



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO DE GODOI SILVA

**AFLATOXINA B₁ NA AVICULTURA DE POSTURA – OVO,
RAÇÃO E MILHO – NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ,
BRASIL**

Londrina
2019

FERNANDO DE GODOI SILVA

**AFLATOXINA B₁ NA AVICULTURA DE POSTURA – OVO,
RAÇÃO E MILHO – NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ,
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Ciência e Tecnologia em Alimentos, da
Universidade Estadual de Londrina como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, Fernando de Godoi.

Aflatoxina B1 na avicultura de postura - ovo, ração e milho - na região norte do Paraná, Brasil / Fernando de Godoi Silva. - Londrina, 2019.
71 f.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Aflatoxinas - Tese. 2. Imunoensaio - Tese. 3. Aves de postura - Tese. 4. Alimentação animal - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

FERNANDO DE GODOI SILVA

**AFLATOXINA B₁ NA AVICULTURA DE POSTURA – OVO, RAÇÃO E
MILHO – NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior
Universidade Federal do Tocantins – UFT

Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 21 de fevereiro de 2019

*Aos meus pais, Aparecida e Paulo, que
nunca mediram esforços para me fazer
feliz, com amor e incentivo.
À minha irmã, Larissa, pelo
companheirismo e cumplicidade em
todos os momentos.
À minha família eu dedico todas as
minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka, por todo o conhecimento que me foi transmitido, além da paciência, conselhos e apoio durante estes últimos anos;

À Universidade Estadual de Londrina, instituição que me acolheu com carinho e me permitiu evoluir como profissional;

À coordenação e todos os funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos, por todo auxílio e de dedicação;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, por dividir sua sabedoria e estarem sempre à disposição dos alunos;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento- CNPq, pela concessão da bolsa;

Aos Dr. Hirotoshi Tamura, Dr^a. Lina Yonekura, Dr. Osamu Kawamura e demais professores da *Kagawa University*, por me aceitarem como participante do *SS Program 2018*, experiência única que me permitiu progredir na área de segurança de alimentos e conhecer outros países e culturas;

À minha família, Aparecida de Godoi Silva, Larissa de Godoi Silva e Paulo Roberto da Silva, por todo o incentivo e amor, sem os quais nenhuma realização seria possível;

Aos colegas de laboratório, André Ribeiro da Silva, Cleverson Ferreira Shimizu, Daiane Dias Lopes, Gervásio Hitoshi Saito, Livia Montanheiro Médici Zanin, Renata Pinheiro Sobottka, e Thaís Marques Amorim, por dividirem suas experiências, por todos os conselhos, auxílio e companheirismo;

Aos meus amigos, Aline Marangon de Oliveira, Bruna Fritegotto Soares, Bruno Ambrozini, Daysa Marcatto de Souza, Francine Fernandes da Silva, Jair Pereira Júnior, José Carlos Ribeiro Júnior, e Juliane Correa Amadeu, pela amizade, por estarem sempre presentes, dispostos a ajudar e por compartilharmos de boas lembranças;

Aos amigos do mestrado, Bárbara Geremia Vicenzi, Caroline Cagnin, Daniele Cristina Savoldi, Fábio Martins Campos, Italo Marcos Tamazzo de Oliveira, e Jéssika Menck Curti, pelo companheirismo, por compartilhar conhecimentos e momentos de descontração;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SILVA, FERNANDO DE GODOI. **Aflatoxina B₁ na avicultura de postura – ovo, ração e milho – no Norte do Paraná, Brasil.** 2019. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A avicultura de postura no país segue a tendência de fortalecimento do agronegócio, com aumento da produtividade, do consumo interno, e expansão das exportações. Para alcançar maior destaque no mercado internacional é necessário romper barreiras sanitárias e garantir a qualidade e segurança do produto. A avaliação de resíduos e contaminantes deve ser parte dos programas de biossegurança aplicados à avicultura. Alguns contaminantes, como as aflatoxinas, chegam às aves de postura através da alimentação, principalmente, milho contaminado. Estes compostos são produzidos por *Aspergillus* spp. no campo ou durante o armazenamento dos grãos. A aflatoxina B₁ é o análogo mais tóxico deste grupo, afetando a saúde e reduzindo a produtividade animal. Além do risco às aves, a transmissão de AFB₁ aos ovos alerta para o consumo humano desta toxina e seus efeitos crônicos, como mutagênese e carcinogênese. A detecção de AFB₁ pode ser realizada por métodos imunoenzimáticos, que são práticos, pouco laboriosos e de menor custo que os métodos convencionais. A fim de definir o grau de contaminação por AFB₁ na avicultura de postura, este trabalho padronizou e realizou a validação intralaboratorial de um método de ELISA competitivo indireto, e o aplicou para análise de amostras de milho (n=39), ração (n=40) e ovos (n=400) produzidos por duas granjas do Norte do Paraná. Os parâmetros avaliados demonstraram que o método é válido para a detecção e quantificação de AFB₁. Medidas de linearidade ($R^2 > 0,99$), precisão (C.V. < 5%) e exatidão (recuperação entre 72,7% e 104,9%) foram adequados aos regulamentos para validação de métodos químicos. Limites de detecção e quantificação foram estabelecidos em 0,017ng.g⁻¹ e 0,027ng.g⁻¹, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as granjas avaliadas, porém a análise das medianas sugere que a alimentação utilizada não possui o mesmo nível de contaminação. Do total de amostras de milho, 56,4% foram positivas para AFB₁ com contaminação média de 1,51±0,94ng.g⁻¹ e variação entre 0,11ng.g⁻¹ e 3,91ng.g⁻¹. Em ração, 87,5% foram positivas com média de 1,22±0,97ng.g⁻¹, variando de 0,04ng.g⁻¹ a 3,58ng.g⁻¹. Das amostras de ovo, 48,3% foram positivas com média de 1,00±0,77ng.g⁻¹ e variação entre 0,03ng.g⁻¹ e 3,85ng.g⁻¹. Nenhuma das amostras de milho, ração ou ovo superou os limites estabelecidos para aflatoxinas. Os resultados deste trabalho demonstram que há elevada prevalência de AFB₁ na avicultura de postura, no entanto as concentrações encontradas são baixas. A análise deste contaminante deve ser frequente a fim de garantir a qualidade da alimentação animal e a segurança do produto final.

Palavras-chave: Imunoensaio. Alimentação animal. Poedeiras. Micotoxinas.

SILVA, FERNANDO DE GODOI. **Aflatoxin B₁ in layer poultry farming – egg, animal feed and maize – in Northern region of Paraná, Brazil.** 2019. 71 p. Dissertation (Masters in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Brazilian's egg production follows the trend of strengthening agribusiness, increasing productivity and domestic consumption, and aiming to expand exports. To achieve prominence in the international market it is necessary to guarantee the quality and safety of the product. The assessment of residues and contaminants should be part of the biosafety programs applied to poultry farming. Environmental contaminants, such as aflatoxins, reach poultry through feed, especially contaminated maize. These compounds are produced by *Aspergillus* spp. in the field or during grain storage. Aflatoxin B₁ is the most toxic analog of this group, affecting health, reducing animal productivity, and as its transmitted to eggs, it alerts the human consumption of this toxin and its chronic effects, such as mutagenesis and carcinogenesis. Detection of these compounds can be accomplished by ELISA which is practical, less laborious and of lower cost than conventional methods. In order to define the degree of contamination by AFB₁ in poultry, this work standardized and performed the intra-laboratory validation of an indirect competitive ELISA method, and then it was applied to maize (n=39), animal feed (n=40) and eggs (n=400) produced by two farms in Northern region of Paraná. The evaluated parameters demonstrated that the method is valid for the detection and quantification of AFB₁. Measurements of linearity ($R^2 > 0.99$), precision (C.V. <5%) and accuracy (recovery between 72.7% and 104.9%) were adequate to the regulations for validation of chemical methods. Limits of detection and quantification were set at 0.017ng.g⁻¹ and 0.027ng.g⁻¹, respectively. There was no statistical difference between the farms evaluated, but the analysis of the medians suggests that the feed used does not have the same level of contamination. Of the total corn samples, 56.4% were positive for AFB₁ with mean contamination of 1.51 ± 0.94 ng.g⁻¹ and variation between 0.11ng.g⁻¹ and 3.91ng.g⁻¹. In ration, 87.5% were positive with a mean of 1.22 ± 0.97 ng.g⁻¹, ranging from 0.04ng.g⁻¹ to 3.58ng.g⁻¹. Of the egg samples, 48.3% were positive with mean of 1.00 ± 0.77 ng.g⁻¹ and variation between 0.03ng.g⁻¹ and 3.85ng.g⁻¹. None of the maize, feed or egg samples exceeded aflatoxin limits. The results of this work show that there is a high prevalence of AFB₁ in poultry laying, however the concentrations found are low. The analysis of this contaminant should be frequent in order to guarantee the quality of animal feed and the safety of the final product.

Keywords: Immunoassay. Animal feed. Laying hens. Mycotoxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e seus metabólitos M1 e M2.....	21
Figura 2.	Metabolismo hepático da AFB1 e o sistema de detoxificação de glutathiona-S-transferase, disfuncional em aves.....	22
Figura 3.	Esquema ilustrativo do método de ELISA competitivo indireto	28
Figura 4.	Galpões com sistema manual e automático de coleta de ovos	31
Figura 5.	Silos de armazenamento de grãos e o sistema de distribuição de ração nos galpões de aves (granja B)	32
Figura 6.	Fluxograma das atividades desempenhadas em laboratório para padronização e validação do método de ic-ELISA, e análise das amostras	35
Figura 7.	Procedimentos de ic-ELISA padronizados para detecção de AFB1	37

CAPÍTULO

Figura 1.	Curvas padrão matrizadas de ic-ELISA em milho, ração e ovo com AFB1.....	55
Figura 2.	Distribuição da frequência de AFB1 em milho, ração e ovo coletados na região Norte do Paraná, Brasil.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Regulamentação de limite máximo para aflatoxinas em milho utilizado como ingrediente na alimentação animal	25
Tabela 2.	Formulação das rações produzidas nas granjas A e B para aves em postura	33
Tabela 3.	Temperatura e umidade relativa do ar médias para a semana anterior às datas de coleta de amostra (Londrina-PR).....	34
Tabela 4.	Resultados das análises de AFB1 em amostras de ovo - granja A (1ª Parte).....	67
Tabela 5.	Resultados das análises de AFB1 em amostras de ovo - granja A (2ª Parte).....	68
Tabela 6.	Resultados das análises de AFB1 em amostras de ovo - granja B (1ª Parte).....	69
Tabela 7.	Resultados das análises de AFB1 em amostras de ovo - granja B (2ª Parte).....	70
Tabela 8.	Resultados das análises de AFB1 em amostras de Milho e ração Granja A.....	71
Tabela 9.	Resultados das análises de AFB1 em amostras de Milho e ração Granja B.....	71

CAPÍTULO

Tabela 1.	Validação de ic-ELISA: avaliação de precisão intra e intercorridas em milho, ração e ovo matrizadas com AFB1	56
Tabela 2.	Validação de ic-ELISA: recuperação de AFB1 em milho, ração e ovo	57
Tabela 3.	Ocorrência de AFB1 em amostras de milho, ração e ovo coletadas na Região Norte do Paraná, Brasil.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AcM	Anticorpo Monoclonal
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₁ -BSA	Aflatoxina B ₁ conjugada à albumina de soro bovino
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina de Soro Bovino
C.V.	Coeficiente de Variação
CCA	Cetro de Ciências Agrárias
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DCTA	Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GST	Glutathione-S-transferase
HPLC	<i>High performance Liquid Chromatography</i>
HPLC/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IAPAR	Instituto Agrônômico do Paraná
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ic-ELISA	<i>Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunoassay</i>
IgG	Imunoglobulina G
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LIM	Laboratório de Produção de Imunorreagentes e Técnicas Moleculares
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
OTA	Ocratoxina A
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PBST	Tampão Fosfato de Sódio – Tween
TMB	3',3',5',5 Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1.	Avicultura de postura no Brasil.....	17
2.2.	Micotoxinas na avicultura.....	18
2.3.	Aflatoxinas.....	20
2.4.	Aflatoxinas em ovo.....	24
2.5.	Limites estabelecidos para aflatoxinas em alimentos.....	25
2.6.	Métodos de detecção de micotoxinas.....	27
3.	OBJETIVOS.....	30
3.1.	Objetivo geral.....	30
3.2.	Objetivos específicos.....	30
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1.	Granjas.....	31
4.2.	Amostragem.....	33
4.3.	Fluxograma geral de atividades.....	34
4.4.	Padronização de método de ELISA indireto.....	35
4.5.	Extração de AFB ₁	36
4.6.	Padronização de método de ELISA competitivo indireto.....	37
4.7.	Validação intralaboratorial do ic-ELISA.....	38
4.7.1.	Linearidade.....	39
4.7.2.	Precisão.....	39
4.7.3.	Exatidão.....	39
4.7.4.	Limite de detecção.....	40
4.7.5.	Limite de quantificação.....	40
4.8.	Análise estatística.....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41

CAPÍTULO

1.	INTRODUÇÃO.....	45
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1.	Amostragem.....	46
2.2.	ic-ELISA para detecção e quantificação de AFB ₁	47
2.2.1.	AcM anti-AFB ₁	47
2.2.2.	Extração de AFB ₁ das amostras.....	47
2.2.3.	Método padronizado de ic-ELISA.....	48
2.3.	Validação intralaboratorial do ic-ELISA.....	49
2.4.	Análise estatística.....	50
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1.	Validação intralaboratorial para detecção e quantificação de AFB ₁	50
3.2.	AFB ₁ em milho, ração e ovo.....	51
4.	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO.....	67

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca dentre os grandes produtores e principais exportadores de proteína de origem animal. A produção de ovos, quinta fonte de proteína animal mais consumida mundialmente, é expressiva no país, superando a marca de 39,9 bilhões de ovos no ano de 2017, segundo o Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018). Apesar dos elevados números, 99,74% da produção brasileira de ovos comerciais é destinada para o abastecimento do mercado interno, e apenas 0,26% é exportada, principalmente para os Emirados Árabes Unidos e Japão.

Com o aumento populacional e, conseqüentemente, a maior demanda por alimentos, a avicultura de postura tem tendência a se desenvolver e conseguir maior espaço no mercado internacional. Os ovos servem como fonte proteica de custo reduzido de produção e rápido retorno financeiro quando comparado às outras fontes de origem animal. Tais fatores são vantajosos à produção e podem impulsionar a atividade (AMARAL, 2016).

Nos últimos anos, o Brasil sofreu uma série de sanções econômicas, especialmente por questões sanitárias, que afetaram as exportações de carne, principalmente a bovina. Os fatos ocorridos demonstram o rigor que os países importadores impõem sobre a qualidade e sobretudo, à segurança do produto adquirido por eles. Seguindo por este caminho, podemos inferir que para aumentar as exportações de ovos, o país necessita não somente aumentar a produção, mas garantir a qualidade e assegurar que este é inócuo ao consumidor, estando em conformidade aos padrões higiênico-sanitários internacionais.

Na produção animal, um problema que tem recebido atenção nos últimos anos é decorrente da presença de micotoxinas na cadeia produtiva. Estas toxinas são produtos do metabolismo secundário de alguns bolores e chegam às aves pela alimentação, principalmente através do milho, constituinte majoritário das rações para aves. Os fungos toxigênicos podem se multiplicar e produzir micotoxinas no milho antes ou após a colheita, durante o armazenamento e até mesmo após o processamento do grão. Condições de temperatura e umidade elevadas favorecem a contaminação por fungos e a produção de toxinas. Algumas destas micotoxinas são termoestáveis e continuam presentes no alimento mesmo após a eliminação do fungo por processamento térmico (BURAGAS et al., 2005).

Várias micotoxinas já foram descritas afetando aves, porém as principais são as aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, desoxinivalenol e tricotecenos (GRECO et al., 2014). A toxicidade depende do tipo e concentração de toxina absorvida, dos metabólitos formados, período de exposição e da sensibilidade do animal (FILAZI et al., 2017).

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* spp. e são as micotoxinas mais estudadas pelo potencial mutagênico e carcinogênico de algumas destas, em especial a aflatoxina B₁ – AFB₁ (BURAGAS et al., 2005). Estas toxinas geralmente estão presentes em baixas concentrações nas rações e o consumo prolongado pelas aves produz sinais inespecíficos, como perda de peso, redução na produção de ovos e indícios de afecção hepática (BOCHIO et al., 2017; IAMANAKA et al., 2010).

Iamanaka et al. (2010) descrevem que a presença de micotoxinas na avicultura de postura é prejudicial pela redução da produtividade, comprometimento da saúde do animal, e também pela transmissão destes compostos aos ovos. Os programas de biossegurança aplicados à avicultura devem garantir a segurança do produto para o consumidor e certificar a ausência de patógenos. Também devem atestar que contaminantes, como as micotoxinas, estejam ausentes, ou presentes nas menores concentrações possíveis, abaixo dos limites máximos toleráveis de segurança. Conhecer a contaminação por micotoxinas de produtos utilizados na avicultura (milho e rações), e de ovos é essencial para a elaboração de planos de prevenção e controle da contaminação por estes compostos, além de certificar que os ovos são seguros ao consumo humano.

Regulamentações com limites máximos toleráveis para micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano foram estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2011). A lei abrange alimentos de maior risco para micotoxinas, que são produzidos e comercializados no país. Porém, não há a definição de limites toleráveis para micotoxinas em ovos. Para a alimentação animal, o Ministério da Agricultura determinou em 1988, na portaria nº 7 de 9 de novembro, os limites máximos de aflatoxinas nos ingredientes de rações, que vigoram até o momento (BRASIL, 1988).

A detecção de micotoxinas em alimentos é realizada por métodos variados devido às grandes diferenças composicionais, no entanto, para a maioria dos compostos é conduzida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à

Espectrometria de Massa. As baixas concentrações em que estes contaminantes estão presentes nos alimentos exigem que o método aplicado para detecção seja bastante sensível (IAMANAKA et al., 2010). Como alternativa à HPLC, que é uma análise cara e laboriosa, pode-se utilizar métodos imunoenzimáticos, como o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), técnica quantitativa, sensível, mais rápida e menos onerosa, adequada a detecção de micotoxinas em alimentos (ZHENG et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi padronizar um método de ic-ELISA para detecção e quantificação de Aflatoxina B₁ e utilizá-lo na avaliação da contaminação da alimentação animal e de ovos produzidos em duas granjas de postura da região Norte do Paraná.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Avicultura de postura no Brasil

O Brasil ocupa o quinto lugar no ranking de países com maior produção de ovos por ano, superando a marca de 39 bilhões de ovos em 2017 (ABPA, 2018). Os números são expressivos, no entanto, quase que em sua totalidade esta produção é destinada para o consumo interno. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o brasileiro consumiu em 2017, em média 190 ovos por pessoa, valor que engloba praticamente toda a produção do país. Desse modo, apenas 0,26% dos ovos foram destinados ao mercado externo, principalmente para os Emirados Árabes Unidos e Japão.

A avicultura, em especial a atividade de corte, se desenvolveu muito no país nas últimas décadas, o que resultou num cenário de destaque no mercado mundial de carne de frango. Já a produção de ovos, ainda que seja elevada, tem participação muito discreta no mercado externo, porém, há a possibilidade de expansão e as perspectivas são boas para o futuro. O aumento da demanda por alimentos e condições favoráveis para a atividade, como a facilidade no cultivo de cereais, devem incentivar a produção, visando maior lucro e representatividade no mercado internacional (KRABBE et al., 2013).

De acordo com Amaral (2016) o consumo per capita de ovos no país ainda é baixo quando comparado a países próximos e de renda parecida. O aumento na demanda interna e a possibilidade de elevar a participação brasileira no mercado externo, devem impulsionar a produção. No entanto, não basta aumentar a oferta. Promover a saúde animal e garantir a qualidade e segurança no produto final são essenciais para o desenvolvimento da atividade.

O sucesso da avicultura de postura é dependente de uma série de ações bem planejadas e executadas que devem resultar na maior produção de ovos, com qualidade e segurança, prezando ainda pelo bem-estar dos animais. Desde a escolha da linhagem dos animais com aptidão para a postura, preparo das instalações e equipamentos, medidas sanitárias como vacinação e controle de doenças, manejo e a alimentação devem ser pensados de forma a permitir o máximo desempenho do animal. Atualmente, a desconfiança quanto às condições sanitárias e de níveis de resíduos nos ovos dificultam a comercialização do produto brasileiro nos mercados

mais exigentes como os EUA e a União Europeia (AMARAL, 2016). Garantir a biossegurança e adequar-se às condições internacionais de produção são os requisitos básicos para aumentar as exportações de ovos.

2.2. Micotoxinas na avicultura

O desempenho produtivo das aves é determinado, em grande parte, pela qualidade de alimentação oferecida aos animais. As rações para aves de postura, apesar das diferenças entre as idades, possuem em comum a elevada concentração de milho, geralmente em torno de 60% da composição final do alimento (REAL et al., 2013).

Os custos com a alimentação são elevados e é comum no Brasil, como forma de reduzir as despesas com rações, que o produtor de ovos cultive também milho para a produção da ração (AMARAL, 2016). Atualmente, a importância deste grão para a alimentação animal é grande ao ponto que a maior parte do milho produzido no país é destinado para a produção de rações para animais, principalmente para aves e suínos (SOUZA et al., 2013).

O milho é uma excelente fonte de carboidratos sob a forma de amido, fornecendo energia necessária para manutenção corpórea das aves e para a produção de ovos. Do mesmo modo, este grão pode servir de substrato para a multiplicação de fungos, principalmente em condições de elevada temperatura e umidade. Fatores predisponentes como a presença de lesões nos grãos, ou o seu acondicionamento inadequado favorecem a multiplicação dos fungos, sendo que alguns podem produzir compostos metabólicos secundários, as micotoxinas (REAL et al., 2013).

O crescimento de fungos nos grãos de milho pode ocorrer no campo, após a colheita e até mesmo depois do processamento. Práticas agrícolas inadequadas, ataque de insetos e procedimentos que lesionem os grãos durante a colheita são exemplos de problemas que podem predispor à multiplicação de fungos toxigênicos no milho antes mesmo do processamento. Para o armazenamento é indicado que a secagem do grão tenha sido realizada corretamente. A temperatura do local de estocagem deve ser controlada e de preferência estar abaixo de 18°C para evitar a multiplicação de fungos (MALLMAN et al., 2007).

Fusarium, *Aspergillus* e *Penicilium* spp. são os principais gêneros de fungos toxigênicos que afetam o cultivo de milho, resultando na contaminação dos grãos por uma variedade de toxinas. As micotoxinas encontradas com maior frequência na alimentação de aves de postura são as fumonisinas e aflatoxinas, produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*, respectivamente. (RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002; SOUZA et al., 2013).

Os efeitos das micotoxinas na avicultura, em geral, ocorrem após longos períodos com consumo de baixas concentrações e resultam em sinais pouco específicos. Menor ganho de peso, redução na conversão alimentar e o baixo desempenho produtivo são os principais efeitos do consumo de micotoxinas. Os sinais agudos da intoxicação são decorrentes do consumo de altas concentrações das micotoxinas afetando órgãos vitais como fígado, rins e o sistema imune, podendo inclusive, ser letal (GRECO et al., 2014).

Ocratoxinas também afetam a avicultura de postura, sendo a Ocratoxina A (OTA) a mais frequente e tóxica. São produzidas por espécies de *Aspergillus* e *Penicilium* spp. e tem efeito hepatotóxico, nefrotóxico, neurotóxico, teratogênico e imunotóxico. Os rins são os órgãos mais afetados e os principais sinais da intoxicação por OTA são fraqueza, anemia, redução na produtividade, deficiência de empenamento e alta mortalidade (FILAZI et al., 2017).

As fumonisinas são um grupo de toxinas produzidas por espécies de *Fusarium* spp. A fumonisina B₁ é a mais comum encontrada na natureza. A estrutura destes compostos assemelha-se aos esfingolipídios presentes nas membranas celulares. Tal semelhança pode gerar alterações na estrutura e função celular, podendo levar a célula a apoptose. As aves são particularmente resistentes a esta toxina, mas a produtividade pode ser reduzida com a intoxicação. O consumo de em altas concentrações pode também resultar em hiperplasia de alguns órgãos e hepatite (MARTINS et al., 2006).

O grupo das aflatoxinas representa as principais e mais estudadas micotoxinas que afetam a avicultura. São produzidas por espécies de *Aspergillus* spp. e têm elevada toxicidade, com efeito mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Nas aves, estão relacionadas à redução de enzimas digestivas, o que resulta em baixa produtividade. Diminuição na produção e tamanho dos ovos são observados em aves que consumiram aflatoxinas por longos períodos (SILOTO et al., 2011).

Para o controle de micotoxinas em alimentos podem ser utilizados métodos preventivos, que evitam a contaminação inicial, ou métodos corretivos, que reduzem os efeitos da contaminação. Em alimentos destinados aos animais podem ser utilizados métodos químicos, biológicos e físicos para reduzir a intoxicação por micotoxinas. Métodos químicos alteram a estrutura da toxina, mas podem afetar negativamente a palatabilidade e valor nutritivo do alimento. Métodos biológicos utilizam microrganismos ou enzimas para metabolizar o composto ou biotransformá-lo em uma substância menos tóxica. Já os métodos físicos pretendem retirar os grãos mais contaminados da elaboração da ração, ou, utilizar substâncias inertes que se adsorvem às micotoxinas e reduzem a absorção intestinal das mesmas. Em rações para aves são utilizados “sequestrantes” de micotoxinas, geralmente compostos por aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado, carvão ativado ou argila (FILAZI et al., 2017).

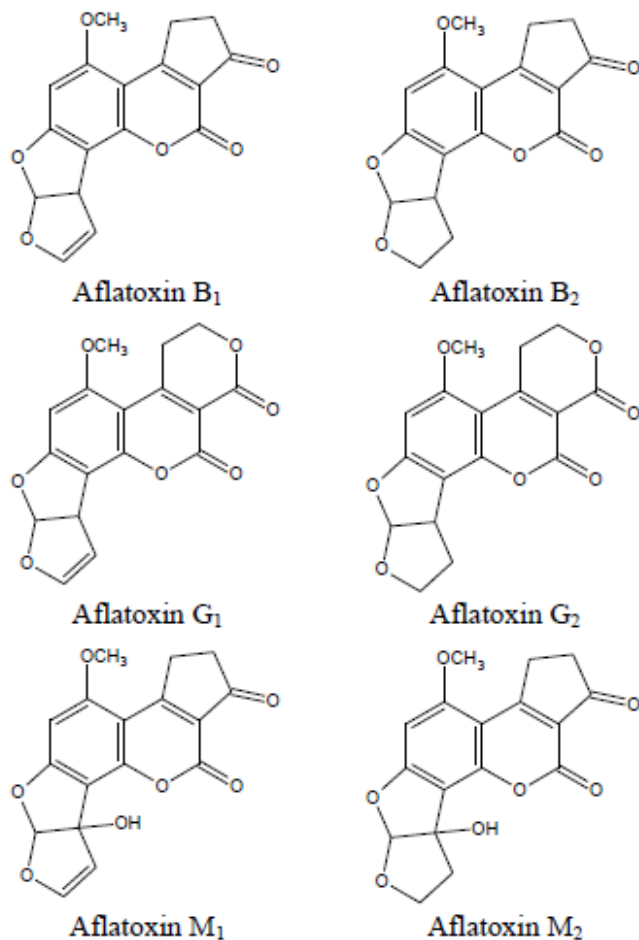
No entanto, mesmo com estas alternativas para reduzir os impactos da contaminação, o efetivo controle de micotoxinas só é realizado com a prevenção do crescimento de fungos. Deve-se garantir a qualidade dos insumos destinados à alimentação animal, com seleção da matéria-prima e monitoramento da temperatura e umidade de galpões (FILAZI et al., 2017). A presença de micotoxinas na avicultura é prejudicial para a saúde do animal, afetando negativamente a produção de carne e ovos, gera barreiras para o mercado internacional, além de expor ao risco a saúde humana pelo consumo de alimentos contaminados.

2.3. Aflatoxinas

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por fungos das espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que frequentemente afetam culturas como o milho, amendoim e trigo, e conseqüentemente podem estar presentes na alimentação de aves (MOSS, 1998; BURAGAS et al., 2005). São compostos heterocíclicos derivados das furanocumarinas classificadas principalmente como B₁, B₂, G₁, G₂, e seus metabólitos M₁ e M₂ (Figura 1). A aflatoxina B₁ é a forma mais encontrada em rações e também a que apresenta maior toxicidade, sendo classificada como um composto carcinogênico do grupo 1 de acordo com IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 1993; AMIRKHIZI et al., 2015).

As pesquisas sobre a toxicidade das aflatoxinas vêm sendo desenvolvida desde os anos 60, quando alimentos à base de amendoim contaminados por aflatoxinas resultaram na mortalidade de perus pela enfermidade denominada na época de “Doença X”. Posteriormente, descobriu-se que a causa da intoxicação eram as aflatoxinas e atualmente sabe-se que as aves, e especialmente os perus, são espécies de elevada sensibilidade a estes compostos (FILAZI et al., 2017).

Figura 1- Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e seus metabólitos M₁ e M₂ (YUNUS et al., 2011).



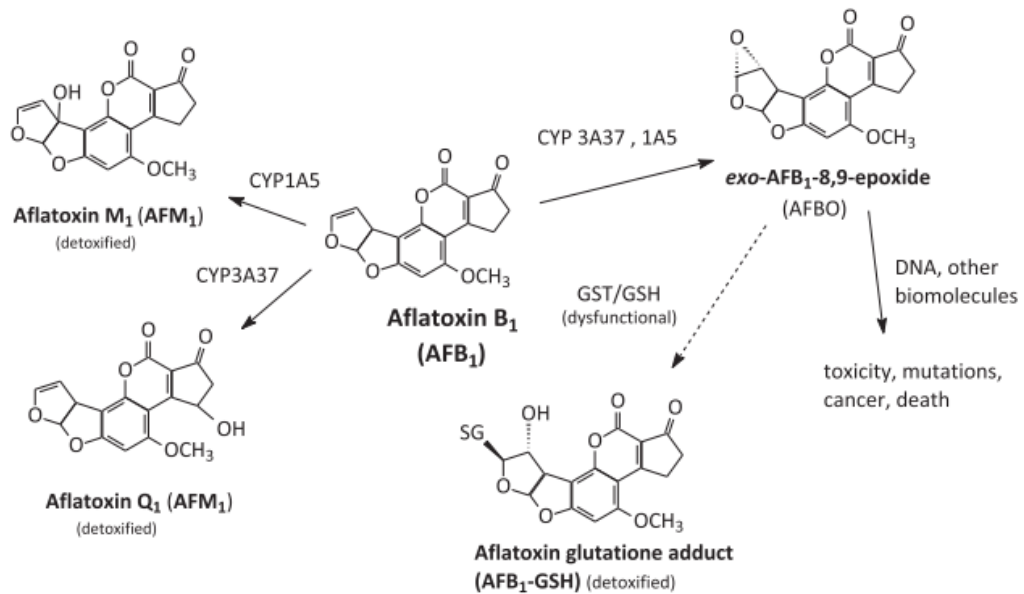
Aflatoxinas M₁ e M₂ são metabólitos de B₁ e B₂ e são encontradas em níveis residuais no leite, já havendo sido descritas também nos ovos. Estes metabólitos são produzidos a partir da hidroxilação de AFB₁. Estima-se que a taxa de conversão de AFB₁ em AFM₁ ocorra entre 1-3% no leite (HERZALLAH, 2009). Em aves, a taxa de conversão é menor, e conseqüentemente a prevalência de AFM₁ nos ovos é menos significativa (RAWAL; KIM; COULOMBE JR., 2010).

A biotransformação hepática da AFB₁ parece ser a principal via responsável pelos efeitos mutagênicos e carcinogênicos desta micotoxina. As enzimas do citocromo P450 acabam por gerar 8-9,epóxidos da AFB₁ que têm a habilidade se ligar ao DNA, RNA e proteínas, afetando a multiplicação celular e podendo desenvolver neoplasias, principalmente no fígado (AMIRKHIZI et al., 2015).

A conjugação dos epóxidos de AFB₁ ao DNA e RNA inibem os processos de transcrição e tradução, e induzem mutações no DNA que podem resultar em apoptose ou carcinogênese. Além disso, a ligação de metabólitos de AFB₁ a resíduos de lisina de proteínas é tóxica por interferir na estabilidade e função proteica (MONSON; COULOMBE; REED, 2015).

Nos mamíferos, a detoxificação e excreção destas substâncias é realizada parcialmente pela família das glutitiona-S-transferases (GST). Porém, nas aves, o sistema GST é menos ativo e a deficiência na detoxificação é provavelmente o principal fator responsável pela suscetibilidade destes animais a AFB₁ (RAWAL; KIM; COULOMBE JR., 2010). Na figura 2 pode-se identificar algumas vias do metabolismo hepático da AFB₁ e o processo de detoxificação, disfuncional em aves, o que acentua o acúmulo de AFB₁, agravando a toxicidade desta toxina:

Figura 2 - Metabolismo hepático da AFB₁ e o sistema de detoxificação de glutitiona-S-transferase, disfuncional em aves (RAWAL; KIM; COULOMBE JR., 2010).



Em aves de postura os principais efeitos observados da aflatoxicose são inespecíficos. Siloto et al. (2011) relatam que há redução da atividade de enzimas pancreáticas e da produção de proteínas plasmática, além de lesões renais e hepáticas, que resultam em menor ganho de peso, diminuição na produção e no peso dos ovos. De acordo com Monson, Coulombe e Reed (2015), o potencial metabólico do fígado é afetado pelo consumo de AFB₁ e resulta em diminuição do peso, tamanho, concentração de albumina e porcentagem de gema dos ovos produzidos. Também é descrito que as aves que consomem alimentação contaminada por aflatoxinas tendem a atingir a maturidade sexual mais tardiamente, acentuando o prejuízo decorrente da contaminação (PANDEY; CHAUHAN, 2007).

Além de afetar a saúde das aves, a possibilidade de transmissão das toxinas aos produtos animais representa um risco à saúde pública. Os contaminantes presentes no fígado, carne e ovos expõem os humanos ao consumo da aflatoxina B₁. As concentrações de toxinas no tecido animal e nos ovos é dependente de uma associação de fatores: concentração de AFB₁ na dieta, tempo de consumo, idade e susceptibilidade individual das aves (HUSSAIN et al., 2010). No caso de aves de postura, a exposição ao alimento contaminado pode ser prolongada pelas características próprias da atividade, acentuando a redução na produtividade e aumentando o risco de intoxicação e transmissão aos tecidos e ovos.

Os resíduos de aflatoxinas em ovos são encontrados em concentrações menores do que na carne e fígado dos animais que consumiram as toxinas. Assim sendo, o risco de aflatoxicose aguda humana por consumo de ovos é muito baixo. Os principais prejuízos à saúde humana são crônicos, principalmente pelo potencial da AFB₁ e AFM₁ como substâncias pró-carcinogênicas (MANAFI, 2011). Adicionalmente, aflatoxinas são termoestáveis e não são removidas no processamento industrial. Estas se mantêm ativas e representam risco no consumo dos alimentos contaminados, como leite ou ovos, mesmo após o seu preparo (ROSSI et al., 2012). Aly e Anwer (2009) avaliaram a estabilidade térmica da aflatoxina B₁ em ovos contaminados com 0,06ng.g⁻¹, mantendo-os sob fervura por 20 minutos, o que resultou na redução de apenas 1% da concentração inicial da toxina. Estes dados reforçam a ideia de que os tratamentos térmicos aplicados aos alimentos, e em especial aos ovos, não reduzem significativamente as concentrações da toxina, nem o risco do consumo do alimento contaminado.

2.4. Aflatoxinas em ovo

A possibilidade de micotoxinas contaminantes de alimentos destinados aos animais serem transmitidos aos seus produtos, como os ovos, alertam para o potencial risco à saúde humana, à intoxicação indireta e os efeitos decorrentes da ingestão crônica destas toxinas (LI et al., 2015).

A transferência de micotoxinas para tecidos animais e para os ovos é baixa, sendo muito dependente de particularidades estruturais da micotoxina, da concentração ingerida e da espécie afetada. As aflatoxinas são as micotoxinas que mais frequentemente encontradas nos ovos, pois após o metabolismo hepático, AFB₁ e aflatoxicol (outro metabólito originado a partir de AFB₁) são acumulados nos ovos (HOSSAIN et al., 2011).

A baixa polaridade das moléculas de AFB₁ favorecem a deposição em tecidos com maior concentração de lipídios. A transmissão aos ovos pode ocorrer logo no início da maturação do óvulo e observa-se que com o tempo de postura a concentração da toxina aumenta na gema e reduz na clara (SAWHNEY et al., 1973; NIZAMLÝOLU; OGUZ, 2003).

A taxa de transferência de aflatoxinas da ração para o ovo é muito variável, sendo estimada em trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2000) em aproximadamente 5000:1. Outro estudo, de Pandey e Chauhan (2007) mantiveram por 40 semanas aves sendo alimentadas com rações contaminadas por aflatoxinas em concentrações controladas e obtiveram taxas de transmissão para o ovo entre 2399:1 e 1748:1.

Outros autores, como Aly e Anwer (2009), obtiveram razões de transmissão de aflatoxina menores, entre 500:1 e 1428:1. Neste estudo, as contaminações das rações foram controladas e a transmissão avaliada por um período de 60 dias após a contaminação. Os autores descrevem que a contaminação dos ovos aumentou durante o período experimental, indicando que o consumo prolongado de alimentos contaminados resulta em acúmulo da micotoxinas e maior transmissão aos ovos.

A transmissão de aflatoxinas para os ovos geralmente é baixa, porém a prevalência de amostras de ovos positivas é significativa, sobretudo em países de clima tropical ou subtropical. Em trabalho realizado por Iqbal et al. (2014), os autores relataram que em 22 de 80 amostras de ovos coletadas no Irã havia a presença de AFB₁ acima do limite de detecção de 0,05µg.mg⁻¹, determinado para o método

utilizado. Amirkhizi et al. (2015) avaliaram 150 amostras de ovos e obtiveram 58% de resultados positivos para AFB₁, no entanto, as concentrações detectadas de toxina foram baixas, com média de 0,69ng.g⁻¹, sendo 2,35ng.g⁻¹, a contaminação máxima das amostras analisadas.

A contaminação dos ovos é consequência da presença da aflatoxina na alimentação animal. Amostras com elevada prevalência de aflatoxinas são descritos por vários autores, como: Rossi et al. (2012), com 92% das amostras de ração para poedeiras contaminada por AFB₁, ou Nizamlyolu e Oguz (2003), que detectaram aflatoxinas em 71,1% das amostras analisadas de ração e em 57,7% das amostras de milho.

Conhecer a contaminação do milho e da ração é essencial para assegurar a qualidade da alimentação oferecidos às aves e evitar prejuízos à saúde e produtividade dos animais, além de reduzir o risco de transmissão de resíduos aos ovos. A adoção de medidas de prevenção de micotoxinas no alimento animal é a principal forma de garantir a qualidade e a segurança do produto final.

2.5. Limites estabelecidos para aflatoxinas em alimentos

A Portaria nº 7 de 9 de novembro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento regulamenta a composição de ingredientes utilizados na alimentação animal e estabelece o limite máximo de aflatoxinas (totais) no milho, conforme apresentado na tabela 1:

Tabela 1 - Regulamentação de limite máximo para aflatoxinas em milho utilizado como ingrediente na alimentação animal (BRASIL, 1988).

Micotoxina	Alimento	Limite (ng.g⁻¹)
Aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂)	Milho em grão, desgerminado, farelo de gérmen, farelo de glúten de milho 21, farelo de glúten 50-60 ou gérmen desengordurado	50

Por esta regulamentação compreende-se que as rações preparadas para animais, sendo milho o principal ingrediente, devem ter no máximo 50ng.g^{-1} de AFB_1 . O LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade de Santa Maria-RS, no entanto, indica para aves poedeiras o limite máximo de 10ng.g^{-1} de aflatoxinas nas rações. Por outro lado, o FDA (*Food And Drug Administration Guidelines, 2011*) determina como limite máximo de aflatoxinas em milho destinado às aves adultas de postura a concentração de 100ng.g^{-1} .

A contaminação por aflatoxinas é comum nas culturas de milho, especialmente em regiões de clima tropical ou subtropical. Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2016) foram avaliadas 148 amostras de milho dos estados da região sul do Brasil e foi detectada a presença de aflatoxinas em 26% das amostras, no entanto, em nenhuma delas a contaminação foi superior ao limite legal.

Por outro lado, Machinski Junior et al. (2001) coletaram 110 amostras de cultivares de milho no Estado de São Paulo e obtiveram 54,5% de amostras positivas para a presença de AFB_1 . A média da contaminação encontrada pelos autores foi de 168ng.g^{-1} , com o máximo de $1,6\mu\text{g.g}^{-1}$. Estes valores superam os limites estabelecidos pelo MAPA (1998), sendo impróprios para a produção de alimentos para animais.

Para amostras de rações prontas para aves de postura, as contaminações encontradas também são variadas. Souza et al. (2013) analisaram 36 amostras de ração para aves e não encontraram AFB_1 acima do limite de detecção ($0,8\text{ng.g}^{-1}$) em nenhuma das amostra. Já Greco et al. (2014) detectaram 90% de amostras de ração de aves positivas para AFB_1 , com contaminação média de $2,69\text{ng.g}^{-1}$. Kannan et al. (2014) avaliaram 51 amostras de ração para aves produzidas na Índia, e 98% estavam contaminadas por AFB_1 . Em 5 destas amostras, a contaminação ultrapassava os 50ng.g^{-1} , atingindo até o máximo de $160,7\text{ng.g}^{-1}$, superior inclusive, às recomendações do FDA (2011) para alimentação animal.

A grande variação na concentração de aflatoxinas na ração animal é reflexo dos diferentes níveis de contaminação inicial dos ingredientes (milho), e das condições de transporte e estocagem da matéria-prima e do alimento produzido.

Para ovos não há regulamentação nacional de limites máximos para nenhuma micotoxina, no entanto, alguns países como os Estados Unidos da América possuem uma legislação mais abrangente, definindo os limites máximos da somatória de aflatoxinas como 20ng.g^{-1} para todos os alimentos destinados ao consumo humano, segundo o FDA (2011).

Devido à baixa taxa de transmissão para os ovos e a ausência de regulamentação específica para micotoxinas neste alimento, poucas pesquisas foram conduzidas para detectá-las. Normalmente, quando encontradas em ovos, as aflatoxinas estão presentes em pequenas concentrações, abaixo de qualquer limite estabelecido para alimento humano. Anfossi et al. (2015) utilizaram um método imunoenzimático para detecção de aflatoxinas em ovos comercializados na Itália, porém, em nenhuma das 50 amostras analisada foi detectada a presença da toxina acima dos limites de detecção ($0,03\text{ng.g}^{-1}$). Também, Deeb et al. (2016) pesquisaram aflatoxina B₁ em 50 amostras de ovos, sendo que em apenas duas foram superiores ao limite de detecção do método utilizado (1ng.g^{-1}), resultando na média de $1,4\text{ng.g}^{-1}$, ainda muito abaixo do limite do FDA.

Mais estudos devem ser realizados para melhor definir qual o grau de transferência destas micotoxinas aos ovos e determinar realmente se há o risco deste alimento ao consumo humano, além de, se necessário, estabelecer limites toleráveis para estes contaminantes no ovo.

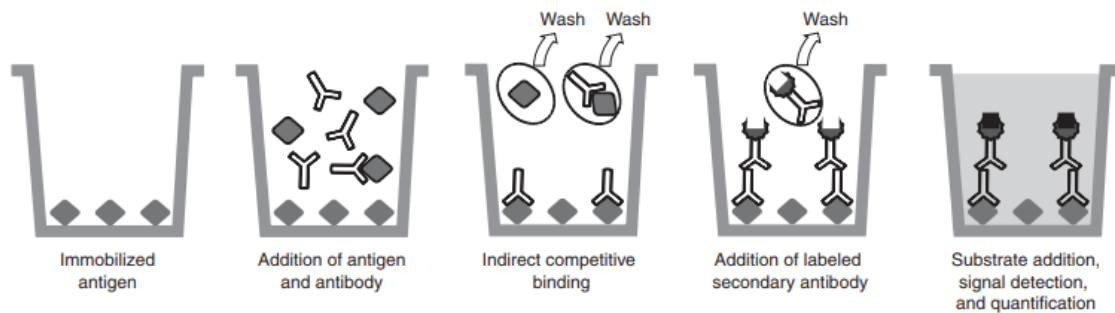
2.6. Métodos de detecção de micotoxinas

Os métodos de detecção e quantificação utilizados para aflatoxinas inicialmente eram realizados por CCD – Cromatografia em Camada Delgada, sendo aperfeiçoados para HPLC acoplados a detectores de acordo com especificidades de cada molécula. Atualmente, pela rapidez e sensibilidade das análises, métodos imunológicos estão sendo empregados, como o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent assay*) (GUO et al., 2016).

As micotoxinas, são compostos normalmente encontrados em baixas concentrações nos alimentos e com valores máximos permitidos para resíduos nas dimensões de ng.g^{-1} . Este fato exige que os métodos de detecção sejam acurados e sensíveis. De acordo com Urusov et al. (2015), a Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas tem sido o método de escolha para identificação destes compostos. A complexidade e custo elevado do método, no entanto, podem restringir sua aplicação como um método confirmatório. O ELISA é um método menos complexo e que permite a avaliação de um número maior de amostras ao mesmo tempo e com instrumentação mais simples.

O ELISA é baseado na detecção da interação antígeno-anticorpo. Dentre as modalidades de ELISA, o método competitivo indireto (ic-ELISA) tem sido bastante utilizado na detecção de aflatoxinas. Na Figura 3, podemos observar o esquema do ic-ELISA e em seguida a descrição dos procedimentos de acordo com Kohl e Ascoli (2017):

Figura 3 – Esquema ilustrativo do método de ELISA competitivo indireto (KOHL e ASCOLI, 2017).



Neste método as microplacas são imobilizadas com o conjugado de proteína-hapteno. Um anticorpo primário, geralmente monoclonal, é adicionado às placas juntamente com a amostra a ser analisada. O anticorpo reconhece o determinante antigênico e se conjuga a ele. A presença do antígeno na amostra faz com que ocorra uma competição pelo anticorpo primário, entre os antígenos em solução e aqueles imobilizados na placa. Os procedimentos de lavagem entre as fases do ic-ELISA, removem os anticorpos que se conjugaram aos antígenos em solução, restando somente aqueles que se conjugaram ao antígeno imobilizado na placa. Um anticorpo secundário é adicionado ao ensaio e age como anti-anticorpo, se ligando ao primeiro. O anticorpo secundário está conjugado a uma enzima que atua como marcador da reação e produz a coloração final do ensaio após a adição do substrato da enzima. A partir da reação colorimétrica é possível estabelecer a concentração do analito pesquisado. O método é indireto por detectar indiretamente ao final da reação a presença do antígeno na amostra. E, por ser competitivo, a coloração final do ensaio é inversamente proporcional à concentração do analito na amostra.

De acordo com Azri et al. (2018), a escolha pelo método de ic-ELISA é justificada pelo pequeno peso molecular das aflatoxinas e a indisponibilidade de vários sítios com caráter antigênico. Nestes ensaios, os antígenos provenientes da amostra

competem com o conjugado imobilizado pelo anticorpo monoclonal e a resposta final em absorvância é inversa à concentração de toxina.

Outros autores como Wang et al. (2011) e Guan et al. (2013) relatam que para a análise de substâncias de baixo peso molecular, como alguns pesticidas, resíduos de medicamentos veterinários e as aflatoxinas, o ic-ELISA é uma excelente opção para reduzir o tempo e custo da análise, mantendo elevada sensibilidade e especificidade, principalmente por utilizar um anticorpo monoclonal.

O uso de um anticorpo monoclonal reduz a possibilidade de ocorrer reações inespecíficas. Porém, nas análises conduzidas em matrizes alimentares, os outros componentes do alimento podem interferir na conjugação antígeno-anticorpo e gerar resultados falso-positivos. Para minimizar a interpretação equivocada dos resultados, é justificável que seja feita a confirmação de resultados acima dos limites legais para micotoxinas por um método mais específico, como o HPLC/MS (SUN et al., 2015).

Por outro lado, em matrizes homogêneas, alguns autores relatam boa correlação entre resultados obtidos para HPLC e ELISA, como os descritos por Zheng et al. (2005), que analisaram milho naturalmente contaminado com aflatoxinas e quantificaram contaminações entre 19ng.g^{-1} e 138ng.g^{-1} por HPLC, e $23,3\pm 1,5\text{ng.g}^{-1}$ e $129,3\pm 11,5\text{ng.g}^{-1}$ por ELISA para as mesmas amostras.

Os métodos imunoenzimáticos são uma alternativa de fácil execução, barata e de elevada sensibilidade quando comparados aos métodos cromatográficos, e podem ser aplicados no monitoramento de micotoxinas na cadeia produtiva de ovos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Padronizar método de ic-ELISA para detecção e quantificação de Aflatoxina B₁ e utilizá-lo na avaliação da contaminação da alimentação animal e de ovos produzidos em duas granjas de postura da região norte do Paraná.

3.2. Objetivos específicos

- Padronizar método de ic-ELISA para detecção e quantificação de AFB₁;
- Realizar a validação intralaboratorial do método de ic-ELISA padronizado;
- Quantificar AFB₁ em 39 amostras de milho e 40 amostras de ração utilizadas na alimentação de aves de postura;
- Quantificar AFB₁ em 400 amostras de ovos produzidos por duas granjas da região de Londrina-PR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Granjas

Duas granjas de aves de postura situada no município de Arapongas-PR participaram deste experimento. O município, localizado no Norte do Paraná, foi escolhido por ser o maior produtor de ovos no estado, comercializando no ano de 2017, mais de 420 milhões de ovos, de acordo com o censo agropecuário do IBGE (2018).

Os estabelecimentos que aceitaram participar deste projeto são de elevada produção e dispõem de sistemas automatizados e manuais de fornecimento de alimento para as aves e coleta de ovos (Figura 4). O sistema de criação adotado nas duas granjas é o convencional em gaiolas durante toda a produção.

Figura 4 - Galpões com sistema manual (à esquerda) e automático (à direita) de coleta de ovos.



Fonte: arquivo pessoal.

Na granja A, as aves em postura são da linhagem H&N, Nick Chick de ovos brancos. Aproximadamente 470.000 aves estão em postura com produtividade média de 82%, ou seja, 376.000 ovos por dia. O milho utilizado nas rações é obtido semanalmente de fornecedores. Após o recebimento, o milho é acondicionado em um galpão de chegada com piso perfurado que leva os grãos diretamente para os silos

anteriores à fábrica de ração. Diariamente as rações são produzidas e distribuídas nos galpões.

Na granja B, as aves são da linhagem Hisex White de ovos brancos, e 249.000 aves adultas estão em postura. A produtividade média é de 82,5%, ou seja, 205.425 ovos por dia. O milho utilizado para a alimentação dos animais é produzido na mesma propriedade das instalações avícolas. Os grãos são estocados em silos e a produção de ração é controlada de acordo com as necessidades da granja. A produção no próprio local do milho assegura a disponibilidade de matéria-prima para a produção da alimentação dos animais. Por outro lado, exige também que o estabelecimento disponha de silos com grande capacidade de armazenamento, como pode ser visto na Figura 5.

Figura 5 – Silos de armazenamento de grãos e o sistema de distribuição de ração nos galpões de aves (granja B).



Fonte: arquivo pessoal.

Na tabela 2 é apresentada a composição das rações utilizadas para aves adultas (acima de 18 semanas) em postura nas duas granjas avaliadas. A granja B utiliza em sua formulação o adsorvente comercial Grasp® para neutralização de toxinas na concentração de 0,1% da ração final. A granja A, não relatou o uso de adsorventes como ingrediente de ração de aves em postura.

Tabela 2 - Formulação das rações produzidas nas granjas A e B para aves em postura.

GRANJA A		GRANJA B	
INGREDIENTE	%	INGREDIENTE	%
MILHO	61,31	MILHO	62,0
FARELO DE SOJA	27,45	FARELO DE SOJA	23,5
CALCÁREO FINO	5,0	CALCÁREO GROSSO	5,5
CALCÁREO GROSSO	4,5	CALCÁREO FINO	4,7
FOSFATO BICÁLCICO 20%	0,95	FARINHA DE CARNE	2,0
PX POSTURA 800 (DSM) ¹	0,4	FOSFATO BICÁLCICO 18%	0,6
SAL REFINADO	0,39	SAL	0,37
-	-	OUTROS ²	1,33
TOTAL	100	TOTAL	100

¹ Mix de suplementos composto por: carbonato de cálcio, sal, minerais, colina, metionina, vitaminas e enzima fitase.

² Mix de suplementos composto por: emulsificantes, vitaminas, minerais, metionina, colina, enzimas e adsorventes.

4.2. Amostragem

Amostras de milho, das rações preparadas e dos ovos produzidos em duas granjas avaliadas foram coletadas semanalmente entre fevereiro e julho de 2018. A cada semana foram coletados de cada granja:

- (I) 1 amostra de milho contendo aproximadamente 1kg.
- (II) 1 amostra de ração contendo aproximadamente 1kg.
- (III) 50 ovos que foram distribuídos aleatoriamente em 10 amostras (5 ovos por amostra).

As amostras de milho foram coletadas do galpão de recepção do milho para a granja A, e do silo anterior à fábrica de ração para a granja B. As amostras de ração foram coletadas imediatamente após a produção na fábrica de ração de cada granja. Já os ovos, foram coletados aleatoriamente, na etapa final da produção, ou seja, já na sala para expedição, evitando assim que ovos que seriam rejeitados para o consumo humano fizessem parte das amostras.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Produção de Imunorreagentes e Técnicas Moleculares (LIM), do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. Amostras de milho e rações foram congeladas a -20°C. As amostras de ovos foram quebradas, homogeneizadas manualmente, armazenadas em frascos plásticos para coleta e congeladas -20°C.

Ao final do período de coletas, a amostragem completa foi composta de: 39 amostras de milho (19 da granja A e 20 da granja B), 40 amostras de ração (20 de cada granja), e 400 amostras de ovos (200 de cada granja), perfazendo o total de 2000 ovos coletados.

A tabela 3 apresenta as datas das coletas de amostras realizadas em 2018 e os dados de temperatura e umidade relativa do ar médias para a semana anterior à data de coleta. Estes dados foram obtidos dos registros diários do Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) para a cidade de Londrina, sendo esta, a estação meteorológica mais próxima de Arapongas (aproximadamente 36km) a fornecer em detalhes os dados meteorológicos.

Tabela 3 - Temperatura e umidade relativa do ar médias para a semana anterior às datas de coletas de amostra (Londrina-PR) - dados do IAPAR para o ano de 2018.

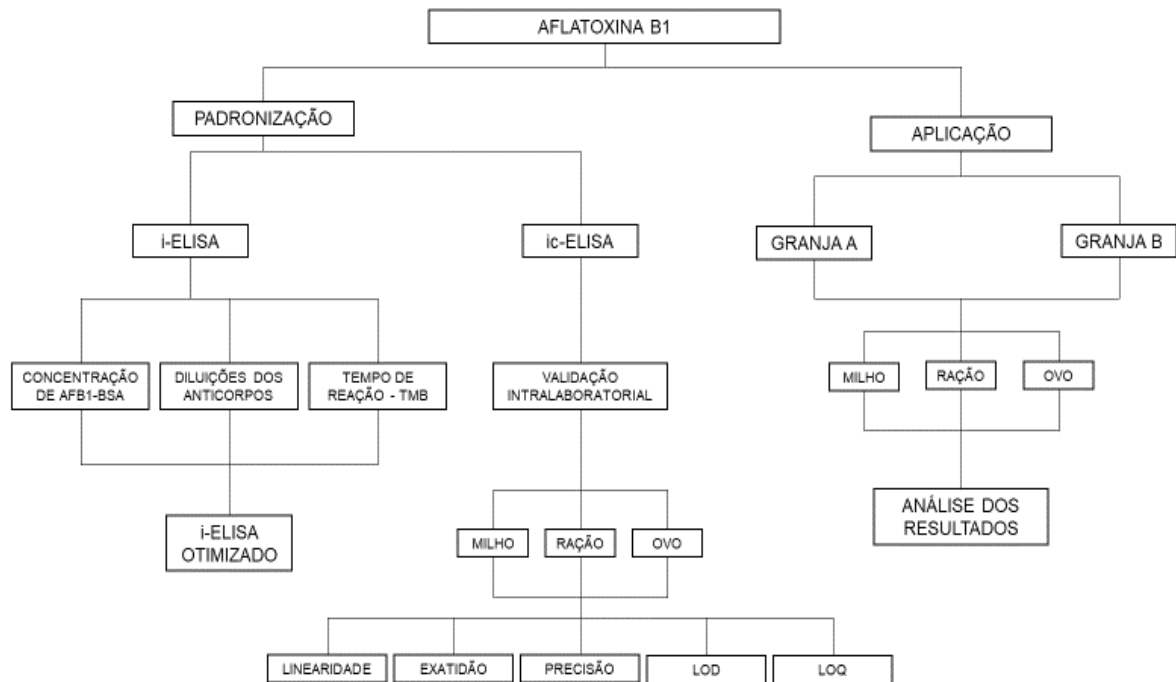
Data	Temperatura (°C)	Umidade relativa (%)	Data	Temperatura (°C)	Umidade relativa (%)
27/fev	23,4	65	08/mai	22,6	63
06/mar	25,2	77	15/mai	20,7	67
13/mar	25,5	73	22/mai	18,1	71
20/mar	25,7	75	05/jun	17,9	74
27/mar	23,3	82	12/jun	17,9	76
03/abr	22,5	84	19/jun	17,9	80
10/abr	23,0	67	26/jun	19,7	68
17/abr	22,7	68	03/jul	20,6	63
24/abr	21,7	65	10/jul	19,8	61
02/mai	23,2	63	17/jul	16,9	52

Fonte: <http://www.iapar.br/pagina-1828.html>.

4.3. Fluxograma geral de atividades

As atividades desempenhadas no Laboratório de Produção de Imunorreagentes e Técnicas Moleculares (LIM/DCTA/CCA/UEL) para a padronização e validação do método, além da detecção e quantificação de AFB₁ nas amostras coletas estão expostos na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma das atividades desempenhadas em laboratório para padronização e validação do método de ic-ELISA e análise das amostras.



Os métodos imunoenzimáticos aplicados neste experimento foram adaptados de Kawamura et al. (1998). O mesmo autor cedeu os hibridomas da linhagem AF4, (células fusionadas de mieloma SP2/0-AG14 com célula esplênica de camundongo BALB/c), capazes de se multiplicar e produzir anticorpos monoclonais reativos à aflatoxina B1 (AcM anti-AFB₁). O anticorpo secretado por estas células apresenta alta afinidade por AFB₁ (100% de reatividade) e baixa reatividade cruzada com outras aflatoxinas, em geral menor que 5%, garantindo assim a especificidade na detecção de AFB₁. O cultivo dos hibridomas e a purificação do anticorpo monoclonal utilizado neste experimento foi realizado por Médici (2016).

4.4. Padronização de método de ELISA indireto.

As condições de análise do método foram padronizadas a fim de obter os resultados de absorbância entre 0,2 e 0,8, faixa de maior linearidade da lei de Lambert-Beer (SKOOG et al., 2006). Nesta fase do experimento os ensaios foram realizados sem a presença de amostra ou do padrão do analito, e por este motivo o método é não competitivo.

A concentração do conjugado de hapteno-proteína (AFB₁-BSA - albumina de soro bovino) utilizado na imobilização das placas foi definido em 250ng/mL de tampão fosfato salino (PBS 0,015M a pH 7,3).

As diluições dos anticorpos foram estabelecidas em: 1:1000 de anticorpo primário (AcM Anti-AFB₁) em tampão fosfato salino (PBS 0,015 M a pH 7,3), e, 1:4000 de anticorpo secundário (Anti-IgG-HRP - *horseradish* peroxidase, ThermoFisher Scientific, EUA) em PBST (PBS 0,015M a pH 7,3 + 0,05% de Tween 20).

O tempo de reação enzimática após a adição do substrato 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB) ao ensaio foi padronizado em 20 minutos.

Estes parâmetros foram definidos para garantir resultados mais precisos e otimizar o uso dos reagentes, reforçando as características de custo reduzido e praticidade do método.

4.5. Extração de AFB₁.

Antes de iniciar o processo de extração, as amostras de milho e ração foram moídas até atingir partículas de 20 mesh, garantindo melhor homogeneidade e extração do analito. As amostras de ovos foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas manualmente.

Para a extração de AFB₁ das amostras de milho, ração e ovo, foram realizadas adaptações das recomendações do kit comercial RIDASCREEN® *Aflatoxin Total*. Os procedimentos estão descritos a seguir:

- I- Foram adicionadas 5g da amostra a 25mL de solução de metanol grau HPLC:água (70:30, v/v) e 0,5g NaCl.
- II- As amostras foram agitadas a 150rpm por 30 minutos à temperatura ambiente.
- III- Primeira filtragem em Papel Filtro nº1.
- IV- Segunda filtragem:
 - a. Amostras de milho e ração foram filtradas em microfiltro de fibra de vidro GF-1, 47mm, com porosidade de 0,7µm (Macherey-Nagel, Alemanha).

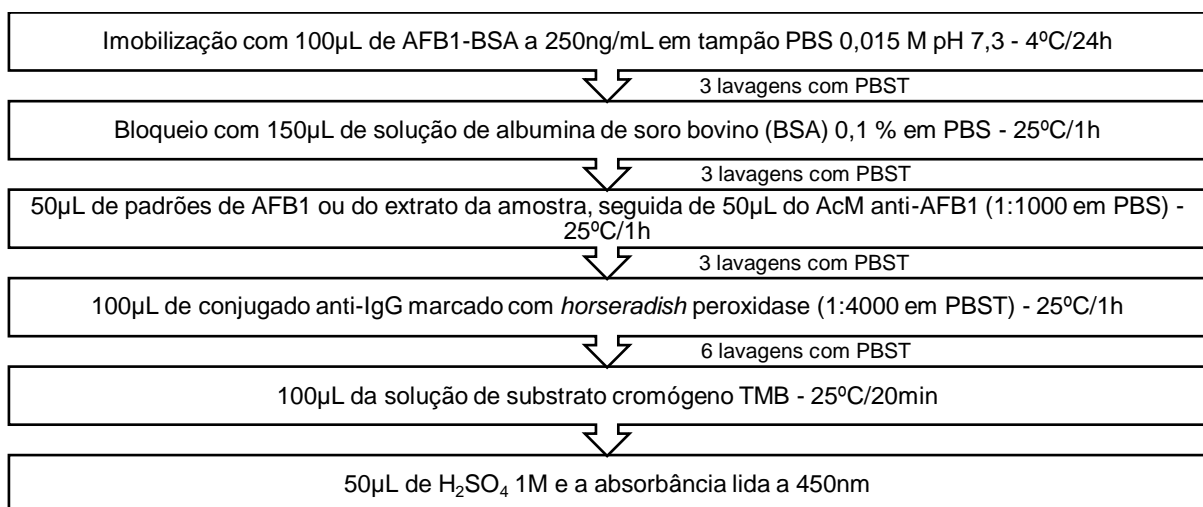
- b. Amostras de ovo foram filtradas em membrana hidrofóbica de fluoreto de polivinilideno, 13mm, com porosidade de 0,22 μ m (Starlab Scientific Co., Ltd., China).
- V- Alíquotas de 500 μ L do filtrado foram recolhidas em tubos de ensaio e secas a 40°C sob fluxo de nitrogênio.
- VI- Os extratos foram ressuspensos em 500 μ L de PBST:Metanol (9:1, v/v), e refrigerados para análise.

Todas as amostras extraídas foram analisadas em menos de 24 horas após o processo de extração, para evitar variações nos resultados decorrentes da possível degradação do analito.

4.6. Padronização de método de ELISA competitivo indireto.

O método já padronizado de ELISA indireto foi utilizado como base para os ensaios competitivos indiretos. O ic-ELISA é aplicado quando há a adição de padrão de AFB₁ ou do extrato das amostras, que competem com o antígeno imobilizado na placa pelo AcM anti-AFB₁. Na Figura 7 podemos observar a sequência de procedimentos realizados no método padronizado de ic-ELISA.

Figura 7 - Procedimentos de ic-ELISA padronizados para a detecção de AFB₁.



As microplacas foram imobilizadas com 100 μ L de AFB₁-BSA (toxina conjugada a albumina de soro bovino) na concentração de 250ng/mL em tampão fosfato salino

(PBS 0,015M a pH 7,3). As microplacas foram incubadas a 4°C por 24h. Em seguida, realizadas 3 lavagens das microplacas com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20) e bloqueio com 150µL de solução albumina de soro bovino (BSA) 0,1 % em PBS. Após incubação por 1h a 25°C, foram realizadas 3 lavagens com PBST, e em sequência, adicionados 50µL de padrões de AFB₁ ou da amostra extraída, seguida de 50µL do anticorpo monoclonal anti-AFB₁, na diluição 1:1000 em PBS. As microplacas foram incubadas por mais 1h a 25° C. Após 3 lavagens em PBST, foram adicionados 100µL do conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish* peroxidase (1:4000 em PBST), novamente sendo as microplacas incubadas a 25° C por 1h. Decorrido este tempo, foram realizadas mais 6 lavagens com PBST e 100µL da solução de substrato cromógeno TMB foram adicionados ao ensaio. Após 20 min a 25° C, a reação enzimática foi bloqueada com 50µL de H₂SO₄ 1 M e a absorbância lida a 450nm.

As análises do ic-ELISA foram realizadas em triplicata. Os resultados inicialmente são expressos no valor médio de absorbância da amostra e calculada a porcentagem de ligação a partir da equação:

$$\% \text{ de ligação} = (A + / A -) \times 100$$

Sendo:

A+: absorbância média lida na presença de amostra ou do padrão de AFB₁

A-: absorbância na ausência de AFB₁

A partir dos valores de porcentagem de ligação é possível determinar a concentração de AFB₁ nas amostras, aplicando os resultados à curva padrão previamente definida.

4.7. Validação intralaboratorial do ic-ELISA

A validação intralaboratorial do ic-ELISA foi realizada seguindo as orientações do INMETRO (2007), para validação de métodos para ensaios químicos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e os limites de detecção e quantificação.

4.7.1. Linearidade

Mede a habilidade do método em produzir resultados diretamente proporcionais a concentração do analito em uma determinada faixa de medição. Este parâmetro foi definido com a equação da reta obtida pela curva padrão de diferentes concentrações de AFB₁ entre 0,05ng.g⁻¹ e 10,0ng.g⁻¹:

As curvas foram elaboradas no extrato de amostras negativas para AFB₁, deste modo, os interferentes de matriz são considerados pelo método. As concentrações de AFB₁ para cada matriz foram:

- Milho (seis níveis): 0,05, 0,5, 1,5, 2,75, 7,0 e 10,0ng.g⁻¹ de AFB₁;
- Ração (seis níveis): 0,05, 0,5, 1,5, 4,5, 7,0 e 10,0ng.g⁻¹ de AFB₁;
- Ovo (sete níveis): 0,05, 0,5, 1,5, 2,75, 4,5, 7,0 e 10,0ng.g⁻¹ de AFB₁.

O coeficiente de determinação (R²) foi utilizado para indicar quão adequada é a reta como modelo matemático.

4.7.2. Precisão

Mede a concordância dos resultados de medições sucessivas do mesmo mensurado. O parâmetro foi avaliado pelo teste de repetitividade com a análise sendo executada nas mesmas condições, mesmo local e analista. Os coeficientes de variação foram obtidos a partir do desvio padrão de sete replicatas de três concentrações pré-determinadas de AFB₁ em cada matriz analisada. Também foi avaliada a precisão intermediária a partir dos valores de desvio padrão das análises realizadas por três dias consecutivos.

4.7.3. Exatidão

Este parâmetro foi medido pelo teste de recuperação de três concentrações determinadas de AFB₁ (0,05, 1,5 e 4,5ng.g⁻¹), adicionadas às amostras negativas de cada matriz. Os resultados de recuperação foram expressos como:

$$\frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

4.7.4. Limite de detecção

Define o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. Foi calculado a partir da repetição de sete replicatas do branco, conforme a equação:

$$LOD = 0 + t.s$$

Onde:

t: abcissa da distribuição de Student para o tamanho da amostra (3,143 no caso de sete replicatas);

s: desvio padrão do branco .

4.7.5. Limite de quantificação

Representa a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Calculado a partir da repetição de sete replicatas do branco e calculada por:

$$LOQ = 0 + 5s$$

Onde:

s: desvio padrão do branco.

4.8. Análise estatística

Os cálculos de estatística básica (média, desvio padrão, coeficiente de variação e mediana) e a comparação de médias entre as granjas A e B, por meio do teste t com intervalo de confiança de 95%, foram realizados empregando o Programa Statistica versão 7.0 (Tulsa, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da validação intralaboratorial e das análises de amostras coletadas de milho, ração e ovos são apresentados na forma do Capítulo intitulado:

“DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ EM MILHO, RAÇÃO E OVO APLICANDO ELISA COMPETITIVO INDIRETO”

Os resultados de contaminação de AFB₁ em todas as amostras analisada estão dispostos, detalhadamente, nas tabelas em anexo, entre as páginas 66 e 70.

CAPÍTULO

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE ic-ELISA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINA B1 EM MILHO, RAÇÃO E OVO

Validação intralaboratorial de ic-ELISA para detecção e quantificação de aflatoxina B₁ em milho, ração e ovo. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka.

RESUMO

Ensaio imunoenzimático competitivo indireto foi desenvolvido com anticorpo monoclonal anti-AFB₁ produzido por hibridoma da linhagem AF4, e validado para avaliar a ocorrência de aflatoxina B₁ na cadeia produtiva de ovo. Amostras de milho (n=39), ração para aves em postura (n=40) e ovo (n=400) foram coletadas em duas granjas de alta produção na região norte do Paraná, Brasil. Os parâmetros avaliados demonstraram validade do método perante quantificação de aflatoxina, obtendo-se linearidade de $R^2=0,9945$ em milho, $R^2 = 0,9922$ para ração e $R^2=0,9915$ para ovo. Nos testes de precisão, o coeficiente de variação foi menor que 5% em todos os produtos. A exatidão foi avaliada por teste de recuperação, empregando três níveis de AFB₁ (0,05, 1,5 e 4,5ng.g⁻¹), estando todos dentro dos valores de referência permitidos. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram 0,017ng.g⁻¹ e 0,027ng.g⁻¹, respectivamente. Não houve diferença estatística na média da contaminação entre granjas, seja para milho, ração ou ovo. Nenhuma amostra de milho ou ração ultrapassou o limite de 50ng.g⁻¹, estabelecido para aflatoxinas na alimentação animal no Brasil. Referente às amostras de milho, 56,4% apresentaram contaminação acima do LOQ, (média de amostras positivas em 1,51±0,94ng.g⁻¹), enquanto 87,5% de ração foram positivas (média de 1,22±0,97ng.g⁻¹). Quanto a ovo, a contaminação por AFB₁ acima do LOQ ocorreu em 48,3% das amostras, com média de positivos em 1,00±0,77ng.g⁻¹. Embora não haja legislação sobre limite de AFB₁ em ovo, todas as amostras apresentaram-se com nível menor que 20ng.g⁻¹, considerado limite americano para AFB₁ em alimentos para humanos. Os dados demonstraram elevada prevalência, porém baixa contaminação por AFB₁ em milho, ração e ovo. Todavia, cuidado especial deve ser apontado ao real perigo no consumo humano. Assim como, o aumento na prevalência de AFB₁ entre a etapa de matéria-prima (milho) e ração, sugere a necessidade de medidas que minimizem a contaminação.

Palavras-chave: Imunoensaio – contaminantes – aflatoxicose.

In-house validation of ic-ELISA for detection and quantification of Aflatoxin B₁ in maize, animal feed and egg samples. 2019. Dissertation (Masters in Food Science) – Department of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina. Advisor: Prof. Dr. Elisa Yoko Hirooka.

ABSTRACT

An indirect competitive Immunoassay was developed using a monoclonal antibody against AFB₁, produced for AF4 hybridoma cell lines, and validated to evaluate aflatoxin B₁ occurrence in egg's production chain. Samples of maize (n=39), laying hens' feed (n=40) and egg (n=400) were collected from two high yield farms in the Northern region of Parana State, Brazil. The evaluated parameters showed validity of the method for aflatoxin quantification, obtaining linearity of $R^2=0.9945$ in maize, $R^2=0.9922$ for feed and $R^2=0.9915$ for egg. In the precision tests, the coefficient of variation was less than 5% in all products. Accuracy was assessed by recovery test, using three levels of AFB₁ (0.05, 1.5 and 4.5ng.g⁻¹), all of which the results were within the permitted reference values. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.017ng.g⁻¹ and 0.027ng.g⁻¹, respectively. There was no difference in the level of mean contamination between farms, either for maize, feed or egg. No maize or feed sample exceeded the 50ng.g⁻¹ limit established for aflatoxins in animal feed in Brazil. Regarding maize samples, 56.4% presented contamination above the LOQ (mean of positive samples at 1.51±0.94ng.g⁻¹), while 87.5% of rations were positive (mean of 1.22±0.97ng.g⁻¹). For egg samples, AFB₁ contamination above the LOQ occurred in 48.3%, with a positive mean of 1.00±0.77ng.g⁻¹. Although there is no legislation for AFB₁ residues in egg, all the samples presented a level lower than 20ng.g⁻¹, considered the American limit for AFB₁ in human's food. The data showed high prevalence, but low AFB₁ contamination in feed and egg. However, special care should be given to the real danger in human consumption. As well, the increase in the prevalence of AFB₁ between raw material (maize) and feed, suggests the need for actions that minimize contamination.

Keywords: immunochemistry, contaminants, aflatoxicosis.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores e exportadores de proteína animal no agronegócio globalizado, tendo em avicultura de postura ainda um setor em expansão promissor, com produção de 39,9 bilhões de ovos em 2017 (ABPA, 2018). O expressivo aumento na produtividade se deve à garantia na saúde animal, aliada a qualidade e segurança do produto final. Os perigos na avicultura podem ser de ordem física, biológica e química, com destaque às micotoxinas (EMBRAPA, 2004).

Composto com potencial carcinogênico, produzido por fungos do gênero *Aspergillus* spp., a aflatoxina se destaca em grãos pela elevada toxicidade, sendo a aflatoxina B₁, a prevalente e mais tóxica (RAWAL; KIM; COULOMBE JR., 2010). A exposição em aves de postura decorre da alimentação - grão contaminado, em especial o milho, sendo a aflatoxina produzida no campo ou na estocagem. Doenças na planta, lesões nos grãos e o uso de práticas agrícolas inadequadas favorecem o crescimento fúngico e produção de aflatoxinas, aliado ao subsequente perigo pós-colheita devido a temperatura e umidade elevadas no transporte e armazenamento do grão (COTTY; JAIME-GARCIA, 2007).

A biotransformação hepática da aflatoxina B₁ é o principal fator de toxicidade deste composto. As enzimas do citocromo P450, convertem AFB₁ em exo-AFB₁-8,9-epóxido, que é mais reativa que a toxina original. Os epóxidos de AFB₁ são altamente instáveis e reagem com DNA, RNA e proteínas, alterando as funções celulares e induzindo a carcinogênese. Em mamíferos, parte dos metabólitos de AFB₁ são detoxificados por enzimas glutathione-S-transferase, porém em aves este sistema é menos funcional, o que explica a maior sensibilidade destes animais à toxina (MONSON; COULOMBE; REED, 2015).

A ingestão prolongada de aflatoxinas as aves tende a reduzir a produção e o peso dos ovos (ATHERSTONE, 2016). Além do prejuízo à saúde dos animais, a ocorrência deste contaminante representa risco ao consumidor humano, sendo essencial o controle através de limites em alimentos, definidos por órgãos governamentais em nível nacional e internacional (COPPOCK et al., 2018). A Portaria n.º.7 de 09 de novembro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabelece o limite máximo de 50ng.g⁻¹ de aflatoxinas em milho destinado a alimentação animal (BRASIL, 1998). Não há, no entanto, limites estabelecidos para aflatoxinas em ovos.

A detecção de aflatoxinas no alimento destinado aos animais é essencial para atestar a obediência aos limites estabelecidos, colaborando para garantir a qualidade e segurança do produto final ao consumidor. O imunoensaio tem sido um método rápido de escolha pela facilidade de execução, custo reduzido e elevada sensibilidade, despontando na área analítica aplicada, a exemplo dos expostos em relatórios de validação interlaboratorial a nível internacional, executados pela Romers (AVDIC; KOGLER, 2018). O método baseia-se na afinidade de anticorpo ao antígeno mono ou policlonais ao antígeno, sendo que no caso de AFB₁, a conjugação ao antígeno de baixo peso molecular ocorre apenas em um simples epítipo, o que demanda a modalidade de técnica competitiva (ALSHAWABKEH et al., 2015; AZRI et al., 2018).

O presente trabalho padronizou e realizou a validação intralaboratorial de método imunoenzimático competitivo indireto para detecção de AFB₁ e, sua subsequente aplicação na avaliação da cadeia produtiva de ovo, envolvendo análise de aflatoxina em milho, ração destinada às aves em postura e de ovo produzido no norte do Paraná, Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

Amostras de milho, ração para aves em postura e de ovos foram coletadas de duas granjas localizadas no município de Arapongas, região Norte do estado do Paraná. A granja A é caracterizada como um estabelecimento que produz em média 376.000 ovos por dia e o milho utilizado nas rações é obtido semanalmente de fornecedores. A granja B produz em média 205.000 ovos por dia, e o milho utilizado para alimentação das aves é cultivado na própria granja.

Na formulação da ração da granja A o milho compõe 61,31% do total, e não há a adição de adsorventes. Na granja B o milho representa 62% da ração e é feita a adição de adsorventes de micotoxinas juntamente aos suplementos.

As coletas foram realizadas semanalmente entre os meses de fevereiro e julho de 2018, totalizando 20 coletas. Ao final do experimento, a presença de aflatoxina B₁ foi analisada em 39 amostras de milho, 40 amostras de ração para aves em postura e 400 amostras de ovos.

Uma coleta em cada granja foi composta de: (I) 1 amostra de 1kg de milho obtida aleatória e diretamente dos silos de armazenamento anteriores à fábrica de ração; (II) 1 amostra de 1kg de ração recém preparada e (III) 50 ovos coletados na sala de expedição, que foram distribuídos aleatoriamente em 10 amostras.

Todas as amostras foram imediatamente conduzidas até o Laboratório de Produção de Imunorreagentes e Técnicas Moleculares (LIM), do Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. As amostras de milho e ração foram prontamente estocadas congeladas a -20°C . Os ovos foram redistribuídos (5 ovos por amostra), quebrados, homogeneizados manualmente e acondicionados em frascos plásticos para coleta, sendo também congelados a -20°C .

2.2. ic-ELISA para detecção e quantificação de AFB₁

2.2.1. AcM anti-AFB₁

Hibridomas da linhagem AF4, secretores de anticorpos monoclonais anti-AFB₁, produzidos por Kawamura et al. (1998), foram gentilmente cedidas à Universidade Estadual de Londrina, onde foram cultivados e os anticorpos produzidos foram purificados conforme procedimentos realizados por Médici (2016).

O AcM específico para AFB₁, produzido por esta linhagem de hibridomas, demonstra baixa reatividade cruzada com análogos de AFB₁, como AFB₂ (2,3%), AFG₁ (3,4%) e AFG₂ (2,4%) (KAWAMURA et al., 1988). Estes dados demonstram elevada especificidade do anticorpo, desejável para métodos de detecção de contaminantes em alimentos.

2.2.2. Extração de AFB₁ das amostras

Anteriormente ao processo de extração, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas manualmente. As amostras de milho e ração foram moídas até as partículas atingirem 20 mesh.

O método de extração utilizado foi adaptado do kit comercial RIDASCREEN® *Aflatoxin Total* (Biopharm, Alemanha) empregando basicamente o mesmo procedimento para as amostras de milho, ração e ovo.

A extração se procedeu adicionando 5g da amostra em 25mL de solução de metanol grau HPLC:água (70:30, v/v) e 0,5g de NaCl. As amostras foram homogeneizadas a 150rpm por 30 min à temperatura ambiente e filtradas em papel de filtro qualitativo n° 1. As amostras de ovo foram submetidas a segunda filtragem por membrana hidrofóbica de fluoreto de polivinilideno 13mm, 0,22µm (Macherey-Nagel, Alemanha), enquanto as amostras de milho e ração foram filtradas por membrana de fibra de vidro, 45mm, 0,7 µm (Starlab Scientific Co., Ltd., China). Uma alíquota de 500µL de filtrado foi seco a 40°C (banho maria sob fluxo de nitrogênio). O extrato foi ressuspendido em 500µL de PBST:metanol (9:1, v/v) e armazenado sob refrigeração para análise por ic-ELISA em até 24 horas após a extração.

A eficiência da extração para cada matriz foi comprovada pelo teste de recuperação aplicados para a validação do método.

2.2.3. Método padronizado de ic-ELISA

Os procedimentos e condições de realização do método padronizados estão descritos a seguir:

Sensibilização: As placas foram sensibilizadas com 100µL do conjugado de aflatoxina B₁ e albumina de soro bovino (AFB₁-BSA). A concentração utilizada foi de 250ng/mL diluído em tampão fosfato salino (PBS) a 0,015M e pH 7,3. Em seguida as placas foram incubadas a 4°C por 24 horas. Para a próxima etapa, foram realizadas 3 lavagens da placa com PBST (PBS+0,05% Tween 20).

Bloqueio: Esta etapa foi realizada com a adição de 150µL de solução de albumina de soro bovino 0,1% em PBS a 0,015M e pH 7,3. As placas foram incubadas a 25°C por 1 hora e em seguida, realizadas 3 lavagens com PBST.

Extrato da amostra e anticorpo primário: foram adicionados 50µL da amostra extraída e 50µL do anticorpo monoclonal (AcM) anti-AFB₁ na diluição 1:1000 em PBS a 0,015M e pH 7,3. As placas foram incubadas a 25°C por 1 hora e em seguida, realizadas 3 lavagens com PBST.

Anticorpo secundário: adicionou-se 100µL do anticorpo anti-IgG conjugado a enzima peroxidase (anti-IgG *horseradish* peroxidase) na diluição 1:4000 em tampão PBS adicionado de 0,05% de Tween 20. Esta etapa também foi incubada a 25°C por 1 hora e em seguida, realizadas 6 lavagens com PBST.

Substrato cromógeno: foram adicionados às placas 100µL da solução de substrato cromógeno de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em tampão acetato de sódio 0,1M. As placas foram incubadas por 20 minutos à 25°C para reação.

Bloqueio da reação enzimática e leitura dos resultados: adicionou-se 50µL de H₂SO₄ 1M. Imediatamente, a absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram calculados com base na porcentagem de ligação antígeno-anticorpo e aplicação na curva de calibração.

2.3. Validação intralaboratorial do ic-ELISA

A validade do método para o que se propõe foi avaliada seguindo as orientações do INMETRO (2007) para validação de métodos para ensaios químicos. Os parâmetros avaliados foram:

Linearidade: Avaliou-se por meio do coeficiente de determinação (R^2), obtido por curvas elaboradas com diferentes concentrações de AFB₁. Para considerar os interferentes da matriz, as curvas padrões foram diluídas em extrato de amostra negativa para AFB₁ para cada tipo de produto avaliado. A curva utilizada para as amostras de ovo foi constituída por sete pontos: 0,05, 0,5, 1,5, 2,75, 4,5, 7,0 e 10,0ng.g⁻¹ de AFB₁. Em extrato de milho, a linearidade foi avaliada com seis níveis de contaminação: 0,05, 0,5, 1,5, 2,75, 7,0 e 10,0ng.g⁻¹ de AFB₁. E, para as amostras de ração, seis concentrações de toxina foram utilizadas: 0,05, 0,5, 1,5, 4,5, 7,0 e 10,0ng.g⁻¹ de AFB₁.

Precisão: Parâmetro avaliado pelos testes de repetitividade (intra-corrída) e precisão intermediária (inter-corrída), executados sob as mesmas condições, mesmo local e analista. A precisão intra-corrídas do método foi verificada a partir do coeficiente de variação de sete replicatas de três concentrações pré-determinadas do analito (0,05, 1,5 e 4,5ng.g⁻¹). Também foi avaliada a precisão intermediária a partir dos valores de coeficiente de variação das análises das mesmas sete replicatas realizadas por três dias consecutivos.

Exatidão: O parâmetro foi aferido a partir do teste de recuperação de três concentrações (0,05, 1,5 e 4,5ng.g⁻¹) de AFB₁ adicionadas a amostras negativas de cada matriz. O valor de recuperação é expresso na porcentagem de concentração de AFB₁ obtida no teste em relação à concentração adicionada. Os valores de recuperação foram tidos como satisfatórios quando se adequaram aos intervalos

estabelecidos pela Regulamentação nº401/2006 da Comissão Europeia para Análise de micotoxinas em alimentos (EC, 2006).

Limites de detecção (LOD): calculado a partir da multiplicação do desvio padrão de sete replicatas do branco pela abscissa da distribuição *t Student* para o tamanho da amostra (neste caso, 3,143 para sete replicatas).

Limite de quantificação (LOQ): corresponde a cinco vezes o desvio padrão de sete replicatas do branco.

2.4. Análise Estatística

Os cálculos de estatística básica (média, desvio padrão, coeficiente de variação e mediana) e a comparação de médias entre as granjas A e B, por meio do teste t com intervalo de confiança de 95%, foram realizados empregando o Programa Statistica versão 7.0 (Tulsa, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação intralaboratorial do método de ic-ELISA para detecção e quantificação de AFB₁

A linearidade do método foi atestada pelos valores de coeficiente de determinação obtidos para as curvas padrão, sendo que em todas as matrizes este parâmetro foi adequado ($R^2 > 0,99$). As equações da reta em cada matriz analisada podem ser observadas na Figura 1. Os coeficientes de determinação obtidos foram: 0,9915 no extrato de ovo, 0,9945 no extrato de milho e 0,9922 para o extrato de ração. Portanto, as três matrizes analisadas demonstraram adequada linearidade na faixa de 0,05 a 10,0ng.g⁻¹ de AFB₁.

O método foi considerado preciso pela análise do coeficiente da variação de repetições de três concentrações adicionadas de AFB₁ (0,05, 1,5 e 4,5ng.g⁻¹), conforme a Tabela 1. O teste de repetibilidade foi aplicado para análise da precisão intra-corridas, com os valores de C.V. entre 1,23% e 3,28%. Na avaliação da precisão intermediária (inter-corridas), os coeficientes de variação foram obtidos a partir dos resultados de 3 dias diferentes de análise, e os resultados variaram de 1,14% a 4,9%. Todos os resultados foram satisfatórios, com coeficiente de variação menor que 5%,

como indicado pelo Guia de Validação de Métodos Analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). Os resultados de precisão são melhores que os descritos por Anfossi et al., (2015), que obtiveram C.V. entre 8% e 15% nas análises intra-corridas e entre 12% e 20% inter-corridas.

Para determinar a exatidão do método foi realizado o teste de recuperação de três concentrações adicionadas de AFB₁ (0,05, 1,5 e 4,5ng.g⁻¹) às amostras negativas de cada matriz. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Os valores de recuperação variaram entre 78,1% e 104,5% nas amostras de milho, 72,7% e 92,7% em ração, e, 84,8% e 104,9% nas amostras de ovos. Para as três matrizes analisadas, os valores de recuperação estiveram dentro dos limites de referência descritos na Regulamentação nº401/2006 da Comissão Europeia para Análise de micotoxinas em alimentos (EC, 2006). Os resultados de recuperação são semelhantes aos relatados por Lee et al., (2004), com valores entre 70,8% e 111,3% em amostras de milho artificialmente contaminadas por AFB₁, e Anfossi et al. (2015), que descreve valores de recuperação de AFB₁ em amostras de ovo entre 84% e 100%.

Além dos parâmetros já determinados, foram estabelecidos por cálculos previamente descritos, os valores de limite de detecção (LOD) em 0,017ng.g⁻¹ e limite de quantificação (LOQ) em 0,027ng.g⁻¹ de AFB₁ para o método utilizado. Os baixos limites demonstram que o método aplicado é muito sensível. Outros autores obtiveram limites superiores aos deste trabalho, como Zheng et al. (2005), que determinaram o LOD médio de 1,65ng.g⁻¹ em kits comerciais de ELISA para detecção de AFB₁ em milho. Por outro lado, Oplatowska-Stachowiak et al. (2016) produziram anticorpos monoclonais específicos para AFB₁, e aplicaram estes a kits comerciais de ELISA, resultando em maior sensibilidade e valor de LOD de 0,08ng.g⁻¹.

Os resultados obtidos para todos os parâmetros avaliados demonstram que o método utilizado é adequado para a detecção e precisa quantificação de AFB₁ nas amostras analisadas.

3.2. AFB₁ em milho, ração e ovo

Os resultados das análises de ic-ELISA para detecção e quantificação de AFB₁ nas amostras de milho, ração e ovos são apresentados na Tabela 3.

Não houve diferença estatística das médias de contaminação entre as granjas para nenhuma das matrizes avaliadas. Assim sendo, o uso de adsorventes nas rações produzidas na granja B não interferiu nos resultados de AFB₁. Por outro lado, a análise das medianas de contaminação sugerem que o milho utilizado na granja B, produzido e armazenado no próprio estabelecimento, apresenta um nível maior da toxina, provavelmente devido ao tempo e condições de armazenamento do grão.

Em 56,4% das amostras de milho analisadas foi quantificada a contaminação por AFB₁ acima do LOQ. Nas amostras positivas, a contaminação média obtida foi de $1,51 \pm 0,94 \text{ ng.g}^{-1}$, com valores variando de 0,11 a $3,91 \text{ ng.g}^{-1}$. Estes resultados estão de acordo com a Portaria nº 7 de 9 de novembro de 1988 do Ministério da Agricultura, para ingredientes destinados à alimentação animal.

Os dados de contaminação do milho obtidos neste trabalho indicam um baixo nível de AFB₁ nos grãos. Kotinagu et al. (2015) avaliaram 13 amostras de milho utilizadas na alimentação animal e detectaram 38,4% das amostras positivas para AFB₁, na contaminação média de 62 ng.g^{-1} , concentração que ultrapassa os limites indicados para alimentos destinados a alimentação animal. Abdallah et al. (2017), analisaram 79 amostras de milho e detectaram aflatoxina B₁ em 13 (16%), com concentração média de $4,81 \text{ ng.g}^{-1}$. Em ambos experimentos citados, a prevalência de amostras positivas foi discreta, porém os limites de quantificação determinados para os métodos utilizados foram mais elevados que o do presente trabalho (0,66 e $0,98 \text{ ng.g}^{-1}$, respectivamente).

Amostras de milho também foram avaliada para a presença de AFB₁ por Nomura et al. (2017) durante 5 anos de experimento. Os autores coletaram 246 amostras em mercados do Japão e detectaram em 46% a presença da toxina. A concentração média quantificada nas amostras positivas foi de $3,9 \text{ ng.g}^{-1}$, sendo 24 ng.g^{-1} a maior contaminação quantificada pelos autores. Sabe-se que o milho utilizado no trabalho é importado, oriundo dos Estados Unidos da América, principal fornecedor de grãos para o Japão. Além disso, os autores associam as maiores prevalências de amostras contaminadas por AFB₁ a períodos de temperaturas anormalmente elevadas no país importador. Tais dados demonstram a interferência que fatores climáticos tem na multiplicação fúngica e na contaminação dos cereais no campo.

Das análises de amostras de ração, 87,5% resultaram positivas. A maior prevalência de contaminação na ração comparada ao milho pode indicar que os outros

ingredientes da formulação, como o farelo de soja e a farinha de carne, podem estar contaminados. Além disso, o armazenamento do grão pode apresentar falhas que favoreçam a contaminação. Condições inadequadas de estocagem favorecem o crescimento fúngico, e conseqüentemente, a contaminação de grãos ou ração por micotoxinas. A adequada secagem do milho e o eficiente controle de umidade, temperatura, e aeração dos silos, permite reduzir os riscos da contaminação pós-colheita (KABAK et al., 2006).

A concentração média de AFB₁ nas amostras positivas de ração foi de $1,22 \pm 0,97 \text{ ng.g}^{-1}$, variando entre 0,04 a $3,58 \text{ ng.g}^{-1}$. A exemplo do milho avaliado, todas as amostras de ração para aves em postura estiveram abaixo do limite de 50 ng.g^{-1} para aflatoxinas na alimentação animal, estabelecido pelo MAPA (1988).

Outros dados reforçam a elevada prevalência, porém com elevados níveis de contaminação por aflatoxinas nas rações de aves de postura. Rossi et al. (2012) detectaram aflatoxinas em 92% das amostras coletadas, com contaminação média de $20,83 \text{ ng.g}^{-1}$. Morrison et al. (2017) avaliaram amostras comerciais de rações prontas para aves na Guiana e obtiveram a média de $27,38 \text{ ng.g}^{-1}$ de aflatoxinas totais no alimento. Por outro lado, Lee et al. (2016) pesquisaram em 20 amostras de alimentos para aves a presença de AFB₁ e todas (100%) estavam contaminadas, com média de $0,38 \text{ ng.g}^{-1}$ e variação de 0,09 a $1,71 \text{ ng.g}^{-1}$.

Ao analisar as amostras de ovos, 48,3% foram consideradas positivas, com concentrações de AFB₁ variando de 0,03 a $3,85 \text{ ng.g}^{-1}$. A média de AFB₁ nas amostras contaminadas foi de $1,00 \pm 0,77 \text{ ng.g}^{-1}$. No Brasil, até o momento não há limites estabelecidos para aflatoxinas em ovo. Porém, a regulamentação americana, determinada pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2011), estabelece o limite máximo de 20 ng.g^{-1} de aflatoxinas para qualquer alimento destinado ao consumo humano. Assim sendo, nenhuma das amostras de ovos analisadas ultrapassou o limite proposto pela lei americana.

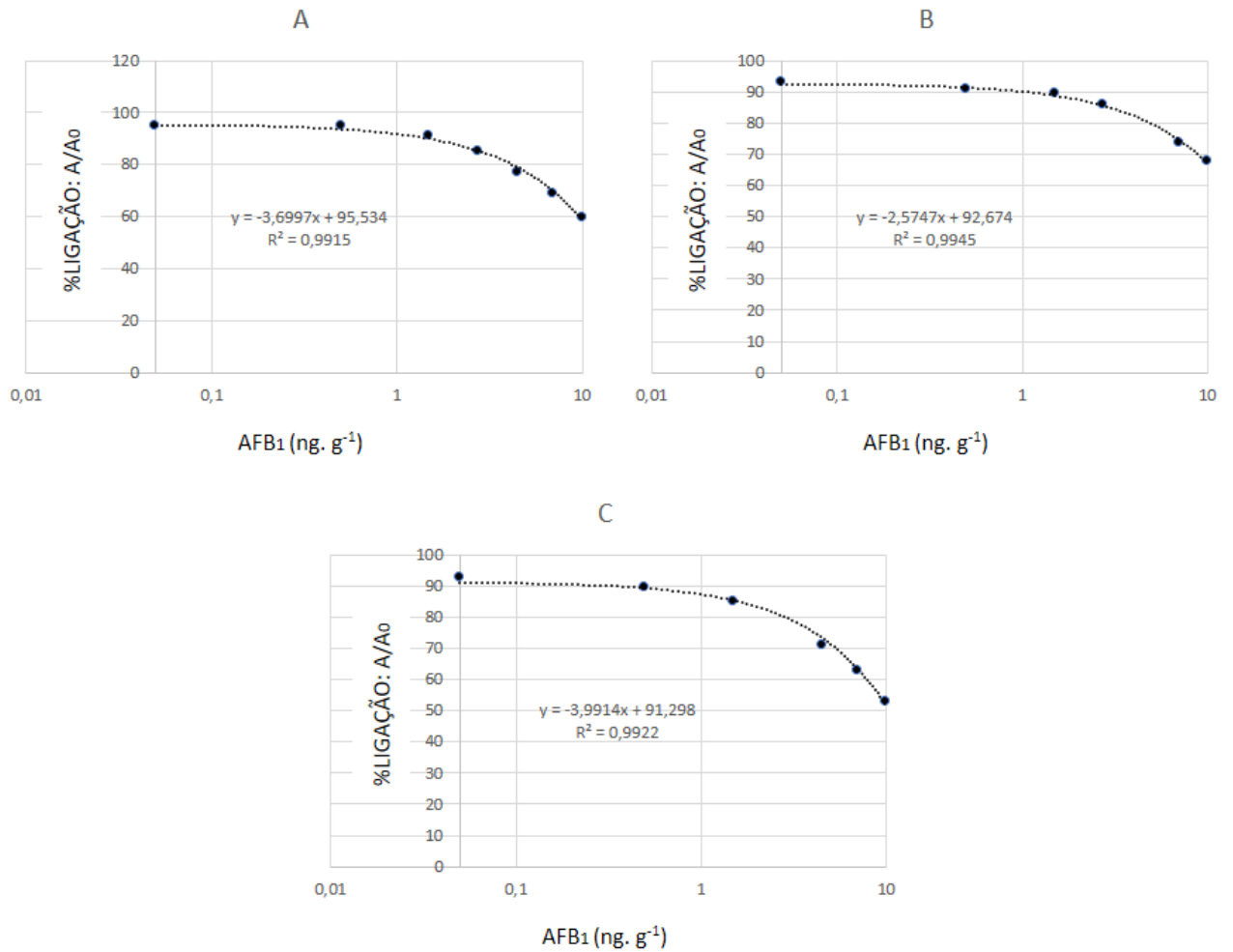
Anfossi et al. (2015) também utilizaram ensaios imunoenzimáticos para a detecção de aflatoxinas em ovos coletados em mercados da Itália, porém, nenhuma das 50 amostras coletadas foi considerada positiva. É importante destacar, que o limite de detecção calculado pelos autores foi de $0,3 \text{ ng.g}^{-1}$, superior ao obtido neste experimento. Por outro lado, Amirkhizi et al. (2015) avaliaram ovos comerciais produzidos no Irã, detectando a contaminação por AFB₁ em 58% das amostras, com a média de $0,74 \pm 0,04 \text{ ng.g}^{-1}$ e valor máximo de $2,35 \text{ ng.g}^{-1}$.

A qualidade do alimento oferecido aos animais reflete na contaminação dos ovos. Herzallah et al. (2009) coletaram amostras de ovo para análise de AFB₁ por dois períodos diferentes, inverno e primavera. Em ambos, o número de amostras positivas foi baixo, 20% no inverno e apenas 5% na primavera. Porém, a concentração média de AFB₁ nas amostras positivas foi 4,5ng.g⁻¹ nas amostras coletadas no inverno e 1,45ng.g⁻¹ nas amostras de primavera. Os autores relatam que durante o inverno a disponibilidade de alimentos frescos e de boa qualidade é reduzida, conseqüentemente o consumo de alimentos contaminados aumenta. Além disso, prolongados períodos de estocagem de grãos e condições inadequadas de armazenamento favorecem a contaminação mais elevada dos alimentos nos períodos de seca ou inverno.

Na figura 2, pode-se observar a distribuição percentual das amostras analisadas em níveis de contaminação. Na maior parte das amostras de ovos (51,8%), a concentração de AFB₁ não pode ser detectada (<0,017ng.g⁻¹) e apenas 5% das amostras resultaram em contaminação acima de 2ng.g⁻¹. Para milho, 43,6% estiveram abaixo do LOD e 12,9% acima de 2ng.g⁻¹. Por outro lado, as amostras de ração resultaram numa prevalência maior de AFB₁, com apenas 12,5% das amostras abaixo do LOD, e 20% acima de 2ng.g⁻¹. O eventual uso de outros ingredientes contaminados na produção de ração, aumenta a distribuição dos contaminantes, resultando na maior prevalência de amostras positivas.

A partir dos dados obtidos por este experimento pode-se assumir que a contaminação do milho e conseqüentemente, da ração se faz presente na avicultura de postura. As condições favoráveis de crescimento fúngico no campo ou durante o transporte e armazenamento dos grãos, aumentam a concentração de AFB₁ no alimento e refletem na contaminação ovos. Apesar da elevada prevalência do contaminante no alimento animal e nos ovos, as concentrações obtidas ficaram abaixo dos limites estabelecidos em regulamentações específicas. A pesquisa deste contaminante deve ser feita frequentemente para controle da qualidade da alimentação animal e garantia da segurança para o consumo de ovos.

Figura 1 – Curva padrão matrizada de ic-ELISA em milho, ração e ovo com AFB₁.



Concentrações de AFB₁ adicionada à matriz limpa:

Curva A – Ovo: 0,05, 0,5, 1,5, 2,75, 4,5, 7,0 e 10,0ng.g⁻¹

Curva B – Milho: 0,05, 0,5, 1,5, 2,75, 7,0 e 10,0ng.g⁻¹

Curva C – Ração: 0,05, 0,5, 1,5, 4,5, 7,0 e 10,0ng.g⁻¹

Tabela 1 – Validação de ic-ELISA: avaliação de precisão intra e inter-corridas em milho, ração e ovo matrizadas com AFB₁.

AFB ₁ adicionada (ng.g ⁻¹)	Coeficiente de variação (%)					
	Milho		Ração		Ovo	
	Intra-corrída (n=7)	Inter-corrída (n=3)	Intra-corrída (n=7)	Inter-corrída (n=3)	Intra-corrída (n=7)	Inter-corrída (n=3)
0,05	3,12	1,14	3,68	4,03	2,96	1,15
1,5	3,28	2,77	1,23	2,10	2,98	2,13
4,5	2,87	4,90	1,66	2,32	3,14	2,98

Intra-corrída: 7 replicatas realizada no mesmo dia.

Inter-corrída: análise de variação de 3 dias diferentes para o mesmo ensaio.

Tabela 2 - Validação de ic-ELISA: recuperação de AFB₁ em milho, ração e ovo.

AFB ₁ adicionada (ng.g ⁻¹)	Recuperação (AFB ₁ , ng.g ⁻¹)						Valor de referência* (CE nº401/2006)
	Milho		Ração		Ovo		
	Média ± D.P.	%	Média ± D.P.	%	Média ± D.P.	%	
0,05	0,05±0,04	104,5	0,03±0,1	72,7	0,04±0,02	84,8	50-120%
1,5	1,48±0,03	98,5	1,1±0,01	73,4	1,39±0,01	92,5	70-110%
4,5	3,52±0,02	78,1	4,17±0,01	92,7	4,72±0,01	104,9	70-110%

*Valores de referência recomendados por CE nº401/2006.

D.P.: Desvio Padrão

Cada análise foi realizada em triplicata.

LOD: 0,017ng.g⁻¹ e LOQ: 0,027 ng.g⁻¹.

Tabela 3 - Ocorrência de AFB₁ em amostras de milho, ração e ovo coletadas na Região Norte do Paraná, Brasil.

Granja	AFLATOXINA (ng.g ⁻¹)														
	MILHO					RAÇÃO					OVO				
	N Pos/Total	%	Media±D.P	Mediana	Faixa	N Pos/Total	%	Media±D.P	Mediana	Faixa	N Pos/Total	%	Media±D.P.	Mediana	Faixa
A	10/19	52,6	1,35±1,21	0,98	0,11-3,91	18/20	90	1,35±1,04	1,06	0,04-3,58	101/200	50,5	1,00±0,71	0,88	0,05-3,85
B	12/20	60	1,64±0,68	1,76	0,24-2,52	17/20	85	1,08±0,89	0,83	0,34-3,18	92/200	46	1,00±0,84	0,67	0,03-3,72
Total	22/39	56,4	1,51±0,94	1,68	0,11-3,91	35/40	87,5	1,22±0,97	0,95	0,04-3,58	193/400	48,3	1,00±0,77	0,81	0,03-3,85

Comparação de média entre granjas analisada pelo teste t com intervalo de confiança de 95%.

D.P.: desvio padrão

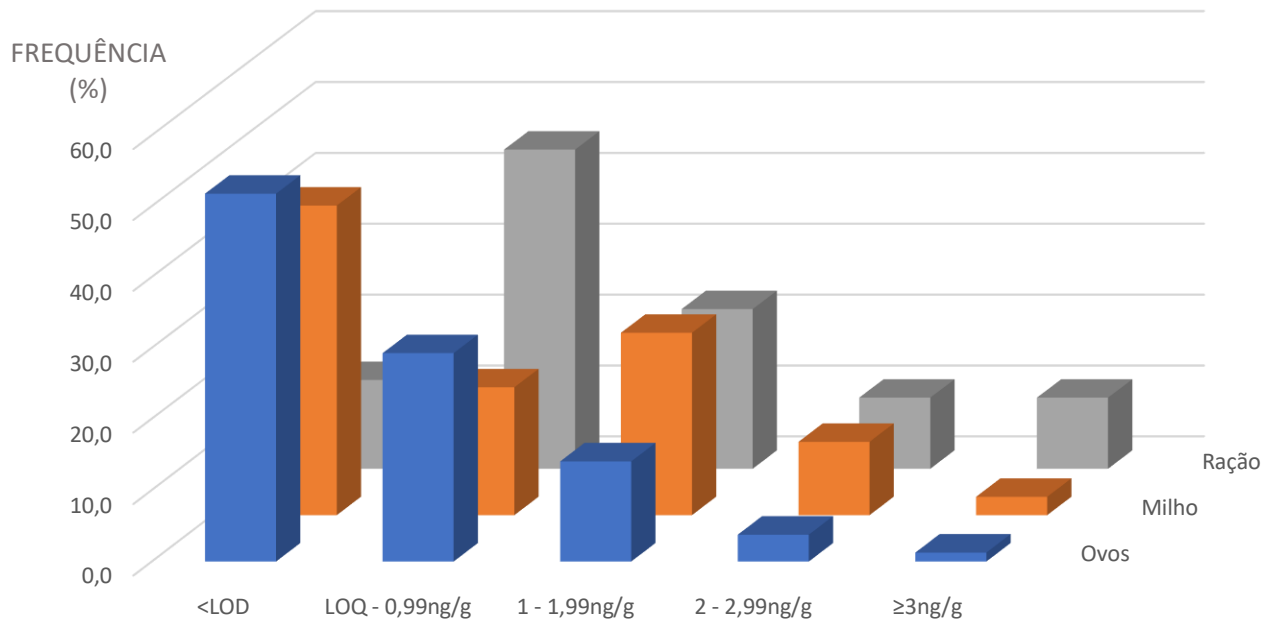
Pos: positivo

LOD: 0,017ng.g⁻¹ e LOQ: 0,027ng.g⁻¹

Período de coleta: fevereiro a julho de 2018.

Limites regulamentados para AFB₁: 50,0ng.g⁻¹ em alimentos destinados a animais (MAPA, 1988) e 20,0ng.g⁻¹ para alimentos destinados ao consumo humano (FDA, 2011).

Figura 2 - Distribuição da frequência de AFB₁ em milho, ração e ovo coletados na Região Norte do Paraná, Brasil.



LOD: 0,017ng.g⁻¹ e LOQ: 0,027ng.g⁻¹

Nenhuma amostra obteve resultados entre o LOD e LOQ.

Período de coleta: fevereiro a julho de 2018.

Limites regulamentados para AFB₁: 50,0ng.g⁻¹ para alimentos destinados a animais (MAPA, 1988) e 20,0ng.g⁻¹ para alimentos destinados ao consumo humano (FDA, 2011).

4. CONCLUSÃO

O ensaio imunoenzimático competitivo indireto aplicando AcM anti-AFB₁ demonstrou ser um excelente método para detecção e quantificação de aflatoxina B₁ em amostras de milho, ração e ovos, com resultados satisfatórios para todos os parâmetros avaliados na validação intralaboratorial. Nenhuma amostra de milho ou ração de aves de postura resultou em contaminação por AFB₁ acima dos limites estabelecidos por lei. Nenhuma amostra de ovo resultou em contaminação acima de limites internacionais para a alimentação humana. Os resultados demonstram elevada prevalência, porém baixos níveis de AFB₁ na alimentação de aves e em ovos, não evidenciando risco imediato ao consumo humano.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M. F., GIRGIN, G., BAYDAR, T., KRŠKA, R., SULYOK, M. Occurrence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in animal feed and maize samples from Egypt using LC-MS/MS. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 97, n. 13, p.4419-4428, 31 mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8293>.
- ABPA. **Relatório Anual 2018**. 2018. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2018>. Acesso em: 25 out. 2018.
- ALSHAWABKEH, K., ALKHALAILEH, N., ABDELQADER, A., FATAFTAH, A. A., HERZALLAH, S. M. Occurrence of Aflatoxin B1 in Poultry Feed and Feed Ingredients in Jordan Using ELISA and HPLC. **American-urasian Journal Of Toxicological Sciences**, v. 4, n. 7, p.316-320, 2015.
- A ALY, Salwa; ANWER, W. Effect of Naturally Contaminated Feed with Aflatoxins on Performance of Laying Hens and the Carryover of Aflatoxin B Residues in Table Eggs. **Pakistan Journal Of Nutrition**, v. 2, n. 8, p.181-186, 2009.
- AMARAL, G. Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. In: AMBROZIO, A. M. H. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social 43**. Rio de Janeiro: Bndes Setorial, 2016. p. 167-207.
- AMIRKHIZI, B., ENMATI, M., AREFHOSSEINI, S. R., ANSAIN, M. Aflatoxin B1 in eggs and chicken livers by dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC. **Food Additives & Contaminants: Part B**, [s.l.], p.1-5, 27 ago. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19393210.2015.1067649>.
- ANFOSSI, L., NARDO, F., PASSINI, G. C., BAGGIANI, C. Enzyme immunoassay for monitoring aflatoxins in eggs. **Food Control**, [s.l.], v. 57, p.115-121, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.013>.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE - Nº899, 29/05/2003 . Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos , maio, 2003.
- ATHERSTONE, C. Assessing the impact of aflatoxin consumption on animal health and productivity. **African Journal Of Food, Agriculture, Nutrition And Development**, [s.l.], v. 16, n. 03, p.10949-10966, 5 ago. 2016. African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development. <http://dx.doi.org/10.18697/ajfand.75.ilri01>
- AVDIC, D., KOGLER, E. **Romers Lab Check Sample Survey: Aflatoxins/Fumonisin in Corn**: Final Report. Tulln: 2018.
- AZRI, F. A., SUKOR, R., SELAMAT, J., BAKAR, F. A., YUSOF, N. A., HAJIAN, R. Electrochemical Immunosensor for Detection of Aflatoxin B1 Based on Indirect Competitive ELISA. **Toxins**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.1-13, 11 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10050196>.
- BOCHIO, V., TAKAHASHI, S. E., GROFF, P. M., SCHADECK, M. M., MAIER, G. S. Efeitos da aflatoxina na produção avícola: Revisão. **Pubvet**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.832-839, ago. 2017. PUBVET. <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v11n8.832-839>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os Limites Máximos Tolerados (LMT) de Micotoxinas em Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

BRASIL. Portaria nº7 de 09 de novembro de 1988. Estabelecer, os padrões mínimos, das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1988.

BURAGAS, A. **Comportamento alimentar de codornas poedeiras (Coturnix coturnix Japonica) recebendo rações com diferentes micotoxinas**. 2005. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Nutrição Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

COPPOCK, R. W., CRHISTIAN, R. G., JACOBSEN, B. J. Aflatoxins. **Veterinary Toxicology**, [s.l.], p.983-994, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00069-6>.

COTTY, P. J., JAIME-GARCIA, R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 119, n. 1-2, p.109-115, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060>.

DEEB, A. M., AMAN, I. M., EL-HAWARY, I. Determination of Aflatoxin M1 and B1 in Egyptian Raw Milk, Soft Cheese and Table Eggs using ELISA Technique. **International Journal Of Innovative Research In Science & Engineering**, v. 4, n. 11, p.154-159, 2016.

EC (European Commission) Commission Regulation nº401/2006. 23 de fevereiro de 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European**. 2006.

EMBRAPA. Manual de Segurança e Qualidade para a Avicultura de Postura, Brasília. 2004.

FDA. 2011. U.S. Food and Drug Administration – Mycotoxin Regulatory Guidance. 2011

FILAZI, A. YURDAKOK-DIKMEN, B., KUZUKIRAN, O., SIRELI, U. T. Mycotoxins in Poultry. **Poultry Science**, [s.l.], p.73-92, 15 fev. 2017. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/66302>.

GRECO, M. V., FRANCHI, M. L., GOLBA, S. L. R., PARDO, A. G., POSE, G. N. Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Poultry Feed for Food-Producing Animals. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2014, p.1-9, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/968215>.

GUAN, Y., WU, X., MENG, H. Indirect competitive ELISA based on monoclonal antibody for the detection of 5-hydroxymethyl-2-furfural in milk, compared with HPLC. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 96, n. 8, p.4885-4890, ago. 2013. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6550>.

GUO, B. JI, X., NI, X., FOUNTAIN, J. C., LI, H., ABBAS, H. K., LEE, R. D., SCULLY, B. T. Evaluation of maize inbred lines for resistance to pre-harvest aflatoxin and fumonisin contamination in the field. **The Crop Journal**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.259-264. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cj.2016.10.005>.

HERZALLAH, S. M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 114, n. 3, p.1141-1146, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.077>.

HOSSAIN, S. A., HAQUE, N., KUMAR, M., SONTAKKE, U.B., TYAGI, A. K. Mycotoxin residues in poultry production: their effect in human health and control. **Wayamba Journal Of Animal Science**, p.92-96, 2011.

HUSSAIN, Z. KHAN, M. Z., KHAN, A., JAVED, I., SALEEMI, M. K., MAHMOOD, S., ASI, M. R. Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 48, n. 12, p.3304-3307, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.016>.

IAMANAKA, B. T., OLIVEIRA, I. S., TANIKAWI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p.138-161, 2010.

IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná. Agrometeorologia: Dados diários de Londrina-PR. Disponível em: <http://www.iapar.br/pagina-1828.html>. Acesso em: 15 ago. 2018.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação automática – Dados de produção de origem animal por município. Disponível em :< sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 26 de janeiro de 2019.

INMETRO, Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQCGCRE-008, 2007.

INTERNATIONAL Agency for Research on Cancer (IARC) 1993. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic Risk to humans, some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins (Vol. 56). Lyon, France.

IQBAL, S. Z., NISAR, S., ASI, M. R., JINAP, S. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. **Food Control**, [s.l.], v. 43, p.98-103, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.046>.

KABAK, B., DOBSON, A. D. W., VAR, I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 46, n. 8, p.593-619, dez. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408390500436185>.

KANNAN, K., SUPRIYA, S., ADHITHYA, R., VELAZHAHAN, R. Aspergillus flavus and Aflatoxin Contamination of Poultry Feeds in Tamil Nadu, India. **International Journal Of Agriculture, Environment And Biotechnology**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.361-369, 2014. New Delhi Publishers. <http://dx.doi.org/10.5958/2230-732x.2014.00256.3>.

KAWAMURA, O., NAGAYAMA, S., SATO, S., OHTANI, K., UENO, I., UENO, Y. A monoclonal antibody-based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of aflatoxin B1 in peanut products. **Mycotoxin Research**, 4, 75–87. 1998.

KOHL, T. O., ASCOLI, C. A. Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Cold Spring Harbor Protocols**, [s.l.], v. 2017, n. 7, jul. 2017. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot093757>.

KOTINAGU, K., MOHANAMBA, T., KUMARI, L. R. Assessment of aflatoxin B1 in livestock feed and feed ingredients by high-performance thin layer chromatography. **Veterinary World**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.1396-1399, dez. 2015. Veterinary World. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2015.1396-1399>.

KRABBE, E. L., FILHO, J. I. S., MIELE, M., MARTINS, F. M. Cadeias produtivas de suínos e aves. In: GENTILINI, F. P., ANCIUTI, M. A. **Tópicos atuais na produção de suínos e aves**. Pelotas: Instituto Federal Sul-riograndense, 2013. p. 9-32.

LEE, M., SEO, D. J., JEON, S. B., OK, H. E., JUNG, H., CHOI, C., CHUN, H. S. Detection of Foodborne Pathogens and Mycotoxins in Eggs and Chicken Feeds from Farms to Retail Markets. **Korean Journal For Food Science Of Animal Resources**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.463-468, 31 ago. 2016. Korean Society for Food Science of Animal Resources. <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.463>.

LEE, N. A., WANG, S., ALLAN, R. D., KENNEDY, I., R. A Rapid Aflatoxin B1ELISA: Development and Validation with Reduced Matrix Effects for Peanuts, Corn, Pistachio, and Soybeans. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 10, p.2746-2755, maio 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0354038>.

LI, Y., WEN, S., CHEN, Z., XIAO, Z., MA, M. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2, zearalenone and its metabolites in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure. **Anal. Methods**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.4145-4151, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5ay00124b>.

MACHINSKI JR, M., SOARES, L. M. V., SAWAZAKI, E., BOLONHEZI, D., CASTRO, J. L., BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **J. Sci. Food Agric.**, 81, 1001-1007, 2001.

MALLMANN, C. A., DILKIN, P., GIACOMINI, L. Z., RAUBER, R. H., PEREIRA, C. E. Micotoxinas em Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves. In: XX CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 20., 2007, Porto Alegre., 2007. p. 191 - 204.

MANAFI, M. Aflatoxicosis in Layer and Breeder Hens, **Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology**, Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.), ISBN: 978-953-307-395-8, Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/aflatoxicosis-in-layer-andbreeder-Hens>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

MARTINS, H. M., GUERRA, M. M., BERNARDO, F. Zearalenone, deoxynivalenol and fumonisins in mixed-feed for laying hens. **Mycotoxin Research**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.206-210, dez. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02946743>

MÉDICI, L. M. **Anticorpo Monoclonal Anti-Aflatoxina B1: aplicação em imunoenensaio enzimático, imunofluorescência in situ e estudo da toxicidade em embrião de frango**. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

MONSON, M., COULOMBE, R., REED, K. Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B1 in Poultry. **Agriculture**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.742-777, 8 set. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture5030742>.

MORRISON, D. M., LEDOUX, D. R., CHESTER, L. F. B., SAMUELS, C. A. N. A Limited Survey of Aflatoxins in Poultry Feed and Feed Ingredients in Guyana. **Veterinary Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.60-65, 24 nov. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci4040060>.

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

NIZAMLÝOLU, F., OGUZ, H. Occurrence of aflatoxins in layer feed and corn samples in Konya province, Turkey. **Food Additives And Contaminants**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.654-658, jul. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030303842>.

NOMURA, M., AOYAMA, K., ISHIBASHI, T. Sterigmatocystin and aflatoxin B1 contamination of corn, soybean meal, and formula feed in Japan. **Mycotoxin Research**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.21-27, 23 set. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12550-017-0295-9>.

OLIVEIRA, C. A. F., KOBASHIGAWA, E., REIS, T. A., MESTIERI, L., ALBUQUERQUE, R., CORREA, L. M. B. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. **Food Additives And Contaminants**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.459-462, jun. 2000. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030050034037>.

OLIVEIRA, M. S., ROCHA, A., SULYOK, M., KRŠKA, R., MALLMAN, C. A. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. **Food Control**, [s.l.], v. 73, p.127-132, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.033>.

OPLATOWSKA-STACHOWIAK, M., SAJIC, N., XU, Y., HAUGHEY, S. A., MOONEY, M. H., GONG, Y. Y., VERHEIJEN, R., ELLIOTT, C. T. Fast and sensitive aflatoxin B1 and total aflatoxins ELISAs for analysis of peanuts, maize and feed ingredients. **Food Control**, [s.l.], v. 63, p.239-245, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.041>.

PANDEY, I., CHAUHAN, S. S. Studies on production performance and toxin residues in tissues and eggs of layer chickens fed on diets with various concentrations of aflatoxin AFB1. **British Poultry Science**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.713-723, dez. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00071660701713534>.

RAWAL, S., KIM, J. E., COULOMBE, R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research In Veterinary Science**, [s.l.], v. 89, n. 3, p.325-331, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.011>.

REAL, G. S. C. P. C., COUTO, H. P., MATOS, M. B., CHIQUIERI, M. S. L., CHIQUIERI, J. Milho: influência de sua qualidade no setor avícola brasileiro. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 12, n. 3, p.326-335, 2013.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B., SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.1-11, jan. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822002000100001>.

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**, [s.l.], v. 132, n. 4, p.2211-2216, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.067>.

SAWHNEY, D. S., Vadehra, D. V., Baker, R. C. The metabolism of ¹⁴C aflatoxins in laying hens. *Poultry Science*, 52, 1302–1309, 1973.

SILOTO, E. V., SARTORI, D. R. S., OLIVEIRA, E. F. A., SARTORI, J. R., FASCINA, V. B., BERTO, D. A. Performance and Egg Quality of Laying Hens Fed Diets Containing Aflatoxin, Fumonisin and Adsorbent. **Brazilian Journal Of Poultry Science**, v. 13, n. 1, p.21-28, 2011.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. São Paulo: Thomson Learning, 2006

- SOUZA, M. L. M., SULYOK, M., FREITAS-SILVA, O., COSTA, S. S., BRABET, C., MACHINSKI JR, M., SEKIYAMA, B. L., VARGAS, E. A., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R. Cooccurrence of Mycotoxins in Maize and Poultry Feeds from Brazil by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2013, p.1-9, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/427369>.
- SUN, D., GU, X., LI, J., YAO, T., DONG, Y. Quality Evaluation of Five Commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kits for Detecting Aflatoxin B1 in Feedstuffs. **Asian-australasian Journal Of Animal Sciences**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.691-696, 16 mar. 2015. Asian Australasian Association of Animal Production Societies. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.14.0868>.
- URUSOV, A. E., ZHERDEV, A. V., PETRAKOVA, A. V., SADYKHOV, E. G., KOROLEVA, O. V., DZANTIEV, B. B. Rapid Multiple Immunoenzyme Assay of Mycotoxins. **Toxins**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.238-254, 27 jan. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins7020238>.
- WANG, X., NIESSNER, R., TANG, D., KNOPP, D. Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 912, p.10-23, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.048>.
- YUNUS, A. W., RAZZAZI-FAZELI, E., BOHM, J. Aflatoxin B1 in Affecting Broiler's Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A Review of History and Contemporary Issues. **Toxins**, [s.l.], v. 3, n. 12, p.566-590, 14 jun. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins3060566>.
- ZHENG, Z., HUMPHREY, C. W., KING, R. S., RICHARD, J. L. Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. **Mycopathologia**, Dordrecht v. 159, p.255-263, 2005.

ANEXO I

Tabela 4 - Resultados das análises de AFB₁ em amostras de ovo da granja A (1ª Parte).

Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)
27/02	1	64,13	N.D.	06/03	1	69,43	N.D.	13/03	1	70,01	N.D.	20/03	1	67,53	N.D.	27/03	1	67,05	N.D.
	2	64,13	N.D.		2	69,57	N.D.		2	69,51	N.D.		2	67,9	N.D.		2	69,62	0,18
	3	62,54	N.D.		3	70,68	N.D.		3	71,07	N.D.		3	69,03	1,4		3	68,62	0,93
	4	62,25	N.D.		4	71,32	1,71		4	70,46	N.D.		4	68,32	N.D.		4	64,68	N.D.
	5	61,6	N.D.		5	69,81	N.D.		5	70,21	0,99		5	68,38	N.D.		5	69,62	N.D.
	6	66,66	N.D.		6	70,51	N.D.		6	70,44	N.D.		6	66,71	0,79		6	69,52	0,6
	7	61,85	N.D.		7	71,27	0,11		7	69,68	N.D.		7	68,1	N.D.		7	68,56	N.D.
	8	64,83	N.D.		8	69,08	0,22		8	69,76	0,5		8	67,64	N.D.		8	69,38	N.D.
	9	62,68	N.D.		9	70,01	N.D.		9	70,20	0,42		9	67,42	N.D.		9	68,43	0,29
	10	63,35	N.D.		10	70,9	1,02		10	69,81	3,19		10	68,88	N.D.		10	69,09	0,55
Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)
03/04	1	69,52	0,33	10/04	1	68,54	0,56	17/04	1	63,6	N.D.	24/04	1	63,28	0,33	02/05	1	68,09	0,05
	2	72,46	0,39		2	68,89	0,47		2	65,11	0,82		2	62,9	N.D.		2	67,18	0,36
	3	72,19	N.D.		3	69,32	0,76		3	64,15	N.D.		3	65,26	N.D.		3	68,61	N.D.
	4	72,17	3,85		4	68,88	0,83		4	62,06	N.D.		4	63,5	1,2		4	69,67	N.D.
	5	69,86	0,36		5	70,45	1,09		5	64,14	0,88		5	62,99	N.D.		5	68,52	N.D.
	6	70,46	N.D.		6	70,25	2,13		6	64,36	N.D.		6	62,71	N.D.		6	69,66	N.D.
	7	70,64	0,36		7	68,67	0,89		7	63,34	N.D.		7	63,45	N.D.		7	68,58	0,05
	8	71,41	2,41		8	71,88	0,88		8	61,89	N.D.		8	62,69	N.D.		8	68,39	1,54
	9	71,03	0,64		9	68,5	0,98		9	62,99	1,79		9	61,82	N.D.		9	68,4	1,32
	10	69,85	0,28		10	69,45	0,89		10	62,55	N.D.		10	64,76	N.D.		10	68,4	N.D.

N.D.: não detectável – abaixo do limite de detecção (0,017ng.g⁻¹).

Tabela 5 - Resultados das análises de AFB₁ em amostras de ovo da granja A (2ª Parte).

Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)
08/05	1	65,68	0,93	15/05	1	68,36	0,32	22/05	1	64,51	0,64	05/06	1	60,72	0,11	12/06	1	52,06	1,09
	2	65,87	1,17		2	68,38	N.D.		2	62,33	N.D.		2	61,79	1,35		2	54,4	0,4
	3	64,93	0,91		3	69,07	0,28		3	61,4	N.D.		3	61,19	1,36		3	56,69	1,45
	4	66	0,8		4	67,94	0,52		4	62,52	N.D.		4	61,64	N.D.		4	54,27	0,66
	5	65,4	N.D.		5	70	0,88		5	65,46	2,31		5	62,44	0,54		5	54,66	1,25
	6	65,94	0,52		6	68,17	N.D.		6	64,18	1,8		6	62,05	1,82		6	54,54	0,13
	7	64,99	N.D.		7	70,4	1		7	63,14	2,92		7	61,77	0,79		7	55,09	0,07
	8	65,61	N.D.		8	68,28	N.D.		8	63,04	1,43		8	61,25	N.D.		8	55,53	N.D.
	9	65,48	N.D.		9	69,78	N.D.		9	62,11	1,97		9	61,18	1,62		9	57,65	N.D.
	10	65,37	N.D.		10	69,99	1,02		10	62,64	1,26		10	61,37	1,29		10	53,79	0,18
19/06	1	61,68	0,47	26/06	1	62,72	1,68	03/07	1	57,08	N.D.	10/07	1	50,58	1,03	17/07	1	52,3	0,72
	2	60,77	N.D.		2	63,15	N.D.		2	56,53	N.D.		2	50,54	2,12		2	53,58	1,08
	3	61,23	N.D.		3	63,48	N.D.		3	57,38	N.D.		3	50,01	N.D.		3	52,31	0,77
	4	62,08	N.D.		4	61,23	N.D.		4	57,68	N.D.		4	49,89	N.D.		4	52,3	1,31
	5	63,7	N.D.		5	62,03	0,53		5	57,2	N.D.		5	49,36	N.D.		5	52,52	0,14
	6	62,99	N.D.		6	61,76	N.D.		6	56,68	1,41		6	50,33	N.D.		6	53,4	0,61
	7	62,88	N.D.		7	61,74	N.D.		7	56,96	1,92		7	49,97	0,57		7	51,11	1,36
	8	61,66	N.D.		8	62,26	0,89		8	56,26	N.D.		8	50,43	1,34		8	54,19	0,81
	9	62,43	N.D.		9	62,95	1,89		9	57,01	N.D.		9	50,6	0,48		9	53,8	1,37
	10	61,65	N.D.		10	61,31	1,33		10	57,29	N.D.		10	48,67	2,6		10	53,19	0,35

N.D.: não detectável – abaixo do limite de detecção (0,017ng.g⁻¹).

Tabela 6 - Resultados das análises de AFB₁ em amostras de ovo da granja B (1ª Parte).

Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB ₁ (ng/g)
27/02	1	60,44	N.D.	06/03	1	59,26	N.D.	13/03	1	59,38	0,34	20/03	1	58,95	0,14	27/03	1	57,82	N.D.
	2	60,21	N.D.		2	59,49	0,36		2	57,77	0,33		2	57,71	1,4		2	59,15	1,7
	3	59,99	N.D.		3	58,13	0,83		3	57,72	N.D.		3	60,2	0,3		3	57,22	N.D.
	4	62,62	N.D.		4	58,93	0,25		4	59,53	N.D.		4	59,57	0,32		4	60,12	0,65
	5	61,78	N.D.		5	59,03	N.D.		5	56,69	0,85		5	59,11	N.D.		5	57,16	0,47
	6	60,79	N.D.		6	58,24	0,76		6	58,37	0,55		6	56,73	N.D.		6	57,69	0,53
	7	61,22	N.D.		7	60,37	N.D.		7	57,67	1,93		7	59,74	N.D.		7	58,64	0,11
	8	58,27	N.D.		8	58,36	N.D.		8	58,85	0,55		8	59,55	N.D.		8	58,25	N.D.
	9	60,38	N.D.		9	58,65	N.D.		9	58,96	0,46		9	55,99	N.D.		9	58,35	N.D.
	10	63,73	N.D.		10	59,37	N.D.		10	56,28	0,97		10	58,52	0,81		10	58,74	N.D.
03/04	1	58,26	0,3	10/04	1	57,29	1,44	17/04	1	56,46	N.D.	24/04	1	58,1	N.D.	02/05	1	58,52	N.D.
	2	57,69	N.D.		2	58,75	N.D.		2	57,64	1,61		2	57,69	1,14		2	59,18	N.D.
	3	56,66	N.D.		3	57,6	0,38		3	59,33	0,83		3	55,82	N.D.		3	58,94	N.D.
	4	59,61	N.D.		4	57,56	0,19		4	57,86	N.D.		4	55,35	N.D.		4	59,27	3,12
	5	58,72	N.D.		5	56,38	0,13		5	57,09	N.D.		5	56,96	0,35		5	57,65	0,1
	6	60,65	0,55		6	55,72	N.D.		6	58,54	N.D.		6	57,9	N.D.		6	58,11	0,33
	7	57,81	N.D.		7	57,65	N.D.		7	56,52	N.D.		7	59,43	0,41		7	58,78	1,18
	8	58,26	N.D.		8	57,13	N.D.		8	57,51	N.D.		8	58,37	N.D.		8	60,17	0,31
	9	57,74	N.D.		9	57,36	N.D.		9	57,72	N.D.		9	58,92	N.D.		9	57,78	N.D.
	10	58,97	N.D.		10	56,63	0,24		10	58,88	N.D.		10	57,4	N.D.		10	58,09	N.D.

N.D.: não detectável – abaixo do limite de detecção (0,017ng.g⁻¹).

Tabela 7 - Resultados das análises de AFB₁ em amostras de ovo da granja B (2ª Parte).

Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)	Coleta	Amostra	Peso médio (g)	AFB1 (ng/g)
08/05	1	57,85	N.D.	15/05	1	58,45	1,79	22/05	1	58,42	0,52	05/06	1	58,54	1,92	12/06	1	60,06	1,12
	2	57,52	N.D.		2	57,41	N.D.		2	57,47	N.D.		2	58,31	2,51		2	59,68	0,95
	3	57,68	N.D.		3	58,32	N.D.		3	57,78	N.D.		3	58,28	1,52		3	60,69	2,33
	4	57,26	N.D.		4	56,97	N.D.		4	57,86	2,07		4	57,82	0,53		4	58,32	N.D.
	5	57,53	N.D.		5	58,57	N.D.		5	56,84	1,66		5	59,28	0,94		5	57,97	0,99
	6	56,73	N.D.		6	57,85	0,25		6	58,42	3,72		6	59,65	0,26		6	59,88	1,65
	7	58,19	N.D.		7	59,59	2,9		7	57,84	2,7		7	57,17	0,5		7	58,17	N.D.
	8	58,34	N.D.		8	59,12	N.D.		8	58,58	2,66		8	58,3	N.D.		8	59,02	N.D.
	9	55,75	N.D.		9	59,4	N.D.		9	57,85	2,62		9	58,41	N.D.		9	59,49	N.D.
	10	56,9	N.D.		10	58,82	N.D.		10	58,59	3,31		10	60,26	N.D.		10	59,14	0,53
19/06	1	58,86	N.D.	26/06	1	59,66	1,59	03/07	1	59,15	0,66	10/07	1	60,53	N.D.	17/07	1	58,49	N.D.
	2	59,49	N.D.		2	59	1,35		2	57,79	0,67		2	61,03	N.D.		2	59,02	0,09
	3	59,87	N.D.		3	58,07	0,39		3	57,29	1		3	60,2	N.D.		3	57,68	0,69
	4	59,21	N.D.		4	58,55	N.D.		4	57,49	N.D.		4	60,4	2,46		4	57,92	0,67
	5	58,59	N.D.		5	60,97	1,26		5	59,78	0,2		5	58,56	N.D.		5	59,03	N.D.
	6	58,88	N.D.		6	58,69	0,25		6	58,32	0,55		6	60,4	N.D.		6	56,81	0,75
	7	58,05	N.D.		7	59,28	N.D.		7	58,03	1,61		7	60,3	N.D.		7	56,91	0,07
	8	59,2	N.D.		8	59,05	0,52		8	56,19	0,65		8	60,43	N.D.		8	57,55	1,27
	9	58,47	1,76		9	59,19	0,52		9	59,87	0,56		9	60,91	1,35		9	56,07	0,31
	10	59,58	2,03		10	58,02	1,48		10	58,28	0,03		10	59,19	N.D.		10	57,74	0,26

N.D.: não detectável – abaixo do limite de detecção (0,017ng.g⁻¹).

Tabela 8 - Resultados das análises de AFB₁ em amostras de milho e ração – Granja A.

	Coleta	27/02	06/03	13/03	20/03	27/03	03/04	10/04	17/04	24/04	02/05	08/05	15/05	22/05	05/06	12/06	19/06	26/06	03/07	10/07	17/07
	Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
AFB ₁ (ng.g)	Milho	N.D.	0,49	-	3,91	N.D.	N.D.	N.D.	0,36	2,86	1,29	N.D.	N.D.	1,83	N.D.	1,01	0,11	N.D.	N.D.	0,95	0,64
	Ração	N.D.	0,52	0,04	N.D.	2,55	0,81	1,13	0,7	0,25	1,03	3,58	3,21	0,55	1,07	2,11	1,87	1,41	1,04	0,1	2,3

No dia 13/03/2018 não houve coleta de milho para a granja A.

N.D.: não detectável – abaixo do limite de detecção (0,017ng.g⁻¹).

Tabela 9 - Resultados das análises de AFB₁ em amostras de milho e ração – Granja B.

	Coleta	27/02	06/03	13/03	20/03	27/03	03/04	10/04	17/04	24/04	02/05	08/05	15/05	22/05	05/06	12/06	19/06	26/06	03/07	10/07	17/07
	Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
AFB ₁ (ng/g)	Milho	N.D.	N.D.	1,96	N.D.	1,73	0,24	1,85	2,27	N.D.	0,55	1,62	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,73	2,27	1,79	1,2	2,52
	Ração	3,14	0,51	1,03	0,53	N.D.	N.D.	N.D.	0,65	0,39	0,85	0,43	3,18	0,95	0,34	0,46	0,63	2,13	1,17	1,22	0,83

N.D.: não detectável – abaixo do limite de detecção (0,017ng.g⁻¹)