



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAQUELINE GOZZI BORDINI

**ESTRATÉGIAS PARA A MINIMIZAÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO DE RAÇÕES POR MICOTOXINAS**

Londrina
2013

JAQUELINE GOZZI BORDINI

**ESTRATÉGIAS PARA A MINIMIZAÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO DE RAÇÕES POR MICOTOXINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B729e Bordini, Jaqueline Gozzi.
Estratégias para a minimização de contaminação de rações por micotoxinas / Jaqueline Gozzi Bordini. – Londrina, 2013.
82 f. : il.

Orientador: Elisabete Yurie Sataque Ono.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Microbiologia – Teses. 2. Micotoxinas – Teses. 3. Frango de corte – Alimentação e rações – Teses. 4. Milho como ração – Teses. I. Ono, Elisabete Yurie Sataque. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 641.579

JAQUELINE GOZZI BORDINI

**ESTRATÉGIAS PARA A MINIMIZAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO DE
RAÇÕES POR MICOTOXINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Marta Hiromi Taniwaki
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL

Prof^a. Dr^a. Maria Josefa Santos Yabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 1 de março de 2013.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio M. Bordini e
Carmen S. G. Bordini, e ao João Paulo Belafonte pelo
amor, incentivo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono por toda dedicação, orientação e ensinamentos indispensáveis para a realização desse trabalho.

Ao CNPq, CNPq/MAPA, Fundo Paraná/SETI, à Fundação Araucária, PPSUS/Ministério da Saúde e CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio de Oliveira pela oportunidade e disponibilização de materiais e sorventes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Dionisio Borsato pelo auxílio e paciência fundamentais para análise estatística dos dados.

À Prof^a Dr^a Elisa Yoko Hirooka, pelo auxílio, ensinamentos e sugestões.

Aos professores do Programa do Mestrado em Biotecnologia pelos ensinamentos e colaboração em diversos aspectos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC/UEL): Nelson Rodriguez, Elda Aguiar, Sílvia Borba, Sérgio Evangelista, Sandra Aparecida Defende pela colaboração e auxílio.

Aos amigos, colegas de curso, de laboratório e estagiários Andressa Lofrano, Felipe Seixas, Rebecca Dall' Agnol, Ismael Amador, Luciano Aoyagi, Ana Carolina Corazza de Souza, Gervásio Saito, Thiago Zaninelli, Érica Mitsuo, Arthur Siqueira, Léa Ivano e em especial à Danielle Camelo Cardoso, Renata Badini, Karita Costa, Thiago Andrade Marques, Flávia Lordani e Daniele Ferreira pela amizade e companheirismo no decorrer do curso e no dia-a-dia.

À Carolina Nachi Rossi pela disponibilização das amostras de ração de frangos de corte e por toda amizade.

Aos amigos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA/UEL), Angélica Ishikawa, Patrícia Sambatti, Tatiana Miguel e Cássia Takabayashi por toda amizade e colaboração para a realização deste trabalho.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

BORDINI, Jaqueline Gozzi. **Estratégias para a minimização de contaminação de rações por micotoxinas**. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos que podem contaminar produtos agrícolas e estão relacionadas a diversos efeitos tóxicos em seres humanos e animais. O melhor método de controle de micotoxinas é a prevenção, porém, muitas vezes a contaminação é inevitável, sendo necessária a utilização de métodos de detoxificação, como o uso de sorventes. O objetivo deste estudo foi avaliar o grau de exposição de frangos de corte à ocratoxina A (OTA) por meio de ração naturalmente contaminada, bem como a qualidade higiênica das rações. Para este propósito, a contagem fúngica total e a ocorrência de OTA foram avaliadas em quatro tipos de ração destinada à alimentação de frangos de corte, coletadas de uma granja da região norte do Estado do Paraná, Brasil. Paralelamente, a eficácia de uma mistura de sorventes orgânico (parede celular de levedura) e inorgânico (carvão ativado) na proporção de 75:25 na remoção de zearalenona (ZEA) *in vitro* foi avaliada por meio de um planejamento experimental Box Behnken (4³) incompleto. Considerando os resultados desse delineamento, foi desenvolvido um segundo planejamento Box Behnken (3³) incompleto para avaliar a eficiência de diferentes proporções de mistura de sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado) na sorção de ZEA *in vitro*, bem como o efeito do pH e de diferentes concentrações de ZEA. Na maioria das amostras de ração, a contagem fúngica total estava abaixo de 10⁵ UFC/g, limite máximo estabelecido para assegurar a boa qualidade da ração. A OTA foi detectada em 42,8% das amostras de ração pré-inicial e em 40,9% na inicial com níveis médios de 0,29 µg/kg e 0,19 µg/kg, respectivamente. Nas rações de engorda e abate, a OTA foi detectada em 43,1% e em 52,2% com níveis médios de 0,59 µg/kg e 0,28 µg/kg, respectivamente. A ingestão diária estimada de OTA para as amostras de ração pré-inicial, inicial, engorda e abate foram de 0,021 µg/kg peso por dia, 0,008 µg/kg peso por dia, 0,033 µg/kg peso por dia e 0,018 µg/kg peso por dia, respectivamente. A ingestão diária de OTA estava abaixo do LOAEL (Low Observed Adverse Effect Level) para suínos (8 µg/kg peso corpóreo por dia), indicando que a ração é segura para o consumo em relação à OTA. Em relação aos testes de sorção de ZEA, a mistura de sorventes parede celular de levedura e carvão ativado (75:25) apresentou alta eficiência na sorção de ZEA *in vitro* (97,6 a 99,7%). Com base nesses resultados, a porcentagem de sorvente foi fixada em 0,5 % e o tempo de incubação, em 60 minutos para os ensaios dos testes de sorção do segundo planejamento Box Behnken (3³). O modelo resultante do planejamento Box Behnken (3³) mostrou coeficiente de correlação adequado (R²) de 0,98. A mistura de sorventes mais eficiente na sorção de ZEA foi a de proporção 75:25 (> 96,13%), em relação à mistura nas proporções de 87,5:12,5 (81,34 a 93,67%) e de 100:0 (55,7 a 78,13%). A proporção de sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado), bem como a concentração de ZEA foram as variáveis significativas em nível de 5%, indicando que a sorção será maior quando se utilizar a proporção 75:25 dos sorventes e concentrações menores de ZEA. Porém, a sorção utilizando ZEA na concentração de 1200 ng/mL, com essa proporção de sorvente foi satisfatória (> 98%). O pH entre 3,0 e 6,0 não interferiu no processo de sorção de ZEA *in vitro*, indicando que a ligação entre a mistura de sorventes e a zearalenona será estável em todo trato gastrointestinal dos animais.

Palavras-chave: Ocratoxina A. Zearalenona. Sorvente

BORDINI, Jaqueline Gozzi. **Approaches for minimizing feed contamination by micotoxins**. 2013. 82 p. Dissertation (Mater in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by filamentous fungi that can contaminate agricultural products and they are related to several toxic effects in human and animals. Prevention is the best procedure for mycotoxin control, however, the contamination is often unavoidable, and the use of detoxification methods, such as the use of sorbents becomes necessary. The objective of the present study was to evaluate the degree of exposure of broilers to ochratoxin A (OTA) through naturally contaminated feed and the hygienic quality of feeds. For this purpose, total fungal count and occurrence of OTA were evaluated in four feed types intended for broilers collected from a poultry breeding farm in northern Paraná State, Brazil. In parallel, the efficacy of mixture of organic (yeast cell wall) and inorganic sorbents (activated charcoal) at a 75:25 ratio in *in vitro* zearalenone (ZEA) removal was evaluated by means of a Box Behnken (4^3) incomplete design. Considering the results of these experiments, a second Box Behnken (3^3) incomplete design was used to evaluate the efficiency of different ratios of mixture of sorbents (yeast cell wall and activated charcoal) in the ZEA sorption *in vitro*, as well as the effect of pH and different ZEA concentration. In most feed samples, the total fungal count was lower than 10^5 CFU/g, the maximum limit established to assure good quality of the feed. OTA was detected in 42.8% (pre-starter) and in 40.9% (starter) feed samples, at mean levels of 0.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In the grower and finisher feed, OTA was detected in 43.1% and 52.2% samples at mean levels of 0.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The estimated daily intake of OTA for broilers were 0.021 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight (bw)/day (pre starter), 0.008 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day (starter), 0.033 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day (grower) and 0.018 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day (finisher feed). These estimated daily intake values were below the LOAEL (Low Observed Adverse Effect Level) for swine (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day), indicating that these feed samples are safe for consumption concerning OTA. In relation to ZEA sorption tests, the sorbent mixtures (yeast cell wall and activated charcoal, 75:25) showed high efficiency in *in vitro* ZEA sorption (97.6 to 99.7%). There was no influence of the variables analyzed (pH, percentage of sorbents, ZEA concentration and incubation time). Based on these results, the sorbent percentage was set at 0.5% and the incubation time at 60 minutes for the experiments of sorption tests of the second statistical design (Box Behnken 3^3). The resulting model of the Box Behnken (3^3) showed appropriate coefficient (R^2) of 0.98. The most efficient ratio of sorbent mixture in ZEA sorption was the 75:25 (> 96.1%), in relation to those with 87.5:12.5 (81.34 to 93.7%) and 100:0 (55.7 to 78.1%). The sorbent ratio (yeast cell wall and activated charcoal), as well as ZEA concentration were the significant variables at 5 % level, indicating that the sorption will be higher when using the 75:25 sorbent ratio and low ZEA concentration. However, using ZEA at 1200 ng/mL and the same ratio of the sorbent mixture (75:25), the sorption was satisfactory (> 98 %). The pH between 3.0 and 6.0 did not interfere in the sorption process *in vitro*, indicating that the binding between ZEA and the sorbent mixture would be stable throughout the animal gastrointestinal tract.

Key Words: Ochratoxin A. Zearalenone. Sorbents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da ocratoxina A	17
Figura 2 – Mecanismo proposto para a biossíntese da ocratoxina A.....	18
Figura 3 – Estrutura química da zearalenona, α -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalenol, β -zearalenol	25
Figura 4 – Provável via biossintética da zearalenona	25
Figura 5 – Componentes da parede celular de levedura	31
Figura 6 – Conformação favorável da zearalenona para a interação com a β -(1,3)-D-glucana ramificada com β -(1,6)-glucana.....	32
Figura 7 – Amostragem de ração destinada à alimentação de frangos de corte. Em sequência: silo, caixas de abastecimento e pratos de arrojamento.....	34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Exemplo da composição de ração de frangos de corte em diferentes fases de crescimento 35
- Tabela 2** – Níveis do planejamento estatístico Box Behnken (4^3), com variáveis codificadas e decodificadas para avaliação do efeito do pH, da concentração de ZEA, da porcentagem da mistura de sorventes parede celular de levedura:carvão ativado (75:25) e dos tempos de interação sobre a sorção de zearalenona *in vitro* 40
- Tabela 3** – Níveis do planejamento estatístico Box Behnken (3^3), com variáveis codificadas e decodificadas, para avaliar o efeito de diferentes proporções de sorventes, do pH e da concentração de zearalenona na sorção de zearalenona *in vitro*, fixando a quantidade de sorvente e o tempo de interação 41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	AVICULTURA	14
3.2	OCRATOXINA A	15
3.2.1	Fungos Produtores	15
3.2.2	Estrutura Química e Biossíntese	16
3.2.3	Efeitos Tóxicos em Aves e Mecanismo de Ação	18
3.2.4	Avaliação da Exposição à Ocratoxina A	20
3.3	ZEARALENONA	23
3.3.1	Fungos Produtores	23
3.3.2	Estrutura Química e Biossíntese	23
3.3.3	Efeitos Tóxicos e Mecanismo de Ação	26
3.4	OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM MILHO E RAÇÕES	27
3.5	SORVENTES PARA MICOTOXINAS	29
3.5.1	Tipos de Sorventes	30
3.5.2	Eficácia de Diferentes Sorventes para Zearalenona	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	AMOSTRAGEM DE RAÇÃO DESTINADA À ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE.....	34
4.2	TIPOS DE RAÇÃO DESTINADA À ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	34
4.3	<i>ASPERGILLUS</i> SP. E CONTAGEM FÚNGICA TOTAL	35
4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA	36
4.5	CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE OCRATOXINA A	36
4.6	EXTRAÇÃO DE OCRATOXINA A.....	36
4.7	DETECÇÃO DE OCRATOXINA A.....	37
4.8	ESTIMATIVA DO GRAU DE EXPOSIÇÃO À OCRATOXINA A	37
4.9	TESTES DE SORÇÃO DE ZEARALENONA <i>IN VITRO</i>	38

4.9.1	Calibração do Padrão de Zearalenona	38
4.9.2	Testes de Sorção com Mistura dos Sorvente (Parede Celular de Levedura e Carvão Ativado)	38
4.9.3	Testes de Sorção com Diferentes Proporções de Sorventes	39
4.9.4	Extração de Zearalenona	41
4.9.5	Detecção de Zearalenona Sorvida	42
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
	ARTIGO 1: EXPOSURE ASSESSMENT OF OCHRATOXIN A THROUGH NATURALLY CONTAMINATED FEED	45
	ARTIGO 2: SORÇÃO DE ZEARALENONA <i>IN VITRO</i> POR MISTURA DE SORVENTES ORGÂNICO E INORGÂNICO	58
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, e sua produção foi de 72,9 milhões de toneladas, em 2012. O Paraná é o segundo maior produtor nacional de grãos, responsável por 19% da produção e, o maior produtor de milho, produzindo 17 milhões de toneladas, em 2012 (CONAB, 2012).

Aproximadamente 80% da produção brasileira de milho é destinada à produção de ração de suínos e frangos de corte, enquanto que seu processamento para o consumo humano corresponde a 13% (ABIMILHO, 2008). Devido à alta qualidade nutricional, o milho está exposto à contaminação por micro-organismos, principalmente por fungos toxigênicos, produtores de micotoxinas, cujo crescimento é favorecido pelo clima tropical predominante no Brasil.

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos por fungos filamentosos que causam diversos efeitos tóxicos para seres humanos e animais, acarretando perdas econômicas para produtores e processadores de grãos. Entre as micotoxinas prevalentes em milho e rações destacam-se as fumonisinas, aflatoxinas, OTA e ZEA. Por apresentarem, de modo geral, grande estabilidade química e térmica, podem persistir nos alimentos ou rações mesmo após a inativação dos fungos através de processos de industrialização e, ao serem metabolizadas pelos animais, podem ocorrer em carne, ovos e leite, constituindo um risco para a saúde humana.

O melhor método de controle de micotoxinas em cereais é a prevenção por meio de boas práticas agrícolas, armazenamento e processamento de grãos. Apesar de essas práticas minimizarem a contaminação por micotoxinas, a sua presença em cereais e seus derivados muitas vezes é inevitável e de difícil controle. O monitoramento da contaminação natural e a avaliação da exposição a micotoxinas são essenciais para minimizar a ingestão de alimentos e rações contaminadas e, conseqüentemente, os riscos associados à saúde, uma vez que essas substâncias são tóxicas em baixas concentrações para seres humanos e animais.

No entanto, uma vez que o cereal já está contaminado, torna-se necessário diminuir a contaminação a níveis abaixo dos limites máximos tolerados, por meio dos métodos de detoxificação. Vários métodos de detoxificação têm sido desenvolvidos para minimizar a ocorrência de micotoxinas em alimentos. Uma alternativa promissora é a utilização de materiais sorventes, que formam ligações estáveis com as micotoxinas, impedindo que sejam absorvidas pelo trato gastrointestinal.

A eficácia da sorção depende da estrutura química do sorvente e da micotoxina. A principal característica inerente ao sorvente é a estrutura física, como distribuição de cargas, distribuição dos poros e área de superfície de contato. Por outro lado, as propriedades das micotoxinas, como polaridade, solubilidade e distribuição de cargas, determinam um papel significativo. A eficiência de sorventes como carvão ativado, aluminossilicatos de sódio e potássio, parede celular de levedura e seus componentes tem sido avaliada para diferentes tipos de micotoxinas *in vitro*.

A avaliação da ocorrência e da exposição a micotoxinas, bem como o uso de sorventes constituem importantes ferramentas para minimizar os efeitos tóxicos em animais e seres humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência natural de ocratoxina A em rações destinadas à alimentação de frangos de corte.

Avaliar a eficácia de sorventes orgânico e inorgânico na remoção de zearalenona *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a qualidade higiênica, a ocorrência natural de ocratoxina A, em quatro tipos de ração (pré-inicial, inicial, engorda e abate) destinadas à alimentação de frangos de corte, bem como o grau de exposição de frangos de corte à ocratoxina A.

Verificar a eficácia de mistura de sorventes orgânico (parede celular de levedura) e inorgânico (carvão ativado) na proporção 75:25 *in vitro*, bem como a influência de diferentes porcentagens da mistura, do pH, da concentração de zearalenona e do tempo de incubação na remoção de zearalenona *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AVICULTURA

Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado grandes índices de crescimento. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, sendo os Estados Unidos e China os maiores produtores mundiais, respectivamente. O Brasil, em 2011, produziu aproximadamente 13 milhões de toneladas de carne de frango, constituindo um aumento de 6,8% em relação a 2010. O principal produtor nacional foi o Estado do Paraná, responsável por 28,4% do total de frangos abatidos e por 26,2% das exportações, abastecendo 142 países. Este crescimento foi impulsionado pelo aumento no consumo de carne de frango e pela expansão de 5,1% nas exportações. Fatores como manejo adequado do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada contribuíram para aperfeiçoar a produtividade no setor (BRASIL, 2011; CONAB, 2012).

Do total de frangos de corte produzido no país em 2011, 69,8% foi destinado ao consumo interno. Assim, o consumo per capita de carne de frango foi de 47,4 quilos por pessoa, um novo recorde para o setor (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2012).

O Oriente Médio é a principal região de destino da carne de frango brasileira, e importou 1,4 milhões de toneladas, em 2011. Para a União Européia e para os países das Américas, as exportações foram de 488 mil toneladas e 289 mil toneladas de carne de frango, respectivamente (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2012).

Aproximadamente 80% da produção brasileira de milho é destinada à produção de ração de suínos e frango de corte, enquanto que seu processamento para o consumo humano corresponde a 13% (ABIMILHO, 2008). Em 2012, foram consumidos aproximadamente 62 milhões de toneladas de rações. A indústria de frangos de corte e suínos demanda mais de 70% das rações produzidas no Brasil formuladas com 90% da mistura de milho e farelo de soja (SINDIRAÇÕES, 2012).

A composição média do milho em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo (PAES et al., 2006). Devido à alta qualidade nutricional, o milho está exposto à contaminação por micro-organismos, principalmente por fungos produtores de micotoxinas, cujo desenvolvimento é favorecido pelo clima subtropical predominante no sul do Brasil (SYDENHAM et al., 1996).

Entre as micotoxinas associados à cultura de milho, as aflatoxinas, produzidas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, as fumonisinas, produzidas por *Fusarium verticillioides*,

são as mais prevalentes. A OTA, produzida principalmente por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus steynii* e a ZEA, produzida por *Fusarium graminearum*, também são consideradas importantes para a agricultura, devido à toxicidade (CAST, 2003; DOMIJAN et al., 2005; GIL-SERNA, et al., 2011).

3.2 OCRATOXINA A

3.2.1 Fungos Produtores

A OTA é um metabólito secundário tóxico produzido por fungos dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. que contaminam principalmente culturas de cereais como milho, trigo, cevada, centeio e aveia, bem como grãos de café, cacau, frutas secas e uva (LARSEN, 2001; VARGAS et al., 1996;). *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus steynii*, duas novas espécies de *Aspergillus* sp. (GIL-SERNA, et al., 2011), e *Penicillium verrucosum* representam as principais espécies produtoras, porém, se diferenciam nas condições ótimas de temperatura e atividade de água para o seu crescimento e produção de OTA (CAST, 2003; GIL-SERNA, et al., 2011; PITT, 1986).

Aspergillus westerdijkiae, *A. steynii* e *A. ochraceus*, principais produtoras de OTA pertencentes à seção *Circumdati*, apresentam crescimento em temperaturas entre 24 – 31°C e altos valores de aw (0,95 – 0,99). Essas espécies fúngicas podem contaminar os cereais, sendo mais importantes em frutas secas estocadas, castanhas, café e cacau (CABANÃS et al., 2008; GIL-SERNA et al., 2011). Outras espécies da seção *Circumdati* tem sido reportadas como produtores de OTA: *A. auricomus* (VARGA et al., 1996; BATISTA et al., 2003), *A. elegans* (BATISTA et al., 2003; NASSER et al., 2003; TSUBOUCHI et al., 1985), *A. insulicola* (BATISTA et al., 2003), *A. melleus* (CIEGLER, 1972; LAI, SEMENUK, HESSELTINE 1970), *A. ostianus* (BATISTA et al., 2003; CIEGLER, 1972; NASSER et al., 2003), *A. petrakii* (BATISTA et al. 2003; CIEGLER, 1972), *A. sclerotiorum* (BATISTA et al., 2003; CIEGLER 1972; NASSER et al., 2003; VARGA et al., 1996) e *A. sulphureus* (BATISTA et al., 2003; CIEGLER, 1972, NASSER, et al. 2003; VARGA et al., 1996).

O segundo grupo de *Aspergillus* ocratoxigênicos, *Aspergillus* section *Nigri*, do qual *Aspergillus carbonarius* é o principal representante, contamina principalmente produtos tropicais e subtropicais, principalmente na fase de maturação de frutas, especialmente uvas (ABARCA et al., 1994). Recentemente, foi relatado que em temperaturas entre 20 e 35°C e atividade de água de 0,98, ocorre crescimento e produção de OTA por *Aspergillus niger* e *A.*

carbonarius em milho em apenas 5 dias (ALBORCH et al., 2011). A capacidade de outras espécies em produzir OTA, como *A. awamori* e *A. japonicus*, tem sido relatada (DALCERO et al., 2002; MAGNOLI et al., 2003).

Entre as espécies de *Penicillium* sp., *P. verrucosum* e *P. nordicum* são as principais espécies produtoras de OTA (CABAÑES, BRAGULAT, CATELLÁ, 2010). As condições ótimas para o crescimento e produção de OTA por *Penicillium verrucosum* são 20°C e 0,95 de aw, sendo estas condições geralmente encontradas em regiões de clima temperado, como o Norte da Europa e Canadá, ocasionalmente na região do Mediterrâneo, como Espanha, Itália, França e Portugal (CABAÑAS et al., 2008; CAIRS-FULLER, ALDRED, MAGAN, 2005;). Nessas regiões, *P. verrucosum* desenvolve-se principalmente em cereais armazenados que não foram adequadamente secos (ALDRED; CAIRS-FULLER; MAGAN, 2008; JOINT FAO/WHO, 1999).

A ocorrência de OTA não é restrita somente a matérias-primas, mas também em produtos processados, devido a sua estabilidade térmica (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). OTA foi detectada em produtos derivados de cereais, como alimentos infantis, cervejas (ARAGUÁS et al., 2005), café processado (BATISTA et al., 2009), pimentas secas (JALILI; JINAP, 2011), vinhos e sucos de uvas (BATILLANI; PIETRI, 2002), pão fabricado com trigo contaminado com OTA (SCUDAMORE; BANKS; MACDONALD, 2003) e rações (BEG et al., 2006).

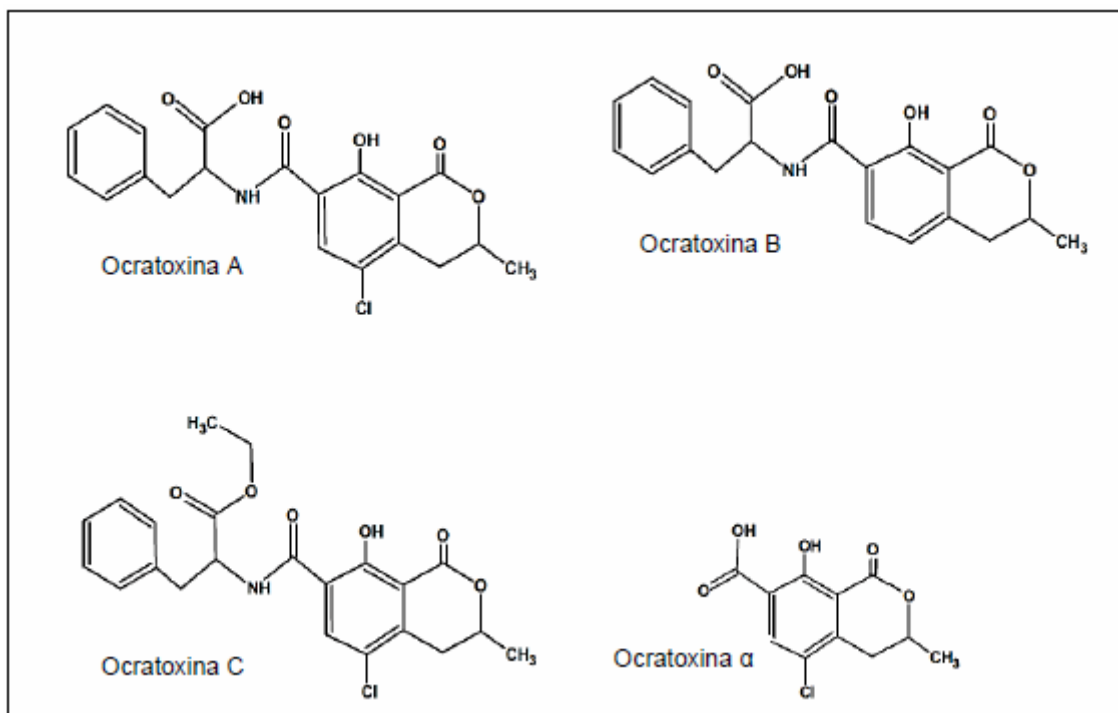
O risco à saúde humana existe não somente por meio do consumo de produtos de origem vegetal contaminados, mas também de origem animal, como carne de frango e suíno, salsichas e leite, devido à transferência de OTA para os tecidos (DUARTE; LINO; PENA, 2011).

3.2.2 Estrutura Química e Biossíntese

A OTA, quimicamente descrita 7-[L-β-fenilalanil carbonil] carboxil-5-cloro-8 hidroxil-3,4 diidro-3R metil isocumarina), é uma diidroisocumarina ligada ao aminoácido L-fenilalanina, na posição 7-carbonila, através de uma ligação amida (Figura 1) (XIAO et al., 1995). Apresenta polaridade média, sendo solúvel em solventes orgânicos polares e solução aquosa bicarbonatada, mas fracamente solúvel em água. Além disso, é caracterizada pela presença de grupos cromóforos com propriedades fluorescentes sob luz UV a 335 nm. O grupo carboxil da fenilalanina não está ligado, razão pela qual a ocratoxina A é fracamente ácida (pKa 7,1) (VALENTA, 1998).

Ao menos 20 diferentes análogos de ocratoxinas foram caracterizados, como as ocratoxinas A, B, C, α , β , metiléster de OT α , 4-hidroxi-OTA, sendo a ocratoxina A a mais tóxica e de ocorrência natural (XIAO et al., 1995). A presença do átomo de cloro em um dos anéis diidroisocumarínicos da estrutura da OTA contribui para a sua atividade tóxica. A ocratoxina B, que contém um hidrogênio ao invés do átomo de cloro, é aproximadamente dez vezes menos tóxica que a ocratoxina A, enquanto que os produtos da hidrólise da OTA e da ocratoxina B, a ocratoxina α e β , respectivamente, não são tóxicas (XIAO et al., 1996).

Figura 1 – Estrutura da ocratoxina A e de seus principais análogos

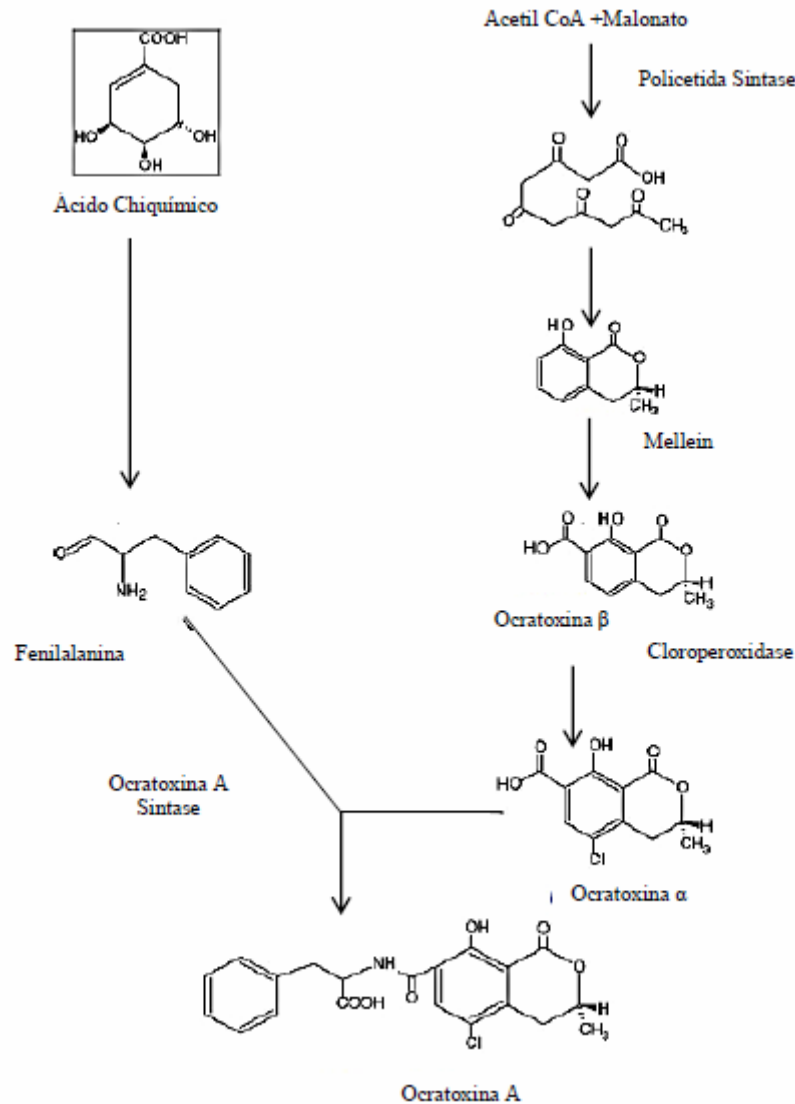


Fonte: Duarte, Lino, Pena (2011)

A via biossintética da ocratoxina A não está completamente esclarecida. No entanto, estudos utilizando C14 e C13 marcados demonstraram que os precursores da ocratoxina A são a fenilalanina e a diidroisocumarina, derivados da via do chiquimato e da via pentacetida, respectivamente. A primeira etapa da via consiste na formação de uma cadeia policetida isocumarínica por meio da condensação de uma molécula de acetato (acetil-Coenzima A) com quatro moléculas de malonato. Na próxima etapa, a cadeia policetida é modificada por meio da formação de um anel lactona e da adição de um grupo carboxil derivado de S-metilmetionina e formato de sódio. Subsequentemente, o átomo de cloro é incorporado pela ação da cloroperoxidase (formação de ocratoxina α), e, finalmente, a ocratoxina A sintase

catalisa a ligação de fenilalanina à $OT\alpha$, formando a OTA (Figura 2) (HARRIS; MANTLE, 2001; YAMAZAKI; MAEBAYASHI; MIYAKI, 1971).

Figura 2 – Mecanismo proposto para a biossíntese da ocratoxina A



Fonte: Adaptado de Ringot et al. (2006)

3.2.3 Efeitos Tóxicos em Aves e Mecanismo de Ação

A OTA tem sido relacionada a diversas micotoxicoses humanas e animais. Os efeitos tóxicos incluem nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, (KUIPPER-GODMAN; SCOOT, 1989), teratogenicidade (WANGIKAR et al., 2004) imunotoxicidade (ELAROISSE et al., 2006) e carcinogenicidade. Além disso, é classificada como possivelmente carcinogênico para humanos (categoria 2B) pela Agência Internacional de pesquisas sobre Câncer (IARC, 1993).

O primeiro relato de nefropatia relacionada com a ingestão de OTA ocorreu em aves. De 14 aves avaliadas, quatro apresentaram nefropatia caracterizada por atrofia e degeneração dos túbulos proximais e distais, bem como fibrose intersticial (ELLING et al., 1975). Nos Estados Unidos, Hamilton et al. (1982) descreveu episódios de ocratoxicoses em perus, galinhas poedeiras e frangos de corte. As três espécies de aves desenvolveram nefropatia, sendo que os perus apresentaram mortalidade acima de 59%, as galinhas poedeiras reduziram a produção de ovos e os frangos de corte apresentaram redução do ganho de peso e da conversão alimentar. No Brasil, 400 porcos morreram em uma semana no sul do Estado de Santa Catarina devido a um episódio de ocratoxicose proveniente da ingestão de milho contaminado (CRUZ et al., 1984). Além disso, em aves, a OTA aumenta a susceptibilidade e agrava o quadro clinicopatológico em caso de coccidioses (STOEV et al., 2002), salmoneloses (GUPTA et al., 2008) e colibacilloses (KUMAR et al., 2004).

Em ração artificialmente contaminada com OTA (800 µg/Kg) destinadas a alimentação de frangos de corte durante cinco semanas, foi observada significativa redução do peso corpóreo, do consumo de ração, da taxa de conversão alimentar e aumento da mortalidade (ELAROISSE et al., 2006). Sakthivelan e Rao (2010) contaminaram rações com OTA com níveis de 1000 a 2000 µg/Kg destinada à frangos de corte e também relataram redução da taxa de crescimento, da ingestão de ração, da conversão alimentar, além da redução de proteínas séricas e albumina. Em pintos alimentados com ração contaminada artificialmente com 5000 µg/Kg de OTA apresentaram efeitos degenerativos em fígado e rim, mudanças degenerativas e depleção de células em órgão linfoides, degeneração e edemas em cérebro, hemorragias musculares, bem como adenocarcinoma de fígado e rim (STOEV, 2010).

Em seres humanos, a OTA tem sido relacionada com tumores de bexiga e do trato urinário e com a nefropatia endêmica dos Balkans, condição envolvendo uma nefropatia crônica progressiva na região próxima ao Rio Danúbio, abrangendo parte da Bulgária, Romênia e Iugoslávia (PETKOVA-BOCHAROVA; CHERNOZEMSKI; CASTEGNARO, 1998; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002).

Os efeitos tóxicos de OTA são atribuídos principalmente ao prejuízo do metabolismo das proteínas. A estrutura da OTA é similar à molécula de fenilalanina e, conseqüentemente, compete com a fenilalanina pelos sítios de ligação das enzimas fenilalanina-tRNA sintase e da fenilalanina hidroxilase, inibindo a síntese de proteínas, causando a perda de peso, redução da conversão alimentar, diminuição da produção de ovos, entre outros. Esta competição também causa hipoproteinemia e hipoalbuminemia, ainda mais agravadas pela depleção renal de

albumina causada pelos danos renais relacionados à OTA. O prejuízo do metabolismo das proteínas eventualmente pode causar um aumento à susceptibilidade a várias infecções. Além disso, devido à inibição da síntese de proteínas, OTA também afeta indiretamente a atividade de várias outras enzimas, como a fosfoenolpiruvato carboxilase citosólica, enzima chave na gliconeogênese, alterando o metabolismo dos carboidratos. (DUARTE; LINO; PENA, 2011; RINGOT et al., 2006). A nefrotoxicidade de OTA pode estar relacionada com a disfunção mitocondrial que causa escassez de energia gerando espécies reativas de oxigênio (ALEO et al., 1991).

A toxicocinética e a toxicodinâmica são os fatores que determinam a toxicidade da OTA (RINGOT et al., 2006). Ao ser ingerida, a OTA é absorvida pelo trato gastrointestinal, e ao atingir a corrente sanguínea é ligada, em mais de 99%, a proteínas plasmáticas (principalmente a albumina - BSA). Esta ligação à BSA ocorre em dois sítios, um envolvendo forças hidrofóbicas relacionadas à parte isocumarínica da toxina e o outro, envolve os centros catiônicos da BSA com o íon fenolato da toxina. Esta ligação prolonga o longo tempo de meia vida da OTA no organismo. Uma grande fração de OTA sofre excreção biliar seguida de reabsorção da toxina pelo intestino e reabsorção pelos túbulos renais, retornando à circulação sanguínea e favorecendo sua redistribuição a diferentes tecidos (FUCHS; HULTA, 1992). A reabsorção nos túbulos proximal e distal causa acumulação de OTA nos tecidos renais, resultando na alta susceptibilidade do rim aos danos causados por OTA (DUARTE, LINO, PENA, 2011).

A concentração de OTA nos tecidos e no sangue depende da espécie animal, da dose administrada, da composição da alimentação, bem como do estado de saúde animal. Os principais tecidos os quais a OTA se acumula são rim, fígado, músculo, tecido adiposo e também tem sido encontrada no leite (FERRUFINO-GUARDIA et al., 2000; RINGOT et al., 2006).

Devido aos efeitos tóxicos causados pela ocratoxina A, a Comissão Europeia (2006, 2007) recomendou limite máximo tolerável de 250 µg/Kg para cereais e produtos de cereais destinados à alimentação animal e de 100 µg/Kg em ração destinada a aves.

3.2.4 Avaliação da Exposição à Ocratoxina A

Alimentos e rações contêm uma grande variedade de substâncias essenciais para a manutenção da saúde – carboidratos, proteínas, lipídios, fibras, vitaminas e minerais, e algumas potencialmente tóxicas, como micotoxinas, resíduos de pesticidas, aditivos e metais

pesados. A falta de algum nutriente ou a presença excessiva de substâncias tóxicas podem representar um risco a saúde humana e animal. Assim, a estimativa confiável dos valores ingeridos é necessária para avaliar os riscos aos quais seres humanos e animais são expostos (JARDIM; CALDAS, 2009; KROES, 2002;).

A avaliação do risco é realizada em um processo de quatro etapas que inclui: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco. Essa última etapa integra as informações coletadas nas três etapas precedentes (KROES, 2002).

A identificação do perigo tem como objetivo identificar os potenciais efeitos adversos à saúde humana e animal associados a uma substância química. Após a identificação do perigo, a caracterização do perigo que consiste na relação entre a exposição e a incidência de um efeito adverso, na qual, a relação dose-resposta é avaliada. Nessa etapa é estimada, para substâncias que apresentam limiar de dose para o efeito adverso (*threshold*), a dose em que não foi observado efeito adverso em animais (*Non-Observed-Adversed-Effects-Levels* – NOAEL) ou a menor dose na qual um efeito adverso foi observado (*Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level* – LOAEL) (JARDIM; CALDAS, 2009; RINGOT; CHANGO, 2010).

O NOAEL e o LOAEL para a OTA foram determinados em suínos, pois, são considerados os animais mais sensíveis em relação à OTA. Em estudo realizado durante dois anos em suínos, o NOAEL foi estabelecido em 8 µg/Kg peso corpóreo por dia para nefropatia, enquanto que o LOAEL para nefropatia progressiva foi de 40 µg/Kg peso corpóreo por dia. Porém, em estudo realizado durante 90 dias em suínos com dose de 8 µg/Kg peso corpóreo por dia de OTA causou redução da atividade de enzimas renais fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica e *gamma*-glutamil transpeptidase acompanhada da diminuição da função renal. Baseado nesses efeitos, o NOAEL não pode ser estabelecido nesse estudo, e 8 µg/Kg peso corpóreo por dia de OTA deve ser considerado como o LOAEL (EFSA, 2004, 2006).

A avaliação da exposição é uma etapa importante no processo de avaliação do risco e consiste na determinação quantitativa da ingestão provável de contaminantes por seres humanos e animais por meio dos alimentos e rações, respectivamente. A estimativa da ingestão de OTA requer informação sobre os níveis de contaminação e a taxa de consumo de alimentos e rações (RINGOT; CHANGO, 2010). E, a última etapa, a caracterização do risco, pode ser definida como a estimativa qualitativa ou, sempre que possível, quantitativa, incluindo as incertezas esperadas, da probabilidade de ocorrência de um efeito adverso de um

dado agente em um dado organismo ou população sob condições definidas de exposição (KROES, 2002).

O NOAEL e o LOAEL, obtidos dos estudos utilizando as espécies mais sensíveis em relação à OTA, podem ser utilizados no cálculo dos parâmetros seguros de ingestão crônica no homem e nos animais. Esses parâmetros são calculados dividindo-se o NOAEL ou o LOAEL por um fator de segurança ou incerteza, ou de segurança, para extrapolar os resultados obtidos com animais para outras espécies ou para seres humanos. Dentre os parâmetros de ingestão crônica segura estimados estão a Ingestão Diária Aceitável (IDA), ingestão semanal tolerável (*Tolerable Weekly Intake* – TWI), a ingestão máxima diária tolerável provisória (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake* – PMTDI) e a ingestão semanal provisória (*Provisinal Tolerable Weekly Intake* – PTWI) (BOERMANS; LEUNG, 2007; JARDIM; CALDAS, 2009).

Para a OTA, a TWI foi estabelecida para seres humanos pelo European Food Safety Authority (EFSA, 2006). Uma TWI de 120 ng/Kg de peso foi derivada do LOAEL de 8 µg/Kg de peso/dia para toxicidade renal em suínos aplicando um fator de incerteza de 450, considerando a diferença toxicodinâmica interespecie entre suínos e seres humanos (2,5 vezes), diferenças cinéticas baseado no tempo de meia-vida da OTA (6 vezes), variabilidade intraespecie (10 vezes) e o uso de LOAEL ao invés de NOAEL (3 vezes). Com base diária, o TWI corresponderia a aproximadamente 17 ng/Kg de peso corpóreo por dia (EFSA, 2006).

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2008) derivou a ingestão semanal provisória (PTWI) para OTA de 100 ng/Kg de peso corpóreo ou aproximadamente 14 ng/Kg de peso corpóreo por dia, baseado em estudos com suínos. Essa avaliação baseia-se no LOAEL para efeitos adversos no rim em suínos dividido por um fator de segurança de 500.

O grau de exposição à OTA determinado na etapa de avaliação da exposição pode ser comparado com os parâmetros de ingestão segura (TWI, ADI, PTWI) para avaliar a qualidade do alimento e da ração. Porém, para a ocratoxina A, esses parâmetros não foram determinados para alguns animais, como aves ou frangos de corte. Assim, o grau de exposição à OTA pode ser comparado com o LOAEL determinado para suínos, de 8 µg/Kg peso corpóreo por dia (EFSA, 2004).

3.3 ZEARALENONA

3.3.1 Fungos Produtores

A ZEA é um metabólito secundário tóxico estrogênico não esteroidal produzido por fungos do gênero *Fusarium*, incluindo *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* e *F. semitectum*, que são encontrados principalmente no solo, e contaminam os cereais no mundo todo. Os fungos produtores de ZEA contaminam e colonizam principalmente o milho, e em menor extensão, a cevada, aveia, trigo, sorgo e arroz (BENNETT; KLICH, 2003).

O gênero *Fusarium* sp. pertence à classe Hyphomycetes, subdivisão Deuteromycotina (Fungi Imperfecti) e inclui espécies que formam colônias com colorações diversas (branco, rosa pálido, roxo, alaranjado, púrpura), produzem macroconídios hialinos septados que podem ou não apresentar microconídios e clamidósporos (CAST, 2003).

Muitas espécies toxigênicas de *Fusarium* são patógenos de plantas, causando podridão de colmo e raiz em milho, resultando na redução da qualidade e rendimento da cultura (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Os problemas relacionados à contaminação por *Fusarium* sp. em grãos incluem as reduções da produtividade das culturas, das taxas de germinação e vigor. No produto final, podem ocorrer alterações no sabor e odor, diminuindo a palatabilidade e o consumo (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; VISCONTI, 2001).

Embora a infecção de cereais por *Fusarium* sp. ocorra no campo antes da colheita, a produção de ZEA pode ocorrer antes ou após a colheita, quando os grãos não são manuseados e secos adequadamente. Altas concentrações de ZEA têm sido encontradas em rações à base de milho como resultado de estocagem imprópria. Além disso, esta toxina tem sido detectada em produtos derivados de cereais, como farinha, malte e cerveja (CCFA, 2000).

Geralmente, altas concentrações de ZEA tem sido detectadas em regiões de clima temperado e quente, com temperaturas próximas de 28 °C e 16 % de umidade (CAST, 2003).

3.3.2 Estrutura Química e Biossíntese

ZEA é quimicamente descrita como ácido 6- [10 – hidroxí – 6 – oxo – trans – 1 – undecenil] –β– lactona resorcíclico, apresentando um resorcinol ligada a uma lactona macrocíclica de 14 membros (Figura 3). É solúvel em soluções alcalinas, éter, benzeno, acetonitrila, cloridrato de metila, clorofórmio, acetona e álcool, e insolúvel em água. A máxima absorção no UV para esta micotoxina é de 236, 274 e 316 nm. Persiste nos alimentos

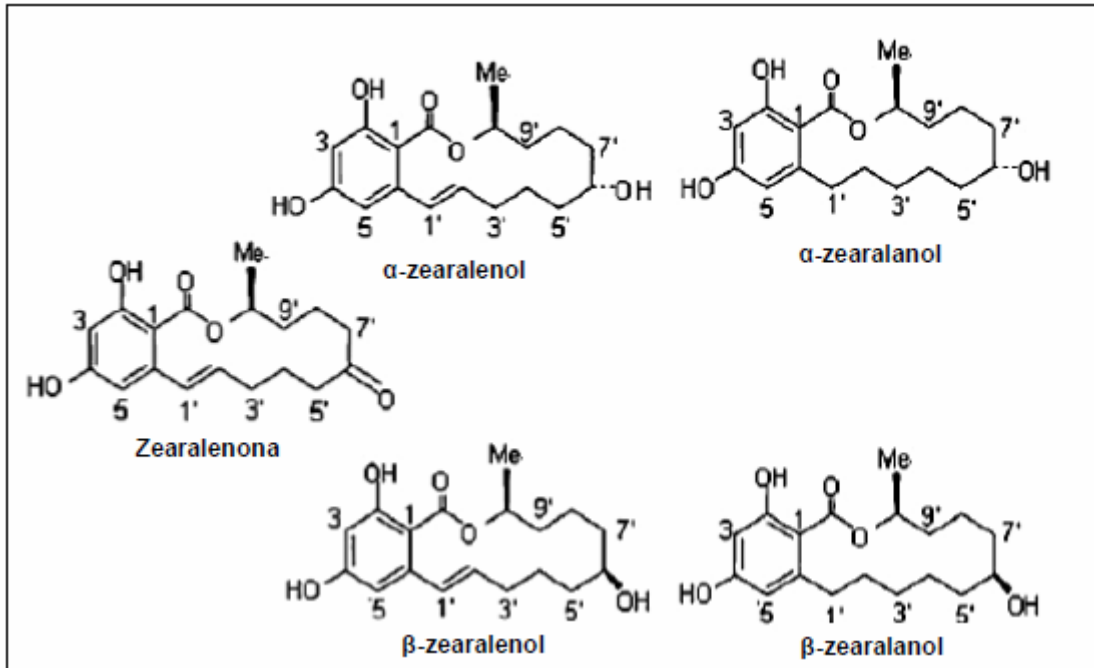
após o processamento devido à elevada estabilidade térmica (KUIPER-GUDMAN; SCOOT; WATANABE, 1987; URRY, et al., 1966;).

A ZEA apresenta cinco principais derivados, α -zearalenol (α -ZEA), β -zearalenol (β -ZEA), α -zearalanol (α -ZAL), β -zearalanol (β -ZAL) e zearalanona (ZAN). α -ZEA, β -ZEA, bem como α e β -ZAL contém um grupo hidroxil no carbono 6 comparado com o grupo ceto de ZEA e ZAN. Além disso, ZAN, α -ZAL e β -ZAL não contém dupla ligação nos carbonos 1 e 2 (HUFFMAN, GERBER, DU, 2010; ZINEDINE et al., 2007).

Em mamíferos, o grupo cetona no carbono C8 da ZEA é reduzido para dois metabólitos estereoisômeros (α - e β -ZEA) (Figura 3). Esses metabólitos são também produzidos por fungos, mas em concentrações muito menores do que a ZEA (ZINEDINE et al., 2007). α -ZEA contém efeitos estrogênicos três vezes maior que ZEA, enquanto que β -ZEA é o composto menor efeito estrogênico (DE SAEGER; LIBANDA; PETEGHEM, 2003).

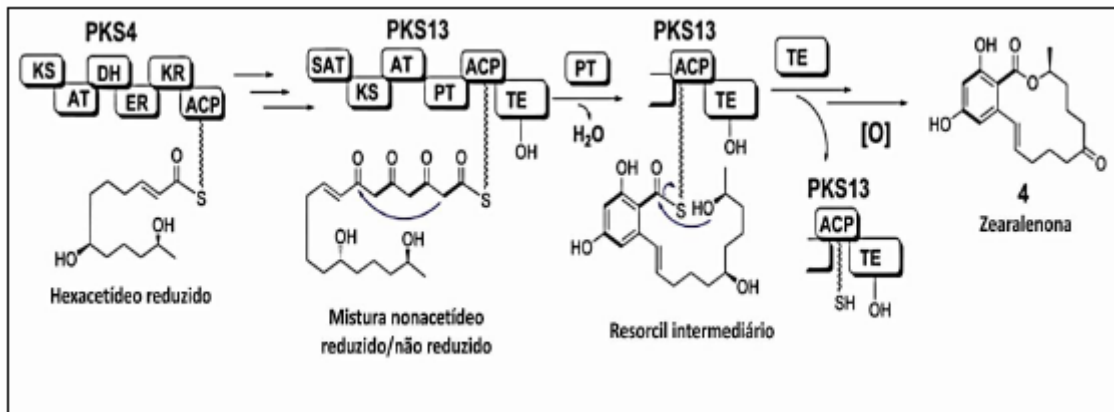
Para a biossíntese de ZEA por *Fusarium graminearum* são requeridos dois genes indispensáveis, o ZEA1 e o ZEA 2, apesar de possuírem um mesmo promotor e serem transcritos de forma divergente. Baseado na função dos genes e nos estudos de expressão, foi proposto uma via biossintética, na qual duas enzimas policetidas sintase (PKSs), HR-PKS e NR-PKS, atuam colaborativamente para a síntese de ZEA. Na proposta via da síntese de ZEA, a HR-PKS catalisa a formação da cadeia hexacetida reduzida, a qual é transacetilada pela NR-PKS e, posteriormente, alongada por mais três ciclos para formar uma cadeia nonacetídeo de zearalenona. Nos três últimos ciclos de alongamento, o grupo β -ceto, depois de cada reação de condensação, permanece não-reduzido, e somado a sete carbonos da cadeia nonacetídeo formam um resorcilato via condensação aldol intramolecular nos carbonos C2-C7 (Figura 4) (HUFFMAN; GERBER; DU, 2010).

Figura 3 – Estrutura química da zearalenona, α -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalenol, β -zearalanol



Fonte: Adaptado de Fink-Gremmels, Malekinejad (2007)

Figura 4 – Provável via biossintética da zearalenona



Fonte: Huffman, Gerber, Du (2010)

3.3.3 Efeitos Tóxicos e Mecanismo de Ação

Após a exposição por meio de alimentos e rações, a ZEA é rapidamente absorvida sendo que a taxa de absorção em suínos, após administração oral de 10 mg/Kg de peso, é de 80-85% (BIEHL et al., 1993; KUIPER-GOODMAN; SCOTT; WATANABE, 1987;). A biotransformação da ZEA, em diferentes espécies animais, ocorre principalmente no intestino e no fígado, além de alguns órgãos-alvo da atividade estrogênica e envolve as reações da Fase

I e Fase II do metabolismo (MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006; OLSEN; KIESSLING, 1983;).

Nas reações da Fase I, o grupo cetona da ZEA é reduzido resultando em α -ZEA e β -ZEA (Figura 3), por meio da ação das enzimas 3α e 3β hidroxisteróide desidrogenase. Essas enzimas estão presentes em vários órgãos e são responsáveis pelo metabolismo dos hormônios esteroides sob condições fisiológicas (MALEKINEJAD et al., 2005; OLSEN et al., 1985).

Após o metabolismo da Fase I, a α -ZEA e a β -ZEA são conjugadas com o ácido glucurônico, reação catalisada pela enzima uridina difosfatoglucuronil transferase (OLSEN et al., 1981). Em seguida, o glucuronídeo de ZEA é excretado pela bile e pela urina, ou pode ser reabsorvido pelas células da mucosa intestinal e, finalmente entra no fígado e na circulação sistêmica através da via porta-hepática (BIHEL et al., 1993). Esta circulação entero-hepática causa retenção prolongada de ZEA e seus derivados no sistema circulatório, retardando a sua eliminação e aumentando a duração de seus efeitos adversos (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999).

A biotransformação hepática de ZEA é diferente entre as espécies animais. Em suínos a transformação em α -ZEA é predominante, enquanto que em gado, o metabolito hepático é a β -ZEA (MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006). Em novilhos, após a administração oral de cereais contaminados com ZEA, cerca de 80 % dessa toxina é transformada em α -ZEA e β -ZEA em uma taxa de 1:8 (KLEINOVA et al., 2002).

A toxicidade de ZEA e de seus metabólitos tem sido relacionada às estruturas químicas similares aos estrógenos naturais. Dessa forma, ZEA e seus análogos ligam-se à receptores de estrogênio citoplasmáticos e o complexo receptor-zearalenona é transferido para o núcleo onde se liga a elementos responsivos aos hormônios, ativando a transcrição gênica (RILEY, 1998). Essa ligação causa desregulação dos efeitos estrogênicos, como hiperestrogenismo e desordens do sistema reprodutor (FINK-GREMMELS; MALEKINEJAD, 2007).

Os suínos são considerados os animais mais sensíveis e os principais efeitos tóxicos são a redução da sobrevivência embrionária, vulvovaginites, mortalidade neonatal de leitões, carcinoma de mama, prolapso retal (CHENG et al., 2006; TAKEMURA et al., 2007), redução do peso dos testículos, do epidídimo e da glândula vesicular (PIER et al., 1981). A ZEA também pode causar feminilização de suínos machos com alteração do esperma, diminuição da libido e da espermatogênese (ETIENNE; DOURMAD, 1994). Além disso, os leitões podem ser expostos no útero, bem como durante a amamentação. Os sintomas clínicos são semelhantes aos descritos para animais adultos e o aparecimento e a gravidade dos sintomas

dependem do tempo de exposição durante a gestação da porca e no período pré-desmame (BHIEL, 1993). Em seres humanos, a ZEA tem sido relacionada com a proliferação de células do câncer de mama (HUSSEM; BRASEL, 2001). Níveis baixos de zearalenona (2 - 20 µg/g) causam vulvovaginites em leitões enquanto que concentrações maiores (25 – 100 µg/g) estão relacionadas a pseudogestação e efeitos adversos na concepção, ovulação e implantação (CAST, 2003).

A ZEA apresenta baixa toxicidade aguda, exibindo valores de LD50 oral de 4000 mg/Kg de peso após administração oral em ratos (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Devido aos efeitos tóxicos relacionados à ZEA, a Comissão Europeia (2006) estabeleceu limites máximos tolerados em rações destinadas a leitões e leitões de 100 µg/Kg, a porcos de engorda, de 250 µg/Kg, e a bezerros, vacas leiteiras, ovelhas e cordeiros, de 500 µg/Kg.

3.4 OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A E ZEARELENONA EM MILHO E RAÇÕES

A maior fonte de exposição de animais a micotoxinas é por meio da ingestão de ração contaminada, devido à suscetibilidade de cereais, grãos e produtos derivados à contaminação por fungos (MAGNOLI et al., 2007).

Amostras de milho coletadas em diferentes regiões do Brasil (n= 380) foram analisadas por Silva e Vargas (2000) que detectaram ZEA em 7,8 % das amostras (n=30) com níveis variando de 46,7 a 719,4 µg/kg (nível médio de 232 µg/kg).

Machinski et al. (2001) analisaram 110 amostras de 48 cultivares de milho recém colhido provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, e somente uma amostra apresentou contaminação por ZEA com nível de 4640 µg/kg e duas amostras estavam contaminadas por OTA em níveis entre 128 e 206 µg/kg. Adicionalmente, a aflatoxina B₁ foi detectada em 60 amostras, variando de 6 a 1600 µg/kg.

A análise de 214 amostras de milho não processado (safra de 1997-1998), coletados na região central, sul e sudeste do Brasil, demonstrou contaminação por ZEA em 60 amostras (30,4 %) em níveis que variaram de 36,8 a 719 µg/kg, com média de 155 µg/kg. Além disso, foram detectadas, nas mesmas amostras, fumonisinas e aflatoxinas, em níveis variando de 0,4 a 139 µg/kg e 200 a 6100 µg/kg, respectivamente (VARGAS et al., 2001).

Sekiyama et al. (2005) avaliaram a contaminação por OTA e ZEA em 121 produtos derivados de milho destinados ao consumo humano, em Maringá, Estado do Paraná. Os produtos analisados foram milho degerminado (n = 37), farinha de milho (n = 17), flocos de milho (n = 10), sêmola de milho (n = 26), pipoca (n = 24) e farelo (n = 7), sendo que a

contaminação por OTA ocorreu em somente uma amostra de farinha de milho em nível de 64 µg/kg. A ZEA foi detectada em uma amostra de pipoca em nível de 448 µg/kg.

Na análise de 20 cultivares de milho coletados no estado do Paraná e Rio Grande do Sul, entre 2006-2007, foi detectada ZEA em 75 % das amostras com concentrações que variaram de 50 a 640 µg/kg (OLIVEIRA et al., 2009).

Queiroz et al. (2012) relataram a ocorrência de ZEA em amostras de milho armazenados em silagens de 10 fazendas familiares na cidade de Sete Lagoas, em Minas Gerais, coletado em quatro períodos durante o ano de 2009, totalizando 40 amostras. ZEA foi detectada em 38 amostras e os níveis médios variaram de 1,8 a 99 µg/kg. A presença de ZEA desde o primeiro período de estocagem pode ocorrer devido à contaminação previa do milho no campo, uma vez que essa micotoxina é produzida por *Fusarium* spp., classificado como fungo de campo.

A OTA e a ZEA também foram detectadas em rações destinadas à alimentação de animais. Almeida et al. (2011) analisaram 227 amostras de rações para suínos e detectaram ZEA em 69 amostras (24,9 %) com níveis variando de 5 a 73 µg/Kg. De 36 amostras de ração de abate para frangos de corte, provenientes de uma indústria do Rio de Janeiro, 100 % apresentaram contaminação por OTA em níveis que variaram de 17 a 197 µg/kg, com média de 98,2 µg/kg (FRAGA et al., 2007).

Em um estudo similar, Rosa et al. (2006) analisaram 96 amostras de ração destinadas a alimentação de frangos de corte, coletadas em quatro indústrias do Rio de Janeiro, quanto à ocorrência de fungos e OTA. *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foram os gêneros prevalentes. OTA foi detectada em 100 % das amostras em níveis variando de 1,3 a 80 µg/Kg.

Dalcerio et al (2002) determinaram os níveis de OTA em amostras de ração à base de milho para aves coletadas em indústrias argentinas, por um período de oito meses (maio de 1999 a abril de 2000). A OTA foi detectada em apenas três meses de amostragem (novembro, dezembro e janeiro), sendo que a frequência de contaminação foi de 38, 25 e 13 %, com níveis médios de 27 µg/kg. Esses resultados mostram a dependência do tempo de estocagem e das condições de temperatura e umidade na produção de OTA, e destacam a importância das boas práticas de estocagem para a prevenção da produção dessa micotoxina. Além disso, a avaliação de OTA em matérias-primas estocadas para uso em ração animal é necessária, a fim de determinar a ocorrência dessa micotoxina e seus riscos toxicológicos.

Jaimez et al. (2004) analisaram OTA e ZEA em amostras de vários tipos ração (n= 39) e matérias-primas das rações (n= 53) (milho, glúten de milho, sementes de algodão e de palma). Do total, 14 amostras eram ração para aves, 11 amostras de ração para bovinos, oito

amostras de ração para galinhas poedeiras e seis amostras de ração não especificada. Das 39 amostras de ração analisadas, OTA foi detectada em 13 (33 %) em níveis variando de 0,42 a 1,89 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e ZEA, em apenas uma amostra de ração para aves (5,1 %) com nível de 0,53 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Nas amostras das matérias-primas, 14 amostras apresentaram contaminação por OTA com níveis variando de 0,47 a 12,24 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Apenas uma amostra de milho e uma de semente de algodão estavam contaminadas com OTA acima de 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. ZEA foi detectada em 4 amostras de milho (0,47 a 2,24 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e em uma amostra de semente de algodão (0,92 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Em estudo recente realizado por Martins et al. (2012) em Portugal foi avaliada a contaminação por OTA em 186 amostras de ração para galinhas poedeiras. OTA foi detectada em 12 amostras (6,41 %) com níveis de 3 a 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Devido aos efeitos tóxicos causados por OTA e ZEA, a detecção dessas micotoxinas em alimentos e rações são essenciais para evitar os riscos à saúde humana e animal, bem como os prejuízos econômicos.

3.5 SORVENTES PARA MICOTOXINAS

Muitas estratégias para minimizar a contaminação de cereais por fungos toxigênicos e micotoxinas têm sido investigadas, as quais podem ser divididas em pré e pós colheita incluindo métodos químicos, biológicos e físicos (HUWIG et al., 2001; MALLMAN et al., 2006).

As estratégias pré-colheita incluem as boas práticas agrícolas, utilizando sementes de boa qualidade e cultivares resistentes a fungos ou danos, uma vez que algumas micotoxinas podem ser produzidas durante o desenvolvimento da planta no campo. Após a colheita, devem ser evitados os danos mecânicos aos grãos para evitar a invasão rápida por fungos, bem como boas práticas de armazenamento e processamento (MALLMAN et al., 2006).

O melhor procedimento para prevenir os efeitos das micotoxinas consiste na minimização de sua produção por meio da colheita dos grãos maduros, além da estocagem em baixas temperaturas e condições secas, que é difícil de ser realizado em países com clima quente e úmido. Porém, se a contaminação for inevitável, é necessário minimizá-la por meio dos métodos de descontaminação pós-colheita. Uma alternativa importante entre os vários métodos de detoxificação de alimentos é a utilização de materiais sorventes (JOUANY, 2007; MALLMAN et al., 2006).

Os sorventes formam ligações estáveis com as micotoxinas no trato gastrointestinal e impedem que sejam absorvidas, e conseqüentemente, a toxicidade sistêmica no organismo (HUWIG et al., 2001; RAMOS et al., 1996). A estabilidade da ligação entre o sorvente e a micotoxina depende das propriedades químicas e físicas de ambas as moléculas. A característica mais importante da sorção é a estrutura física do sorvente, como a distribuição das cargas, o tamanho dos poros e a área de superfície de contato. Por outro lado, as características das micotoxinas, como polaridade e solubilidade também desempenham um papel importante na sorção (HUWIG et al., 2001).

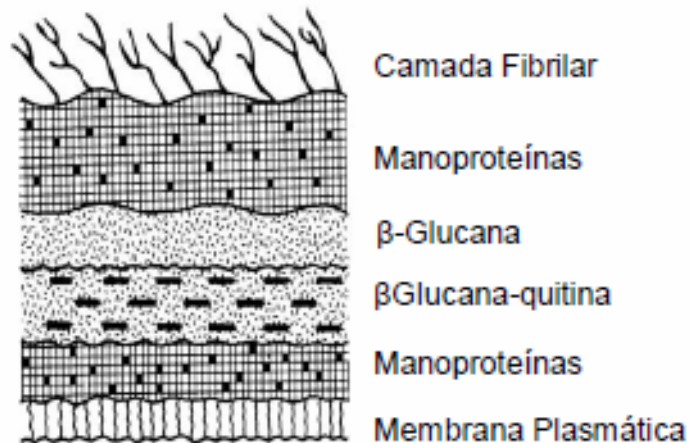
3.5.1 Tipos de Sorventes

Os sorventes podem ser classificados como polímeros orgânicos e inorgânicos. Os polímeros inorgânicos incluem as argilas, quimicamente compostas por silicatos e aluminossilicatos. Este grupo de sorventes inclui uma grande variedade de produtos como aluminossilicato hidratado de cálcio e sódio (HSCAS), filossilicatos, bentonitas e zeolitas (origem vulcânica), e montmorillonitas (HSCAS hidratado de magnésio) (JOUANY, 2007). Outro tipo de sorvente inorgânico com alta eficiência na ligação com micotoxinas é o carvão ativado, que é um pó não solúvel formado por pirólise de diferentes tipos de materiais orgânicos. Devido à sua grande área de superfície de contato e a sua porosidade, o carvão ativado possui excelente capacidade sorviva de várias substâncias tóxicas, além de aumentar sua eliminação direta (JARD et al., 2011).

Os sorventes inorgânicos, caracterizados por sua capacidade de sorver moléculas de diâmetro apropriado e realizar trocas de cátions inorgânicos sem modificar a sua estrutura, tem sido muito utilizados como eficientes sorventes de micotoxinas (DAKOVIG et al., 2007; LEMKE; GRANT; PHILLIPS, 1998). Apesar dos sorventes inorgânicos apresentarem alta eficiência na ligação com micotoxinas, exibem propriedades sorvivas de certos nutrientes e contaminação com metais pesados, não são biodegradáveis e podem acumular-se no ambiente. Devido às desvantagens dos sorventes inorgânicos em alimentos e rações, a utilização de sorventes orgânicos, tem sido proposta. Os polímeros orgânicos incluem os derivados de vegetais fibrosos (casca de aveia, farelo de trigo e fibras de alfafa), celulose, hemicelulose, pectina e extratos de parede celular de leveduras. Além do valor nutricional associado, a parede celular de levedura ou seus componentes são potenciais sorventes para micotoxinas (JOANNIS-CASSAN et al., 2011; JOUANY, 2007; YANNIKOURIS et al., 2004 b).

Aproximadamente 75% do peso seco da parede celular de levedura são constituídos por polissacarídeos. A superfície da parede é formada por moléculas de β -(1,3)-D-glucanas com alto grau de polimerização, ramificado com cadeias laterais lineares de β -(1,6)-D-glucana e quitina, enquanto que os componentes amorfos da matriz, bem como a camada fibrilar localizados sob a superfície da parede celular, são compostos por manoproteínas (Figura 5). As β -D-glucanas e a quitina são responsáveis pela rigidez da parede celular e definem a morfologia e a forma da levedura. Assim como as manoproteínas, as β -D-glucanas também modulam a resposta imune, previnem o estresse oxidativo e sua adição à rações animais suprimem os efeitos tóxicos a micotoxinas (KOGAN; KOCHER, 2007).

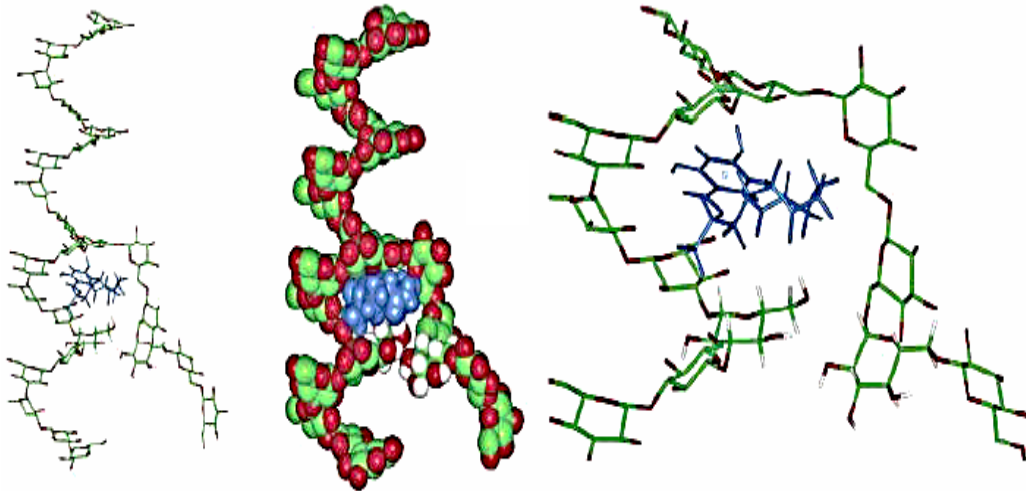
Figura 5 – Componentes da parede celular de levedura



Fonte: Kogan, Kocher (2007)

O mecanismo de sorção de micotoxinas por parede celular de leveduras não está totalmente esclarecido (JOANNIS-CASSAN et al., 2011), porém, estudos demonstram que esta possui diferentes centros de sorção, ligando-se às micotoxinas por meio de pontes de hidrogênio ou interações iônicas ou hidrofóbicas. A parede celular de leveduras, especificamente a fração β -D-glucana, está diretamente envolvida no processo de ligação com as micotoxinas. Análises por espectroscopia no infravermelho e por modelagem molecular sugerem que os grupos hidroxil, cetona e lactona da molécula de ZEA ligam-se com os grupos hidroxil da única hélice da estrutura da (1,3) β -D-glucana por meio de pontes de hidrogênio, enquanto que as interações hidrofóbicas ocorrem entre a porção fenil de ZEA e duas porções opostas de β -D-glicopirranose (Figura 6) (YANNIKOURIS et al., 2003). Alguns estudos tem relatado a eficiência de parede celular de levedura, bem como suas frações purificadas na sorção de ZEA *in vitro* (JOANNIS-CASSAN et al., 2011; SABATER-VILAR et al., 2007; YANNIKOURIS et al., 2004 c).

Figura 6 – Conformação favorável de zearalenona para a interação com β -(1,3)-D-glucana ramificada com β -(1,6)-D-glucana



Fonte: Yannikouris et al. (2004, a)

3.5.2 Eficácia de Diferentes Sorventes para Zearalenona

Estudos *in vitro* demonstram que os alumíniosilicatos são ineficientes em sorver ZEA, pois sorvem, em média, 5% da toxina (DÖLL et al., 2004). A baixa polaridade de ZEA seria a razão para a baixa afinidade aos aluminosilicatos que são muito polares. Por isso, aluminosilicatos são excelentes sorventes de aflatoxinas, devido à polaridade do grupo β -dicarbonil presente na sua molécula (GRANT; PHILIPPS, 1998; HUWIG et al., 2001).

O carvão ativado é capaz de sorver efetivamente muitas micotoxinas, como aflatoxinas, patulina, fumonisinas, OTA, ZEA e desoxinivalenol. A sorção de compostos tóxicos por carvão ativado depende de vários fatores, como o tamanho do poro, área de superfície, natureza química do composto químico e dose do sorvente. Bueno et al. (2005) avaliaram vários sorventes inorgânicos (carvão ativado, bentonita, talco e sulfato de cálcio) na remoção de ZEA *in vitro*. O carvão ativado a 0,1% sorveu 100% de ZEA em pH 3 e 7,3, enquanto que bentonita a 0,25% removeu 50% da concentração de ZEA sem apresentar aumento na eficiência da sorção com o aumento da porcentagem. Talco e sulfato de cálcio apresentaram eficiência de sorção que variou de 36,2% a 77,3% e 9,7% a 31,8%, respectivamente, dependendo da concentração de sorvente adicionada. Döll et al. (2005) demonstraram que carvão ativado em pH neutro e ácido também foi eficiente em remover ZEA *in vitro* (100%).

Apesar da alta eficiência em remover ZEA, a aplicação prática de carvão ativado em rações como sorvente de micotoxinas é restrita devido às características técnicas (formação de

poeira e coloração escura) e nutricional (sorção de minerais, vitaminas e outros nutrientes). Por isso, uma alternativa ao uso do carvão ativado são as paredes celulares de levedura (AVANTAGGIATO; SOLFRIZZO; VISCONTI, 2005; BUENO et al., 2005; RAMOS, FINK-GREMMELS, HERNANDEZ, 1996).

Joannis-Cassan et al. (2011) avaliaram diversos produtos à base de parede celular de levedura de panificação e de cerveja, e levedura alcoólica na sorção de diferentes concentrações iniciais de ZEA (0,5 a 80 $\mu\text{g/mL}$), aflatoxina B₁ (0,005 a 10 $\mu\text{g/mL}$) e OTA (0,005 a 10 $\mu\text{g/mL}$), utilizando 5 mg/mL de sorvente em pH 3,0. A sorção diminuiu com o aumento da concentração inicial para as três micotoxinas analisadas, sendo que a eficiência na sorção variou entre 11 a 68 % para ZEA, 3 a 49% para a aflatoxina B₁ e 14 a 72% para OTA.

Sabater-Vilar et al. (2007) avaliaram diferentes sorventes para ZEA. O carvão ativado exibiu sorção próxima de 100% de ZEA (1 $\mu\text{g/mL}$) em pH baixo e alto. A β -D-glucana purificada apresentou sorção de 88 e 77% em pH baixo e alto, respectivamente, enquanto que a parede celular de levedura apresentou 71 e 68% de sorção e as manoproteínas purificadas apresentaram sorção insignificante (3 e 6%). Outros sorventes (misturas de argilas minerais e misturas de substâncias húmicas) mostraram sorção em torno de 70% quando adicionados em uma concentração de 2,5 mg/mL. Shehata et al. (2000), avaliando a sorção de 30 mg/kg de ZEA com 5% de parede celular de levedura, demonstraram 50% de sorção.

Estudos experimentais realizados a 37 e 39°C mostraram que a fração β -D-glucana da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* apresenta uma afinidade de 50% por ZEA, em solução aquosa. O processo de sorção é dependente da organização tridimensional das β -D-glucanas, presumivelmente envolvendo a ocorrência de conformações individuais e/ou tripla-hélice de β -(1,3)-D-glucana. A desorganização dessa estrutura tem sido testada em várias condições de pH, sendo que condições ácidas e neutra (pH 3,0 e 6,0) foram as mais adequadas para a máxima formação do complexo com β -(1,3)-D-glucana, enquanto que condições alcalinas (pH 8,0) diminuíram a eficiência do complexo, devido ao efeito de desestabilização da organização espacial das β -D-glucanas (YANNIKOURIS et al., 2004 c).

A avaliação da eficácia de materiais sorventes e a possível utilização em rações sem causar prejuízo à saúde do animal contribui para a minimização dos efeitos tóxicos associados a micotoxinas, visando à redução das perdas econômicas e a melhoria da qualidade dos produtos de origem animal destinados à alimentação humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM DE RAÇÃO DESTINADA À ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

A amostragem da ração destinada a frangos de corte consistiu na coleta de subamostras a partir de caixas de alimentação dos comedouros automatizados do tipo “Tuboflex” (Figura 7). Os comedouros automatizados estão conectados diretamente a silos que se localizam adjacentes ao aviário. Destes a ração é levada até as caixas de alimentação, localizadas no interior dos galpões, por meio de helicóides. No sistema “Tuboflex”, roscas levam a ração das caixas, através de helicóides, para os pratos de arraçoamento (IGAYARA, 2006). Após homogeneização do material, as amostras de ração (aproximadamente 500g) foram conduzidas ao laboratório e estocadas a 4°C por no máximo 7 dias. Posteriormente, foram trituradas até a granulometria de 50 mesh em ambiente estéril e uma subalíquota de 200 g foi utilizada para determinação *Aspergillus* sp., contagem total de bolores e leveduras e ocratoxina A.

Figura 7 – Amostragem da ração destinada à alimentação de frangos de corte. Em seqüência: silo, caixa de abastecimento e pratos de arraçoamento



Fonte: ROSSI (2011)

4.2 TIPOS DE RAÇÃO DESTINADA À ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Quatro tipos de ração peletizada destinadas à alimentação de frangos de corte (pré-inicial, inicial, engorda e abate) foram coletados em uma granja comercial da Região Norte do Paraná, durante o período correspondente a um ciclo de produção (junho a agosto de 2010)

totalizando 110 amostras. As rações foram produzidas e fornecidas por uma indústria de ração.

Tabela 1 – Exemplo da composição de ração de frangos de corte em diferentes fases de crescimento.

Ingredientes	Tipo de Ração			
	Pré-Inicial	Inicial	Engorda	Abate
Milho	55,58	54,70	57,82	57,93
Fosfato bicálcico	1,98	1,83	1,74	1,74
Farelo de soja	37,10	36,62	32,90	32,88
Óleo de soja	2,75	4,35	5,39	5,37
Calcáreo	1,33	1,29	1,11	1,11
Sal	0,51	0,51	0,46	0,46
L-Lisina HCl	0,16	0,15	0,12	0,12
DL-Metionina	0,23	0,22	0,18	0,18
Premix mineral	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix vitamínico	0,13	0,12	0,10	0,10
Clor. Colina (70%)	0,11	0,09	0,06	0,06
Avilamicina	0,01	0,01	0,01	-
Monensina	0,06	0,06	0,06	-
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

Fonte: EMBRAPA (2003)

4.3 ASPERGILLUS SP. E CONTAGEM FÚNGICA TOTAL

Uma alíquota de 10 g de ração triturada (50 mesh) foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1% (v/v) e submetida a diluições seriadas em tubos contendo 9,0 mL do mesmo diluente até fator 10^{-5} . Em seguida, 1 mL de cada diluição foi plaqueado, em duplicata, pelo método de Pour Plate (semeadura em profundidade) utilizando ágar batata dextrosado (BDA - pH 4,0) adicionado de 50 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25°C por seis dias e, submetidas à identificação de *Aspergillus* sp. e à contagem fúngica total de acordo com os métodos preconizados por Nelson (1983), Singh et al. (1991) e Samson et al. (1995).

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA

A determinação da atividade de água foi realizada em medidor Aqua Lab/Decagon CX-2 calibrado com água destilada $a_w = 1,000 \pm 0,003$ a 20 – 25°C.

4.5 CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE OCRATOXINA A

Para determinar a concentração do padrão de ocratoxina A, foi realizada a calibração de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), utilizando espectrofotômetro UV/VIS. O padrão de Ocratoxina A foi dissolvido em 1 mL de metanol grau HPLC e a absorvância da solução foi determinada a 334 nm, sendo a concentração calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g micotoxina/ml} = \frac{(A \times FC \times MM \times 1000)}{E}$$

sendo:

A = absorvância

FC = fator de correção do espectrofotômetro

MM = massa molar da micotoxina (ocratoxina A = 403)

E = absortividade molar da micotoxina (ocratoxina A= 6337)

4.6 EXTRAÇÃO DE OCRATOXINA A

A extração de ocratoxina A foi realizada de acordo com o manual da Vicam[®] com algumas modificações. Uma alíquota de 15 gramas de ração foi adicionada de 1,5 g de cloreto de sódio e 30 mL de metanol:água (80:20 v/v) e, agitada a 175 rpm por 30 minutos em incubadora horizontal (shaker). Em seguida, o extrato foi filtrado em papel de filtro Whatman n°1 e 10 mL do extrato foi diluído com 40 mL tampão fosfato salina (PBS) 10 mM, pH 7. O extrato diluído foi filtrado novamente em filtro de lã de vidro Sartorius Stedim Biotech GmbH e 10 mL foi submetido a coluna de imunoafinidade Ocratest[®] (Vicam[®]) para pré-limpeza da amostra. Após a lavagem da coluna com 10 mL de tampão PBS e 10 mL de água ultra-pura para a retirada de material interferente, a ocratoxina A foi eluída com 1,5 mL de metanol grau HPLC (1-2 gotas/s). O eluato foi seco a 40°C sob fluxo de N₂ gasoso e armazenado à -20 °C para posterior análise.

4.7 DETECÇÃO DE OCRATOXINA A

A ocratoxina A foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em sistema isocrático de fase reversa, de acordo com Fujii et al. (2007). As amostras secas foram ressuspensas em 200 µL de acetonitrila:água (1:1), agitadas durante um minuto e uma alíquota de 20 µL foi injetada no Cromatógrafo, utilizando como fase móvel acetonitrila:água:ácido acético (99:99:2), pH 3,0, e fluxo de 1 mL/min. O sistema constituiu-se de bomba Shimadzu LC-10 AD, detector de fluorescência RF-10A XL e coluna C18 Luna 5µ 100Å (4,6 x 250 mm, Phenomenex). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 nm e 475 nm, respectivamente.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados como 3 vezes e 5 vezes o desvio padrão de 7 replicatas do branco de uma amostra (INMETRO, 2007).

Para o teste de recuperação, uma amostra em que não foi detectada OTA foi contaminada artificialmente com 5, 10 e 20 ng/g de ocratoxina A, em triplicata para cada nível. As amostras foram incubadas a 4°C por 24 h e submetidas à extração de OTA.

4.8 ESTIMATIVA DO GRAU DE EXPOSIÇÃO À OCRATOXINA A

A ingestão diária estimada (IDE) foi calculada de acordo com a fórmula (JARDIM; CALDAS, 2009):

IDE (ng/Kg/dia): consumo médio de ração x média de contaminação por OTA

Onde o consumo de ração foi a quantidade média de ração consumida por cada frango de corte em cada estágio de crescimento. Peso corpóreo foi o peso médio de frangos de corte em cada estágio de crescimento.

O consumo médio em cada tipo de ração destinada à alimentação de frango de corte é de 20 g na pré-inicial, 86 g na inicial, 190 g na engorda e 202 g na ração final e o peso médio de frangos de corte em cada fase de crescimento é 0,138 kg, 1,176 kg, 1,633 kg e 1,801 kg, respectivamente.

Os níveis médios de OTA em cada tipo de ração destinada à alimentação de frangos de corte, coletadas de uma granja comercial no Norte do Estado do Paraná, Brasil foram calculadas considerando que as amostras que apresentaram níveis de OTA abaixo do limite de detecção (LD), continham ½ LD, de acordo com critério recomendado pelo IPCS/GEMS

(1995) para estimar a contaminação por micotoxinas quando os valores menores que o LD são observados. O critério recomenda o seguinte: Quando todas as observações estiverem acima do LD então a média verdadeira é calculada; quando a proporção de observações menores que LD é inferior ou igual a 60%, a média é calculada substituindo estas observações por $\frac{1}{2}$ LD. No presente estudo, menos de 60% das observações estavam abaixo do LD, portanto, a média foi calculada substituindo essas observações por $\frac{1}{2}$ LD. O EDI foi calculado para cada tipo de ração: pré-inicial, inicial, engorda e abate.

4.9 TESTES DE SORÇÃO DE ZEARALENONA *IN VITRO*

4.9.1 Calibração do Padrão de Zearalenona

Para determinar a concentração do padrão de zearalenona, foi realizada a calibração de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), utilizando espectrofotômetro UV/VIS. O padrão de ZEA foi dissolvido em 1 mL de metanol grau HPLC e a absorvância da solução foi determinada a 334 nm, sendo a concentração calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g micotoxina/ml} = \frac{(A \times FC \times MM \times 1000)}{E}$$

sendo:

A = absorvância

CF = fator de correção do espectrofotômetro

MM = massa molar da micotoxina (zearalenona= 318)

E = absortividade molar da micotoxina (zearalenona= 6000)

4.9.2 Testes de Sorção com Mistura de Sorventes (Parede Celular de Levedura e Carvão Ativado)

Os experimentos de sorção foram realizados de acordo com um planejamento experimental Box Behnken (4^3) incompleto resultando em 27 experimentos. As variáveis avaliadas foram o pH (3, 4,5 e 6), concentração de ZEA (300, 750 e 1200 ng/mL), quantidade de mistura de sorvente parede celular de levedura:carvão ativado 75:25 (0,5, 1 e 1,5 %), e os

tempos de interação entre ZEA e a mistura de sorvente em 30, 60 e 90 minutos, conforme demonstrado na Tabela 2.

Para a realização dos testes, foram adicionados 25, 50 e 75 mg de sorvente em pó, correspondente a 0,5%, 1% e 1,5%, a tubos Falcon (50 ml) contendo 4,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M, com pH previamente ajustado em 3, 4,5 e 6 (referentes ao pH do trato gastrointestinal de animais monogástricos), e 0,5 mL de padrão de ZEA em metanol, nas concentrações de 300, 750 e 1200 ng/mL. Os tubos foram agitados em incubadora de bancada (shaker) a 250 r.p.m., a 37°C (temperatura média corporal de animais monogástricos), por 30, 60 e 90 minutos e centrifugados a 4000 x g por 10 minutos. Controles (sem sorvente) foram preparados simultaneamente.

4.9.3 Testes De Sorção Com Diferentes Proporções de Sorventes

Baseando-se nos resultados do experimento Box Behnken (4^3), foi desenvolvido outro planejamento estatístico Box Behnken (3^3) incompleto, com quintuplicata no ponto central, a fim de avaliar a existência de diferença significativa na sorção de ZEA entre diferentes proporções da mistura dos sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado), bem como a influência do pH e da concentrações de ZEA. As variáveis analisadas no planejamento estatístico Box Behnken (3^3) foram proporção de mistura de sorventes parede celular de levedura:carvão ativado (100:0, 87,5:12,5 e 75:25), o pH (3, 4,6 e 6) e a concentração de zearalenona (300, 750 e 1200 ng/mL). O planejamento estatístico está apresentado na Tabela 3.

De acordo com os resultados do planejamento Box Behnken (4^3), a quantidade de sorvente foi mantida em 0,5% (25 mg), pois, não houve diferença significativa ente as porcentagens de sorventes e quanto menor a quantidade de sorvente a ser adicionado em ração diminui os custos para os produtores de animais. O tempo de interação entre a ZEA e o sorvente foi mantido em 60 minutos por ser o tempo médio de digestão dos alimentos em animais e devido a não interferência do tempo no processo de sorção.

Os testes foram realizados conforme descrito no item 4.9.2.

Tabela 2 – Níveis do planejamento estatístico Box Behnken (4^3), com variáveis codificadas e decodificadas para avaliação do efeito do pH, da concentração de zearalenona, da porcentagem da mistura de sorventes parede celular de levedura/carvão ativado (75:25) e dos tempos de interação sobre sorção de zearalenona in vitro.

Ensaio	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	pH	Sorvente (%)	ZEA (ng/mL)	Tempo de incubação
1	-1	-1	0	0	3	0,5	750	60
2	1	-1	0	0	6	0,5	750	60
3	-1	1	0	0	3	1,5	750	60
4	1	1	0	0	6	1,5	750	60
5	0	0	-1	-1	4,5	1	300	30
6	0	0	1	-1	4,5	1	1200	30
7	0	0	-1	1	4,5	1	300	90
8	0	0	1	1	4,5	1	1200	90
9	0	0	0	0	4,5	1	750	60
10	0	0	0	0	4,5	1	750	60
11	-1	0	0	-1	3	1	750	30
12	1	0	0	-1	6	1	750	30
13	-1	0	0	1	3	1	750	90
14	1	0	0	1	6	1	750	90
15	0	-1	-1	0	4,5	0,5	300	60
16	0	1	-1	0	4,5	1,5	300	60
17	0	-1	1	0	4,5	0,5	1200	60
18	0	1	1	0	4,5	1,5	1200	60
19	0	0	0	0	4,5	1	750	60
20	0	0	0	0	4,5	1	750	60
21	-1	0	-1	0	3	1	300	60
22	1	0	-1	0	4,5	1	300	60
23	-1	0	1	0	3	1	1200	60
24	1	0	1	0	6	1	1200	60
25	0	-1	0	-1	4,5	0,5	750	30
26	0	1	0	-1	4,5	1,5	750	30
27	0	-1	0	1	4,5	0,5	750	90
28	0	1	0	1	4,5	1,5	750	90
29	0	0	0	0	4,5	1	750	60
30	0	0	0	0	4,5	1	750	60

x₁= pH; x₂= ZEA, x₃= % sorvente; x₄= tempo de incubação

Tabela 3 – Níveis do planejamento estatístico Box Behnken (3^3), com variáveis codificadas e decodificadas, para avaliar o efeito de diferentes proporções de sorventes, do pH e da concentração de zearalenona na sorção de zearalenona *in vitro*, fixando a quantidade de sorvente e o tempo de incubação.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	X ₁	X ₂	X ₃	*PCL:CA	pH	ZEA (ng/mL)
1	-1	-1	0	100:0	3	750
2	1	-1	0	75:25	3	750
3	-1	1	0	100:0	6	750
4	1	1	0	75:25	6	750
5	-1	0	-1	100:0	4,5	300
6	1	0	-1	75:25	4,5	300
7	-1	0	1	100:0	4,5	1200
8	1	0	1	75:25	4,5	1200
9	0	-1	-1	87,5:12,5	3	300
10	0	1	-1	87,5:12,5	6	300
11	0	-1	1	87,5:12,5	3	1200
12	0	1	1	87,5:12,5	6	1200
13	0	0	0	87,5:12,5	4,5	750
14	0	0	0	87,5:12,5	4,5	750
15	0	0	0	87,5:12,5	4,5	750
16	0	0	0	87,5:12,5	4,5	750
17	0	0	0	87,5:12,5	4,5	750

x₁= PCL:CA; x₂=pH; x₃=ZEA

*PCL/CA: Parede celular de levedura/Carvão Ativado

4.9.4 Extração de Zearalenona

Foram adicionados 0,1 g de NaCl e 20 mL de metanol:água (80:20 v/v) à uma alíquota de 4 mL do sobrenadante dos testes de sorção. Após 30 minutos de homogeneização em shaker horizontal a 150 rpm, os extratos foram filtrados em filtro Whatman N° 1 e uma alíquota de 10 ml do filtrado foi diluído em 40 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, homogeneizados e filtrados em filtro de lã de vidro Sartorius Stedim Biotech GmbH. Uma alíquota de 30 mL da solução foi aplicada à coluna de imunoafinidade (Zearalateste[®] - VICAM) com fluxo de 1-2 gotas/s e em seguida, a coluna foi lavada com 30 mL de água ultra-pura (1-2 gotas/s). ZEA foi eluída com 1 mL de metanol grau HPLC, realizada a secagem em gás N₂ a 45°C e acondicionamento a -20°C para posterior análise (Zearalatest WB[®] modificado por DE SAEGER; SIBANDA; VAN PETEGHEM, 2003).

4.9.5 Detecção de Zearalenona Sorvida

A ZEA foi determinada de acordo com Armando et al. (2012). As amostras acondicionadas foram ressuspensas em 200 μ L de metanol:água (70:30 v/v) e 20 μ L foi injetado em Cromatografo Líquido de Alta Eficiência, com sistema isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando coluna C18 Luna 5 μ 100Å (4,6 x 250 mm, Phenomenex). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 236 e 418 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol:água 70:30 v/v com fluxo de 1 mL/min. A concentração de zearalenona sorvida foi calculada subtraindo a concentração determinada nos controles da concentração determinada nos testes com sorvente, de acordo com a fórmula:

$$C_{sr} = (C_{controle} - C_{sobrenadante}) \times 100\%$$

Sendo,

C_{sr} = porcentagem de zearalenona sorvida

$C_{controle}$ = concentração de zearalenona detectada nos controles (ng/mL)

$C_{sobrenadante}$ = concentração de zearalenona detectada no sobrenadante dos testes de sorção (ng/mL)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados como 3 vezes e 5 vezes o desvio padrão de 7 replicatas do branco de uma amostra. (INMETRO, 2007).

A taxa de recuperação foi calculada pela diferença entre a concentração das soluções de ZEA determinadas por CLAE (300, 750 e 1200 ng/mL) e da concentração de ZEA encontrada nos controles do teste de sorção.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre as medias dos níveis de OTA em cada tipo de ração foram avaliadas estatisticamente utilizando ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistical, versão 9.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

Os resultados da porcentagem de sorção de ZEA *in vitro* foram analisados utilizando Statistica Versão 9.0 (Stat Soft, Inc.). Foi aplicada análise de variância ANOVA em nível de 95 % de confiança, e metodologia de superfície de resposta. Para validação da equação obtida no modelo estatístico utilizado, foi aplicado o Teste t de Student.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos sob a forma de artigos científicos a serem submetidos para publicação.

O artigo 1 foi redigido de acordo com as normas do periódico Food Chemistry.

O artigo 2 foi redigido de acordo com as normas do periódico Applied Clay Science.

ARTIGO 1:
EXPOSURE ASSESSMENT OF BROILERS TO OCHRATOXIN A THROUGH NATURALLY
CONTAMINATED FEED

ABSTRACT

The exposure of broilers to ochratoxin A (OTA) through naturally contaminated feed and the hygienic quality of feeds were evaluated. For this purpose, total fungal count and occurrence of OTA were evaluated in four feed types (pre-starter, starter, grower and finisher) intended for broilers from a poultry breeding farm in Northern Paraná State, Brazil. In most feed samples, the total fungal count was lower than 10^5 CFU/g, the maximum limit established to assure a good quality of feed. OTA was detected in 45.5 % samples at levels ranging from 0.1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ to 8.26 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. The estimated daily intake of OTA were 0.021 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ bw/day (pre-starter), 0.008 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ bw/day (starter), 0.033 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ bw/day (grower) and 0.028 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ bw/day for finisher feed samples. These results were below the NOAEL (8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ bw by day) for swine, considered the most sensitive animal to OTA, indicating that feed were safe for broiler consumption, concerning OTA.

Keywords: Mycotoxins. Ochratoxin A. Exposure assessment. Poultry.

1 Introduction

Brazil is the third largest corn producer worldwide and the Paraná State, Southern Brazil, is the main national producer. Approximately 60% of national corn production is destined to broiler and swine feed. Brazil is the third largest broiler producer worldwide and in 2011 produced approximately 13 million tons. In addition, the country is the leading exporter and the Paraná State, the main national producer accounted for 26% of exports (BRASIL, 2011). Due to the high nutritional quality and the tropical climate predominant in Brazil, corn is susceptible to contamination of mycotoxin producing fungi.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi and cause several adverse effects in animals and humans. The prevalent mycotoxins in cereals and that pose the potential risk to animal and human health are fumonisins, aflatoxins, zearalenone and OTA (CAST, 2003). Natural occurrence of mycotoxins is not restricted to raw materials and cereals, but they can be detected in processed products, due to their thermostability (Bullerman & Bianchini, 2007).

OTA is produced by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. In tropical zones, some strains of *Aspergillus westerdijkiae* and *Aspergillus ochraceus* are related to OTA contamination in stored cereals. However, cereal contamination with OTA in cool and temperate regions occur

by *Penicillium verrucosum* (CAST, 2003; Gil-Serna, Vázquez, Sardiñas, González-Jaén, & Patiño, 2011).

OTA is nephrotoxic for poultry and other animals. In broiler chickens, the main adverse effects are reduction of body weight, feed consumption, serum proteins and albumin, increase in mortality, weakness or dullness, goose plumage, transient diarrhea, liver and kidney adenocarcinoma (CAST, 2003; Stoev, 2010). These disorders result in impairment of health and performance of livestock involving economic losses to animals producers, in addition to potential human indirect exposure through the animal derived food consumption (Kuiper-Goodman, 1991). OTA has been classified as 2B carcinogen (possibly carcinogenic to humans) by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993).

OTA occurrence in poultry feed has been reported by some authors (Beg, Al-Mutairi, Beg, Al-Mazeedi, Ali, & Saeed, 2006; Jaimez, Fente, Franco, Cepeda, & Vázquea, 2004; Martins, Almeida, Camacho, Costa, & Bernardo, 2012; Schiavone, Cavallero, Giroto, Pozzo, Antoniazzi, & Cavallarin, 2008) but, to best our knowledge this is the first report on degree of exposure of broilers to OTA trough naturally contaminated feed in Brazil.

The natural occurrence of mycotoxins in feed is a problem difficult to avoid and can cause great economic losses to broiler producers. Moreover, carry-over of mycotoxins to tissues, blood, breasts and liver becomes potential risk to human health. Determination of the exposure degree is one of the most important parameters for the risk assessment of chemical compounds. Therefore, the aim of this study was to estimate the exposure degree of broilers to OTA through naturally contaminated feed in Northern Paraná State, Brazil.

2 Material and Methods

2.1 Sampling

A total of 110 pelleted feed samples intended for broilers was collected from a poultry breeding farm in Northern Paraná State, Brazil, from June to August 2010. Samples included four feed types, i. e., pre-starter (n=14), starter (n=22), grower (n=51) and finisher samples (n=23), corresponding to one cycle of poultry production. This poultry breeding farm is one of the largest poultry growers in the Paraná State (60,000 birds/production cycle). Samplings were performed from the deposits of Tuboflex feeders. The samples were homogenized and 500 g of each feed sample was sent to the laboratory and maintained at 4°C for a maximum of

7 days for microbiological analysis. For ochratoxin A determination, 200 g of each sample were ground to 50 mesh and stored at - 20°C.

2.2 *Aspergillus sp. and total fungal count*

Sub-samples (10 g) of feed, ground to 50 mesh, were blended with 90 ml of sterile 0.1 % peptone water (v/v), and serial dilutions were carried out with 9.0 ml of the same diluent to 10^{-5} . One milliliter of each dilution was transferred into a Petri dish and pour-plated with potato dextrose agar (PDA, pH 4.0), added to 50 µg/ml chloramphenicol and incubated at 25°C for 7 days. After total fungal colony count, *Aspergillus sp.* were identified according to Samson, Hoeskstra, Frisvad & Filtenborg, 1995.

2.3 *Water activity (a_w) determination*

The water activity was performed by Aqua Lab/Decagon CX-2 using distilled water for calibration ($a_w = 1,000 \pm 0,003$) at 20 – 25°C.

2.4 *Ochratoxin A extraction*

OTA extraction was performed according to the methodology proposed by Vicam® manual, with some modifications. An aliquot of 15 g feed sample was shaken at 175 rpm with 1.5 g NaCl and 30 mL methanol-water (80:20 v/v) for 30 minutes. After filtration a 10 ml of crude extract was diluted with 40 ml phosphate-buffer saline (PBS) 10 mM pH 7.4 and then filtered through a glass microfiber filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH). Then, 10 ml of the diluted extract was passed through the Ochratest immunoaffinity column (Vicam Inc., Water Town, USA). After washing the column with 10 ml PBS and 10 ml ultra-pure water, OTA was eluted with 1.5 ml methanol. The eluate was dried under a nitrogen stream, at 40°C.

2.5 *Ochratoxin A Detection*

Ochratoxin A was analyzed according to Fujii et al. (2007). Sample residues were dissolved in 200 µL of acetonitrile:water (1:1), mixed for 1 minute and an aliquot (20 µL) was injected into HPLC. Ochratoxin A was analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a C-18 Luna

Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Spain). Excitation and emission wavelengths were 335 and 475 nm, respectively. The mobile phase was acetonitrile:water:acetic acid (99:99:2) and the flow rate was 1 mL/min.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.05 and 0.1 µg/Kg, respectively, defined as 3-fold and 5-fold the standard deviation of 7 replications of unspiked sample on different days. The recovery rate of OTA from spiked feed samples in the range 5 – 20 µg/kg averaged 83.21% (mean CV 6.83%).

2.6 *Statistical Analysis*

Differences in mean ochratoxin A levels in each feed type were evaluated statistically using ANOVA and the Tukey multiple-comparison test ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed by Statistic software, version 10 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA).

2.7 *Estimated OTA Daily Intake*

The estimated daily intake (EDI) was calculated according to the following formula (Jardim & Caldas, 2009):

$$\text{EDI } (\mu\text{g/kg/day}) = \frac{\text{feed consumption} \times \text{mean OTA level}}{\text{body weight}}$$

Feed consumption was the average amount of feed consumed by each broiler at each growth phase. Body weight was the average body weight of broilers for each growth phase.

OTA levels in four feed types intended for broilers from a poultry breeding farm in Northern Paraná State, Brazil were evaluated, considering the values below the detection limit as $\frac{1}{2}$ LOD, according to the recommendation of the IPCS/GEMS (1995) criteria adopted to estimate mycotoxin contamination when values lower than the LOD are observed. The criteria were as following: When all observations were over the LOD then the true mean is calculated; when the proportion of observations less than LOD is lower than or equal to 60%, the mean is calculated replacing those observations by LOD/2. In the present study, lower than 60% of observations were less than LOD, the mean was calculated replacing those observations by LOD/2. EDI was estimated for each feed type (pre starter, starter, grower and finisher).

3 Results and Discussion

The relative frequency of *Aspergillus* sp. and the total fungal count in 110 feed samples intended for broilers is shown in Table 1. *Aspergillus* sp. was detected in 95.5 to 100% in four feed type. Despite the high frequency, *Aspergillus* sp. was detected predominantly at low levels of contamination (from $<10^3$ to $<10^4$ CFU/g). Mean values of the total mould and yeast count (Table 1) ranged from 3.9×10^3 (grower feed) to 3.8×10^4 CFU/g. In 100% pre starter, 97% starter, 100% grower and 100% finisher feed the total mould and yeast count were lower 10^5 CFU/g, the maximum limit established to assure a good quality of feed (Chelkowsky, 1991).

Rosa et al. (2006) also reported that *Aspergillus* sp. was the prevalent genus in 96 poultry feed samples from Rio de Janeiro State, Brazil, but at higher mean contamination of 4.1×10^5 CFU/g. The low fungal counts in this study can be due to the pelleting process of poultry feeds that uses heat during their fabrication (115°C, 60 min) (Fraga, Curvello, Gatti, Cavaglieri, Dalcerro & Rosa, 2007). Astoreca, Dalcerro, Fernandes Pinto & Vaamonde (2011) demonstrated higher *Aspergillus* sp. contamination in raw materials and ground feeds (4×10^4 to 8×10^4 CFU/g), than pelleted finished poultry feeds ($< 1 \times 10^3$ CFU/g).

The water activity (a_w) ranged from 0.50 to 0.71 in all feed types which favored the growth of *Aspergillus* sp. Almeida et al. (2000) also reported the highest frequency of *Aspergillus* sp. at a_w from 0.60 to 0.70 in freshly harvested corn grains from São Paulo State, Brazil.

OTA levels in 110 feed samples are shown in Table 2. OTA was detected in 42.8% starter and 40.9% pre-starter feed samples at mean levels of 0.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. In grower and finisher feed samples, OTA was detected in 43.1 % and 52.2 % at mean levels of 0.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. There was no significant difference ($p < 0.05$) in the mean OTA levels among all the feed types. Mean OTA levels were similar to those reported by Jaimez et al. (2004), but lower than Beg et al. (2006), Schiavone et al. (2008) and Martins et al. (2012). In Spain, Jaimez et al. (2004) evaluated 14 feed samples intended for poultry and detected OTA in 42.9% at mean level of 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (range from 0.42 to 0.58 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Beg et al. (2006) analyzed 14 starter and 19 finisher feed for broilers, in Kuwait, and detected OTA in 92.9% and 90% of the samples with mean levels of 8.0 and 6.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. In Italy, Schiavone et al (2008) detected OTA in 6 feed samples for broilers (n=6) with mean level of 0.91 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (range from 0.09 to 3.31 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Martins et al.

(2012) detected mean OTA levels of 3.5 and 4.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, in 186 feed samples intended for laying hens in 2009 and 2010, respectively, collected from factories in Portugal.

Low OTA levels ranging from 0.1 to 1.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Figure 1) were predominant in all positive feed samples (99%) and in only one sample OTA was detected at 8.26 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ level. Figure 2 shows the OTA chromatogram with contamination level of 8.26 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

All the positive samples showed OTA levels below the maximum recommended for poultry feed (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), according to the Commission of the European Communities (2006), indicating that the feed samples were safe for broiler consumption, concerning OTA. In Brazil, there are no specific regulations for OTA in broiler or poultry feed.

Exposure assessment is an important step for the risk assessment of OTA and consists in quantitative evaluation of its intake by animals via feed (Ringot & Chango, 2010). In this study, the estimated daily intake (EDI) of OTA was calculated based on the mean OTA levels in each feed type intended for broilers, the daily feed average consumption and body weight (bw) reached at each growth stage (Table 3).

The EDI of OTA by broilers at each growth stage was 0.021 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ bw/day (pre-starter), 0.008 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ bw/day (starter), 0.033 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ bw/day (grower) and 0.028 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day (finisher feed).

There are no specific parameters for OTA safe daily intake for broilers or poultries to evaluate if this OTA intake would cause any hazard to health of animals. The NOAEL (Non Observed Adverse Effects Levels) or LOAEL (Low Observed Adverse Effects Levels) for OTA for broilers or poultries have not been established yet. However, the EDI can be compared with the LOAEL for pigs, which are considered the most sensitive animal to OTA (EFSA, 2004). The LOAEL for pigs was established in a study performed for 90 days in pigs fed with a dose of 8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ bw/day of OTA and caused a reduction in renal enzyme activity of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase and *gamma*-glutamyl transpeptidase followed by decreased renal function (EFSA, 2004). Considering that the LOAEL for pigs is 8 μg OTA/ Kg bw/day, the EDI values for growth phase of broiler were much lower than this LOAEL, indicating that all feed types is safe for broiler consumption, concerning OTA.

In summary, OTA levels in broiler feed samples were lower than those recommended by the Commission of the European Communities. Moreover, exposure degree of broilers to OTA in Northern Paraná State was lower than the LOAEL for pigs. Nevertheless, a continuous monitoring of feed producing chain is essential in order to ensure poultry product quality and minimize human health hazard.

Acknowledgments

The authors thank the CAPES (Co-ordination for Formation of High Level Professionals), CNPq (the Brazilian Government Organisation for Grant Aid and Fellowship to Brazilian Researchers), FINEP, the Araucária Foundation, PPSUS/Brazilian Ministry of Health, Paraná Fund/SETI for the financial support.

References

- Almeida, A. V. A. F., Botura, M. B., Abreu, R. D., Bittencourt, T. C. C., & Batatinha, M. J. M. (2000). Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no estado da Bahia. *Arquivo do Instituto Biológico*, 76, 353-358.
- Astoreca, A. L., Dalcerro, A. M., Fernández Pinto, V., & Vaamond, G. (2011). *International Journal of Food Microbiology*, 146, 38–43.
- Beg, M. U., Al-Mutairi, M., Beg, K. R., Al-Mazeedi, H. M., Ali, L. N., & Saeed, T. (2006). Mycotoxins in poultry feed in Kuwait. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 594-602.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Aves, 2012. URL: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Accessed 11.10.2012.
- Bullerman, L.B., & Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 140-146.
- CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology. (2003). *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*. Ames, Iowa: Task Force Report.
- Chelkowski, J. (1991). Mycological quality of mixed feeds and ingredients. In: J. Chelkowski (Ed.), *Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage* (pp. 217–227). Amsterdam: Elsevier.
- Cobb-Vantress. Suplemento de crescimento e nutrição para frangos de corte, 2008. URL: http://www.cobbvantress.com/contactus/brochures/Cobb500_BPN_PORT.pdf>. Accessed 20.10.2012.
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 101: 1-36.
- European Commission (2006). Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 toxins and fumonisins in products for animal feeding. *Official Journal of the European Union*, L 229: 7-9.

- Fraga, M. E., Curvello, F., Gatti, M. J., Cavaglieri, L. R., Dalcerro, A. M., & Rosa, C. A. R. (2007). Potential aflatoxin and ochratoxin a production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. *Veterinary Research Communications*, 31, 343–353.
- Fujii, S., Ono, E. Y. S., Ribeiro, R. M. R., Assunção, F. G. A., Takabayashi, C. R., Oliveira, T. R. M., Itano, E. Y., Ueno, Y., Kawamura, O., & Hirooka, E. Y. (2007). A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. *Brazilian Archives of Biology And Technology*, 50, 349-359.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M. T., & Patiño, B. (2011). Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 22, 343-345.
- IARC. (1993). Ochratoxin A. In: IARC, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins* (pp.489–521). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- IPCS/GEMS – Internacional Programme on Chemical Safety (1995). *Food Euro workshop on reliable evaluation of low level contamination of food*. Appendix 5, Germany, May.
- Jaimez, J., Fente, A. C., Franco, C. M., Cepeda, A., & Vázquez, B. I. (2004). A survey of the fungal contamination and presence of ochratoxin A and zearalenone on Spanish feed and raw materials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 832-840.
- Jardim, A. N. O., & Caldas, E. D. (2009). Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*, 32, 1898-1909.
- Kuiper-Goodman, T. (1991). Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. *Veterinary & Human Toxicology*, 33, 325-333.
- Martins, H. M., Almeida, I., Camacho, C., Costa, J. M., & Bernardo M. (2011). A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds for swine and laying hens. *Mycotoxin Research*, 28, 107-110.
- Ringot, D., & Chango, A. Risk Assessment of Ochratoxin A. (2010) In: M. Rai, & A. Varma (Eds), *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons* (pp. 307-328). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rosa, C. A. R., Ribeiro, J. M. M., Fraga M. J., Gatti, M., Cavaglieri, L. R., Magnoli, C. E., Dalcerro, A. M., & Lopes, C. W. G. (2006). Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Veterinary Microbiology*, 113, 89-96.
- Samson, R. A., Hoeskstra, E. S., Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (1995). *Introduction to food-borne fungi*. 4.ed. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Schiavone, A., Cavallero, C., Girotto, L., Pozzo, L., Antoniazzi, S., & Cavallarin, L. (2008). A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds and sera collected in conventional and organic poultry farms in Northern Italy. *Italian Journal of Animal Science*, 7, 495-503.

Stove, S. D. (2010). Studies on carcinogenic and toxic effects of ochratoxin A in chicks. *Toxins*, 2, 649-664.

Table 1 – Distribution of *Aspergillus* sp. and total fungal count at four contamination levels in four feed types (n=110) intended for broilers from a poultry breeding farm in Northern Paraná State, Brazil.

Fungal genera	Feed type	N	RF ^y (%)	Mean CFU/g	Percentage of samples with contamination			
					< 10 ³	10 ³ - <10 ⁴	10 ⁴ - <10 ⁵	10 ⁵ - < 10 ⁶
<i>Aspergillus</i> sp.	Pre-Starter	14	100	7.1 × 10 ³	50	50	-	-
	Starter	22	100	2.8 × 10 ³	81	19	-	-
	Grower	51	95.5	1.0 × 10 ³	89	11	-	-
	Finisher	23	100	3.3 × 10 ³	72	28	-	-
Total count ^w	Pre-Starter	14		1.3 × 10 ⁴	36	57	7	-
	Starter	22		3.8 × 10 ⁴	55	36	6	3
	Grower	51		3.9 × 10 ³	76	23	1	-
	Finisher	23		8.5 × 10 ³	57	43	-	-

^wTotal count = Total mould and yeast count

^yRF = Relative frequency

Table 2 – Ochratoxin A levels in four feed types (n=110) intended for broilers from a poultry breeding farm in Northern Paraná State, Brazil

Feed Type	N	a _w	Ochratoxin A (µg/kg)			
			Positive Samples (%)	Mean ¹	Median ¹	Range
Pre-starter	14	0.62	42.8	0.29 ^a	0.14	0.1 – 1.02
Starter	22	0.66	40.9	0.19 ^a	0.11	0.1 – 0.37
Grower	51	0.60	43.1	0.59 ^a	0.17	0.1 – 8.26
Finisher	23	0.58	52.2	0.28 ^a	0.22	0.1 – 0.87

^aMeans followed by the same letter are not significantly different by the Tukey test ($p < 0.05$).

¹Positive samples

Figure 1 – Distribution of ochratoxin A levels in pre-starter (n=14), starter (n=22), grower (n=51) and finisher (n=23) feed samples from a poultry breeding farm Northern Paraná State, Brazil.

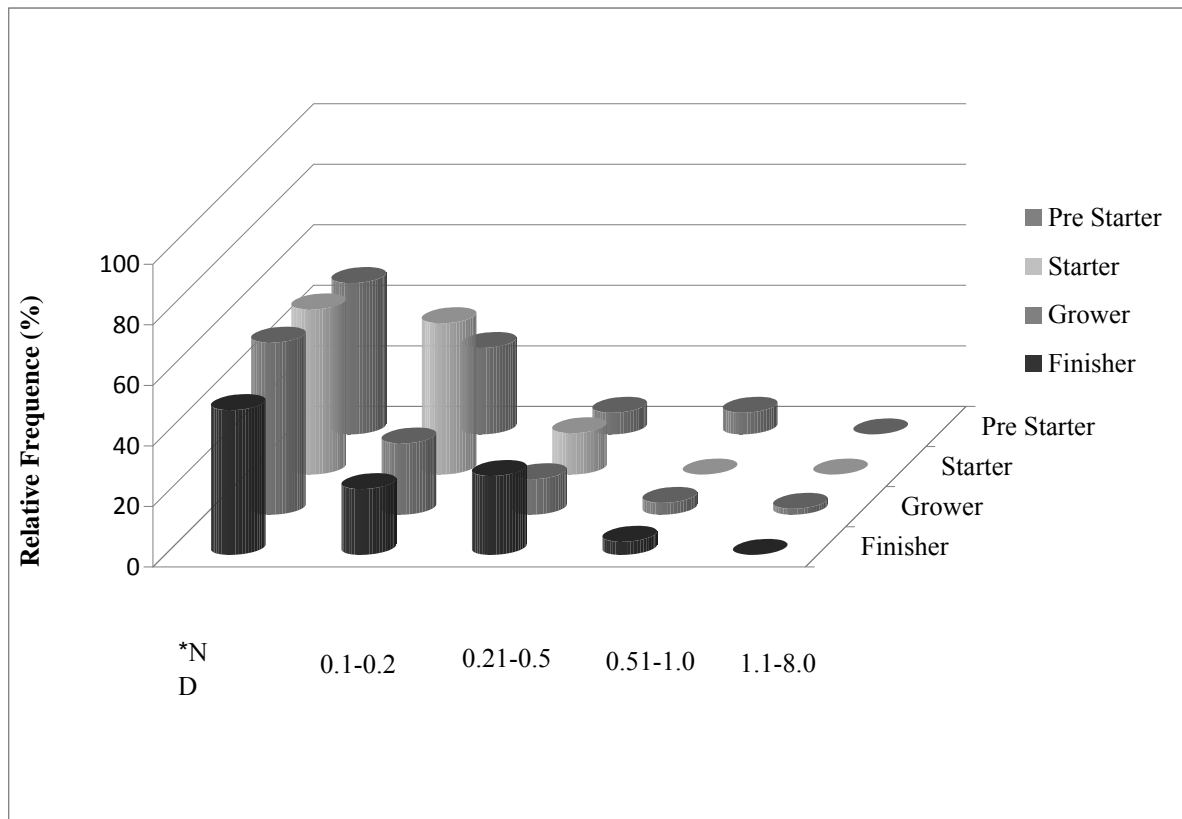


Figure 2 – Ochratoxin A chromatogram from a naturally contaminated feed sample with 8.26 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ level from a poultry breeding farm in Northern Paraná State, Brazil. Ochratoxin A retention time was 12.958 min.

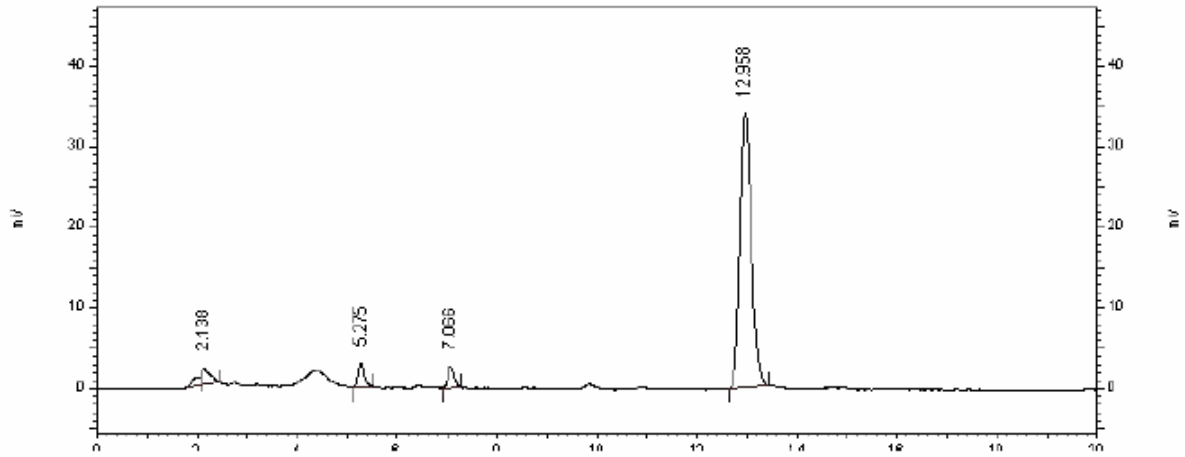


Table 3 – Mean ochratoxin A levels for each feed type, broiler weight (bw) and estimated daily intake (EDI) by broilers at different growth phases in one production cycle.

Feed Type	Growth Phase (days)	Feed Consumption (g) ^w	Body Weight (kg) ^y	Mean OTA Levels (µg/kg) ^z	EDI (µg/kg OTA bw/day)
Pre-Starter	1 - 7	20	0.138	0.15	0.021
starter	8 - 21	86	1.176	0.11	0.008
grower	22 - 42	190	1.633	0.28	0.033
Finisher	43 - 49	202	1.801	0.16	0.018

^w Average feed consumption by each broiler at each growth phase, according to Cobb Vantress manual (2008)

^y Average body weight of broilers for each growth phase

^z Mean OTA calculated considering the values below detection limit as ½ LOD (IPCS/GEMS, 1995)

ARTIGO 2:

SORÇÃO DE ZEARALENONA *IN VITRO* POR MISTURA DE SORVENTES ORGÂNICO E INORGÂNICO

RESUMO

A sorção de zearalenona (ZEA) por mistura de sorventes orgânico (parede celular de levedura) e inorgânico (carvão ativado) foi avaliada por meio de um delineamento estatístico Box Behken (3^3) com quintuplicata no ponto central. As variáveis analisadas foram diferentes proporções dos sorventes - parede celular de levedura e carvão ativado (100:0; 87,5:12,5 e 75:25), pH (3,0, 4,5 e 6,0) e concentrações de ZEA (300, 750 e 1200 ng/mL). O experimento foi conduzido fixando-se a porcentagem de mistura dos sorventes em 0,5% e o tempo de incubação em 60 minutos, resultados obtidos por meio do delineamento estatístico Box Behnken (4^3), realizado previamente. A proporção da mistura em 75:25 apresentou melhor eficácia na sorção de ZEA ($> 96,13\%$), comparada com a proporção 87,5:12,5 (81,34 a 93,67%) e com a parede celular de levedura pura 100:0 (55,7 a 78,13%). As variáveis significativas foram a proporção da mistura dos sorventes e a concentração de ZEA. O efeito do pH (3,0, 4,5 e 6,0) não foi significativo em nível de 5%, indicando que a ligação entre ZEA e o sorvente é estável em todo trato gastrointestinal. O modelo pode ser utilizado para fins preditivos, devido um desvio não significativo ($p = 49,54\%$) e um bom coeficiente de correlação (R^2) de 0,98, sugerindo que a sorção de ZEA será máxima (100%) quando a proporção de mistura dos sorventes é fixada em 75:25 e a concentração de ZEA em 300 ng/mL. A mistura de sorventes parede celular de levedura e carvão ativado na proporção de 75:25 apresenta potencial para aplicação em rações animais, visando diminuir os riscos da contaminação por ZEA.

Keywords: Zearalenona. Sorvente. Parede celular de levedura. Carvão ativado.

1 Introdução

A zearalenona (ZEA) é um metabólito secundário tóxico produzido por fungos do gênero *Fusarium*, incluindo *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum* e *F. verticillioides*. É frequente contaminante do milho, mas pode ser encontrada em outros cereais como trigo, sorgo, cevada e centeio em regiões de clima temperado e quente (CAST, 2003).

A contaminação de cereais e rações por ZEA destinada à alimentação de seres humanos e animais tem sido detectada em todo o mundo (Queiroz et al., 2012; Thiel et al., 2008). A ZEA causa alterações no sistema reprodutivo, principalmente em suínos, como diminuição da fertilidade, morte embrionária, nascimento de leitões fracos, feminização de suínos machos, diminuição da produção de espermatozoides e diminuição da libido (CAST, 2003; JECFA, 2000).

Devido aos efeitos adversos e aos prejuízos econômicos causados por ZEA, várias estratégias tem sido aplicadas para minimizar a contaminação em grãos e rações, como métodos químicos, físicos e biológicas. Porém, muitos desses métodos são caros, geram produtos de degradação tóxicos e possuem eficácia limitada. Uma alternativa promissora para minimizar o risco de micotoxicoses é a utilização de sorventes, os quais formam ligações estáveis com as micotoxinas no trato gastrointestinal e impedem que sejam absorvidas e, conseqüentemente, a toxicidade sistêmica no organismo (Jouany, 2007; Huwig et al., 2001).

Carvão ativado e parede celular de leveduras ou seus componentes, como a β -D-glucana, tem sido os sorventes mais eficientes e utilizados para sorver ZEA em rações. O carvão ativado demonstra eficiência de aproximadamente 100% na remoção de ZEA, porém, seu uso é restrito devido à formação de poeira e sorção de minerais, vitaminas e outros nutrientes (Bueno et al., 2005; Joannis-Cassan et al., 2011; Huwig et al., 2001; Sabater-Vilar et al., 2007). Apesar de a parede celular de levedura apresentar menor eficácia na sorção de ZEA (< 71%), possui a vantagem de complexar várias micotoxinas sem prejudicar o meio ambiente ou reduzir a biodisponibilidade de certos nutrientes e pode ser adicionado em alimentos e ração contaminados para sorver micotoxinas seletivamente (Sabater-Vilar et al., 2007; Yannikouris et al., 2006). Devido às conhecidas propriedades sortivas do carvão ativado e da parede celular de levedura, a mistura desses sorventes foi selecionada neste estudo para avaliação da sorção de ZEA.

Estudos anteriores sobre a sorção de ZEA analisaram os efeitos das variáveis experimentais separadamente, os quais falham em localizar as condições ótimas devido à dificuldade em mostrar os possíveis efeitos de interação dos fatores (Kalil et al., 2000). O delineamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta são importantes ferramentas para determinar as condições ótimas do processo e tem sido utilizada em muitas áreas da Biotecnologia. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de uma mistura de sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado) na sorção de ZEA *in vitro* por meio de planejamento fatorial estatístico e análise de superfície de resposta.

2 Material e Métodos

2.1 Delineamento Experimental para os Testes de Sorção

Os sorventes foram disponibilizados pela empresa SLO Agropecuária. Os experimentos de sorção de ZEA foram realizados de acordo com um delineamento

experimental Box Behnken (4^3) incompleto, resultando em 30 experimentos. As variáveis avaliadas foram o pH (3, 4,5 e 6), concentração de ZEA (300, 750 e 1200 ng/mL), porcentagem da mistura dos sorventes - parede celular de levedura e carvão ativado na proporção de 75:25 (0,5, 1 e 1,5%), e os tempos de interação entre ZEA e a mistura de sorvente em 30, 60 e 90 minutos.

Os resultados do planejamento Box Behnken (4^3) apresentaram alta eficiência (97,6 a 99,7%) dos sorventes parede de celular de levedura e carvão ativado (75:25) na sorção de ZEA e não houve diferença significativa para todas as variáveis analisadas em nível de 5%.

Baseando-se nestes resultados do experimento Box Behnken (4^3), a porcentagem de sorvente foi fixada em 0,5% e o tempo em 60 min., a fim de avaliar a eficácia de proporções menores de carvão ativado na mistura com parede celular de levedura, por meio de outro delineamento estatístico Box Behnken (3^3) incompleto, com quintuplicata no ponto central, totalizando 17 experimentos.

A porcentagem de sorvente foi fixada em 0,5%, pois não houve diferença significativa entre as porcentagens de sorventes e quanto menor a quantidade de sorvente a ser adicionada em razão diminuem os custos para os produtores de animais; e o tempo de incubação em 60 minutos, por ser o tempo médio de digestão dos alimentos em animais e devido a não interferência do tempo no processo de sorção.

As variáveis analisadas no delineamento Box Behnken (3^3) foram proporção de mistura dos sorventes - parede celular de levedura e carvão ativado (100:0, 87,5:12,5 e 75:25), pH (3, 4,5 e 6) e concentração de ZEA (300, 750 e 1200 ng/mL).

2.2 *Ensaio de Sorção de Zearalenona in vitro*

Para a realização dos testes de sorção, foram adicionados 25, 50 e 75 mg de sorvente em pó, correspondente a 0,5%, 1% e 1,5%, a tubos Falcon (50 mL) contendo 4,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M, com pH previamente ajustado em 3,0, 4,5 e 6,0 (correspondentes ao pH do trato gastrointestinal de animais monogástricos) e 0,5 mL de padrão de ZEA em metanol, nas concentrações de 300, 750 e 1200 ng/mL. Os tubos foram agitados em incubadora de bancada (shaker) a 250 r.p.m., a 37°C (correspondente a temperatura corporal dos animais) por 30, 60 e 90 min. e centrifugados a 4000 x g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para determinar a ZEA sorvida. Controles (sem sorvente) foram preparados simultaneamente e a concentração de zearalenona sorvida foi calculada

subtraindo-se a concentração determinada nos controles da concentração determinada no sobrenadante dos testes com sorvente, de acordo com a fórmula:

$$C_{sr} = (C_{\text{controle}} - C_{\text{sobrenadante}}) \times 100\%$$

Sendo,

C_{sr} = porcentagem de zearalenona sorvida

C_{controle} = quantidade de zearalenona detectada nos controles (ng/mL)

$C_{\text{sobrenadante}}$ = quantidade de zearalenona detectada no sobrenadante dos testes de sorção (ng/mL).

2.3 *Determinação de Zearalenona Sorvida*

Foram adicionados 0,1 g de NaCl e 20 mL de metanol:água (80:20 v/v) a uma alíquota de 4 mL do sobrenadante dos testes de sorção. Após 30 minutos de homogeneização em shaker horizontal a 150 rpm, os extratos foram filtrados em papel de filtro e uma alíquota de 10 mL do filtrado foi diluída em 40 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, homogeneizados e filtrados em filtro de 0,2 μm . Uma alíquota de 30 mL da solução foi aplicada à coluna de imunoafinidade (Zearalatest[®] - VICAM) com fluxo de 1-2 gotas/s e em seguida, a coluna foi lavada com 30 ml de água ultra-pura (1-2 gotas/s). A ZEA foi eluída com 1 mL de metanol grau HPLC, seca em gás N_2 a 45°C e acondicionada a -20°C para posterior análise (Zearalatest WB[®] modificado por De Saeger et al., 2003).

A ZEA foi determinada de acordo com Armando et al. (2012). As amostras acondicionadas foram ressuspensas em 200 μl de metanol:água (70:30 v/v) e 20 μL foram injetados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, com sistema de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando coluna C-18 Luna Phenomenex (250 x 4.6 mm, 5 μm , Scharlau, Barcelona, Spain). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 280 e 460 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol:água 70:30 (v/v) com fluxo de 1 mL/min.

Os limites de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram 1,3 ng/mL e 2,35 ng/mL, respectivamente, definidas como 3 vezes e cinco vezes o desvio padrão de 7 replicatas do branco da amostra (INMETRO, 2007).

A recuperação média foi de 85,47%, determinada pela diferença entre a concentração das soluções de ZEA determinadas por CLAE (300, 750 e 1200 ng/mL) utilizadas no teste de

sorção e a concentração de ZEA encontrada nos controles do teste de sorção. A Figura 1 mostra o cromatograma de ZEA obtido do teste controle de 300 ng/mL.

2.5 *Análise Estatística*

Os resultados da eficácia da sorção de ZEA pela mistura de sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado) foram analisados utilizando Statistica Versão 9.0 (Stat Soft, Inc.) Foi aplicada análise de variância ANOVA em nível de 95% de confiança, e metodologia de superfície de resposta. Para validação da equação obtida no modelo estatístico utilizado, foi aplicado o Teste t de Student.

3 **Resultados e discussão**

Os resultados do planejamento experimental Box Behnken (4^3) (Tabela 1) mostraram que a mistura dos sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado em proporção 75:25) apresentou alta eficiência na sorção de ZEA *in vitro* (97,6 a 99,7%). Não houve diferença significativa na sorção de ZEA em nível de 5% para todas as variáveis analisadas, indicando que a mistura é eficiente em sorver vários níveis de ZEA (300 ng/mL a 1200 ng/mL) e em diferentes pH do trato gastrointestinal dos animais (3,0 a 6,0). Considerando que as porcentagens de sorventes (0,5, 1 e 1,5%) e o tempo de incubação (30, 60 e 90 min.) não interferiram no processo de sorção, foram selecionados a porcentagem de 0,5% e o tempo de 60 min, para realizar novos testes por meio de um planejamento experimental Box Behnken (3^3), uma vez que menores quantidades de sorventes a serem adicionadas em rações diminuem os custos para produtores de animais, e o tempo corresponde a um tempo médio de digestão.

As variáveis do planejamento experimental Box Behnken (3^3) consistiram de diferentes proporções dos sorventes parede celular de levedura e carvão ativado, pH e concentrações de ZEA, a fim de avaliar se proporções menores da mistura dos sorventes apresentariam eficácia similar na sorção de ZEA quando comparada com a eficácia da proporção 75:25. As variáveis codificadas e decodificadas do delineamento experimental Box Behnken (3^3), bem como a porcentagem de sorção de ZEA está apresentada na Tabela 2.

Em relação à eficiência da sorção utilizando diferentes proporções da mistura, a proporção de parede celular de levedura e carvão ativado 100:0, ou seja, parede celular de levedura sem adição de carvão ativado apresentou sorção variando de 55,7 a 78,13%. A

mistura com parede celular de levedura e carvão ativado na proporção de 87,5:12,5 apresentou alta afinidade na sorção de ZEA *in vitro* (81,34 a 93,67%), porém a proporção 75:25 foi a mais efetiva (> 96,13%).

Os resultados estão de acordo com Shehata et al. (2000), Sabater-Vilar et al. (2007) e Joannis-Cassan et al. (2011). Shehata et al. (2000) demonstraram 100% de sorção de ZEA (30 mg/kg) por carvão ativado (0,1%). Por outro lado, a parede celular de levedura (5%), apresentou eficiência de 50% na sorção de ZEA *in vitro*. Sabater-Vilar et al. (2007) relataram uma eficácia de 100% na sorção de ZEA (1 µg/mL) por carvão ativado (2,5%) em pH 3,0 e 6,0. A β-D-glucana purificada (5%) apresentou eficiência de 88% na sorção em pH 3,0 e 77% em pH 6,0, enquanto que a parede celular de levedura sorveu entre 71% e 68%, respectivamente. Joannis-Cassan et al. (2011) avaliaram a eficácia de vários sorventes (5 mg/ml) a base de parede celular de levedura na sorção de ZEA com concentrações variando de 590 ng/mL a 72900 ng/mL. A porcentagem de sorção variou de 16% a 68%, sendo que a sorção diminuiu com o aumento da concentração inicial de ZEA. A alta eficiência da mistura em sorver ZEA *in vitro* (Tabela 2) provavelmente se deve a presença do carvão ativado, uma vez que foi relatado que o carvão ativado foi capaz sorver 100% de ZEA e a parede celular de levedura, 50 a 70% (Sabater-Vilar et al., 2007).

Os resultados obtidos por meio da análise de variância do planejamento Box Behnken (3³) (Tabela 3) mostram que as variáveis, proporção dos sorventes parede celular de levedura e carvão ativado (x₁) e a concentração de ZEA (x₃) foram significativas em nível de 5% nos termos lineares e quadráticos, sendo que o efeito foi positivo e negativo, respectivamente. O modelo obtido por meio do delineamento experimental Box Behnken (3³) pode ser utilizado para fins preditivos, uma vez que apresentou um desvio não significativo (p= 49,54%) e um alto coeficiente de correlação (R²= 0,98). De acordo com Joglekar e May (1987), para se obter um bom ajuste, o valor de R² deve ser superior a 0,80. A equação do modelo quadrático está apresentado na Equação 1.

$$Y = 83,93* + 16,48* x_1 + 1,40x_2 - 4,57*x_3 - 4,96*x_1^2 + 0,83x_2^2 + 3,71*x_3^2 - 2,79*x_1x_2 + 5,74*x_1x_3 - 1,02x_2x_3 \quad (1)$$

Onde Y representa a porcentagem de sorção de ZEA; x₁, x₂ e x₃ representam as variáveis codificadas para a proporção de mistura dos sorventes parede celular de levedura e carvão ativado, pH e concentração de ZEA, respectivamente. Os termos que apresentam asterico (*) são significativos em nível de 5%. O modelo preditivo das variáveis

independentes na sorção de ZEA *in vitro* sugere que a sorção de ZEA será máxima (100%) quando a proporção de mistura de sorvente é fixado na variável codificada +1 (proporção de mistura dos sorventes parede celular de levedura e carvão ativado 75:25) e a concentração de ZEA em -1 (300 ng/mL).

O gráfico de Pareto (Figura 2) mostra que a variável significativa ($p < 0,05$) que mais influenciou na sorção de ZEA *in vitro* foi a proporção de mistura de parede celular de levedura e carvão ativado (x_1), seguida da concentração de ZEA (x_3). A Figura 3 apresenta o gráfico da superfície de resposta para a sorção de ZEA em função da proporção de sorvente e da concentração de ZEA, fixando a variável x_2 no nível +1 (pH 6,0), uma vez que não houve diferença significativa na sorção de ZEA em função dos valores de pH, como demonstrado na Equação 1 e na Figura 3. A maior sorção de ZEA (100%) ocorreu quando foi utilizado maior proporção da mistura parede celular de levedura e carvão ativado (75:25), independente da concentração de ZEA. Apesar do modelo preditivo (Equação 1) mostrar que um aumento na eficiência na sorção ocorreria com menor concentração de ZEA (300 ng/mL), a mistura na proporção 75:25 apresentou alta eficiência na sorção ($> 98\%$) quando foi utilizada alta concentração de ZEA (1200 ng/mL) (Figuras 2 e 3), indicando que a mistura é capaz de sorver uma ampla faixa de contaminação por ZEA *in vitro*.

Em pH 3,0 a 6,0, a eficácia da sorção de ZEA utilizando parede celular de levedura e carvão ativado 75:25 variou entre 96,1 e 98,7%, dependendo da concentração de ZEA, indicando que as variações no pH fisiológico do trato gastrointestinal não interfeririam no processo de sorção. Por outro lado, a parede celular de levedura pura, demonstrou sorção entre de 55,4 a 78,1%, respectivamente. Yannikouris et al. (2004) avaliaram o componente β -D-glucana na sorção de ZEA em pH 3,0, 6,0 e 8,0. As condições ácidas e neutra (pH 3,0 e 6,0) não interferiram no processo de sorção de ZEA (64 a 77%), porém, as condições alcalinas (pH 8,0) diminuíram a sorção. O pH alcalino provavelmente impede a conformação tridimensional ativa das β -D-glucanas e favorece a formação de hélice simples e estruturas helicoidais aleatórias.

O valor ótimo (98,7%), previsto na Equação 1 e na Figura 4, foi comparado com os valores experimentais da sorção de ZEA obtidos em triplicata quando se utilizou a proporção de sorvente 75:25, pH 6,0 e concentração de ZEA 1200 ng/mL, a fim de validar o experimento. A maior concentração de ZEA (1200 ng/mL) foi selecionada, uma vez que não houve diferença significativa entre as concentrações avaliadas (Figura 4), e quanto maior a quantidade de ZEA sorvida, menor serão seus efeitos tóxicos. Os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre o valor ótimo previsto e os valores experimentais em

nível de 44,3%, indicando que o modelo estatístico pode ser aplicado para prever a porcentagem de sorção de ZEA *in vitro*.

4 Conclusão

A mistura de sorvente parede celular de levedura e carvão ativado na proporção de 75:25 apresentou alta porcentagem de sorção de ZEA *in vitro* (próxima a 100%) em todos os valores de pH avaliados (3,0, 4,5 e 6,0), indicando estabilidade da ligação com ZEA no trato gastrointestinal dos animais. A mistura de parede celular de levedura e carvão ativado apresenta potencial para a aplicação em ração animal, a fim de minimizar os efeitos tóxicos causados pela contaminação por ZEA.

Agradecimentos

Os autores agradecem a SLO Agropecuária, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FINEP, Fundação Araucária, PPSUS/Ministério da Agricultura, Fundo Paraná /SETI pelo apoio financeiro.

Referências

- Armando, M.R., Pizzolitto, R.P., Dogi, C.A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni V.L., Dalcero, A.M., Cavaglieri, L.R., 2012. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Food Microbiology* 133, 256-264.
- Bueno, D.J., Di Marco, L., Oliver, G., Bardón, A., 2005. *In vitro* binding of zearalenone to diferente adsorbents. *Journal of Food Protection* 68, 613-615.
- CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology, 2003. *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report*, Ames, Iowa.
- De Saeger, S., Sibanda, L., Van Pethegem, C., 2003. Analysis of zearalenone and α zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. *Analytica Quimica Acta* 487, 137-143.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letter* 122, 179-188.

- JECFA, 2000. Zearalenone. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Ed.), Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO/FAO Food additives Series 44.
- Joannis-Cassan, C., Tozlovanu, M., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., Pfohl-Leszkowicz, 2011. Binding of zearalenone, aflatoxin B1 and ochratoxin A by yeast based products: a method for quantification of adsorption performance. *Journal of Food Protection* 74, 1175-1185.
- Joanny, J.P., 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology* 137, 342-362.
- Joglekar, A.M., May, A.T., 1987. Product excellence through design of experiments. *Cereals Food World* 32, 854-868, 1987.
- Kalil, S.J., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., 2000. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry* 35, 539–550.
- Queiroz, V.A.V., Alves, G.L.O., Conceição, R.G.P., Guimarães, L.J.M., Mendes, S.M., Ribeiro, P.E.A., Costa, R.V., 2012. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. *Food Control* 28, 83-86.
- Sabater-Vilar, M., Maleknejad, H., Selman, M.H.J., Van-Der-Doelen, M.A.M., Fink-Gremmels, J., 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycotologia* 163, 81-90.
- Shehata, I.S., Richter, W.I.F., Schuster, M., Scholz W., Nowar, M.S., 2000. Adsorption of ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone in vitro at different pH and adsorbents. *Mycotoxin Research* 16, 136 - 140.
- Thiel, N.Q., Ogle, B., Petterson, H., 2008. Screening of aflatoxins and zearalenone in feedstuffs and complete feeds for pigs in Southern Vietnam. *Tropical Animal Health and Production* 40, 77-83.
- Yiannikouris, A., André, G., Poughon, L., Francois, J., Dussap, C-G., JEMINET, G., Bertin, G., Jouany, J-P., 2006. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans. *Biomacromolecules*, 7,1147-1155.
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C. G., Jeminet, G., Bertin, G., 2004. Influence of pH on complexing of model β -D-Glucans with zearalenone. *Journal of Food Protection*, 67, 2741-2746.

Tabela 1 – Níveis do planejamento estatístico Box Behnken (4^3), com variáveis codificadas e decodificadas para avaliação do efeito do pH, da concentração de ZEA, da porcentagem da mistura de sorventes parede celular de levedura:carvão ativado (75:25) e dos tempos de interação sobre a sorção de zearalenona *in vitro*.

Ensaio	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas				Sorção (%)	Conc. ZEA após sorção(ng/mL)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	pH	Sorvente (%)	ZEA (ng/mL)	Incubação (min.)		
1	-1	-1	0	0	3	0,5	750	60	99,1	6,4
2	1	-1	0	0	6	0,5	750	60	98,4	11,23
3	-1	1	0	0	3	1,5	750	60	99,6	2,73
4	1	1	0	0	6	1,5	750	60	99,3	4,81
5	0	0	-1	-1	4,5	1	300	30	99,4	1,67
6	0	0	1	-1	4,5	1	1200	30	99,2	8,76
7	0	0	-1	1	4,5	1	300	90	99,4	1,29
8	0	0	1	1	4,5	1	1200	90	99,3	8,33
9	0	0	0	0	4,5	1	750	60	99,3	4,83
10	0	0	0	0	4,5	1	750	60	99	6,61
11	-1	0	0	-1	3	1	750	30	99,1	4,93
12	1	0	0	-1	6	1	750	30	99,3	8,99
13	-1	0	0	1	3	1	750	90	98,7	6,71
14	1	0	0	1	6	1	750	90	99	8,18
15	0	-1	-1	0	4,5	0,5	300	60	98,8	1,82
16	0	1	-1	0	4,5	1,5	300	60	99,4	7,52
17	0	-1	1	0	4,5	0,5	750	60	97,7	6,81
18	0	1	1	0	4,5	1,5	1200	60	99,4	6,84
19	0	0	0	0	4,5	1	750	60	99,4	7,83
20	0	0	0	0	4,5	1	750	60	99,3	14,06
21	-1	0	-1	0	3	1	300	60	98,9	2,08
22	1	0	-1	0	6	1	300	60	98	1,56
23	-1	0	1	0	3	1	1200	60	99,4	5,93
24	1	0	1	0	6	1	1200	60	99,5	9,09
25	0	-1	0	-1	4,5	0,5	750	30	99,5	8,34
26	0	1	0	-1	4,5	1,5	750	30	99,2	3,51
27	0	-1	0	1	4,5	0,5	750	90	98,8	3,48
28	0	1	0	1	4,5	1,5	750	90	99,5	2,31
29	0	0	0	0	4,5	1	750	60	99,5	11,79
30	0	0	0	0	4,5	1	750	60	99,7	6,82

Tabela 2 – Níveis do planejamento estatístico Box Behnken (3^3) com cinco pontos centrais, com variáveis codificadas e decodificadas, para avaliar a proporção de parede celular de levedura e carvão ativado, pH e concentração de ZEA na sorção de ZEA *in vitro*.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas			Sorção ZEA (%)	Conc. ZEA após sorção (ng/mL)
	X ₁	X ₂	X ₃	PCL/CA*	pH	ZEA(ng/mL)		
1	-1	-1	0	100/0	3	750	57,9	283,4
2	1	-1	0	75/25	3	750	97,5	16,83
3	-1	1	0	100/0	6	750	67,7	217,5
4	1	1	0	75/25	6	750	96,1	26,04
5	-1	0	-1	100/0	4,5	300	78,1	46,4
6	1	0	-1	75/25	4,5	300	98,5	3,11
7	-1	0	1	100/0	4,5	1200	55,4	418,4
8	1	0	1	75/25	4,5	1200	98,7	15,21
9	0	-1	-1	87,5/12,5	3	300	90,3	27,18
10	0	1	-1	87,5/12,5	6	300	93,7	17,64
11	0	-1	1	87,5/12,5	3	1200	85,3	172,6
12	0	1	1	87,5/12,5	6	1200	84,7	143,9
13	0	0	0	87,5/12,5	4,5	750	86,5	90,9
14	0	0	0	87,5/12,5	4,5	750	85,9	94,8
15	0	0	0	87,5/12,5	4,5	750	84,2	106,65
16	0	0	0	87,5/12,5	4,5	750	81,8	122,6
17	0	0	0	87,5/12,5	4,5	750	81,3	125,6

Tabela 3 – Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis x₁, x₂ e x₃ na sorção de zeaxalenona *in vitro*.

Causas de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	Valor de p
x ₁ L+Q	2275,25	2	1137,62	212,66*	0,00*
x ₂ L+Q	18,49	2	9,24	1,72	0,25
x ₃ L+Q	224,82	2	112,91	21,01*	0,00*
1*2	31,14	1	31,14	5,82*	0,00*
1*3	131,68	1	131,68	24,61*	0,00*
2*3	4,16	1	4,16	0,78	0,40
Resíduo	37,45	7	5,35		
Total	2714,78	16			

x₁= proporção dos sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado); x₂= pH; x₃= concentração de zeaxalenona

L= efeitos lineares; Q= efeito quadráticos

1, 2 e 3 representam a interação entre as variáveis proporção dos sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado), pH e concentração de zeaxalenona, respectivamente.

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 1 – Cromatograma da zearalenona obtido do controle de 300 ng/mL dos testes de sorção de zearalenona *in vitro*.

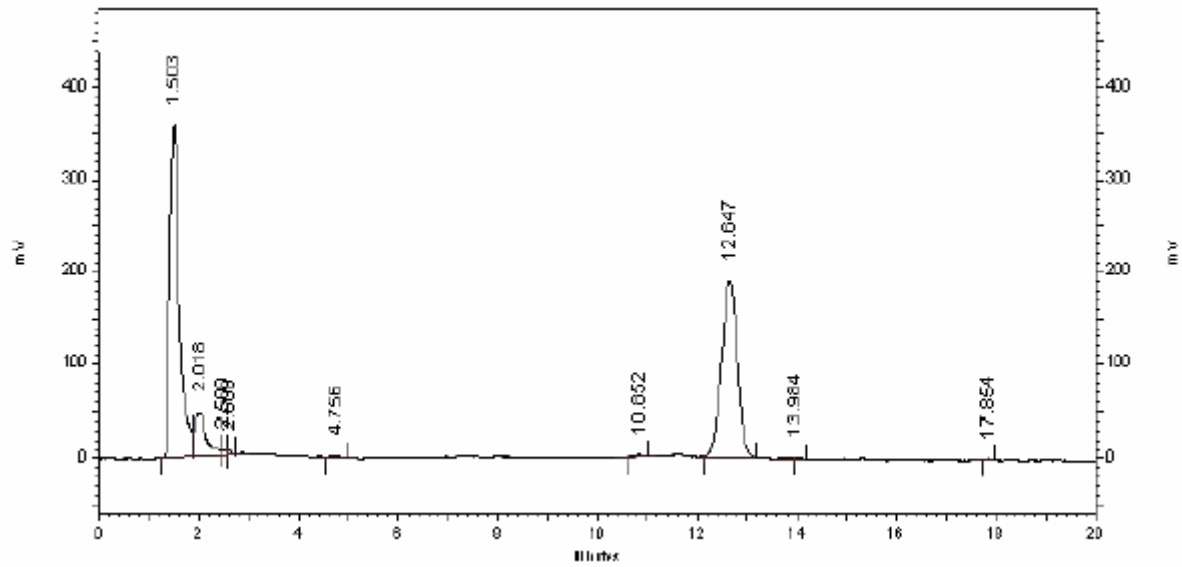


Figura 2 – Gráfico de Pareto do planejamento Box Behnken (3^3) obtido para a porcentagem de sorção de zearalenona *in vitro* (a linha vertical define o intervalo de confiança em 95%). Onde x_1 , x_2 e x_3 são a proporção de sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado), pH e concentração de zearalenona, respectivamente. L e Q são os efeitos lineares e quadráticos, respectivamente.

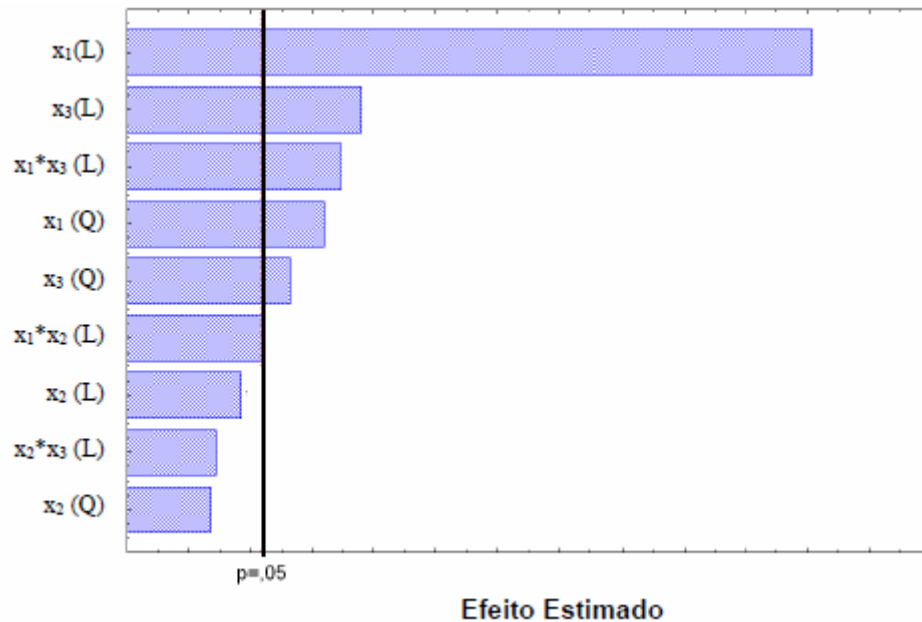


Figura 3 – Superfície de resposta do planejamento estatístico Box Behnken (3^3) com cinco pontos centrais, para avaliação da sorção de ZEA (%) utilizando diferentes proporções de carvão ativado na mistura com parede celular de levedura e concentrações de ZEA, em pH 6,0 e tempo em 60 min.

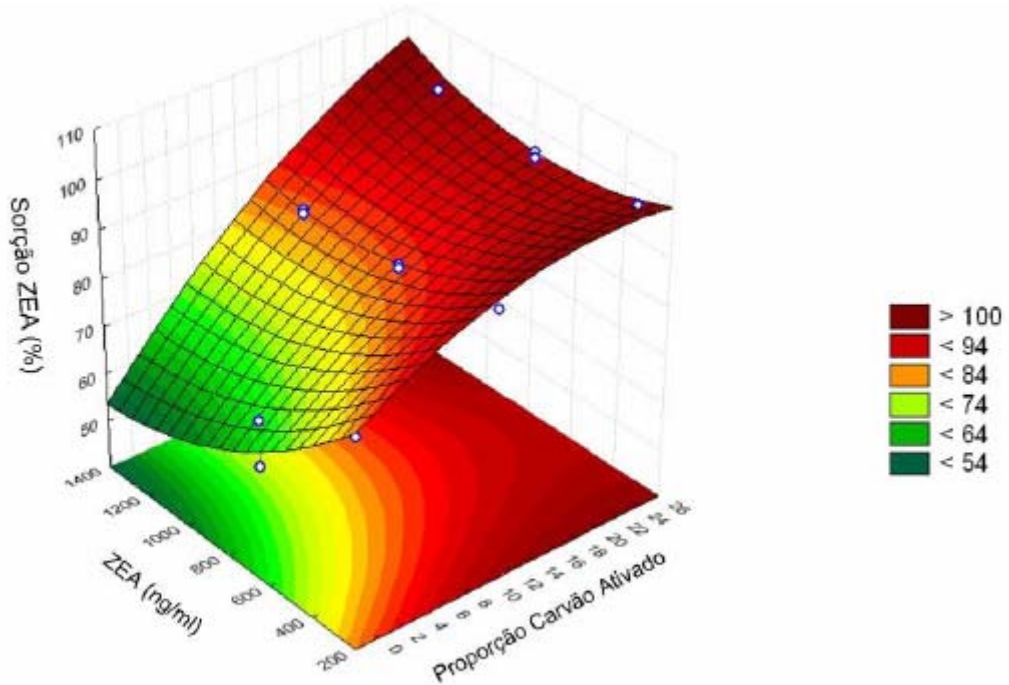
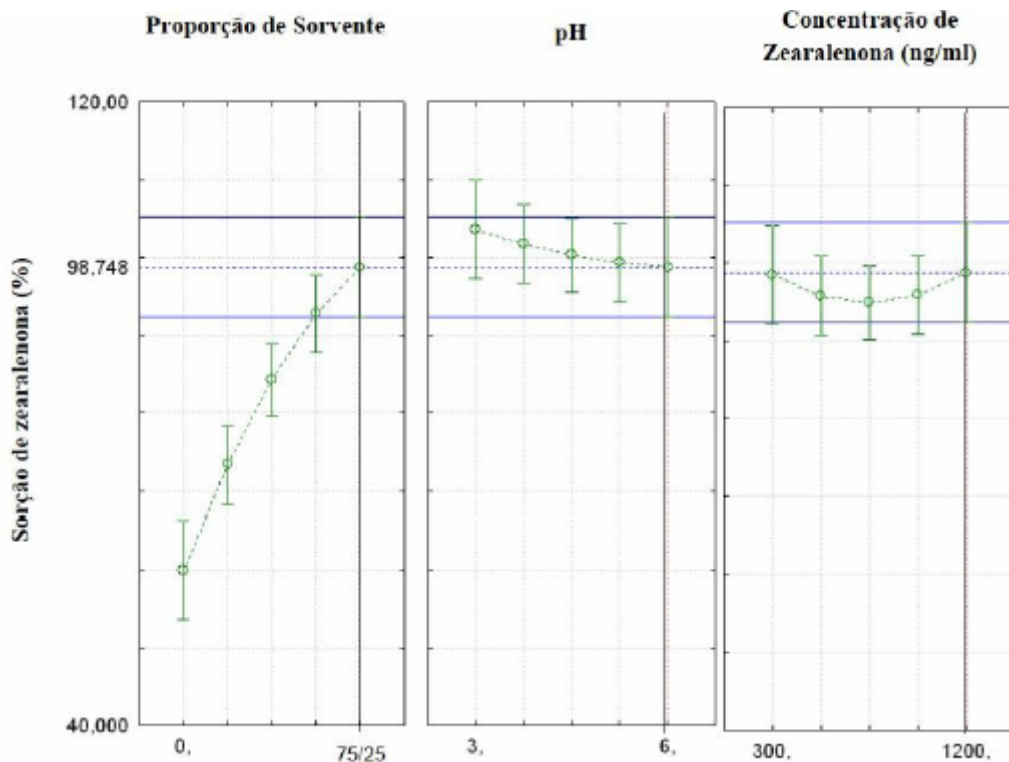


Figura 4 – Perfil dos valores preditivos para a sorção de zearalenona, utilizando as diferentes proporções dos sorventes (parede celular de levedura e carvão ativado), pHs e concentrações de zearalenona.



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a contaminação de rações por ocratoxina A, são necessários estudos de monitoramento aliados a métodos eficientes de prevenção da contaminação natural por micotoxinas tanto no milho quanto durante o processamento de rações para minimizar as perdas econômicas, os riscos à saúde, aumentar a produtividade e assegurar a qualidade da carne e produtos de origem animal.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994.
- ABIMILHO – Associação das Industrias de Milho. 2008. **Processos Industriais e Aplicações-Aproveitamento do milho**. Disponível em: http://www.abimilho.com.br/estatistica/producao_mundial. Acesso em: 20/10/2012
- ALBORCH, L.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p. 53-57, 2011.
- ALDRED, D.; CAIRNS-FULLER, V.; MAGAN, N. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. **Journal Stored of Product Research**, v.44, p. 341-346, 2008.
- ALEO, M.D.; WYATT, R.D.; SCHNELLMANN, R.G. Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat proximal tubules. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 107, P. 73–80, 1991.
- ALMEIDA, A. V. A. F.; BOTURA, M. B.; ABREU, R. D.; BITTENCOURT, T. C. C.; BATATINHA, M. J. M. Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no estado da Bahia. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 76, p. 353-358, 2000.
- ALMEIDA, I.; MARTINS, M. H.; SANTOS, S.; COSTA, J. M.; BERNARDO, F. Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal. **Mycotoxin Research**, v. 27, p. 177–181, 2011.
- ARMANDO, M.R.; PIZZOLITTO, R.P.; DOGI, C.A.; CRISTOFOLINI, A.; MERKIS, C., POLONI V.L.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R.. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. **Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 256-264, 2012.
- ARAGUÁS, C.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. **Food Chemistry**, v. 92, p. 459-464, 2005.
- ASTORECA, A. L.; DALCERO, A. M.; FERNÁNDEZ PINTO, V., & VAAMOND, G. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 38–43, 2011.
- AVANTAGGIATO, G; SOLFRIZZO, M; VISCONTI A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 379-388, 2005.
- BATISTA, L.R.; CHALFOUN, S.M.; SILVA, C.F.; CIRILLO, M.; VARGA, E.A.; SCHWAN, R.F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea Arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, p. 784-790, 2009.

- BATISTA L.R.; CHALFOUN S.M; PRADO G.; SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea Arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 293–300, 2003.
- BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 639-643, 2002.
- BEG, M. U; AL-MUTAIRI, M; BEG, K. R; AL-MAZEEDI, H. M; ALI, L. N; SAEED, T. Mycotoxins in poultry feed in Kuwait. **Arquives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.50, p.594-602, 2006.
- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology**, v. 16, p. 497–516, 2003.
- BIEHL, M.L.; PRELUSKY, D.B.; KORITZ, G.D.; HARTIN, K.E.; BUCK, W.B.; TRENHOLM, H.L. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 121, p. 152-159, 1993.
- BOERMANS, H. J.; LEUNG, M. C. K. Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 95–102, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. 2011. **Aves**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acesso em: 11/10/2012
- BUENO, D.J; DI MARCO, L; OLIVER, G; BARDÓN, A. In vitro binding of zearalenone to diferente adsorbents. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p. 613-615, 2005.
- BULLERMAN, L.B., BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal Food Microbiology**, v. 119, p 140-146, 2007.
- CABAÑAS, R.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. **Food Microbiology**, v.25, p.642-647, 2008.
- CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Ochratoxin A producing specie in the genus *Penicillium*. **Toxins**, v. 2, p. 1111 – 1120, 2010.
- CAIRNS-FULLER, V.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water, temperature and gas composition interations affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1215-1221, 2005.
- CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa, n.139, 2003, 191p.
- CCFAC - Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Posting date. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Position paper on zearalenone**. Publication CCFAC 00/19. Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy. , 2000
- CIEGLER, A.). Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, p. 631–636, 1972.

CHELKOWSKI, J. 1991. Mycological quality of mixed feeds and ingredients. In: J. Chelkowski (Ed.), **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier, p. 217–227.

CHENG, Y. H.; WENG, C. F.; CHEN, B. J.; CHANG, M. H. Toxicity of different *Fusarium* mycotoxins on growth performance, immune responses and efficacy of a mycotoxin degrading enzyme in pigs. **Animal Research**, v. 55, p. 579-590, 2006.

COBB – VANTRESS. Suplemento de crescimento e nutrição para frangos de corte. 2008. Disponível em:
http://www.cobbvantress.com/contactus/brochures/Cobb500_BPN_PORT.pdf. Acesso em: 11/10/2012.

COMISSÃO EUROPEIA. Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 toxins and fumonisins in products for animal feeding. **Official Journal of the European Union**, v. L 229, p. 7-9, 2006.

COMISSÃO EUROPEIA. Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. **Official Journal of the European Union**, v. L255 , p.14-17, 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Produtos e serviços – safras – levantamentos de safra – 12º levantamento grãos safra 2011/2012 agosto de 2012. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/8218897d1eb5849906fc53856bdbc894.pdf> . Acesso em: 11/10/12.

CRUZ, L. C. H.; ROSA, C. A. R.; CAMPOS, J. C.; TURATTI, J. A. Ocratoxicose em suínos no Estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 6, p. 17, 1984.

D’MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C., *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science Technology**, v. 80, p. 183–205. 1999.

DAKOVIC, A.; MATIJAŠEVIC, S.; ROTTINGHAUS, G.E.; DONDUR, V.; PIETRASS, T.; CLEWETT, C. F.M. Adsorption of zearalenone by organomodified natural zeolitic tuff. **Journal of Colloid and Interface Science** , v.311, p. 8–13, 2007.

DALCERO, A.; MAGNOLI, A.; HALLAK, C.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIO, G.; ROSA, C., A., R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 11, p. 1065-1072, 2002.

DE SAEGER, S; SIBANDA, L; VAN PETHEGEM, C. Analysis of zearalenone and α zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.487, p. 137-143, 2003.

DÖLL, S; DÄ NICKE, S; VALENTA, H; FLACHOWSKY, G. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. **Arquives of Animal Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 311-324, 2004.

DOMIJAN, A.M.; PERAICA, M.; CVJETKOVI, B.; TURCIN, S.; JURJEV, E.; IVI, D. Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. **Acta Pharmacologic**, v.55, p. 349-346, 2005.

DUARTE, S.C; LINO, C.M; PENA, A. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p. 1-13, 2011.

EFSA - Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. **The EFSA Journal**, p.1-36, 2004.

EFSA - Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A. **The EFSA Journal**, p.1-56, 2006.

ELAROISSE, M.A.; MOHAMED, F.R.; EL BARKOUKY, E.M.; ATTA, A.M.; ABDOU, A.M.; HATAB, M.H. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 35, n. 4, p. 263- 269, 2006.

ELLING, F., HALD, B., JACOBSEN, C., KROGH, P., Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. **Acta Pathology Microbiology et Immunological Scandinava. – Sect. A**, v. 83, p. 739–741, 1975.

ETIENNE, M.; DOURMAD, J.Y. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. **Livestock Production Science**, v. 40, p. 99-113, 1994.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema de Produção de Frangos de corte**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaodeFrangodeCorte/Racao-tab.html>. Acesso em: 11/01/2013.

FERRUFINO-GUARDIA, E.V.; TANGNI, E.K.; LARONDELLE, Y.; PONCHAUT, S. Transfer of ochratoxin A during lactation: exposure of suckling via milk of rabbit does fed a naturally contaminated feed. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, p. 167–175, 2000.

FINK-GREMMELS, J.; MALEKINEJAD, H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 326 – 341, 2007.

FRAGA, M.E; CURVELLO, F; GATTI, M.J.; CAVAGLIERI, L.R; DALCERO, A.M; ROSA, C. A. R. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 343-353, 2007.

FUCHS, R.; HULTA, K. Ochratoxin A in blood and its pharmacokinetic. **Food and Chemical**, v. 30, p. 201-204, 1992.

FUJII, S.; ONO, E.Y.S.; RIBEIRO, R.M.R; ASSUNÇÃO, F. G. A.; TAKABAYASHI, C. R.; OLIVEIRA, T. R. M.; ITANO, E. Y.; UENO, Y.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 50, n. 2, p. 349-359, 2007.

GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; SARDIÑAS, N.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; PATIÑO, B. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section Circumdati. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, v. 22, 343 – 345, 2011.

GRANT P.G.; PHILLIPS T.D. Isothermal adsorption of aflatoxin B1 on HSCAS clay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 599–605, 1998.

GUPTA, S.; JINDAL, N.; KHOKHAR, R.S.; ASRANI, R.K.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of ochratoxin A and *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* infection on pathological changes in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 37, p. 265–272, 2008.

HAMILTON, P.B.; HUFF, W.E.; HARRIS, J.R.; WYATT, R.D. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. **Poultry Science**, v. 51, p. 1832, 1982.

HARRIS J.P.; MANTLE P.G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**. v. 58. p. 709–716, 2001.

HUFFMAN, J.; GERBER, R.; DU, L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. **Biopolymers**, v. 93, n. 9, p. 764-776, 2010.

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

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179-188, 2001.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human: some naturally occurring substances, food, items and constitutes, heterocyclic aromatic amines and mycotoxin**. Geneva, v. 56. p. 26-32. 1993.

IGAYARA, L. A. Granjas de Frangos de Corte. In: OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma, SC, p. 51-59, 2006.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Revisão: julho/2007.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos- Instituto Adolfo Lutz**, Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: p. 1020, 2008.

IPCS/GEMS – INTERNACIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1995. **Food Euro workshop on reliable evaluation of low level contamination of food**. Appendix 5, Germany, May.

JAIMEZ, J.; FENTE, A.C.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A.; VÁZQUEA, B., I. A survey of the fungal contamination and presence of ochratoxin A and zearalenone on Spanish feed and raw materials. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 832-840, 2004.

JALILI, M.; JINAP, S. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili. **Food Control**, p. 1-5, 2011.

JARD, G; LIBOZ, T; MATHIEU, F; GUYONVARCH, A; LEBRIHI, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 11, p. 1590-1609, 2011.

JARDIM, A. N. O; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, 1898-1909, 2009.

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Ochratoxin A (addendum). In: **Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Prepared by the Sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Geneva, Switz: 2008. p 19–28.

JOANNIS-CASSAN, C; TOZLOVANU, M; HADJEBA-MEDJDOUB, K; BALLEST, N; PFOHL-LESZKOWICZ. Binding of zearalenone, aflatoxin B1 and Ochratoxin A by yeast based products: a method for quantification of adsorption performance. **Journal of Food Protection**, v.74, n7, p. 1175-1185, 2011.

JOGLEKAR, A. M.; MAY, A. T. Product excellence through design of experiments. **Cereals Food World**, v. 32, p. 854-868, 1987.

JOINT FAO/WHO. Position Paper on Ochratoxin A. **Codex Alimentarius Commission**, n.31, p. 22-26 Mar. 1999.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, n. 3, p. 342-362, 2007.

KLEINOVA, M.; ZOLLNER, P.; KHLBACHER, H.; HOCHSTEINER, W.; LINDNER, W. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 4769-4776, 2002.

KOGAN, G; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109, p. 161-165, 2007.

KROES, R.; MÜLLER, D.; LAMBE, J.; LÖWIK, M. R. H.; VAN KLAVERENE, J.; KLEINER, J.; MASSEY, R.; MAYER, S.; URIETA, I.; VERGER, P.; VISCONTI A. Assessment of intake from the diet. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 327–385, 2002.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.7, p. 253–306, 1987.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. **Biomedical and Environmental Science**, v. 2, p.179-24, 1989.

- KUMAR, A.; JINDAL, N.; SHUKLA, C.L.; ASRANI, R.K.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Pathological changes in broiler chickens fed ochratoxin A and inoculated with *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, v. 33, p. 413–417, 2004.
- LAI, M.; SEMENIUK, G.; HESSELTINE, C. W. Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. **Applied Microbiology**, v. 19, p. 542–544, 1970.
- LARSEN, T.O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n. 8, p. 3630-3635, 2001.
- LEMKE, S.L.; GRANT, P.G.; PHILLIPS, T.D. Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v 46, p. 3789-3796, 1998.
- MACHINSKI, M.; SOARES, L.V.S.; SAWASAKI, E.; BOLONHESI, E.; CASTRO, J.L.; BORTOLETTO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 1001-1007, 2001.
- MAGNOLI, C. E.; ASTEORECA, A.L.; CHIACCHERA, S.M.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, v 163, p. 249-260, 2007.
- MAGNOLI, C.; VIOLANTE, M.; COMBINA, M.; PALACIO, G.; DALCERO, A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, p. 179-184, 2003.
- MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R. F.; FINK-GREMMELS, J. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Veterinary Research*, v. 36, p. 799–810, 2005.
- MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v 172, p. 96–102, 2006.
- MALLMANN, C. A; DILKIN, P; GIACOMINI, L. Z; RAUBER, R. H. **Cr terios para Sele o de um Bom Sequestrante para Micotoxinas**. In: Confer ncia APINCO. Santos: FACTA – Funda o APINCO de Ci ncia e Tecnologia, p. 213-224, 2006.
- MARTINS, H. M.; ALMEIDA, I.; CAMACHO, C.; COSTA, J. M.; BERNARDO, F. A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds for swine and laying hens. **Mycotoxins Research**, v. 28, p. 107-110, 2012.
- MUNKVOLD G.P., DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v. 81, p.556-565, 1997.
- NASSER, P.P.; CHALFOUN DE SOUZA, S.M; BATISTA, L.R.; MERCER, J.R. Implica es do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da se o *Circumdati* e produ o de ochratoxina A. **Ci ncena Agrotechnica**, v. 27, p. 1172–1175, 2003.

NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A.; MARASAS, W.F.O. **Fusarium species – An illustrated manual for identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983.

OLIVEIRA, T. R.; JACCOUD-FILHO, D. S.; HENNEBERG, L.; MICHEL, D. M.; DEMIATE, I. M.; PINTO, A. T. B.; MACHINSKI, M.; BARANA, A. C. Maize (*Zea Mays* L) landraces from the southern region of Brazil: contamination by *Fusarium* sp, zearalenone, physical and mechanical characteristics of the kernels. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 11-16, 2009.

OLSEN, M.; KIESSLING, K.H. Species differences in zearalenone-reducing activity in subcellular fractions of livers from female domestic animal species. **Acta Pharmacological Toxicology**, v. 52, p. 287–291, 1983.

OLSEN, M.; MALMLOF, K.; PETTERSSON, H.; SANDHOLM, K.; KIESSLING, K. H. Plasma and urinary levels of zearalenone and alpha-zearalenol in a prepubertal gilt fed zearalenone. **Acta Pharmacological Toxicology**, v. 56, p. 239–243, 1985.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6p. (Informe Técnico).

PETKOVA□BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I. N.; CASTEGNARO, M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. **Food Additives and Contaminants**, v.5, p. 299–301, 1998.

PFOHL□LESZKOWICZ, A.; PETROVA□BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I. N.; CASTEGNARO, M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 283–302, 2002.

PIER, A. C. Mycotoxins and Animal Health. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 25, p.185-243, 1981.

PITT, J.I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.2, p. 266-269, 1986.

QUEIROZ, V. A. V.; ALVES, G. L. O.; CONCEIÇÃO, R. R. P.; GUIMARÃES, L. J. M.; MENDES, S. M.; RIBEIRO, P. E. A.; COSTA, R. V. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, v. 28, p. 83-85, 2012.

RAMOS, A. J.; HERNANDEZ, E.; PIÁ-DELFINA, J.M.; MERNO, M. Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v 128, p. 129-137, 1996.

RAMOS, A.J., FINK-GREMMELS, J.; HERNÁNDEZ, E. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of non-nutritive adsorbent compounds. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 631-641, 1996.

RILEY, R.T. Mechanistic interaction of mycotoxins: theoretical considerations. In: SINHA, K.K., BHATNAGAR, D. **Mycotoxins in Agriculture and Food Safety**, Marcel Dekker, New York. 1998, p. 227–253.

RINGOT, D.; CHANGO, A. Risk Assessment of Ochratoxin A. In: RAI, M.; VARMA, A. (eds). **Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010. P. 307 – 328.

RINGOT D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER Y.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p 18–46, 2006.

ROSA, C.A.R.; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.J.; GATI, M.; CAVAGLIERI, L.R.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M.; LOPES, C.W.G. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin- producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 89-96, 2006.

ROSSI, C. N. **Avaliação do risco de exposição de frangos de corte e galinhas poedeiras à contaminação natural por fumonisinas e aflatoxinas**. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

SABATER-VILAR, M.; MALEKINEJAD, H.; SELMAN, M.H.J.; DOELEN, M.A.M.; FINK-GREMMELS, J. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. **Mycopathologia**. V.163, p. 81-90, 2007.

SAKTHIVELAN, S.M.; RAO, G.V.S. Effect of ochratoxin A on body weight, feed intake and feed conversion in broiler chicken. **Veterinary Medicine International**, p. 1–4, 2010.

SAMSON, R.A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.

SCHIAVONE, A.; CAVALLERO, C.; GIROTTO, L.; POZZO, L.; ANTONIAZZI, S.; & CAVALLARIN, L. A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds and sera collected in conventional and organic poultry farms in Northern Italy. **Italian Journal of Animal Science**, v. 7, p. 495-503, 2008.

SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J.; MACDONALD, S. J. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during milling and bread production. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p.1153–116, 2003.

SEKIYAMA, L. B; RIBEIRO, A. B; MACHINSKI, P. A; MACHINSKI, M. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p. 289-294, 2005.

SHEHATA, I. S.; RICHTER, W. I. F.; SCHUSTER, M.; SCHOLZ W.; NOWAR, M. S. Adsorption of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone *in vitro* at different pH and adsorbents. **Mycotoxin Research**, v.16, p.136- 140, 2000.

SILVA, C. M. G; VARGAS. Survey of zearalenone in corn using Romer Mycosep™ 224 column and high performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n. 1, p. 39-45, 2000.

SINDIRAÇÕES – Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. **Boletim Informativo do Setor de Alimentação Animal**. 2012. Disponível em: <http://sindiracoes.org.br/produtos-e-servicos/boletim-informativo-do-setor>. Acesso em: 28/12/2012.

SINGH, K.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; MATHUR, S.B. **An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins.** Hellerup, Denmark: Danish Government, 1991.

STOEV, S.D.; KOYNARSKY, V.; MANTLE, P.G. Clinicomorphological studies in chicks fed ochratoxin A while simultaneously developing coccidiosis. **Veterinary Research Communications**, v. 26, p. 189–204, 2002.

STOEV, S.D. Studies on carcinogenic and toxic effects of ochratoxin A in chicks. **Toxins**, v. 2, p. 649-664, 2010.

SYDENHAM, E.W; SHEPHARD, G. S; THIEL, P. G; STOCKENSTROM, S; SNIJMAN, P. W; VAN SCHALKWYK, D, J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2 and B3 in corn: AOAC-IUPAC collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 79, p. 688-696, 1996.

TAKEMURA, H., SHIMB, J., SAYAMAC, K., TSUBURA, A., ZHUE, B.T., SHIMOI, K. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 103, p. 170–177, 2007.

TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Caffeine degradation and increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. **Mycopathologia**, v. 90, p. 181–186, 1985.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual**. 2012. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>. Acesso em: 28/12/2012.

URRY, W.H., WEHRMEISTER, H.L., HODGE, E.B.; HIDY, P.H. The structure of zearalenone. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p. 3109-3114, 1966.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 75–92, 1998.

VARGAS, E. A.; PREIS, R. A.; CASTRO, L; SILVA, C.M.G. Co- occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenona and fumonisin B1 in Brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.

VARGA, J.; KEVEI, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A Production by *Aspergillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4461-4464, 1996.

VISCONTI A. Problems associated with *Fusarium* mycotoxins in cereals. **Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences Kinki University**, Nara, Japan, v. 9, p. 39–55, 2001.

WANGIKAR, P.B.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K.; SINHA, N. Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B₁. ii. histopathological features of teratological anomalies induced in fetuses. **Birth Defects Research (Part B)**, v 71, p.352–358, 2004.

XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R.R.; SUZHEN, L.; VODELA, J.K.; FROHLICH, A.A.; KEMPPAINEN, B.W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure–activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v 137, p.182–192, 1996.

XIAO, H.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; LING, Y.Z. Synthesis and Structural Elucidation of Analogs of Ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 524-530, 1995.

YAMAZAKI, M.; MAEBAYASHI, Y.; MIYAKI, K.; Biosynthesis of ochratoxin A. **Tetrahedron Letter**, v. 25, p. 2301–2303. 1971.

YIANNIKOURIS, A.; ANDRÉ, G.; BULÉON, A.; JEMINET, G.; CANET, I.; FRANÇOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J.-P., Comprehensive conformational study of key interactions involved in zearalenone complexation with β -D-glucanas. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, 2176–2185, 2004 a.

YIANNIKOURIS, A., ANDRÉ, G., POUGHON, L., FRANCOIS, J., DUSSAP, C-G., JEMINET, G., BERTIN, G., JOUANY, J-P. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans. **Biomacromolecules**, v. 7, p.1147-1155, 2006.

YANNIKORIS, A.; FRANÇOIS, J.; PUGHT, L.; DUSSAP, C.; BERTIN, G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Adsorption of zearalenone by β -D-glucanas in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1195-1200, 2004 b.

YANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; PUGHNL, L.; DUSSAP, C.G.; JEMINET G.; BERTIN, G.; JOUANY, J.P. Influence of pH on complexing of model β -D-glucanas with zearalenon. **Journal of Food Protection**, v. 67, n 12, p. 2741-2746, 2004 c.

YANNIKOURIS, A.; PUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C.-G.; FRANÇOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J.-P. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell was and mycotoxins: application to zearaelnone. **Biotechnology Letters**, v.25, p. 783-789, 2003.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J.N.; MOLTO, J.C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1–18, 2007.