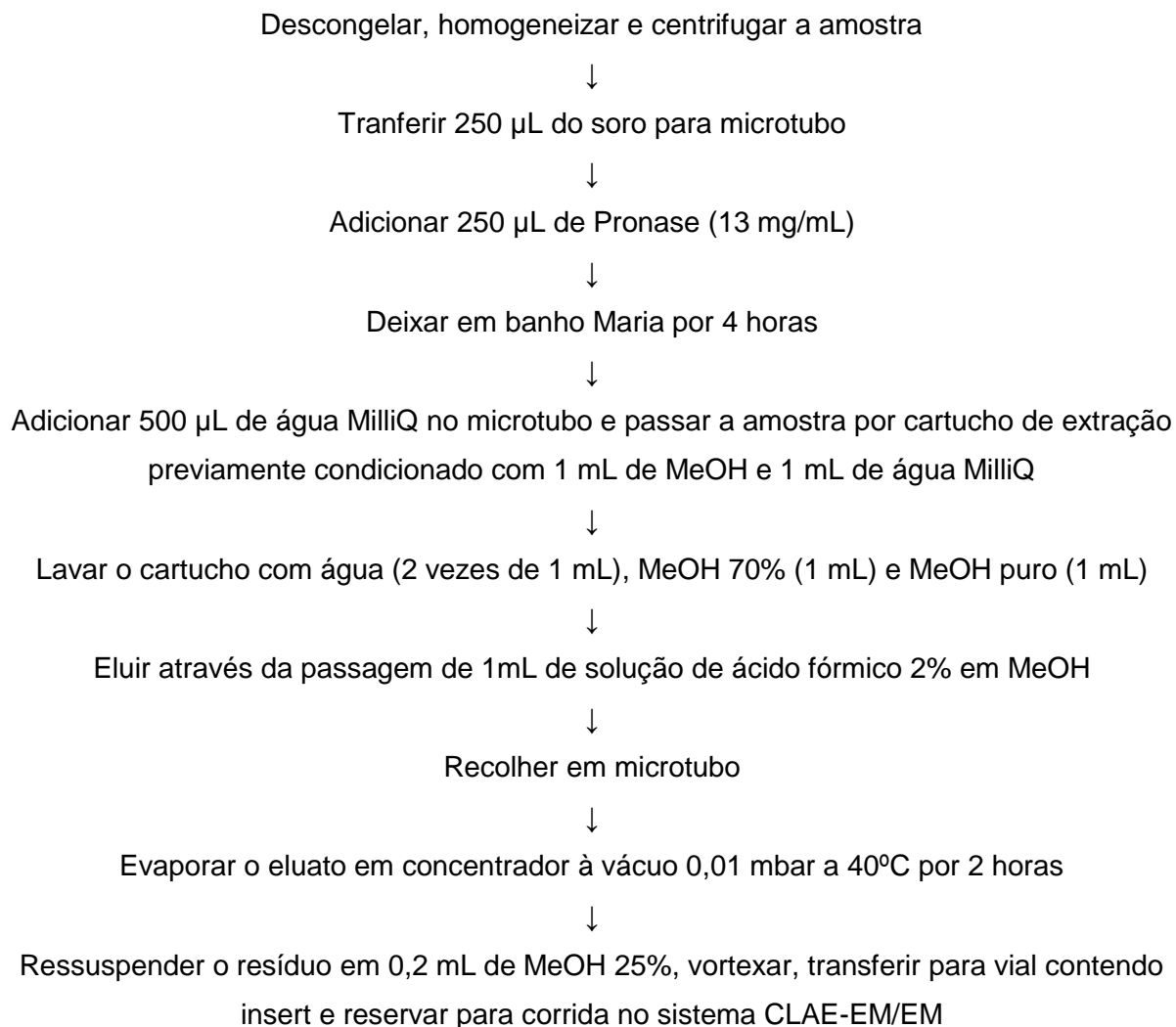
Fonte: Própria autoria

Em ambos os casos foram utilizados tubos com ativador de coágulo. A separação do soro foi feita de acordo com Moreno et al. (1997). Depois da separação do coágulo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (Quimis, Q 222T28) e foi feita a separação do soro em dois eppendorfs, um volume 500,0 µL para realização de provas bioquímicas e o restante armazenado em para as análises de AFB₁ lisina.

A bioquímica sérica tanto de frangos como de suínos foi realizada no Laboratório Clínico Veterinário da Unidade Didático Clínico Hospitalar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Utilizou-se o equipamento Mindray BS 120, China e os kits comerciais Labtest, Brasil. As análises realizadas foram enzima aspartato amino transferase (AST), por metodologia cinética UV-IFCC; enzima gama glutamil transferase (GGT), por metodologia cinética Szasz modificado; proteínas totais (PT), por colorimetria – biureto; albumina, por colorimetria – verde de bromocresol e globulinas, por cálculo matemático.

4.4 Análises de Aflatoxina B₁-lisina no Soro

Para a determinação do aduto AFB₁-lisina em soro, foi utilizado método de alto grau de especificidade e sensibilidade que combina extração em fase sólida e Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas - CL-EM/EM (MCCOY et al., 2005), descrito na Figura 8. As colunas para extração utilizadas foram do fabricante Waters (coluna Oasis® max 1 cc 13 mg). O padrão de AFB₁-lisina utilizado foi produzido no LMMA como descrito originalmente por Scholl e Groopman (2004), com as modificações propostas por Sass et al. (2015).

Figura 8 - Marcha analítica para determinação de AFB₁-lisina em soro.

As análises foram conduzidas em um sistema de CLAE acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo com interface de electrospray. O espectrômetro de massas foi operado no Modo Reações Múltiplas (MRM), usando fonte de ionização do tipo electrospray no modo positivo, com voltagem capilar de 0,75 kV, temperatura da fonte de 150°C e temperatura de dessolvatação de 500°C. Os fluxos dos gases de dessolvatação e do cone foram mantidos a 800 L/h e a 150 L/h, respectivamente. A voltagem do cone, energia de colisão e transições de MRM (íon precursor > fragmento) foram otimizadas manualmente. Para AFB₁-lisina a transição de quantificação foi m/z 457>394 e a transição de confirmação foi m/z 457>376. Foi utilizado o software MassLynx versão 4.1 para coleta e processamento de dados.

Para separação cromatográfica para AFB₁-lisina foi utilizada coluna C₁₈ (2 x 150 mm, 3 µm) termostaticada a 40°C. A composição da fase móvel foi: (A) água deionizada, (B) acetonitrila (C) ácido fórmico 0,6 %. A composição inicial 80% A, 10% B e 10% C é mantida por 1,1 min, o gradiente modificado para 74% A, 16% B e 10% C e mantido por 9,9 min. A concentração de AFB₁-lisina obtida nas análises (ng/mL) foram expressas também relativamente ao teor de albumina sérica (ng/mg de albumina), previamente determinada no soro dos frangos de corte conforme o item 4.3.

O método analítico para AFB₁-lisina em soro de suínos foi validado previamente no laboratório (DI GREGORIO et al., 2017). No presente estudo, foram realizados procedimentos para validação do método nas amostras de soro de frangos. Foi utilizado um pool de 10 soros com resultado negativo para AFB₁-lisina (provenientes do grupo controle), os quais foram fortificados, em triplicata, com níveis de 6,25, 12,5, 25,0 50,0 e 100,0 ng/mL. As amostras fortificadas foram analisadas utilizando-se o mesmo método escrito anteriormente. A recuperação aparente (R_A), supressão do sinal (SSE) devido ao efeito de matriz, e recuperação da extração (R_E) foram calculados de acordo com Di Gregorio et al (2017). Os resultados foram corrigidos pela recuperação, e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados de acordo com o sinal/ruído 3:1 e 10:1 respectivamente. A linearidade foi avaliada verificando-se o coeficiente de determinação (r²).

4.5 Análise Estatística

Os dados de parâmetros bioquímicos e de AFB₁-lisina no soro foram analisados por ANOVA, utilizando-se o programa SAS (SAS, 1992). As médias de tratamentos que mostraram diferenças significativas na ANOVA foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey. Os resultados obtidos nos exames de bioquímica sérica foram utilizados para a determinação do Coeficiente de Correlação de Pearson (r), entre as concentrações de AFB₁-lisina e os parâmetros bioquímicos analisados no experimento. O teste “t” de Student, com aproximação normal, foi utilizado para comparar os valores de correlação (SNEDECOR; COCHRAN, 1967). A significância estatística aceita foi no nível de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos Animais, Rações e Bioquímica sérica

5.1.1 Frangos de Corte

Durante o experimento os frangos dos dois boxes apresentaram boas condições de saúde. O consumo total de ração durante esse período, pelos grupos controle e com AFB₁ foi de 4.602,0 g e 4.650,5 g, respectivamente, não havendo diferenças ($P > 0.05$) entre esses valores. As aves do box 2, que a partir do 28º dia foram alimentados (durante 14 dias) com a ração experimental contaminada com AFB₁, não apresentaram sinais visíveis de intoxicação por aflatoxinas. As concentrações de aflatoxinas totais encontradas nas rações experimentais (controle e contaminada) encontram-se na Tabela 6. As rações do tratamento controle apresentaram níveis baixos de AFB₁ nos períodos de 29-35 dias (2,03 µg/kg) e 36-42 dias (2,13 µg/kg), bem como de aflatoxinas totais (4,50 µg/kg no período de 29-35 dias, e 7,60 µg/kg no período de 36-42 dias). Essas concentrações encontram-se abaixo dos níveis de tolerância em rações, adotados em todos os países que possuem regulamentação para aflatoxinas (OLIVEIRA et al., 2014). Deste modo, pode-se considerar que os níveis encontrados não ocasionaram efeitos significativos nos frangos de corte durante o experimento.

Tabela 6 - Concentração de aflatoxinas B₁, G₁, B₂ e G₂ encontradas nas rações dos frangos dos tratamentos controle e alimentados com aflatoxinas

Tratamento	Período (dias)	Concentração (µg/kg de ração) ¹				
		AFB ₁	AFG ₁	AFB ₂	AFG ₂	Total
Controle	29-35	2,03	1,53	0,50	0,44	4,5
	36-42	2,13	2,92	0,95	1,64	7,6
Aflatoxinas	29-35	197,01	30,10	55,65	35,51	318,28
	36-42	247,34	53,76	133,73	88,53	523,35

¹ Valores médios obtidos de amostras em duplicata.

As rações contaminadas apresentaram concentrações próximas do valor originalmente proposto (~200 µg/kg de AFB₁), tanto no período de 29-35 dias (197,01 µg/kg) quanto no de 36-42 dias (247,34 µg/kg), resultando na média de 222,17 µg/kg

no período total do experimento (14 dias). Um efeito importante da intoxicação por aflatoxinas é o dano severo ao fígado, resultando em aumento da atividade enzimática, além da diminuição das proteínas sanguíneas (LESSON; DIAZ; SUMMERS, 1995), principalmente dos níveis de albumina (QUEZADA et al., 2000). Neste estudo, no entanto, o nível de 222,17 µg AFB₁/kg de ração foi suficiente apenas para causar efeitos leves em frangos após 14 dias de intoxicação, conforme pode ser observado nos resultados da bioquímica sérica apresentados na Tabela 7.

Aos 28 dias (início do período de intoxicação), 35 e 42 (7 e 14 dias de intoxicação, respectivamente) não houve diferenças ($P > 0,05$) nos níveis de AST, PT e GLO entre as aves do grupo com AFB₁ e o grupo controle. No entanto, os níveis de GGT foram maiores ($P < 0,05$) no grupo com AFB₁ ao 42º dia, não havendo diferenças nos dias anteriores. Fernandez et al. (1994) observaram aumento na atividade de GGT dose e tempo-dependentes usando rações com 2.500 e 5.000 µg/kg de AFB₁, ou seja, cerca de 10-20 vezes acima do utilizado no presente trabalho. Níveis aumentados de GGT são indicativos de efeitos tóxicos da AFB₁ no tecido hepático, embora outros fatores também possam causar o aumento das concentrações séricas desta enzima, incluindo outras micotoxinas, tais como as fumonisinas (LEDOUX et al., 2003).

Com relação às alterações nas variáveis ao longo do tempo, os níveis de AST aumentaram nos dois tratamentos, indicando tratar-se de um efeito fisiológico natural (LESSON; DIAZ; SUMMERS, 1995), sendo maior ($P < 0,05$) no 42º dia, no grupo com AFB₁ em comparação aos dias anteriores (28 e 35). Tessari et al. 2010, usando níveis de 50 µg/kg de AFB₁ e analisando soros de frangos com 6 e 33 dias também verificaram aumento nos níveis de AST e discreta degeneração vacuolar no fígado, confirmando a ausência de lesões severas no fígado quando há baixas concentrações de AFB₁ na ração. Aparentemente, um aumento nos níveis de AST só é observado com níveis de AFB₁ muito superiores ao utilizado nesse estudo, como reportado por Denli et al. (2009), que alimentaram frangos com 1.000,0 µg/kg AFB₁ de 7 a 42 dias e observaram aumento neste parâmetro.

Tabela 7 - Bioquímica sérica de frangos de corte

Parâmetro	0 (Controle)	AFB ₁
AST (U/L)		
Dia 28	270,75 ± 73,64 ^{Ab}	263,35 ± 70,09 ^{Ab}
Dia 35	367,05 ± 186,02 ^{Ab}	266,40 ± 74,16 ^{Ab}
Dia 42	491,95 ± 225,86 ^{Aa}	476,32 ± 241,30 ^{Aa}
GGT (U/L)		
Dia 28	10,15 ± 3,25 ^{Aa}	10,85 ± 3,53 ^{Aa}
Dia 35	12,37 ± 3,17 ^{Aa}	13,5 ± 5,29 ^{Aa}
Dia 42	10,42 ± 3,88 ^{Ba}	14,26 ± 4,79 ^{Aa}
PT (g/dL)		
Dia 28	2,70 ± 0,21 ^{Aa}	2,68 ± 0,21 ^{Aa}
Dia 35	2,84 ± 0,20 ^{Aa}	2,61 ± 0,32 ^{Aa}
Dia 42	3,06 ± 0,40 ^{Aa}	2,69 ± 0,29 ^{Aa}
ALB (g/dL)		
Dia 28	1,21 ± 0,10 ^{Ba}	1,29 ± 0,10 ^{Aa}
Dia 35	1,31 ± 0,10 ^{Aa}	1,13 ± 0,11 ^{Ab}
Dia 42	1,32 ± 0,12 ^{Aa}	1,05 ± 0,14 ^{Bb}
GLO (g/dL)		
Dia 28	1,49 ± 0,19 ^{Aa}	1,40 ± 0,16 ^{Aa}
Dia 35	1,53 ± 0,16 ^{Aa}	1,48 ± 0,26 ^{Aa}
Dia 42	1,74 ± 0,30 ^{Aa}	1,63 ± 0,20 ^{Aa}

AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama-glutamil transferase; PT: proteína total; ALB: Albumina; GLO: Globulina.

Maiúsculas referem-se às médias das linhas (dias), minúsculas referem-se às médias das colunas (tratamentos).

Um segundo efeito da AFB₁ nos parâmetros bioquímicos dos frangos de corte foi sobre a concentração de albumina, que foi menor ($P < 0,05$) no grupo alimentado com ração contaminada após 14 dias (42º dia de vida), em comparação ao grupo controle. No dia, 28, o teor de albumina foi menor ($P < 0,05$) no grupo controle em comparação ao que recebeu ração com AFB₁, porém os níveis de albumina aumentaram ($P < 0,05$) no grupo controle entre os dias 28 e 35, não havendo diferença entre este e o dia 42. Contrariamente, no grupo que recebeu AFB₁, as concentrações de albumina diminuíram ao longo do tempo, sendo menor ($P < 0,05$) no dia 42 em relação aos demais dias de tratamento, indicando que o efeito supressor da AFB₁ sobre a síntese de albumina ocorre progressivamente ao longo do período de exposição à toxina (RAWAL; KIM; COULOMBE-JR, 2010). Quezada et al. (2000) também observaram queda nos níveis de albumina, porém utilizando concentrações de AFB₁ na ração bem maiores do que a do presente estudo (2.000,0 µg/kg).

5.1.2 Suínos

O experimento com suínos não teve tratamentos diferenciados em relação à alimentação. As rações analisadas foram as de uso padronizado pelo Setor de Suinocultura do campus e apresentaram níveis muito baixos de contaminação por aflatoxinas (AFB₁: 0,16 – 0,27 µg/kg), bem abaixo do recomendado pelo Ministério da Agricultura (Tabela 8) e portanto, sem qualquer potencial aflatoxigênico para os animais. Sinais de intoxicação por aflatoxinas em suínos incluem pele áspera e letargia, como observado por Di Gregorio et al. (2017), em estudo no qual os animais receberam rações contendo 1.100,0 µg/kg de AFB₁.

Tabela 8 - Concentração de aflatoxinas encontradas nas rações de suínos

Amostra	Concentração (ug/kg de ração) ¹			
	AFB ₁	AFG ₁	AFB ₂	AFG ₂
Ração 80 dias	0,16	ND	ND	ND
Ração 100 dias	0,27	ND	ND	ND
Ração 130 dias	0,21	ND	ND	ND

¹ Valores médios obtidos de amostras em duplicata.

ND: não detectado (limite de detecção = 0,10 µg/kg para cada aflatoxina).

Em relação à bioquímica sérica dos suínos, nenhum parâmetro analisado apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparado entre os dias de coleta (Tabela 9).

Tabela 9 - Bioquímica sérica de suínos

Dia	Parâmetro				
	AST (U/L)	GGT (U/L)	PT (g/dL)	ALB (g/dL)	GLO (g/dL)
80	64,60 ± 60,92	42,95 ± 20,33	5,68 ± 0,67	2,78 ± 0,36	2,9 ± 0,42
100	75,35 ± 48,60	38,65 ± 10,12	6,13 ± 0,45	3,07 ± 0,30	3,06 ± 0,51
130	58,84 ± 90,71	38,16 ± 11,08	6,83 ± 0,49	3,62 ± 0,75	3,37 ± 0,59

AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama-glutamil transferase; PT: proteína total; ALB: Albumina; GLO: Globulina.

¹ Valores indicam a média ± DP de 20 animais em cada dia.

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias dos valores em uma mesma coluna ($P > 0,05$).

5.2 Desempenho do Método Analítico para AFB₁-lisina

Os resultados de desempenho do método analítico para determinação de AFB₁-lisina em soro estão apresentados na Tabela 10. As análises para calcular as recuperações foram feitas a partir de um “pool” de soros de 10 frangos do grupo controle, sem níveis detectáveis AFB₁-lisina, que foram fortificados em triplicata com níveis de 6,25, 12,5, 25,0 50,0 e 100,0 ng/mL, para gerar uma curva de calibração com 5 pontos. Foi utilizada matriz e não solvente, devido ao importante efeito de supressão observado.

As concentrações obtidas nas análises foram de 4,86, 12,47, 26,49, 50,39 e 99,52 respectivamente e as médias das recuperações ficaram entre 77,7% e 106,0%, com desvios-padrão relativos entre 5,7 e 15,2%. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram de 7,25 e 25,0 ng/mL respectivamente, que equivale a 0,62 e 2,08 ng/mg de albumina, considerando a média do nível de albumina (1,2 g/dL) no “pool” de soros. Os valores de R_A, SSE e R_E foram 16,79%, 15,59% e 107,72%, respectivamente. Os coeficientes de determinação (r²) das curvas de calibração foram superiores a 0.9896.

Tabela 10 – Desempenho do método analítico para determinação de AFB₁-lisina em amostras de soro de frango¹

Nível de fortificação (ng/mL)	Concentração encontrada (ng/mL)	RSDr ^a (%)	Recuperação
0	ND	0	0
6,25	4,86	5,7	77,7
12,5	12,47	15,2	99,8
25,0	26,49	12,1	106,0
50,0	50,39	10,5	100,8
100,0	99,52	7,9	99,5

¹ Resultados expressos como média de 3 replicatas de um pool de soros negativos (n=10)

ND não detectada (limite de detecção = 15 ng/mL)

^a Desvio padrão relativo (n=3 por nível de contaminação)

Os valores de R_A (16,79%) e SSE (15,59%) foram baixos, indicando um elevado efeito da matriz na análise. Mesmo assim, o LOQ do método analítico foi satisfatório, uma vez que permitiu a quantificação de AFB₁-lisina em todas as amostras de soro dos frangos que receberam AFB₁ na dieta. R_A expressa a razão entre os níveis observados em uma curva de calibração preparada em matriz e as concentrações correspondentes obtidas em solvente, enquanto que o SSE se refere à supressão ou aumento do sinal obtido na análise da matriz (Sulyok et al., 2006). Pode-se considerar que o valor de R_E obtido no trabalho (107,72%) foi adequado, uma vez que este parâmetro é definido como o rendimento da fase de extração dividido pelo valor de SSE (Di Gregorio et al., 2017). Por este motivo, as concentrações de AFB₁-lisina nas amostras de soro foram calculadas com base em curvas de calibração do padrão preparadas nesta matriz.

5.3 AFB₁-lisina no Soro de Frangos de Corte e Suínos

Não foram encontrados níveis detectáveis de AFB₁-lisina no soro de suínos, em nenhuma fase de vida, visto que não houve contaminação da ração por aflatoxinas em níveis relevantes (igual ou abaixo de 0,27 µg/kg – Tabela 8). Di Gregorio et al. (2016) encontraram níveis entre 4,00 e 10,81 ng/mg de albumina em animais que receberam ração contendo 1.100,0 µg/kg por 7 e 42 dias, respectivamente.

As concentrações médias de AFB₁-lisina no soro de frangos do tratamento com AFB₁ estão apresentadas na Tabela 11.

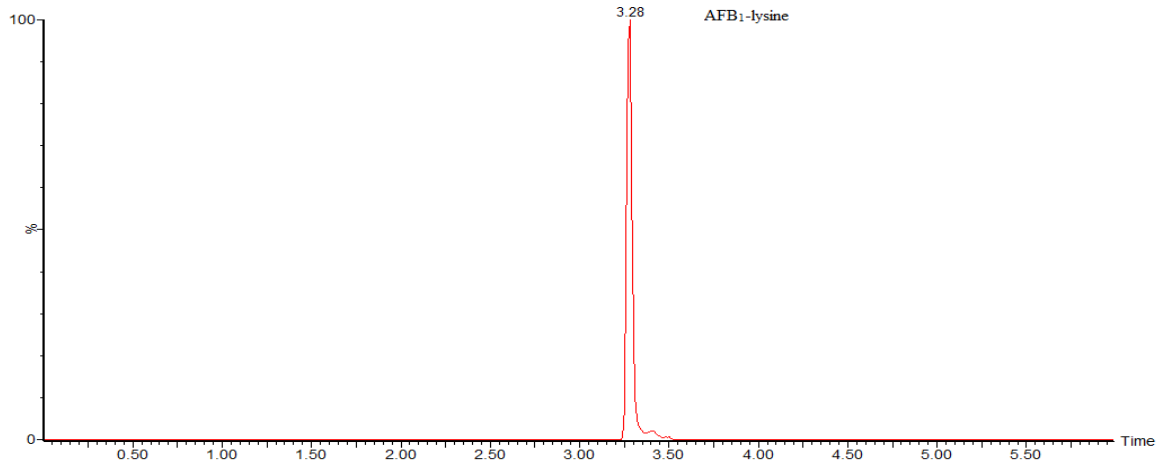
Tabela 11 – Valores de AFB₁-lisina em ng/mL e em ng/mg de albumina aos 35 e 42 dias de vida, 7 e 14 dias de intoxicação, respectivamente

Animal	Dia 35		Dia 42	
	AFB ₁ - lis (ng/mL)	AFB ₁ - lis (ng/mg alb)	AFB ₁ - lis (ng/mL)	AFB ₁ - lis (ng/mg alb)
21	57,20	5,95	27,44	2,95
22	65,11	5,97	63,82	7,78
23	82,14	7,02	60,0	5,55
24	81,04	6,69	48,19	4,34
25	98,03	8,45	57,83	4,70
26	75,02	6,35	58,97	5,36
27	81,98	7,06	61,68	5,18
28	94,12	8,96	82,61	8,98
29	90,98	8,27	79,28	8,52
30	54,87	4,49	AP	AP
31	85,43	7,17	64,34	7,31
32	81,47	8,06	58,90	5,50
33	61,48	6,68	45,67	4,11
34	71,64	5,01	52,87	4,13
35	76,38	7,27	75,92	7,23
36	43,92	3,85	32,74	2,70
37	93,00	8,61	46,09	4,70
38	78,31	6,52	52,55	4,45
39	100,38	8,29	85,45	7,84
40	84,02	8,48	76,10	9,28

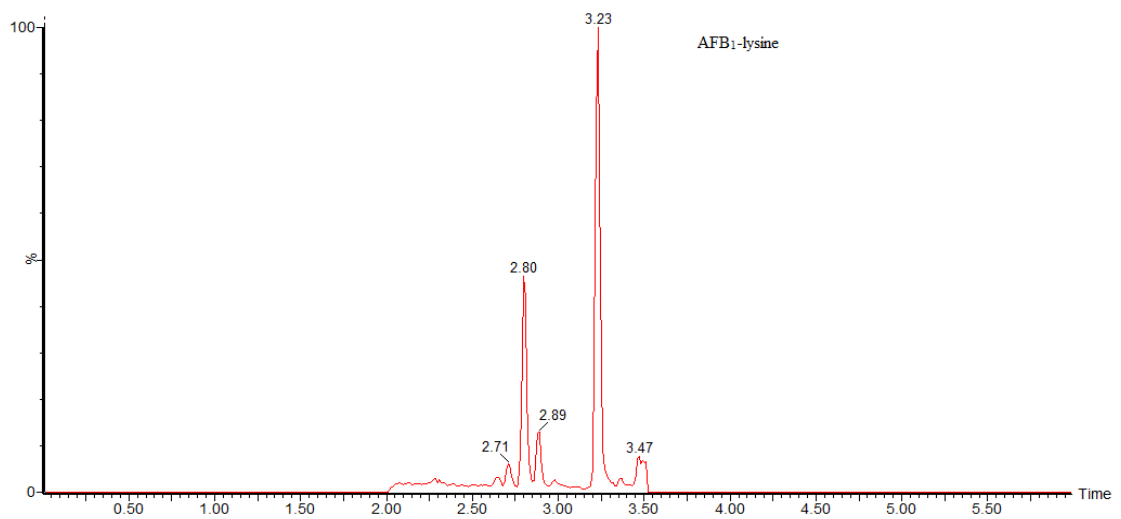
AP: Amostra perdida.

Todas as aves do grupo alimentado com AFB₁ apresentaram AFB₁-lisina, em níveis que variaram individualmente entre 27,44 e 100,38 ng/mL (2,70 e 9,28 ng/mg de albumina). A Figura 9 mostra dois cromatogramas de AFB₁-lisina obtidos no padrão (100,0 ng/mL) e em uma amostra de frango de corte contendo 85,4 ng/mL. Os valores de LOD e LOQ foram 7,5 e 25,0 ng/mL, respectivamente. As médias foram diferentes ($P < 0,05$) entre os dias 35 e 42 (7 e 14 dias de intoxicação, respectivamente), cujos valores foram $6,96 \pm 1,42$ ng/mg de albumina e $5,82 \pm 2,01$ ng/mg de albumina), respectivamente (Figura 10).

Figura 9 - Cromatogramas (transições de quantificação) de aflatoxina B₁-lisina em: A) Padrão (100,0 ng/mL); B) Amostra contendo 85,4 ng/mL, coletado de frango alimentado com 220,17 µg/kg AFB₁.

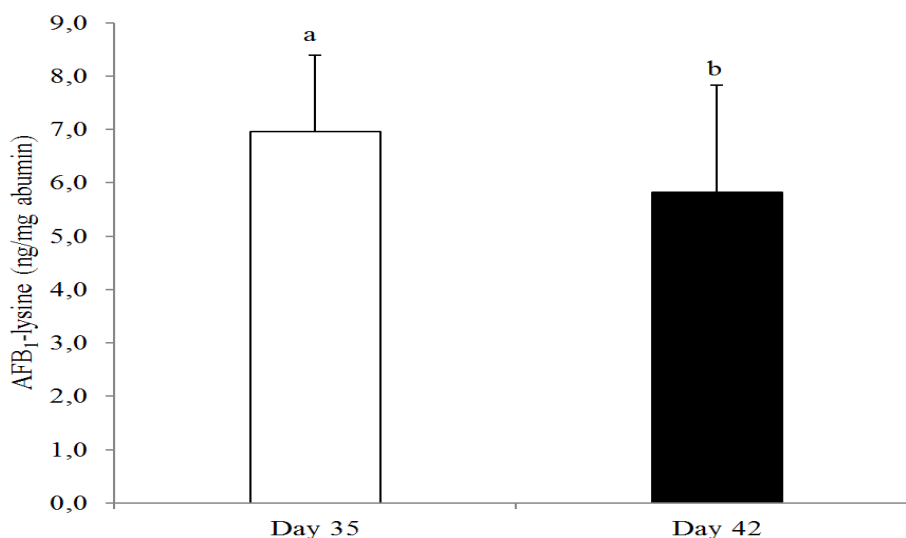


A



B

Figura 10 – Concentrações de AFB₁-lisina sérica aos 35 e 42 dias de vida em frangos alimentados com ração experimental contendo AFB₁.



É difícil fazer alguma comparação entre os dados, pois não existem trabalhos relacionando o consumo de ração contaminada com AFB₁ e a presença de AFB₁-lisina no soro sanguíneo de frangos. Em estudo realizado com suínos, Di Gregorio et al. (2017) encontraram níveis de AFB₁-lisina variando entre 4,00 and 10,81 ng/mg albumina em animais que receberam ração contendo 1.100 µg/kg de AFB₁ por 7 e 42 dias, respectivamente. Deste modo, mesmo considerando as diferenças interespécies, pode-se observar uma equivalência relativa entre os níveis de AFB₁-lisina reportados em suínos por Di Gregorio et al. (2017) e as concentrações descritas no presente estudo, no qual todas as aves que receberam 222,17 µg/kg de AFB₁ apresentaram AFB₁-lisina em níveis que variaram entre 2,70 e 9,28 ng/mg de albumina após 14 dias de intoxicação. A diminuição nos níveis de AFB₁-lisina no soro dos frangos do 7º até o 14º dia de intoxicação foi surpreendente, considerando que outros estudos relataram um aumento dos níveis durante o período de exposição à AFB₁ em suínos (Di Gregorio et al., 2017) ou em animais de laboratório (Mccoy et al., 2005). As razões para essa diminuição não estão claras. Porém, tendo em vista que o intervalo foi de apenas 7 dias, devido à data de abate das aves, outros estudos são necessários para confirmar a ocorrência de variações nas concentrações de AFB₁-lisina em condições de exposição prolongada à AFB₁.

A Tabela 12 apresenta os coeficientes de correlação entre AFB₁-lisina (ng/mg de albumina) e os parâmetros bioquímicos analisados no soro dos frangos que receberam AFB₁. Houve correlação negativa ($P < 0,05$) entre os níveis de AFB₁-lisina e as concentrações séricas de PT, albumina e globulina aos 42 dias (após 14 dias de consumo de ração contendo AFB₁). Os níveis das enzimas AST e GGT não apresentaram correlação ($P > 0,05$) com os níveis de AFB₁-lisina no soro.

Tabela 12 – Coeficientes de correlação (r) entre AFB₁-lisina (ng/mL de albumina) e os respectivos níveis de parâmetros de bioquímica sérica de frangos alimentados com ração contendo AFB₁ durante 42 dias

Parâmetro	Dia 35 ¹		Dia 42 ¹	
	r	P	r	P
Aspartato Aminotransferase (U/L)	0,116	0,40	-0,218	0,25
Gama Glutamil Transferase (U/L)	0,228	0,25	-0,145	0,40
Proteína Total (g/dL)	-0,198	0,25	-0,600	< 0,005
Albumina (g/dL)	-0,366	0,10	-0,663	< 0,001
Globulina (g/dL)	-0,081	0,40	-0,396	< 0,05

¹ N = 20 para cada dia de tratamento.

As correlações obtidas no estudo corroboram os dados apresentados nas seções anteriores, os quais indicam que, mesmo em níveis relativamente baixos de contaminação da ração com aflatoxinas, a AFB₁-lisina é um excelente biomarcador para avaliação da exposição de frangos de corte à AFB₁ na dieta. Pode-se considerar, também, o potencial da AFB₁-lisina como parâmetro para avaliar com maior precisão a eficiência de adsorventes para aflatoxinas, tendo em vista a possibilidade de redução dos custos dos experimentos *in vivo* com esses compostos.

6 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

1. A presença de AFB₁ no nível de 222,17 µg/kg teve apenas efeitos adversos leves em frangos de corte após 14 dias de intoxicação.
2. O nível de 0,213 µg/kg de aflatoxinas na ração utilizada pelo Setor de Suinocultura do Campus de Pirassununga está muito abaixo do nível máximo recomendado pelo Ministério da Agricultura, e portanto não causou efeitos adversos nos suínos.
3. Os níveis séricos de AFB₁-lisina indicam a dose interna de AFB₁ nas aves, que correlaciona-se com os níveis de proteína total, albumina e globulina.
4. Os resultados indicam que AFB₁-lisina tem potencial como biomarcador sensível e específico na avaliação da exposição de frangos de corte à AFB₁ na dieta e para fins de diagnóstico.
5. São necessários estudos adicionais para fornecer as bases fisiológicas da toxicocinética da AFB₁-lisina sérica como biomarcador em frangos de corte.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. V. A. F. et al. 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.
- BANDO, E. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, 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.
- BATTILANI, P. et al. Aflatoxin B₁ contamination in maize in Europe increases due to climate change. **Scientific Reports**, London, v. 6, art. 24328, 2016.
- BENTO L. F. et al. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n.1, p.44-9, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA n° 07, de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 nov. 1988. Seção 1, p. 21.968.
- CASS, Q.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC, fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77 p.
- CARÃO, A. C. P. **Determinação de biomarcadores de aflatoxina B₁ e aplicabilidade na avaliação da eficiência de adsorventes em frangos de corte**. 2016.145 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- CARVALHO, B. F. et al. Occurrence of mycotoxins and yeasts and moulds identification in corn silages in tropical climate. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 120, p. 1181-1192, 2016.
- COUNCIL OF AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Ames, Iowa: CAST, 2003.
- COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Ed.). **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 103-43.
- DENLI, M. et al. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B₁. **Poultry Science**, Cary, v. 88, n. 7, p. 1444-1451, 2009.

DI GREGORIO, M. C. et al. Determination of serum aflatoxin B₁-lysine to evaluate the efficacy of an aflatoxin-adsorbing feed additive in pigs fed an aflatoxin B₁-contaminated diet. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 33, n. 2, p. 93-102, 2017

ESSIGMANN, J. M. et al. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ in vitro. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, 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.

FERNANDEZ, A. et al. Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin-containing feed. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 23, p. 37-47, 1994.

GAN, L. S. et al. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B₁ intake and urinary excretion of aflatoxin M₁. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 9, p. 1323-5, 1988.

GOMPERTZ, O. F. et al. Fungos tóxicos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 533-4.

GROOPMAN, J. D. et al. Molecular dosimetry of aflatoxin-N₇-guanine in human urine obtained in The Gambia, West Africa. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 1, n. 3, 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. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 52, p. 45-52, 1992b.

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

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, 1993. 245 p. v. 56.

JAGER, A. V. et al. Biomarkers of aflatoxin exposure and its relationship with the hepatocellular carcinoma. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G. (Ed.). **Aflatoxins**: biochemistry and molecular biology. Rijeka: InTech, 2011. p. 107-126.

JAGER, A. V. et al. Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: a pilot study. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Muenchen, v. 219, p. 294-300, 2016.

LEDOUX D. R. et al. Individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B₁ and moniliformin in broiler chicks. **Avian Diseases**, Jacksonville, v.47, p.1368-1375, 2003.

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

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

MARIN, D. E. et al. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. **Journal of Animal Science**, Cary, v. 80, p. 1250-1257, 2002.

MCCOY, L. et al. Analysis of aflatoxin B₁-lysine adducts in human serum by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 19: p. 2203-2210, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Portaria MA/SNAD/SFA nº 07 de 09/11/2008**. Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 – seção 1, página 21, 1988.

MORENO, A. M. et al. **Colheita e processamento de amostras de sangue em suínos para fins de diagnóstico**. Concórdia: EMBRAPA CNPSA, 1997.

MORENO, E. C. et al. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Parana State, Brazil. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 220-226, set. 2009.

MOTTA, T. P. et al. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B₁ na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 25-28, 2015.

MYKKANEN, H. et al. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B₁ metabolites (AFQ₁, AFM₁ and AFN-N7-guanine) in Young Chinese males. **International Journal of Cancer**, v. 115, p. 879-884, 2005.

NEEFF, D. V. et al. 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**, Cary, v. 92, p. 131-137, 2013.

OERKE, E. C. Centenary review: crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 144, p. 31-43, 2006.

OGA, S.; FARSKY, S. H. P.; MARCOURAKIS, T. Toxicocinética. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 1, p. 9-26.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Animal health: mycotoxins. In: VAN ALFEN, N. (Ed.). **Encyclopedia of agriculture and food systems**. San Diego: Elsevier, 2014. p. 358-377. v. 1.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Simultaneous occurrence of aflatoxins and fumonisins in corn intended for the pet feed industry and for human consumption. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, Santa Clara, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2016.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Determinação de aflatoxina B₁ em rações e aflatoxina M₁ no leite de propriedades do estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 221-225, 2010.

OLIVEIRA, M. S. et al. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 73, p. 127-132, 2017.

PATTERSON, D. S. P. Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 11, p. 287- 294, 1973.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, Kidlington, v. 43, p. 1902-14, 2010.

QUEIROZ, B. et al. Fungal contamination and determination of fumonisins and aflatoxins in comercial feeds intend for ornamental birds in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 57, p. 405-411, 2013.

QUEZADA, T. et al. Effects of aflatoxin B₁ on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Phisiology Part C**, Philadelphia, v. 125, p. 265-272, 2000.

RAWAL, S.; KIM, J. E.; COULOMBE-JR, R. Aflatoxin B₁ in poultry: toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, London, v. 89, p. 325-31, 2010.

REGES, J. T. A. et al. Ocorrência de fungos e micotoxinas em grãos de milho em Jataí-GO, Brasil. **Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales**, Tulua, p. 34-39, 2016.

ROCHA, L. O. et al. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, n. 11, p. 5090-103, 2009.

ROSSI, C. N. et al. Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 132, n.4, p. 2211-2216, 2012.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, DZO, 2011. 252 p.

RUSTEMEYER, S. M. et al. Effects of dietary aflatoxin on the health and performance of growing barrows. **Journal of Animal Science**, Cary, v. 88, n. 11, p. 3624-30, 2010.

SABBIONI, G. et al. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B₁ in vivo in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 8, p. 819-24, 1987.

SABINO, M. Micotoxinas em alimentos. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 5, p. 609-620.

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

SAS Institute. SAS® User's Guide: statistics. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1992.

SASS, D. C. et al. Methods for chemical preparation of aflatoxin B₁ adducts, AFB₁-N7-guanine and AFB₁-lysine. **Toxin Reviews**, Philadelphia, v. 32, p. 68-74, 2013.

SASS, D. C. et al. Synthesis and purification of AFB₁-lysine adduct. **Toxin Reviews**, Philadelphia, v. 34, p. 53-59, 2015.

SCHELL, T. C. et al. 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**, Cary, v. 71, n. 5, p. 1209-18, 1993.

SCHOLL, P. F.; GROOPMAN, J. D. Synthesis of 5,5,6,6-D₄-l-lysine-aflatoxin B₁ for use as a mass spectrometric internal standard. **Journal Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 47, p. 807-815, 2004.

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, 1990. p.1184-213.

SCUSSEL, V. M. et al. Study of aflatoxin exposure in a Brazilian population using an aflatoxin - albumin biomarker. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 11, 2006, Bethesda. **Proceedings...** Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 197-202.

SHEPARD, G. S. Analytical methodology for mycotoxins: recent advances and future challenges. In: KOE, W. J. et al. **Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium**. Wageningen: Ponsen & Looyen, 2000. p. 19-47.

SHOTWELL, O. L. et al. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 15, n. 3, p. 425-428, 1966.

SIMAS, M. M. S. et al. Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 18, n. 5, p. 404-408, 2007.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6th ed. Ames, IA: University Press, 1967.

- SOUZA, M. L. M. et al. Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **The Scientific World Journal**, New York, art. 427369, 2013.
- TEDESCO, E. N. C. et al. Efficacy of silymarin-phospholipidic complex in reducing the toxicity of aflatoxin B₁ in broilers chicks. **Poultry Science**, Cary, v. 83, p. 1839-1843, 2004.
- TESSARI, E. N. C. et al. Effects of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ on blood biochemical parameters in broilers. **Toxins**, Basel, v. 2, p. 453-460, 2010.
- TURNER, P. C. Pilot survey of aflatoxin-albumin adducts in sera from Egypt. **Food Additives & Contaminants. Part A**, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, Abingdon, v. 25, n. 5, p. 583-7, 2008.
- WALUM, E. Acute oral toxicity. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, N.C., v. 106, suppl. 2, p. 497-503, 1998.
- WANG, P. et al. 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**, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, Abingdon, v. 25, n. 5, p. 622–34, 2008.
- WILD, C. P. et al. Dietary intake of aflatoxins and the level of albumin-bound aflatoxin in peripheral blood in The Gambia, West Africa. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 1: p. 229-34, 1992.
- WILSON, R. et al. Uptake and vascular transport of ingested aflatoxin. **Toxicol Letters**, Shannon, v. 29, n. 2-3, p. 169-76, 1985.
- WOGAN, G. N.; EDWARD, G. S.; SHANK, R. C. Excretion and tissue distribution of radioactivity from aflatoxina B₁-C¹⁴ in rats. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 27, p. 1729-36, 1967.
- WONG, Z. A.; HSIEH, D. P. H. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B₁ in the monkey, rat and mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Maryland Heights, v. 55, p. 115-25, 1980.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva: World Health Organization, 2002. (Technical Report Series, 906).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva: WHO, 1993. (Environmental Health Criteria Series, 155).
- WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, Philadelphia, v. 41, n. 1, p. 1-7, 2009.