

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação de desempenho de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas e submetidos às concentrações de 0,25% e 0,5% de montmorilonita como adsorvente

JOÃO CARLOS ECKHARDT JÚNIOR

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação de desempenho de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas e submetidos às concentrações de 0,25% e 0,5% de montmorilonita como adsorvente

Autor: **JOÃO CARLOS ECKHARDT JÚNIOR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Subárea: Microbiologia

Especialidade: Micologia

Orientador: **PROF. DR. LAERTE FERREIRO**

Coorientador: **PROF. DR. JANIO SANTURIO**

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Eckhardt Jr, João Carlos

Avaliação de desempenho de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas e submetidos às concentrações de 0,25% e 0,5% de montmorilonita como adsorvente / João Carlos Eckhardt Jr. -- 2014.
64 f.

Orientador: Laerte Ferreiro.

Coorientador: Janio Morais Santurio.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Aflatoxina. 2. Bentonita cálcica natural. 3. Frangos de corte. I. Ferreiro, Laerte, orient. II. Santurio, Janio Morais, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOÃO CARLOS ECKHARDT JÚNIOR

Avaliação de desempenho de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas e submetidos às concentrações de 0,25% e 0,5% de montmorilonita como adsorvente.

Aprovada em: 25/04/2014

APROVADO POR:

Prof. Dr. Laerte Ferreira – Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Alexandre Pires Rosa – Membro da Comissão

Prof. Dr. Janio Moraes Santurio – Membro da Comissão

Dr. Régis Adriel Zanette – Membro da Comissão

PORTO ALEGRE

2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João Carlos Eckhardt e Maria Inez Togni Eckhardt, pelos ensinamentos e caráter repassados no meu crescimento.

Ao meu irmão Ronaldo José Eckhardt, por todo o auxílio durante minha graduação.

À minha noiva, Danilise Facchi, por todo o companheirismo e incentivo durante toda a minha trajetória profissional e pessoal.

Ao professor Laerte Ferreiro, por toda a paciência e ensinamentos.

Ao professor Janio Santurio, pelos ensinamentos, por todos os auxílios prestados, sem os quais minha carreira profissional não teria chegado aonde chegou, e principalmente pela amizade e confiança desenvolvida nesses anos em que trabalhamos juntos.

Ao meu amigo Régis Adriel Zanette, por toda a ajuda pessoal e profissional. Sua ajuda e ensinamentos foram fundamentais para obtenção deste grau de pós-graduação.

A todos os colegas do LAPEMI/UFSM com os quais tive o imenso prazer de trabalhar.

À UFRGS e à UFSM, pelo ensino público de extraordinária qualidade.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

RESUMO

Aflatoxinas são metabólitos altamente tóxicos, com efeitos teratogênicos e carcinogênicos, produzidos predominantemente por fungos do gênero *Aspergillus*.

Devido aos seus graves efeitos deletérios na produção animal, muitos estudos são conduzidos com o objetivo de encontrar métodos eficazes de minimizar seus prejuízos econômicos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do efeito protetor de um aditivo antimicotoxinas a base de bentonita cálcica natural brasileira (BCM – *Brazilian calcium montmorillonite*) sobre os parâmetros de ganho de peso, consumo e conversão alimentar, índice de eficiência produtiva, peso ponderado do coração, fígado, moela e baço, proteínas plasmáticas totais, e concentração de minerais no soro (cálcio, fósforo, magnésio, ferro, sódio, cloro e potássio). O experimento consistiu em 1056 pintos de corte machos, de 1 dia de vida, Cobb, distribuídos em baias aleatoriamente, com 22 aves em cada baia, por 42 dias. Foram utilizados 6 tratamentos, sendo o grupo controle sem o adsorvente BCM e sem aflatoxina (AFL), um grupo contendo apenas AFL (3 mg/kg), dois grupos recebendo apenas BCM (0,25% e 0,5%) e dois grupos recebendo AFL+BCM em dois níveis (0,25% e 0,5%). Os resultados demonstraram que de todo o experimento, o grupo mais afetado foi o das aves que receberam apenas AFL. Os tratamentos que receberam AFL+BCM a 0,25% e a 0,5% tiveram seus pesos 13,3% e 22,7% maiores do que o grupo que recebeu apenas AFL, respectivamente, e também aumentaram seu índice produtivo em 53% e 66,5%, respectivamente. Os índices de peso ponderado dos órgãos foram todos melhorados com a inclusão de BCM, mas houve um decréscimo no nível de potássio sérico de 15,3% quando comparado com o grupo que recebeu apenas AFL. BCM não afetou negativamente os grupos que não receberam AFL. A argila bentonita cálcica pode ser utilizada como aditivo adsorvente de micotoxinas para tratamento e controle de rações contaminadas com aflatoxinas em frangos de corte

Palavras-chave: aflatoxina, bentonita cálcica natural, frangos de corte.

ABSTRACT

Aflatoxins are a highly toxic metabolites, with carcinogenic and teratogenic effects, produced mainly by the genus *Aspergillus*. Due their negative impact in the animal production chain, several studies have been conducted intended to find efficient methods to minimize the economical losses. The present experiment aimed to evaluate the protective effect of a Brazilian natural calcium montmorillonite (BCM) on the parameters of body weight gain, feed consumption, feed conversion, productive efficiency index, heart, spleen, liver and gizzard's weight, total plasmatic protein level, and serum minerals. One thousand and fifty-six 1 d-old Cobb male broilers were housed in experimental pens (22 chickens per pen) for 42 d. Two levels of aflatoxins (AFLs) (0 and 3 mg kg⁻¹) and three levels of BCM (0, 2.5 and 5 g kg⁻¹) were assayed. Each treatment had eight replicates of 22 broiler chickens each. Of all the chickens tested in the experiment, the ones treated with AFLs were the most adversely affected. The treatments that received AFLs and BCM (0.25% and 0.5%) had their weights 13.3% and 22.7% heavier than the group that received only aflatoxins, respectively. They also improved their productive efficiency index in 53% and 66.5%, respectively. The organs weight parameter were all improved with the inclusion of BCM, but a decrease in the serum potassium level of 15.3% was observed when compared with the group that did not received AFLs. BCM did not affect negatively those groups that did not received AFLs. The BCM could be used as a mycotoxin binder for aflatoxins in broilers feed.

Key words: aflatoxins, Brazilian calcium montmorillonite, broiler chickens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos diferentes tipos de aflatoxinas	12
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites máximos estabelecidos pela ANVISA para as diferentes micotoxinas em milho e seus subprodutos	14
Tabela 2 – Composition of the basal diets used in the experiment.....	41
Tabela 3 – Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on body weight of broilers.....	42
Tabela 4 – Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on average weight gain of broilers.....	43
Tabela 5 – Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on feed intake of broilers.....	44
Tabela 6 – Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on feed conversion of broilers.....	45
Tabela 7 – Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on mortality and productive efficiency index (PEI) of broilers.....	46
Tabela 8 – Effect of aflatoxins (AFL) and calcium montmorillonite (BCM) on the weight of organs (g /100 g ⁻¹ BW) of broilers at 42 days of age.....	47
Tabela 9 – Effect of aflatoxins and Brazilian Calcium Montmorillonite (BCM) on the serum levels of Total proteins (TP), Albumin (Alb), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Phosphorous (P), Sodium (Na), Chlorine (Cl), Potassium (K) and Iron (Fe) of broilers at 42-days of age.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Aflatoxinas	11
2.2 Legislação.....	13
2.3 Aditivos antimocotoxinas.....	14
2.3.1 Carvão ativado.....	17
2.3.2 Adsorventes de origem orgânica	19
2.3.3 Argilas	19
2.3.3.1 Zeólitas	21
2.3.3.2 Aluminossilicato Hidratado de Sódio (HSCAS)	21
2.3.3.3 Montmorilonitas (Bentonitas).....	25
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
4 DISCUSSÃO.....	49
4.1 Peso.....	49
4.2 Conversão Alimentar.....	50
4.3 Órgãos.....	50
4.4 Bioquímica	51
5 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas foram descobertas em 1960, ao surgimento de um surto ocorrido em perus na Inglaterra, onde foi dado inicialmente o nome de doença X. Isso gerou um grande interesse pela comunidade científica para o conhecimento da dinâmica de ação destes metabólitos e seus efeitos diversos nos seres vivos (FORGACS, 1962, citado por BENNETT; KLICH, 2003).

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos para seres humanos e animais, produzidos por várias espécies fúngicas, particularmente por espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Alternaria* (HUWIG *et al.*, 2001). Estes compostos tem sido descritos há décadas, porém, no início da década de 60, através do descobrimento das aflatoxinas, estes compostos começaram a ser caracterizados quimicamente (RAMOS GIRONA, 2011). A palavra “aflatoxina” é a combinação de 3 palavras, sendo “a” o gênero *Aspergillus*, “fla” para a designação da espécie *flavus* e “toxina” que significa veneno (BAKIRDERE, 2012).

Compreendem um grupo de centenas de substâncias tóxicas quimicamente diferentes, sendo as aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas as micotoxinas mais comuns (HUWIG *et al.*, 2001).

Sob condições favoráveis, estes fungos desenvolvem-se naturalmente nas plantas ou nos grãos, podendo a infecção ocorrer na lavoura e/ ou durante estocagem (BONNA *et al.*, 1991).

Relata-se que o consumo de dietas contaminadas com micotoxinas pelos animais pode induzir micotoxicose aguda e/ou crônica produzindo efeitos teratogênicos, carcinogênicos, estrogênicos ou imunossupressores. Em adição a estes efeitos tóxicos, observam-se perdas econômicas devido à recusa de alimentos, baixa conversão alimentar, diminuição do peso corporal, aumento da incidência de doenças e interferência com a capacidade reprodutiva (HUWIG *et al.*, 2001).

Aflatoxinas são micotoxinas que geram grandes perdas e maiores custos na produção, devido à sua alta toxicidade e devido às regulamentações governamentais de limites máximos tolerados (ATANDA, 2012; MOSS, 1996; BONNA *et al.*, 1991).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

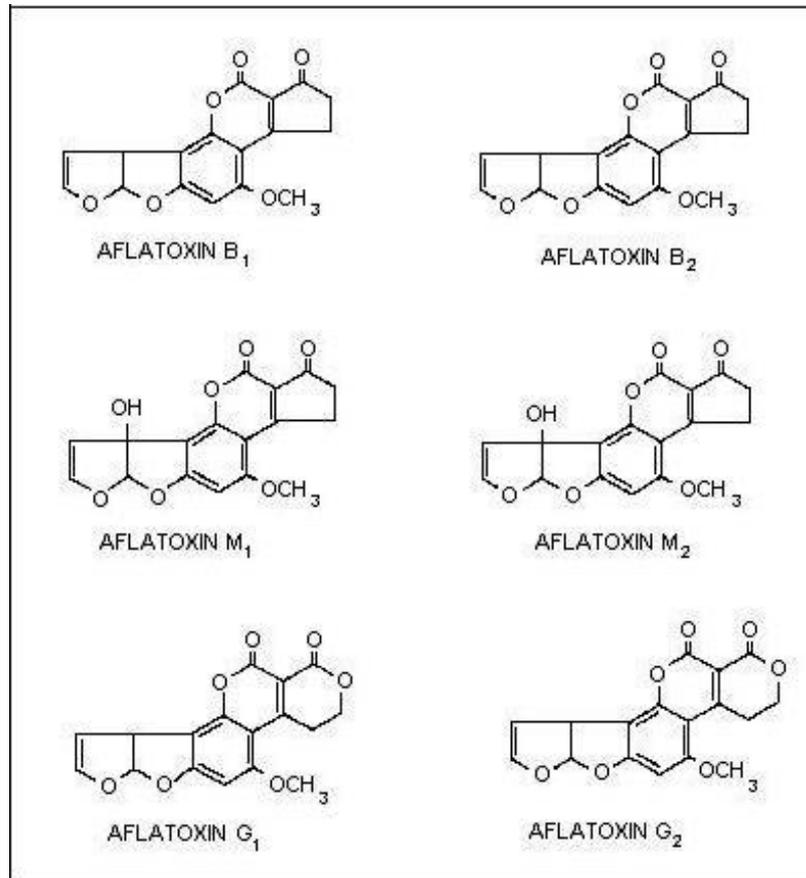
2.1 Aflatoxinas

Os impactos econômicos da contaminação por aflatoxinas tem se tornado um problema de magnitude mundial, chegando a afetar aproximadamente 25% do mercado mundial de grãos, estimado pela Food and Agriculture Organization (FAO) nos Estados Unidos. (FAO, 1997). Os custos incluem os gastos com preservantes, a desvalorização dos preços das *commodities* e o impacto na performance produtiva dos animais.

As micotoxinas tem o peso molecular baixo (BENNETT, 1987 citado por ATANDA, 2012). O micélio dos fungos filamentosos evolui para utilizar de forma eficiente substratos que se encontram sobre superfícies ou interiores onde o fungo se desenvolve. Os fungos são capazes de secretar enzimas e quebrar complexos moleculares para, então, absorve-los com um peso molecular menor, para então utilizá-los no metabolismo ou na produção de metabólitos secundários, não essenciais ao processo de desenvolvimento do micélio (Bushell, 1989 citado por MOSS, 1996).

Algumas aflatoxinas derivadas são classificadas como grupos B ou G, dependendo da cor fluorescente emitida (azul ou verde, sendo *blue* ou *green*, em inglês, respectivamente) sob iluminação ultravioleta. *A. parasiticus* é a espécie mais toxicogênica, e a maioria das cepas é produtora de ambas toxinas: B e G (Van Egmond, 1989a citado por MOSS, 1996). Elas são substâncias cristalinas, solúveis em soluções moderadamente polares, como metanol e clorofórmio (Figura 1).

Figura 1: Estrutura química dos diferentes tipos de aflatoxinas.



Fonte: FOOD-INFO, 2013.

Elas são muito estáveis na maioria dos alimentos, e muito resistentes à degradação. Mas processos comerciais podem reduzir consideravelmente a concentração da toxina, como a remoção das partículas quebradas dos grãos, moagem e diluição da matéria-prima (EUROPEAN MYCOTOXINS, 2012).

Está comprovado o efeito carcinogênico das aflatoxinas, tanto em humanos como nos animais, tanto por contaminação da ração ingerida (animais), como pelo consumo de carne e leite contaminados (humanos) (IARC, 2012; MIRAGLIA *et al.*, 1996 citado por PAPP, 2002).

Aflatoxina B1 (AFB1) é a mais carcinogênica substância produzida pelas espécies do gênero.

Aspergillus (IARC). A substância é responsável por necrose de fígado e, sob exposição crônica, por tumores de fígado (carcinoma hepatocelular) (VAN EGMOND, 1989 citado por MOSS, 1996).

Após ingestão, a AFB1 é metabolizada por enzimas e gera o metabólito ativo 8,9-epóxido que pode ser encontrado posteriormente ligado ao DNA como à albumina sérica, formando a molécula aduzida aflatoxina-N-7 guanina e lisina. A ligação ao DNA mostra-se a precursora para a hepatocarcinogênese (PAPP, 2002).

A presença do fungo não necessariamente implica na presença de toxina. As espécies de fungos podem produzir toxina em grãos quando se encontram sob condições de estresse, e/ou quando a umidade e temperatura da matéria-prima encontram-se elevadas (SCHUSTER *et al.* 1993 citado por PAPP, 2002). A umidade relativa mínima requerida em alimentos que permite o crescimento do *A. flavus* é ao redor de 85% (atividade de água de 0.85), e a temperatura acima dos 25°C. A secagem após a produção dos metabólitos secundários não afetam os níveis de contaminação já existentes (PITTED, 1998; SABINO, 1996; WILSON e PAYNE, 1994 citados por MAIA, 2007). Como o clima é um importante fator para a produção de aflatoxinas, ela pode ser facilmente encontrada em países localizados na América do Sul, África, Ásia e Austrália (AKANDE *et al.*, 2006).

2.2 Legislação

Nas últimas décadas, apenas as aflatoxinas e a ocratoxina A tinham regulamentação para alimentos de origem animal. Para as outras toxinas, os protocolos de segurança se baseavam no controle da contaminação de alimentos de origem vegetal tanto para consumo humano como animal.

Atualmente, outras micotoxinas estão inclusas, e os valores recomendados são especificados no conhecimento de toxicidade e potencial de acúmulo destas moléculas nos derivados animais. Assim, limitando a exposição dos animais através do controle da ração ingerida por estes, é possível garantir que não haja resíduos destas substâncias nos produtos de origem animal (BAILLY & GUERRE, 2009).

Assim, foram criados limites de contaminação tolerados, a fim de garantir a qualidade dos produtos e a saúde dos seres humanos. Estes limites variam em cada país, mas mesmo assim é possível a garantia da contaminação dos alimentos.

O FDA americano (*Food and Drug Administration-EUA*) utiliza níveis de segurança para contaminantes presentes em alimentos e ração animal. O limite seguro para milho, amendoim e caroços de algodão destinados para ração animal são de 100-

200 ppb; para pequenos animais são 20 ppb. Para a alimentação humana, o limite de 20 ppb deve ser respeitado, excetuando-se o leite, onde o limite máximo é de 0,5 ppb (FDA, 1994).

No Brasil, a regulamentação mais recente em alimentos é a RDC 07/2011 (ANVISA, 2011), que estabelece os limites máximos tolerados para as aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1), ocratoxina A, deoxinivalenol, fumonisina (FB1+FB2) e zearalenona em alimentos prontos para consumo ou matérias-primas. Estes limites devem ser atendidos nos mais diferentes níveis de produção até o ano de 2016.

Tabela 1: Limites máximos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para as diferentes micotoxinas em milho e seus subprodutos.

Micotoxina	Milho e subprodutos (ppb)
Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2)	20
Deoxinivalenol	3000
Fumonissina	5000
Zearalenona	400

Fonte: ANVISA, 2011.

2.3 Aditivos Antimicotoxinas

Diaz & Smith (2005) citam que desde a descoberta das micotoxicoses por volta dos anos 60, pesquisadores têm desenvolvido estudos com intuito de eliminar ou minimizar os efeitos destes inevitáveis contaminantes nos alimentos. Entretanto, o grande número de micotoxinas existentes e suas diferenças de composição química dificultam o desenvolvimento de metodologias que visam proteger os animais das micotoxicoses. De acordo com Lopez-Garcia & Park (1988) citados por Diaz & Smith (2005), entre os vários métodos disponíveis para evitar a presença de micotoxinas nos alimentos, encontram-se àqueles mais simples que se baseiam na prevenção da formação das micotoxinas nos diferentes estágios da cadeia produtiva. Porém, é muito

difícil evitar a formação de micotoxinas na pré-colheita, colheita e estocagem e uma vez que o alimento torna-se contaminado, o método mais efetivo para impedir a ingestão é a eliminação do produto, o que se torna inviável. Sendo assim, as micotoxinas estão frequentemente presentes nos alimentos destinados aos animais e induzem perdas econômicas representativas para a agricultura e indústria animal (DIAZ & SMITH, 2005).

Neste cenário, os adsorventes se tornam necessários para obter-se uma redução nos impactos negativos causados pelas micotoxinas, e para conseguir-se obter uma melhora nos índices produtivos de proteína animal, através da remoção e/ou inativação das micotoxinas contidas nas rações utilizadas no crescimento destes animais.

Como as aflatoxinas foram as primeiras descobertas, muito conhecimento técnico foi desenvolvido para este grupo de micotoxinas e, por isso, aditivos antimicotoxinas para aflatoxinas são viáveis e muito eficientes.

Estas estratégias incluem métodos físicos, químicos e biológicos e qualquer um deles deve apresentar alguns pré-requisitos como efetividade na remoção, destruição e inativação das micotoxinas; ausência de efeitos tóxicos ou carcinogênicos nos produtos tratados que serão utilizados na alimentação animal; não devem alterar as propriedades nutritivas e a palatabilidade dos alimentos, assim como devem ser economicamente e tecnologicamente viáveis sem alterar o preço final do produto (DIAZ & SMITH, 2005).

Conforme citado por Huwig *et al.* (2001), os métodos biológicos envolvem a degradação das micotoxinas por microrganismos, enquanto os métodos químicos induzem a destruição de micotoxinas por diferentes produtos químicos (ácidos ou básicos) ou tratamentos por ozonização e amoniação. Já os métodos físicos estão centrados na remoção das micotoxinas através da utilização de diferentes substâncias inorgânicas, denominadas adsorventes ou aditivos antimicotoxinas (AAM), adicionadas às dietas contaminadas. De acordo com o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal (MAPA, 2004), os adsorventes são substâncias capazes de fixar moléculas, estando classificados no grupo de aditivos tecnológicos. Atualmente, a utilização destes adsorventes como agentes descontaminantes de micotoxinas constitui o método mais prático, econômico e mais amplamente utilizado na nutrição animal, especialmente na alimentação de suínos e aves.

Segundo Avantaggiato *et al.* (2005), a Comunidade Europeia preconiza a utilização dos métodos físicos como estratégia de descontaminação e relatam que o uso de adsorventes é recomendado aos produtores com o objetivo de proteger os animais dos efeitos nocivos das micotoxinas. Estas substâncias inorgânicas atuam como esponjas químicas adsorvendo as micotoxinas no trato gastrointestinal, prevenindo assim a absorção sanguínea e subsequente distribuição aos órgãos-alvo.

A prática de adicionar adsorventes (ou sequestrantes) de micotoxinas à ração tem o objetivo de estes dois elementos (adsorvente e micotoxina) se unirem no trato gastrointestinal (TGI) dos animais, tornando-as não-absorvíveis e, assim, diminuindo seus efeitos danosos através da diminuição da biodisponibilidade (PHILLIPS, 2008; DIAZ, 2004)

Diaz & Smith (2005) ressaltam que os adsorventes, além de prevenir ou limitar a absorção das micotoxinas no trato gastrointestinal devem ser efetivos contra várias micotoxinas, uma vez que os alimentos normalmente encontram-se contaminados com mais de uma delas. Afirmam ainda, que a sua utilização deve ser prática, seus preços razoáveis, devendo ser livres de impurezas, sabor e odor, não devendo ocupar grande parte da alimentação ou interferir com as propriedades nutricionais dos alimentos.

Avantaggiato *et al.* (2005) afirmam que a eficácia da adsorção depende da estrutura química de ambos, adsorvente e micotoxina. Estes autores ressaltam que o fator mais importante da adsorção é a estrutura física do adsorvente, ou seja, carga elétrica total e sua distribuição, tamanho dos poros na molécula e área de superfície. De outro lado, as propriedades da molécula das micotoxinas, como polaridade, solubilidade, forma e distribuição das cargas elétricas também constituem fatores importantes da adsorção.

O uso extensivo destes adsorventes tem levado a uma ampla disponibilidade de produtos no mercado, a maioria deles apresentando alta capacidade de adsorção “in vitro”. Entretanto, testes “in vivo” são importantes para confirmar a eficácia de adsorção (AVATAGGIATO *et al.*, 2005), uma vez que várias pesquisas têm demonstrado que a habilidade de um adsorvente para sequestrar uma micotoxina “in vitro” não necessariamente está correlacionada com a sua resposta “in vivo” (DIAZ & SMITH, 2005).

A prática de adicionar agentes aditivos antimicotoxinas tem sido amplamente estudada na tentativa de se obter materiais capazes de reduzir ao máximo os efeitos

maléficos das micotoxinas (PHILLIPS, 2008; DIAZ, 2004). Estes aditivos oferecem um grande potencial na prevenção da toxicidade dos animais. Nos Estados Unidos, apenas o Estado do Texas teve regulamentado pelo FDA o uso de aditivos antimicotoxinas, restando aos outros Estados o uso de agentes com a finalidade *anti-caking*.

O sucesso de alguns adsorventes é debatida devido ao complexo processo que envolve a combinação da molécula, e que inclui variáveis dos materiais tais quais porosidade, acidez da superfície, temperatura, pH do meio e distribuição de íons susceptíveis a troca (YENER *et al.*, 2012; GALVANO *et al.*, 1998).

2.3.1 Carvão Ativado

A efetividade do carvão ativado na adsorção de aflatoxinas é variável. (PIMPUKDEE *et al.*, 2004; EDRINGTON *et al.*, 1996). Em pesquisas realizadas com frangos de corte, Dalvi & Ademoyero (1984) avaliaram a habilidade do carvão ativado em prevenir as alterações funcionais hepáticas causadas pela ingestão de aflatoxinas nesta espécie. Quando as aves foram alimentadas com uma mistura de 6 mg/Kg/PV de AFB1 e 200 mg/Kg/PV de carvão ativado, foi observado que as alterações funcionais hepáticas, determinadas pela concentração da citocromo P-450 e pela atividade da enzima transaminase oxaloacética glutâmica (TGO), foram reduzidas ou prevenidas, ressaltando o efeito positivo do carvão ativado. De forma similar, no trabalho de Dalvi & McGowan (1984), o grupo de aves que recebeu 0,1% de carvão ativado adicionado à dieta contendo 10 ppm de AFB1 demonstrou tendência de melhora no consumo de alimentos e ganho de peso. Além disso, o adsorvente também foi capaz de prevenir os efeitos inibitórios de AFB1 na concentração de citocromo P-450, assim como reduziu a injúria hepática avaliada pelos níveis sorológicos de transaminase oxaloacética glutâmica.

Entretanto, Kubena *et al.* (1990a), estudando os efeitos do carvão ativado em frangos de corte, obtiveram muitos resultados diferentes. Quando carvão ativado foi incluído a 0,5% na dieta, observaram que o mesmo não foi capaz de reduzir a toxicidade de AFB1 purificada ou presente em alimentos naturalmente contaminados e que inclusive, o adsorvente pode ter aumentado os efeitos tóxicos da micotoxina. Os autores não souberam explicar o mecanismo exato pelo qual o carvão ativado aumentou a

toxicidade da aflatoxina, porém acreditam em alterações químicas nos sítios e nas proporções de adsorção e desadsorção da molécula de aflatoxina.

Diaz *et al.* (2004) avaliaram carvão ativado, bentonita sódica (BNa), bentonita cálcica (BCa) e glucana esterificada juntamente com outros adsorventes de AFB1 através da redução de sua absorção pelos animais e consequente biotransformação em AFM1, excretada no leite.

Milho contaminado com 55 ppb de AFB1 foi fornecido à 16 vacas em lactação pelo período de 20 dias. Elas receberam como tratamento 1,2% de AAM a base de BNa. Foram obtidos no leite resultados de 1,24 ppb, 0,52 ppb, 0,43 ppb e 0,62 ppb, respectivamente.

BNa, BCa e glucana esterificada apresentaram bons resultados no sequestro de AFB1, diminuindo consequentemente a biotransformação desta em AFM1. Já a conversão alimentar não apresentou eficiência significativa na adsorção da micotoxina.

Contudo, há trabalhos onde foram obtidos bons resultados de carvão ativado como adsorvente de micotoxinas (JARD, 2011), inclusive comparando a eficiência de algumas matérias-primas minerais, como as bentonitas. E outros trabalhos defendem a ideia de que o carvão ativado é mais eficiente para sequestro de micotoxinas como zearalenona e deoxinivalenol (SABATER-VILAR *et al.*, 2007)

Bueno *et al.* (2005) conduziram um estudo “in vitro” com o objetivo de avaliar o desempenho de 5 tipos de adsorventes na capacidade de adsorção de zearalenona (ZEA). Entre os produtos testados, o carvão ativado utilizado em níveis de 0,1%; 0,25%; 0,5% e 1% foi o que demonstrou melhor capacidade de adsorção, ligando 100% de ZEA, o que sugere que este adsorvente pode ser um bom candidato para detoxificar a micotoxina presente nos alimentos. Um outro experimento realizado por Avantaggiato *et al.* (2005) com o intuito de testar a eficácia de ligação de vários adsorventes disponíveis no mercado para fusariotoxinas, indicou que a maioria dos produtos disponíveis falhou em sequestrar as referidas micotoxinas. Carvão ativado foi o único produto com eficácia de ligação para todas as fusariotoxinas utilizadas no experimento, adsorvendo 100% de FB1 (fumonisina B1) e ZEA e em torno de 50% de deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV).

Entretanto, os mesmos resultados não foram confirmados quando o adsorvente foi testado *in vivo*.

2.3.2 Adsorventes de Origem Orgânica

Os aditivos de origem orgânica são principalmente os derivados da parede da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o qual apresenta ação para vários tipos de micotoxinas, como as aflatoxinas, fumonisinas e ocratoxinas (DIAZ; SMITH, 2005).

Esta levedura apresenta características de tolerância a baixos níveis de oxigênio, variações de temperatura e osmolaridade e boa tolerância a mudanças de pH, inclusive boa resistência a ambientes ácidos, o que torna sua exploração comercial favorável (FIALHO, 2008).

Seu mecanismo de ação como aditivo antimicotoxina (AAM) ainda não está totalmente elucidado, porém alguns autores sugerem que a capacidade do *S. Cerevisiae* está relacionada com a capacidade de adsorvente internamente à sua parede celular as moléculas de micotoxinas, limitando sua disponibilidade para absorção pelo organismo animal.

Em alguns experimentos, pôde-se observar que em frangos de 1 a 21 dias de idade, desafiados com 1000 ppb de AFB1 e com suplementação de 0,1% de glucomananos na ração, evitou o aparecimento dos efeitos deletérios causados por estas micotoxinas (SANTOS, 2010).

2.3.3 Argilas

Os adsorventes vem disponibilizando uma grande seguridade aos consumidores de produtos de origem animal, uma vez que conseguem eficientemente reduzir os efeitos e a contaminação destes tipos de produtos pelas micotoxinas.

Considerando que as aflatoxinas foram as primeiras a serem descobertas, e que possuem muita informação científica sobre elas, a procura por matérias-primas que as adsorvessem também foi mais acentuada.

Porém, há muita divergência nos resultados obtidos, principalmente devido à diferenças na metodologia utilizada para a pesquisa e devido às fontes de obtenção de cada material mineral utilizado.

Argilas como as bentonitas (montmorilonitas), aluminossilicato hidratado de

sódio (HSCAS), zeolita e sepeolita tem sido amplamente utilizados como agentes sequestrantes de aflatoxinas (KUTZ *et al.*, 2009; PIMPUKDEE *et al.*, 2004).

A conformação destas argilas permite a adsorção das micotoxinas, pois apresentam o esqueleto carregado negativamente, conseguindo atrair para o seu interior os metabólitos secundários produzidos por fungos. Para esta característica, se denomina como capacidade de troca catiônica (CTC), onde o distingue a quantidade de cátions intercambiáveis por unidade de peso do material. As argilas com alta CTC possuem um alto número de cargas elétricas negativas em sua superfície (SANTURIO, 2000).

Os tipos de adsorventes comercialmente utilizados se compõe basicamente de uma argila ou um *blend* de alguns tipos de argilas. Os materiais mais utilizados são as bentonitas sódicas e os HSCAS. Porém outro tipo que pode ser explorado são as zeolitas.

Devem ser considerados que, independentemente da derivação de material mineral a ser utilizado, cada fonte (mina) e o método de extração (mineração), ou até mesmo partidas diferentes de uma mesma mina apresentam características específicas, que irão interferir e alterar a composição da matéria-prima, e que podem levar a consideráveis mudanças na capacidade de adsorção das micotoxinas. Estas variáveis devem ser consideradas e avaliadas através de um serviço de garantia de qualidade, para que todo o material extraído apresente a mesma característica com relação à CTC e, conseqüentemente, eficiência como AAM (THIEU & PETTERSSON, 2008).

O melhor método para tal avaliação é o estudo *in vitro*, onde o ensaio simula as condições gastrointestinais, tanto em pH ácidos como básicos (pH 3,0 e pH 6,0 ou 7,0), possibilitando um bom controle de qualidade para cada lote produzido.

Concomitantemente é importante estabelecer o correto percentual de inclusão do material na ração animal, com intuito de otimizar a capacidade de ligação AAM-micotoxina.

Através dos vários estudos *in vivo* já desenvolvidos com estes materiais (BETINA *et al.*, 2005; DIAZ *et al.*, 2003), fica claro que dose de inclusão *versus* desafio de micotoxina é extremamente importante. Estas são condições que não podem deixar de serem consideradas quando performance de produtos forem comparadas.

2.3.3.1 Zeólitas

Sova *et al.* (1991) demonstraram que a zeólita incluída a 5%, significativamente reduziu a heterofilia e linfopenia em frangos de corte alimentados com dietas contaminadas com aflatoxina. Os autores, entretanto, notaram que a zeólita não protegeu os animais das alterações agudas no parênquima hepático causadas pela exposição da micotoxina. Quando Harvey *et al.* (1993), alimentaram frangos de corte com uma dieta contendo 3,5 ppm de aflatoxinas com e sem a inclusão de 5 diferentes tipos de zeólitas disponíveis no comércio, utilizadas na concentração de 0,5%, observaram que 3 das 5 zeólitas testadas não foram eficazes em aliviar a diminuição no ganho de peso associado à ingestão de aflatoxina. Já os outros 2 produtos foram claramente efetivos em reduzir a toxicidade. Similarmente, Parlat *et al.* (1999) mostraram que a adição de clinoptilolita significativamente reduziu os efeitos negativos da aflatoxina no consumo de alimentos e ganho de peso em codornas. Miazzo *et al.* (2000) através de testes *in vitro* identificaram a alta habilidade de uma zeólita de sódio em adsorver aflatoxina. Os testes *in vivo* foram realizados em frangos de corte alimentados com dieta adicionada de 2,5 mg de AFB1/Kg e 1% de zeólita. As avaliações nos ganhos de peso demonstraram que não houve diferenças entre os animais controle e àqueles alimentados com AFB1 adicionada da zeólita, sugerindo a eficácia do produto em adsorver a micotoxina.

2.3.3.2 Aluminossilicato Sódio - Cálcio Hidratado (HSCAS)

É o adsorvente de micotoxinas mais amplamente estudado entre as argilas minerais. O interesse no seu potencial de adsorver micotoxina é baseado na sua habilidade de sequestrar substâncias carregadas positivamente ou compostos catiônicos (RAMOS & HERNANDEZ, 1997). Phillips *et al.* (2002) citam que este produto, utilizado em níveis de até 0,5% no alimento, constitui-se num aditivo alimentar, cuja finalidade é reduzir a umidade em gêneros alimentícios e melhorar as propriedades de fluxo durante estocagem e transporte. Além dessa importante função, pesquisas têm demonstrado a sua eficácia em reduzir a aflatoxicose em aves. Baseado em uma série de estudos “*in vitro*” com vários minerais silicatos, Phillips *et al.* (1988) comprovaram que o HSCAS era o produto mais efetivo para sequestrar aflatoxina devido a sua alta

afinidade e associação estável com a AFB1. A partir dessas informações, vários trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de caracterizar o mecanismo de adsorção da aflatoxina ao HSCAS. Phillips (1999); Phillips *et al.* (1995; 2002) e Grant & Phillips (1998) relatam que a porção β carbonil da molécula de aflatoxina liga-se ao HSCAS através dos íons alumínio presentes nas margens da molécula do adsorvente. Phillips (1999) e Phillips *et al.* (2002) citam que a forte ligação da AFB1 ao HSCAS pode ser explicada pelo mecanismo de compartilhamento de elétrons negativos provenientes da superfície da argila com os átomos parcialmente positivos da molécula adsorvida. Os carbonos que compõe o sistema dicarbonil na molécula de aflatoxina são parcialmente positivos, portanto, essenciais para o mecanismo de adsorção. Além disso, utilizando modelos moleculares, demonstraram que a adsorção da aflatoxina ocorre principalmente nas superfícies internas (regiões intercamadas) da molécula do HSCAS, sendo as superfícies externas responsáveis por menores quantidades de adsorção. Relatam, ainda, que outros mecanismos de adsorção podem envolver a quelação, ou seja, a interação da AFB1 com vários metais nos sítios terminais da molécula ou com cátions (especialmente cálcio) das regiões intercamadas.

HSCAS, fornecido principalmente na concentração de 0,5% nas dietas, tem sido testado em uma grande variedade de animais, incluindo frangos, perus, suínos, visons, bovinos e ovinos.

Frangos De Corte

Em pesquisas realizadas em frangos de corte, Davidson *et al.* (1987) demonstraram que a adição de 0,5% de HSCAS a dietas contaminadas com 20 e 80 μg de aflatoxinas/Kg de alimento, foi capaz de reduzir a disponibilidade da micotoxina no fígado e sangue das aves.

Phillips *et al.* (1988) através de testes *in vitro* demonstraram a alta afinidade e estabilidade de ligação do HSCAS a AFB1 em diferentes soluções aquosas. Realizando estudos *in vivo* em frangos de corte e galinhas *Leghorn* mostraram que a administração de 0,5% de HSCAS significativamente diminuiu os efeitos inibitórios de 7,5 mg de AFB1/Kg de alimento. Os mesmos resultados foram encontrados por Kubena *et al.* (1988) que demonstraram que a adição de 0,5% de HSCAS reduziu os efeitos inibitórios observados no crescimento quando frangos de corte e galinhas *Leghorn* foram alimentados com dietas contendo 7,5 mg de AFB1/Kg ou 5 mg de aflatoxinas

totais/Kg. Com o mesmo desenho experimental, Kubena *et al.* (1990a) confirmaram que 0,5% de HSCAS foi capaz de diminuir o impacto tóxico nos ganhos de peso e taxas de crescimento produzido pela ingestão de aflatoxinas. Também observaram que com exceção do peso relativo da Bursa de Fabricius, os pesos relativos do fígado, rins, proventrículo e moela, assim como as concentrações das proteínas plasmáticas totais, albumina e GGT no soro não foram afetadas quando HSCAS foi incluído na dieta.

Doerr (1989) demonstraram que pequenas doses de HSCAS (0,125%) foram eficazes em proteger frangos de corte quando 2 mg de aflatoxinas foram adicionadas a dieta, observando-se 50% de melhora nos parâmetros avaliados. Entretanto, a completa proteção foi obtida quando o adsorvente foi utilizado em níveis de 0,5%.

Scheideler (1989) obteve efeitos positivos no crescimento de frangos de corte e prevenção do aumento dos lipídios hepáticos quando HSCAS foi adicionado a dietas das aves. Entretanto, observou um incremento dos níveis de fósforo sanguíneo. Já Chung & Baker (1990) conduzindo um estudo com o objetivo de avaliar o efeito do HSCAS na utilização do fósforo sanguíneo obtiveram resultados diferentes. Observaram que a inclusão de 0,5% e 1% do adsorvente não apresentou efeitos na utilização do mineral, indicando que este produto não impede a utilização do fósforo inorgânico. Resultados similares foram obtidos na utilização de riboflavina, vitamina A e magnésio, porém neste estudo, observou-se redução significativa do zinco quando HSCAS foi utilizado a 1% (CHUNG & BAKER, 1990). Outros resultados foram obtidos por Scheideler (1993), que ao conduzir um novo estudo em frangos de corte observou que a adição de 1% de HSCAS a dietas contaminadas com 2,5 mg de AFB1 /Kg de alimento melhorou as taxas de crescimento e suprimiu a quantidade de lipídios hepáticos causados pela ingestão da micotoxina, informações similares ao seu trabalho anterior. Entretanto, neste trabalho, a adição de HSCAS isolado causou aumento da cinza óssea e deprimiu os níveis de cloro sérico.

Araba & Wyatt (1991) mostraram que quando HSCAS foi adicionado a dietas de frangos de corte contaminadas com 5 mg de aflatoxinas /Kg de alimento, a toxicidade foi reduzida.

Kubena *et al.* (1993a) testaram três tipos diferentes de aluminossilicatos que apresentaram altos índices de adsorção de aflatoxinas *in vitro*. A incorporação de 0,5% destes produtos em dietas de frangos de corte contaminadas com 2,5 e 5 mg/Kg de aflatoxina significativamente reduziu os efeitos da aflatoxina no peso corporal, peso

relativo dos órgãos e bioquímica sanguínea. Porém, observaram que esses resultados apresentaram diferenças entre os produtos, o que enfatiza que os aluminossilicatos podem diferir na sua habilidade de proteção contra a aflatoxicose.

Ledoux *et al.* (1999) em estudos *in vitro* encontraram que HSCAS foi capaz de adsorver 100% de AFB1 a pH 3,0 e pH 9,0. A avaliação *in vivo* do adsorvente, utilizando frangos de corte alimentados com dietas contendo 4mg/Kg de AFB1 e incluídas de 1% do HSCAS, demonstrou efeitos positivos do adsorvente nos parâmetros de ganho de peso, peso dos órgãos, níveis bioquímicos e lesões hepáticas.

Pimpukdee *et al.* (2004) estudando a inclusão de 3 níveis diferentes de HSCAS (0,5%; 0,25% e 0,125%), constataram que a adição do adsorvente significativamente protegeu as aves dos efeitos tóxicos causados pela ingestão de 5mg/Kg de aflatoxina, além de preservar os níveis de vitamina A, mesmo quando utilizado na concentração de 0,125%. Os autores observaram ainda que os melhores resultados foram obtidos quando o HSCAS foi utilizado em níveis de 0,25%, não sendo tóxico em nenhuma das dosagens utilizadas.

Como o HSCAS é hábil em sequestrar aflatoxina, sua capacidade em adsorver outras micotoxinas foi estudada por Huff *et al.* (1992), os quais demonstraram em um experimento de 3 semanas que a adição de 0,5% de HSCAS a frangos de corte alimentados com dietas contendo 2g/kg/alimento de ocratoxina A, associada ou não a 3,5 g/kg/alimento de aflatoxinas, foi capaz de reduzir os efeitos tóxicos causados pela ingestão de aflatoxina somente, não apresentando eficácia quando as aves receberam dietas com ocratoxina A isolada ou em combinação com aflatoxina. Resultados similares foram encontrados por Kubena *et al.* (1990b) quando utilizaram HSCAS para adsorver T-2. A adição de 0,5% de HSCAS a dietas com 8 mg de T-2 /Kg, com e sem aflatoxinas, demonstraram que HSCAS significativamente diminuiu alguns dos efeitos tóxicos da aflatoxina quando presente isolada ou em combinação com T-2, porém não teve efeito na toxicidade das dietas contendo T-2 somente. Posteriormente, Kubena *et al.* (1998) adicionaram HSCAS em níveis de 0,25%; 0,375% e 0,8% a dietas de frangos de corte contaminadas com 5 mg de aflatoxina e 8 mg de T-2 /Kg, obtendo resultados similares ao trabalho anterior. Mais uma vez, Kubena *et al.* (1993b) demonstraram que HSCAS a 0,5% foi eficaz em proteger frangos de corte dos efeitos tóxicos causados pela ingestão de aflatoxina. Entretanto apresentou limitada proteção contra os efeitos

combinados de aflatoxina associada a 5 mg/Kg/dieta de diacetoxiscirpenol (DAS) e nenhuma proteção quando DAS foi administrada isolada.

Dwyer *et al.* (1997) avaliaram a habilidade de diferentes adsorventes inorgânicos, entre eles o HSCAS, em adsorver ácido ciclopiazônico em experimentos *in vivo*. Para isto, frangos de corte foram alimentados durante 21 dias com dietas contendo 45 mg/Kg de ácido ciclopiazônico adicionadas de 1% do adsorvente. O tratamento com os adsorventes inorgânicos não diminuiu os efeitos inibitórios da toxina no ganho de peso e aumento de peso dos órgãos, entretanto observaram melhores resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Mesmo assim, os autores afirmam que os adsorventes testados foram ineficazes em prevenir a toxicidade do ácido ciclopiazônico *in vivo*.

2.3.3.3 Montmorilonitas (Bentonitas)

As bentonitas são argilas com predominância de montmorilonitas. Conforme a composição de cátions intercambiáveis podem ser classificadas como bentonitas de cálcio, magnésio, potássio e sódio. Devido ao seu conteúdo de montmorilonita, as bentonitas incham e formam géis tixotrópicos (DIAZ & SMITH, 2005).

Recentemente, Desheng *et al.* (2005) desenvolveram um estudo de adsorção isotérmica da AFB1 em montmorilonita. Os autores encontraram que a quantidade máxima de adsorção em solução aquosa a pH 2 e 8 foi de 613,5 µg (80%) e 628,9 µg (90%) de AFB1/g de montmorilonita, respectivamente. Os resultados deste estudo demonstraram que o mecanismo de adsorção ocorreu preferencialmente nas extremidades da molécula de montmorilonita, por meio de duplas ligações de hidrogênio, não havendo ligação nas áreas internas.

A avaliação da eficácia das bentonitas como agentes sequestrantes de micotoxinas tem sido testada *in vitro* e *in vivo* utilizando várias espécies animais, particularmente frangos de corte e suínos.

Avaliações in vitro

Masimango *et al.* (1978) apud Diaz & Smith (2005), demonstraram que várias bentonitas tinham a habilidade de ligar AFB1 em solução tampão. Entretanto, Dvorak (1989) mostrou que a bentonita era eficaz em adsorver AFB1 em diferentes meios

líquidos assim como água, solução salina, soro e conteúdo gástrico de suínos e líquido ruminal de bovinos. Similarmente, Ramos & Hernández (1996) também demonstraram a alta capacidade das bentonitas em sequestrar aflatoxinas em diferentes soluções.

Diaz *et al.* (2002) avaliaram a capacidade *in vitro* de 3 bentonitas de sódio e 1 bentonita de cálcio em adsorver 5µg de AFB1. Neste estudo, encontraram que as bentonitas testadas foram hábeis em adsorver 95%-98% de AFB1, independente do pH, indicando que estes agentes apresentam forte habilidade de adsorção, porém enfatizam a necessidade de estudos *in vivo*. Resultados diferentes foram obtidos por Bueno *et al.* (2005) ao avaliar a eficácia de adsorção das bentonitas para ZEA.

Frangos De Corte

Utilizando frangos de corte, Santurio *et al.* (1999) conduziram um estudo para avaliar a eficácia de 0,25% e 0,5% de bentonita de sódio natural na prevenção dos efeitos tóxicos causados pela ingestão de 3 mg de aflatoxina/kg de alimento. Observaram que a bentonita, quando incluída na concentração de 0,5%, melhorou os ganhos de peso, consumo de alimentos e eficiência produtiva. Os pesos dos órgãos (fígado, coração, pâncreas e papo), assim como os parâmetros bioquímicos não foram afetados pela inclusão do adsorvente. Entretanto, constataram que os níveis séricos de fósforo foram reduzidos em 30%.

A inclusão de montmorilonita à dietas de frangos de corte na concentração de 0,5%, significativamente reduziu os efeitos adversos da administração de 200 µg de AFB1/ Kg de alimento. Os depósitos de cálcio, fósforo, cobre, ferro e zinco não foram alterados pela ingestão de AFB1 associada a montmorilonita, entretanto os níveis de manganês, chumbo e flúor foram diminuídos pela adição do adsorvente (DESHENG *et al.*, 2005). Já Southern *et al.* (1994) ao realizarem um experimento com a finalidade de determinar a interferência de 0,5% de bentonita de sódio e HSCAS no desempenho de crescimento e concentração de minerais da tíbia em frangos de corte alimentados com dietas desprovidas de minerais, observaram que a inclusão dos adsorventes não alterou o percentual de cinza da tíbia, do cálcio ou do fósforo. Além desse efeito, houve um aumento do consumo de alimentos, o que resultou no incremento do ganho de peso.

A possível interferência da bentonita de sódio na eficácia da monensina e salinomocina, utilizadas para o tratamento da coccidiose aviária, foi pesquisada por Gray *et al.* (1998). Os resultados deste estudo sugerem que a bentonita incluída a 0,5% nas

dietas somente poderá interferir na eficácia dos anticoccidiostáticos quando estes compostos são adicionados em níveis menores que os recomendados. Entretanto, na prática esse problema não deverá ocorrer, uma vez que os níveis indicados de monensina e salinomocina são altos o suficiente para permitir a interferência.

Rosa *et al.* (2001) avaliaram a eficácia de uma bentonita de sódio proveniente do sul da Argentina. A utilização de 0,3% da bentonita em dietas de frangos de corte contendo 5 mg de aflatoxina/kg, amenizou os efeitos tóxicos causadas pela ingestão da micotoxina, porém lesões hepáticas caracterizadas por esteatose foram observadas, indicando a pouca eficácia desta bentonita em adsorver aflatoxina no trato gastrointestinal. Por outro lado, a administração do adsorvente não afetou o desempenho das aves quando utilizado isoladamente nas dietas.

A adição de bentonita em níveis de 0,3% a dietas de frangos de corte contaminadas com 200 mg/Kg de FB1 e 2,5 mg/Kg de AFB1, significativamente reduziu os efeitos tóxicos da AFB1 isolada ou em associação a FB1, observados no ganho de peso, peso dos órgãos, padrões bioquímicos e lesões hepáticas (MIAZZO *et al.*, 2005).

Pasha *et al.* (2007) avaliaram a eficiência de BNa com inclusões de 0,5% e 1%, HSCAS (Sorbatox) a 0,5% e HSCAS (Klinofeed) contra um desafio de 100 ppb de aflatoxinas em ração para frangos de corte.

Na fase inicial, onde os danos causados pela toxina são mais acentuados devido a rápida deposição de proteína muscular, os resultados mostraram que a BNa obteve a melhor eficiência no sequestro das aflatoxinas (acumulando 856,8 g de ganho de peso nesta fase), quando comparado com o grupo controle negativo (1029,4 g) e o controle positivo (663,7 g), e contra os produtos a base de HSCAS (Sorbatox com 649,5 g; Klinofeed com 638,5 g). Inclusive, o BNa obteve melhores resultados no ganho de peso na inclusão de 0,5% quando comparado com a inclusão de 1%. Este estudo mostrou que a adição de 0,5% de BNa à ração de frangos de corte foi efetivo na redução da toxicidade, possibilitando um bom ganho de peso na fase inicial.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo aceito na revista *British Poultry Science*

British Poultry Science, 2014

Vol. 00, No. 00, 1–6, <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2014.883065>



Efficacy of a Brazilian calcium montmorillonite against toxic effects of dietary aflatoxins on broilers reared to market weight

J. C. ECKHARDT, J. M. SANTURIO¹, R. A. ZANETTE¹, A. P. ROSA², A. SCHER², M. D. POZZO², S. H. ALVES¹, AND L. FERREIRO

Post-Graduate Program in Veterinary Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil,

¹*Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, and*

²*Department of Zootechnology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

Title: Effect of Brazilian calcium montmorillonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins.

Authors: J. C. ECKHARDT^a, J. M. SANTURIO^c, R. A. ZANETTE^c, A. P. ROSA^b, A. SCHER, M. dal POZZO^c, S.H. ALVES^c, and L. FERREIRO.

Affiliations:

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

^b Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^c Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

***Corresponding author**

*Janio M Santurio

E-mail: santurio@smail.ufsm.br

Address: Campus UFSM, LAPEMI, Prédio 20, Sala 4139, Postal Code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel/fax: +55-55-32208906

Abstract

The protective effect of Brazilian natural calcium montmorillonite (BCM) in the prevention of aflatoxicosis in chickens was studied. One thousand and fifty-six 1 d-old Cobb male broilers were housed in experimental pens (22 chickens per pen) for 42 d. Two levels of aflatoxins (0 and 3 mg kg⁻¹) and three levels of BCM (0, 2.5 and 5 g kg⁻¹) were assayed. Each treatment had eight replicates of 22 broiler chickens each. Of all the chickens tested in the experiment, the ones treated with aflatoxins were the most adversely affected. The addition of BCM to the contaminated diets at concentrations of 2.5 and 5.0 g kg⁻¹ improved the chickens' body weight ($P < 0.0001$) at 42 d of age by 13.8 and 22.6%, respectively; increased feed intake by 13.6% (2.5g kg⁻¹ BCM) and 29.2% (5 g kg⁻¹ BCM), and improved the productive efficiency index by 39.4 and 49.8%, respectively. Dietary BCM in diets containing aflatoxins positively affected parameters such the weights of the chickens' hearts ($P = 0.0088$) and gizzards ($P = 0.0319$). Serum parameters were not affected when BCM was added to the diets. BCM did not cause adverse effects on the chickens that did not receive aflatoxin. The BCM partially neutralised the effects of aflatoxins on broilers when included at levels of 2.5 and 5.0 g kg⁻¹ in the diet.

Key words: aflatoxins; Brazilian calcium montmorillonite; broiler chickens; performance; blood parameters; natural clay

INTRODUCTION

Aflatoxins are recognised as important mycotoxins because of their toxicity and their widespread occurrence as natural food contaminants, principally in tropical and subtropical countries (Kubena et al., 1990a). The toxicity of aflatoxins in broiler chickens has been described in detail elsewhere (Doerr et al., 1983; Huff et al., 1983).

There are two types of naturally occurring bentonites: calcium montmorillonite (BCM) and sodium montmorillonite (Wright, 1968). Montmorillonites are clays that originate from the smectites, and their physical properties are those of this mineral group. Natural clays have been used in chicken rations primarily as an agglutinant to improve pellet quality (Araba, 1992).

Several studies demonstrate that sodium aluminosilicate, sodium calcium aluminosilicate, BCM and clinoptilolite can adsorb aflatoxins (Phillips et al., 1988; Araba and Wyatt, 1991; Scheideler, 1993; Santurio et al., 1999). This adsorptive capability was demonstrated *in vitro* and *in vivo* (Doerr, 1989; Kubena et al., 1990b; Oguz et al., 2000), and is related to the ion exchange between aflatoxins and free radicals of these substances. Variable degrees of adsorption occur, depending on the chemical structure of each adsorbent. Adsorption of aflatoxin B on untreated bentonite, hydrated calcium bentonite, hydrated sodium bentonite and hydrated sodium calcium bentonite was 67.39, 55.51, 80.83 and 68.55%, respectively (Chaturvedi et al., 2002; Desheng et al., 2005). Desheng et al. (2005) conducted *in vitro* studies of the isothermal adsorption and the adsorptive mechanism of aflatoxin B1 (AFB1) on BCM. These authors found that the maximum amounts of AFB1 adsorbed by AFB1-BCM complex by using aqueous solution at pH 2 and 8 were 613.5 and 628.9 µg of AFB1 per gram of BCM, respectively. The authors measured the structure of AFB1-BCM by using X-ray diffraction and infrared absorption spectrum. The results suggested that the mechanism

of AFB1 adsorption by BCM was that AFB1 sorbed onto the edge of BCM by a double hydrogen bond, and that AFB1 molecules did not penetrate the interlayer of BCM.

Testing four different aluminosilicates, Scheideler (1993) observed that the *in vitro* adsorption capability of these substances on AFB1 in the intestinal tract varied from 0 to 40 percent according to the type of aluminosilicate tested. Santurio et al. (1994) in an *in vitro* test with six adsorbents (two sodium and calcium aluminosilicates, one zeolite and one sodium aluminosilicate), detected variations in adsorption from 17 to 87%, depending on the adsorbent.

Araba and Wyatt (1991) compared the adsorption efficiency of sodium bentonite, hydrated sodium calcium aluminosilicate and ethacal at concentrations of 5 and 10 g kg⁻¹ in the feed of broiler chickens. The authors reported that the different adsorbent substances did not alter the chickens' performance with the exception of the sodium calcium aluminosilicate, which reduced feed intake and body weight gain (BWG) and increased water intake.

The objective of this experiment was to evaluate the efficacy of natural BCM at concentrations of 0, 2.5 and 5 g kg⁻¹ in broiler chicken rations to reduce the toxic effects of aflatoxins.

MATERIAL AND METHODS

*Brazilian Calcium Montmorillonite*¹

The adsorbent used in our experiment (CAS: 1302-789) is produced from mines in northeast Brazil, and its composition is described in the Table 1.

Contamination of diet with aflatoxins

¹ ALPHAFEED[®] – Buntech Tecnologia de Insumos – São Paulo, Brazil

Aflatoxins were produced by fermentation in converted rice under constant stirring and controlled temperature. The NRLL 2999 strain of *Aspergillus parasiticus* was used according to the method described by Shotwell et al. (1966) and improved by West et al. (1973). After autoclaving with open valve to stop fungal growth, the rice was dried with hot air and ground in a coffee grinder. The aflatoxin concentration was determined by using spectrophotometric (Camontney and Nesbitt, 1965) and HPLC methods (Thorpe et al., 1982).

A total of 760 mg kg⁻¹ of aflatoxins was obtained with the dry fermentation method, using rice as substrate that contained 86% AFB₁, 8% AFB₂, 4.6% AFG₁ and 1.4% AFG₂. The ground rice was added to the diets in the required proportion. The concentration of ground rice never exceeded 1% of the total diet.

The basal diets were analysed for the presence of other mycotoxins as zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, Deoxynivalenol and T-2 toxin.

Rearing conditions

One thousand and fifty-six 1 d-old male Cobb broilers were housed in 48 experimental pens (22 chickens per pen), that measured 1.5 x 1.5 m. A 2 x 3 factorial design, with two levels of aflatoxins (0 and 3 mg kg⁻¹) and three levels of BCM (0, 2.5, and 5 g kg⁻¹) was used, totaling six treatments with 8 replicates each.

Animals were fed a commercial feed, using a starter diet from day 1 to 21, 21 d, a grower diet from day 22 to 35 and a finisher diet until slaughter at day 42. Chickens were fed *ad libitum* (Table 2). BCM was added using a mixer while preparing the feed.

Birds were weighed at 7, 21, 35 and 42 days of age, and mortality was recorded as it occurred. The feed was weighed weekly to determine the intake and feed conversion, and animals' viability and their productive efficiency index (PEI) were calculated.

Post-mortem examination

When chickens were 42 d old, 24 birds per treatment (3 per replicate) were weighed and euthanized with electric shock. Blood was collected by cardiac puncture, and liver, spleen, heart and gizzard were collected and weighed. The serum concentrations of calcium, chlorine, iron, magnesium, phosphorous, potassium and sodium were analysed using reagents according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Data obtained from all determined parameters were statistically analyzed by using a factorial experimental design (two aflatoxin levels and three BCM levels) of SAS[®] software (Sas Institute, 1985). The variation of measurements per treatment and its significance were compared by using the Tukey's test. All the significance levels were based on probability levels of $P < 0.05$.

RESULTS

Chickens that consumed diets with 3 mg kg^{-1} of aflatoxins had lower body weight (Table 3) and a significant decrease in BWG from seven to 42 days of age (Table 4), in comparison to the birds in the control group. The inclusion of BCM in feed contaminated with aflatoxins increased the chickens' BWG from 8 to 42 days of age. At 42 days of age, chickens that had been fed aflatoxins and BCM at the concentrations of 0.25 and 0.5 g kg^{-1} weighed 13.8% and 22.6% more, respectively than those that only received aflatoxins in the diet, respectively, at 42 days of age. A reduction of 45.5% in feed consumption was observed in the group that received aflatoxins in the diet when compared to the control group (Table 5). However, reductions of 38.1 and 29.6% in the

feed intake were observed when concentrations of 0.25 and 0.5 g kg⁻¹ of BCM, respectively, were added to the aflatoxin-contaminated diets (Table 5). Feed conversion rate was decreased in 6.9 % when aflatoxins were added to diets (Table 6).

Mortality rates of 30.6 and 1.0% were recorded in groups fed aflatoxins, and in the groups fed aflatoxins free diets, respectively. The addition of BCM to the contaminated diets reduced the mortality of chickens (Table 7).

The productivity efficiency index (PEI) was affected (Table 7). Chickens that consumed diets with 3 mg kg⁻¹ of aflatoxins had a lower production performance than those that consumed diets without aflatoxins. However, concentrations of 0.25 and 0.5 g kg⁻¹ of BCM added to the feed reduced negative effects of aflatoxins on this parameter.

Aflatoxins intake caused an increase of 71.4% in the average weight ($P < 0.0001$) of the chickens' livers (Table 8). An increase in the average weights ($P < 0.001$) of the gizzards and hearts of the chickens that received aflatoxin-contaminated feed was observed and the use of 0.5 g kg⁻¹ of BCM moderated this increase. The spleen weight were not affected in any group.

Because aflatoxins affect hepatic function and the function of other organs, the level of several minerals and serum proteins was evaluated (Table 9). Broiler chickens that received the aflatoxins had decreased serum potassium and iron concentrations (17.2 and 10.5% less than the control animals, respectively). Compared to controls, aflatoxins intake elevated the serum levels of sodium and chlorine. Levels of calcium, magnesium and phosphorous were not affected. Supplementing chickens with BCM did not affect serum levels of any of the minerals tested. The addition of aflatoxins to the diet negatively affected albumin concentration. No differences were observed with the addition of BCM.

DISCUSSION

The use of agents that act as antidotes to, or antagonise the effects of, mycotoxins by the swine and poultry industries has increased in the last few years because of the agents' practicality and economy.

Avantaggiato et al. (2005) reported that the European community would rather use physical methods as decontamination strategies when the use of adsorbents by producers is recommended to protect animals from the deleterious effects of aflatoxins. These inorganic substances act as chemical sponges in the gastrointestinal tract and prevent absorption in the intestine and distribution of the mycotoxins to the target organs. The authors concluded that the most important adsorption factor is the physical structure of the adsorbent, *e.g.*, its electrical load and distribution, pore size and surface area. Moreover, the chemical properties of the mycotoxins, such as polarity, solubility, shape and distribution of the electric load, also constitute important adsorption factors.

The extensive use of these adsorbents has led to a wide availability of products in the market, most of them showing high capacity of *in vitro* adsorption. However, *in vivo* trials are important to prove this adsorption capacity (Avantaggiato et al., 2005) because studies have called attention to the potential lack of *in vivo* efficacy despite good *in vitro* results (Diaz, 2005).

A beneficial effect of BCM and sodium montmorillonite (bentonite) can be observed in chickens that consume aflatoxin-contaminated feed. Santurio et al. (1999) used 0.25 and 0.5% of natural sodium bentonite in diets containing 3 mg kg⁻¹ of aflatoxins that were fed to broiler chickens. The concentration of 0.5% improved body weight gain, feed intake and productive efficiency index. Dietary natural sodium bentonite did not affect the parameters such as the weights of the liver, heart, pancreas, nor did it affect crop or biochemical parameters. The same pattern was observed in our

study, though the beneficial effects of the BCM were more pronounced than the experiment conducted by Santurio et al. (1999), in which the heart and gizzard were less impaired by the aflatoxins in the groups that were fed BCM.

A decrease in serum potassium and an increase in sodium and chloride in the groups that were fed aflatoxins were observed, however BCM had no effect on these parameters. Scheideler (1993), observed no alterations in serum levels of calcium, phosphorous, potassium or sodium of chickens that received diets that contained the adsorbents Ethacal[®], Novasil[®], Perlite or Zeobrite. However, Desheng et al. (2005) reported that AFB1 and Calcium Montmorillonite did not affect the concentrations of calcium, phosphorous, copper, iron and zinc in broiler-chicken bones, but the addition of montmorillonite decreased the concentrations of manganese, lead and iron.

Araba (1992), who evaluated the effect of montmorillonites from various sources and with different pH values on the performance of broiler chickens, demonstrated that bentonites with pH lower than 9 were more efficient at adsorbing and retaining aflatoxins. The BCM used in our experiment had a high swelling capability and pH of 8.5.

CONCLUSIONS

In conclusion, the results indicate that low concentrations (0.25 and 0.5 g kg⁻¹) of dietary BCM reduce the intestinal adsorption of aflatoxins, thus reducing its deleterious effect on broiler productivity. The beneficial effect of BCM was more noticeable at 42 days of age, mainly with regard to BWG. Less benefit was observed in heart and gizzard weights, as well as the analysed serum. Therefore, BCM, studied under the conditions of this experiment, showed a good rate of adsorption of aflatoxins as observed in most of the evaluated parameters.

REFERENCES

- Araba, M., 1992. Factors relating to prevention and control of aflatoxicosis in broiler chickens. Ph.D. Thesis, University of Georgia, Athens, p. 238.
- Araba, M. and Wyatt, R.D., 1991. Effects of sodium bentonite, hydrated sodium calcium aluminosilicate (Novasil), and ethacal on aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Sci.* 70 (Suppl.1):6.
- Avantaggiato, G., Solfrizzo, M., Visconti, A., 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 22, 379-388.
- Camontney, J., Nesbitt, B.F., 1965. A spectrophotometric method for determination the aflatoxins. *Analyst* 3, 155-159.
- Chaturvedi, V.B., Singh, K.S., Agnihotri, A.K., 2002. *In vitro* aflatoxin adsorption capacity of some indigenous aflatoxin adsorbents. *Indian J. Anim. Sci.* 72, 257-260.
- Desheng, Q., Fan, L., Yanhu, Y., Niya, Z., 2005. Adsorption of aflatoxin B1 on montmorillonite. *Poultry Sci.* 84, 959-961.
- Diaz, D.E., 2005. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralization of mycotoxins, in: *The mycotoxin blue book*. Nottingham University Press, Nottingham, U.K., pp. 323-339.
- Doerr, J.A., 1989. Effect of an aluminosilicate on broiler chickens during aflatoxicosis. *Poultry Sci.* 68, 45.
- Doerr, J.A., Huff, W.E., Wabeck, C.J., Chaloupka, G.W., May, J.D., Merkley, J.W., 1983. Effects of low-level chronic aflatoxicosis in broiler-chickens. *Poultry Sci.* 62, 1971-1977.

Huff, W.E., Doerr, J.A., Wabeck, C.J., Chaloupka, G.W., May, J.D., Merkley, J.W., 1983. Individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin-a on bruising in broiler-chickens. *Poultry Sci.* 62, 1764-1771.

Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Corrier, D.E., Phillips, T.D., Rottinghaus, G.E., 1990a. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poultry Sci.* 69, 1078-1086.

Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Huff, W.E., 1990b. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated, sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Sci.* 69, 727-735.

Oguz, H., Kececi, T., Birdane, Y.O., Onder, F., Kurtoglu, V., 2000. Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *Res. Vet. Sci.* 69, 89-93.

Phillips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.R., Heidelbaugh, N.D., 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate - a high-affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Sci.* 67, 243-247.

Santurio, J.M., Mallmann, C.A., Baldissera, M.A., Ewald, C., Heer, A., 1994. Níveis de adsorção de Aflatoxina B1 *in vitro* de aluminosilicatos e bentonitas comercializados no Brasil, In: Proceedings of the I Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia, Rio de Janeiro, Brazil.

Santurio, J.M., Mallmann, C.A., Rosa, A.P., Appel, G., Heer, A., Dageforde, S., Bottcher, M., 1999. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. *Brit. Poultry Sci.* 40, 115-119.

Sas Institute, 1985. SAS User's Guide Statistics. SAS Institute, Incorporated, Cary, NC.
Scheideler, S.E., 1993. Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin-B1 on aflatoxin toxicity, chick performance, and mineral status. *Poultry Sci.* 72, 282-288.

Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W., Stubblefield, R.D., Sorenson, W.G., 1966. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14, 425-428.

Thorpe, C.W., Ware, G.M., Pohland, A.E., 1982. Determination of aflatoxins by high performance liquid chromatography with fluorescence detector and using post-column derivatisation, In: *Proceedings of the 5th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, Vienna, Austria.

West, S., Wyatt, R.D., Hamilton, P.B., 1973. Increased yield of aflatoxin by incremental increases of temperature. *Appl. Environ. Microb.* 25, 1018-1019.

Wright, P.C., 1968. The Meandru creek bentonite - A reply. *J. Geol. Soc. Aust.* 15, 347-350.

Table 2. Composition of the basal diets used in the experiment.

Ingredients (g kg⁻¹)	1 – 7 d	8 – 21 d	22 – 35 d	36 – 42 d
Maize	550	549.9	575.1	597.4
Soybean meal (46% CP)	381.2	370.6	342.2	322.2
Soybean oil	29.3	40.2	43	47
Dicalcium phosphate	18	18.1	18.3	15
Limestone	10.4	10.3	9.4	9
Salt	4	4	4	4
Vitamin and mineral premix ¹	5	5	5	5
L-lysine	1.3	0.8	1.4	0.2
DL-methionine	0.8	1.1	1.6	0.2

Calculated composition (g kg⁻¹)				
Crude Protein	225	220	210	200
Metabolizable energy (MJ kg ⁻¹)	12.47	12.76	12.97	13.18
Calcium	10	10	9.6	9
Available phosphorus	4.5	4.5	4.5	4
Sodium	2	2	1.9	1.9
Lysine	13.8	13	13	11
Methionine	5.4	5.7	5.8	4.6
Met + Cys	9	9.2	9.2	8.1
Threonine	8.6	8.4	8	7.1
Tryptophan	2.4	2.4	2.3	2.1

¹Vitamin and mineral premix provided the following per kilogram: Vitamin A, 2,200,000 IU; vitamin D₃, 500,000 IU; vitamin E, 5,000 mg; vitamin K₃, 660 mg; vitamin B₁, 440 mg; vitamin B₂, 1,150 mg; vitamin B₆, 926 mg; vitamin B₁₂, 3,600 µg; biotin, 36 mg; pantothenic acid, 3,600 mg; folic acid, 250 mg; nicotinic acid, 5,560 mg; choline, 60,000 mg; manganese, 12,002 mg; copper, 1,600 mg; iron, 10,000 mg; iodine, 90 mg; selenium, 40 mg; zinc, 10,996 mg.

Table 3. Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on body weight of broilers¹

Variable	Body weight (g)			
	7 d	21 d	35 d	42 d
AFL (mg kg ⁻¹)				
0	144 ^a	891 ^a	2262 ^a	2782 ^a
3	139 ^b	594 ^b	1438 ^b	1872 ^b
BCM (g kg ⁻¹)				
0	142	721 ^b	1764 ^c	2218 ^c
0.25	141	738 ^b	1850 ^b	2344 ^b
0.50	140	768 ^b	1935 ^a	2418 ^a
AFL x BCM				
0 x 0	144	893 ^a	2259 ^a	2765 ^a
3 x 0	141	550 ^c	1270 ^d	1672 ^d
0 x 0.25	144	893 ^a	2261 ^a	2795 ^a
3 x 0.25	138	583 ^c	1440 ^c	1894 ^c
0 x 0.5	143	887 ^a	2267 ^a	2785 ^a
3 x 0.5	138	649 ^b	1603 ^b	2051 ^b
Source of variation				
AFL (mg kg ⁻¹)	0.0203	0.0001	0.0001	0.0001
BCM (g kg ⁻¹)	0.7504	0.0001	0.0001	0.0001
	AFL x BCM		0.8271	0.0001
			0.0001	0.0001
SEM ²	2.54		9.08	21.65
			25.82	

^{a-d} Means within a column with no common superscript differ significantly.

¹ Values represent the mean of 8 replicates of 22 broilers each.

² Pooled standard error of means.

Table 4. Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on average weight gain of broilers¹

Variable	Weight gain (g)					
	1 to 7d	8 to 21 d	22 to 35 d	36 to 42 d	1 to 21 d	1 to 42 d
AFL (mg kg ⁻¹)						
0	98.82 ^a	746.05 ^a	1369.4 ^a	520.13 ^a	844.87 ^a	2734.35 ^a
3	93.48 ^b	455.11 ^b	843.80 ^b	434.54 ^b	548.59 ^b	1826.94 ^b
BCM (g kg ⁻¹)						
0	97.22	219.7 ^b	1043.05 ^c	4540.0 ^b	676.37 ^b	2173.42 ^c
0.25	95.94	225.02 ^b	1112.39 ^b	494.24 ^b	692.63 ^b	2299.26 ^b
0.50	95.29	235.59 ^a	1164.31 ^a	483.73 ^a	721.18 ^a	2369.25 ^a
AFL x BCM						
0 x 0	98.91	748.70 ^a	1366.53 ^a	506.25 ^a	847.62 ^a	2720.40 ^a
3 x 0	95.52	409.60 ^d	719.57 ^d	401.75 ^d	505.12 ^d	1626.44 ^d
0 x 0.25	99.20	748.66 ^a	1367.43 ^a	534.49 ^a	847.87 ^a	2749.79 ^a
3 x 0.25	92.67	444.72 ^c	857.34 ^c	454.00 ^c	537.40 ^c	1848.74 ^c
0 x 0.5	98.34	740.78 ^a	1374.11 ^a	519.64 ^a	839.12 ^a	2732.87 ^a
3 x 0.5	92.25	511.00 ^b	954.50 ^b	447.88 ^b	603.25 ^b	2005.64 ^b
Source of variation						
AFL (mg kg ⁻¹)	0.0124	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
BCM (g kg ⁻¹)	0.7375	0.0001	0.0001	0.1669	0.0001	0.0001
AFL x BCM	0.7971	0.0001	0.0001	0.7364	0.0001	0.0001
SEM ²	2.49	7.63	16.7	21.59	8.88	25.53

^{a-d} Means within a column with no common superscript differ significantly.

¹ Values represent the mean of 8 replicates of 22 broilers each.

² Pooled standard error of means.

Table 5. Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on feed intake of broilers¹

Variable	Feed intake (g)						
	1 to 7d	8 to 21 d	22 to 35 d	36 to 42 d	1 to 21 d	1 to 42 d	
AFL (mg kg ⁻¹)							
0		113	1026 ^a	2249 ^a	1350 ^a	1138 ^a	4730 ^a
3		105	668 ^b	1402 ^b	950 ^b	770 ^b	2947 ^b
BCM (g kg ⁻¹)							
0		110	816 ^b	1037 ^b	1106 ^b	923 ^b	3655 ^c
0.25		109	841 ^b	1805 ^b	1149 ^{ab}	948 ^b	3822 ^b
0.50		108	884 ^a	1934 ^a	1195 ^a	990 ^a	4038 ^a
AFL x BCM							
0 x 0		113	1022 ^a	2251 ^a	1347 ^a	1135 ^a	4732 ^a
3 x 0		107	610 ^c	1224 ^d	864 ^c	712 ^d	2579 ^d
0 x 0.25		114	1031 ^a	2234 ^a	1354 ^a	1143 ^a	4714 ^a
3 x 0.25		105	651 ^c	1376 ^c	945 ^b	753 ^c	2929 ^c
0 x 0.5		113	1024 ^a	2261 ^a	1348 ^a	1137 ^a	4744 ^a
3 x 0.5		105	745 ^b	1606 ^b	1042 ^b	844 ^b	3333 ^b
Source of variation							
AFL (mg kg ⁻¹)		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
BCM (g kg ⁻¹)		0.8290	0.0001	0.0001	0.0129	0.0001	0.0001
AFL x BCM		0.8263	0.0001	0.0001	0.0136	0.0001	0.0001
SEM ²		2.27	11.28	28.8	28.78	12.51	45.25

^{a-d} Means within a column with no common superscript differ significantly.

¹ Values represent the mean of 8 replicates of 3 broilers each.

² Pooled standard error of means.

Table 6. Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on feed conversion of broilers¹

Variable	Feed conversion ratio (weight gain/feed intake)					
	1 to 7d	8 to 21 d	22 to 35 d	36 to 42 d	1to 21 d	1 to 42 d
AFL (mg kg ⁻¹)						
0	1.15	1.38 ^b	1.64	2.61 ^a	1.35 ^b	1.73 ^a
3	1.13	1.47 ^a	1.66	2.22 ^b	1.40 ^a	1.61 ^b
BCM (g kg ⁻¹)						
0	1.13	1.43	1.68	2.43	1.37	1.66
0.25	1.14	1.42	1.62	2.33	1.37	1.66
0.50	1.14	1.42	1.66	2.49	1.38	1.70
AFL x BCM						
0 x 0	1.15	1.37	1.65	2.68	1.34	1.73
3 x 0	1.12	1.39	1.70	2.19	1.41	1.59
0 x 0.25	1.15	1.38	1.63	2.54	1.35	1.73
3 x 0.25	1.13	1.46	1.61	2.12	1.40	1.59
0 x 0.5	1.15	1.38	1.65	2.62	1.36	1.74
3 x 0.5	1.14	1.46	1.68	2.36	1.40	1.66
Source of variation						
AFL (mg kg ⁻¹)	0.1394	0.0001	0.2863	0.0001	0.0003	0.0001
BCM (g kg ⁻¹)	0.8656	0.9315	0.0783	0.2019	0.9855	0.1165
AFL x BCM	0.8484	0.4642	0.2211	0.4307	0.7600	0.2545
SEM ²	0.01	0.02	0.03	0.09	0.02	0.02

^{a-c} Means within a column with no common superscript differ significantly. Values represent the mean of 8 replicates of 22 broilers each.

² Pooled standard error of means.

Table 7. Effect of aflatoxins (AFL) and Brazilian calcium montmorillonite (BCM) on mortality and productive efficiency index (PEI) of broilers¹

Variable	Mortality (%)						PEI ³
	1 to 7d	8 to 21 d	22 to 35 d	36 to 42 d	1 to 21 d	1 to 42 d	
AFL (mg kg ⁻¹)							
0	0	0.6 ^b	0 ^b	0.4 ^b	0.6 ^b	1.0 ^b	372.5 ^a
3	0.6	2.6 ^a	22.4 ^a	5.0 ^a	3.2 ^a	30.6 ^a	187.5 ^b
BCM (g kg ⁻¹)							
0	0	2.3	15.1	2.9	2.3	20.2	248.8 ^b
0.25	0.28	1.7	10.0	2.7	2.0	14.2	282.9 ^a
0.50	0.57	0.9	8.5	3.0	1.5	12.9	289.0 ^a
AFL x BCM							
0 x 0	0	0	0 ^c	0	0	0 ^c	374.4 ^a
3 x 0	0	4.5	30.2 ^a	5.8	4.5	40.5 ^a	144.9 ^c
0 x 0.25	0	1.7	0 ^c	0	1.7	1.7 ^c	372.0 ^a
3 x 0.25	0.6	1.7	20.0 ^b	4.5	2.3	26.8 ^b	202.0 ^b
0 x 0.5	0	0.0	0 ^c	1.3	0.0	1.3 ^c	369.1 ^a
3 x 0.5	1.1	1.7	17.0 ^b	4.7	2.8	24.52 ^b	217.1 ^b
Source of variation							
AFL (mg kg ⁻¹)	0.0757	0.0133	0.0001	0.0054	0.0056	0.0001	0.0001
BCM (g kg ⁻¹)	0.3406	0.3830	0.0404	0.9165	0.7550	0.0712	0.0034
AFL x BCM	0.3406	0.0788	0.0404	0.8296	0.2075	0.0186	0.0003
SEM ²	0.38	0.98	2.62	1.90	1.10	2.90	9.04

^{a-c} Means within a column with no common superscript differ significantly.

¹ Values represent the mean of 8 replicates of 22 broilers each.

² Pooled standard error of means.

³ PEI = (body weight (kg) x viability (%) / feed conversion x day to slaughter) x 100.

Table 8. Effect of aflatoxins (AFL) and calcium montmorillonite (BCM) on the weight of organs (g/100 g⁻¹ BW) of broilers at 42 days of age¹

Variable	Liver	Gizzard	Heart	Spleen
AFL (mg kg ⁻¹)				
0	2.31 ^b	1.80 ^b	0.59 ^b	0.15
3	3.96 ^a	2.16 ^a	0.70 ^a	0.16
BCM (g kg ⁻¹)				
0	3.29	2.03	0.64	0.17
0.25	3.05	1.95	0.61	0.15
0.50	3.07	1.97	0.69	0.14
AFL x BCM				
0 x 0	2.34	1.75 ^c	0.51 ^c	0.15
3 x 0	4.23	2.31 ^a	0.77 ^a	0.18
0 x 0.25	2.25	1.84 ^c	0.54 ^c	0.14
3 x 0.25	3.85	2.06 ^b	0.68 ^b	0.16
0 x 0.5	2.33	1.82 ^c	0.54 ^c	0.15
3 x 0.5	3.81	2.12 ^b	0.66 ^b	0.14
Source of variation				
AFL (mg kg ⁻¹)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0686
BCM (g kg ⁻¹)	0.1283	0.4081	0.1943	0.0512
AFL x BCM	0.2725	0.0319	0.0088	0.0954
SEM ²	0.13	0.02	0.01	0.01

^{a-c} Means within a column with no common superscript differ significantly.

¹ Values represent the mean of 8 replicates of 22 broilers each.

² Pooled standard error of means.

Table 9. Effect of aflatoxins and Brazilian Calcium Montmorillonite (BCM) on the serum levels of Total proteins (TP), Albumin (Alb), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Phosphorous (P), Sodium (Na), Chlorine (Cl), Potassium (K) and Iron (Fe) of broilers at 42-days of age¹

Variable	TP (g dL ⁻¹)	Alb (g dL ⁻¹)	Ca (mg dL ⁻¹)	Mg (mg dL ⁻¹)	P	Na	Cl (mEq L ⁻¹)	K	Fe (μEq L ⁻¹)
AFL (mg kg ⁻¹)									
0	2.29	1.34 ^a	10.81	2.59	7.58	148.41 ^b	108.00 ^b	7.27 ^a	110.75 ^a
3	1.93	0.97 ^b	10.67	2.61	7.41	150.45 ^a	109.25 ^a	6.02 ^b	99.12 ^b
BCM (g kg ⁻¹)									
0	2.14	1.12	10.80	2.62	7.72	149.85	108.84	6.91	102.30
0.25	2.19	1.18	10.61	2.58	7.37	149.12	108.65	6.68	100.12
0.50	1.98	1.16	10.84	2.59	7.37	149.30	108.36	6.32	113.20
AFL x BCM									
0 x 0	2.36	1.35	10.86	2.58	7.99	148.97	107.70	7.45	110.14
3 x 0	1.92	0.89	10.73	2.67	7.45	150.73	109.99	6.37	94.47
0 x 0.25	2.30	1.32	10.63	2.56	7.29	148.35	107.98	7.02	104.12
3 x 0.25	2.07	1.04	10.59	2.60	7.46	149.88	109.41	6.31	95.62
0 x 0.5	2.19	1.37	10.99	2.63	7.44	148.00	108.36	7.37	119.97
3 x 0.5	1.79	0.97	10.71	2.56	7.31	150.83	108.35	5.39	107.27
Source of variation									
AFL (mg kg ⁻¹)	0.1279	0.0001	0.3545	0.8516	0.5101	0.0085	0.0095	0.0001	0.0215
BCM (g kg ⁻¹)	0.7816	0.3807	0.4333	0.9065	0.4500	0.7159	0.6804	0.1408	0.0826
AFL x BCM	0.9148	0.1611	0.8349	0.7041	0.5148	0.7370	0.1346	0.0539	0.8442
SEM ²	0.79	0.13	0.55	0.27	0.86	2.27	1.50	0.72	17.16

^{a-b} Means within a column with no common superscript differ significantly.

¹ Values represent the mean of eight replicates of 8 broilers each.

² Pooled standard error of means.

4 DISCUSSÃO

4.1 Peso

A tabela 3 mostra que os grupos de aves intoxicadas apresentaram menor peso corporal, causado pelos efeitos maléficos das aflatoxinas e pelo menor consumo de alimentos, também provocado pela toxina.

Entre os tratamentos sem toxinas (1, 2 e 3), os pesos corporais não foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) durante todo o experimento. A aflatoxina começou a afetar acentuadamente as aves a partir do 8º dia de vida, onde pode-se observar diferenças estatísticas no peso dos animais. Da mesma forma, a partir deste período, os efeitos benéficos da BCM começaram a se evidenciar, demonstrando a capacidade em amenizar os efeitos deletérios das aflatoxinas contidas na ração quando comparados com o grupo que recebeu apenas aflatoxinas. Somando-se a isso, não houve diferença entre os tratamentos que receberam apenas BCM e o tratamento que não recebeu nem aflatoxina nem AAM, demonstrando que a adição de adsorvente não influenciou negativamente o ganho de peso das aves quando não havia o desafio de micotoxinas.

Os tratamentos contendo AFB1 que receberam 0,25% e 0,5% de BCM pesaram 13,3% e 22,7% a mais, respectivamente, quando comparados com o tratamento que recebeu apenas AFB1. O peso do grupo de aves intoxicadas foi 39.5% inferior ao das aves do grupo controle, demonstrando o efeito negativo de aflatoxinas.

A perda de peso de aves intoxicadas por aflatoxinas também foi observada por Rosa *et al.* (2001). Salienta-se o efeito positivo da adição do adsorvente na ração, cuja inclusão em todos os tratamentos melhorou significativamente o ganho de peso dos animais. A partir do 21º dia do experimento já pode-se observar esta melhora, onde o grupo que recebeu 3 ppm de aflatoxina somado com 0,5% de BCM já se diferenciou estatisticamente dos demais grupos que recebiam ração contaminada. O grupo que recebeu tratamento de 0,25% de BCM + 3 ppm de aflatoxinas se diferenciou do grupo controle a partir do 35º dia de arraçãoamento.

Assim, os tratamentos os tratamentos 5 e 6 tiveram ganho de peso 8% e 13,7% superior, respectivamente, ao grupo testemunha negativo. Esta proteção é também relatada por Miazza *et al.* (2005) e Zaghini *et al.* (1998).

4.2 Conversão Alimentar

Ao se comparar a conversão alimentar entre os tratamentos, observou-se que os efeitos diretos sobre este parâmetro puderam ser observados após a quinta semana de vida dos animais. Porém este parâmetro mascara o real efeito sobre a produtividade, uma vez que altas doses de aflatoxina reduzem o consumo de ração (-40,7% em relação ao grupo controle sem AFL e sem BCM), ocasionando uma redução no índice de conversão alimentar. Mas quando as dietas contendo aflatoxina receberam doses de 0,25% e 0,5% de BCM, este consumo reduziu apenas para 35% e 26,1%, ou seja, as aves ingeriram mais ração, evidenciando o efeito adsorvente benéfico do AAM adicionado.

Contraverso a estes resultados, Ledoux *et al.* (1998), estudaram em frangos de corte até os 21 dias de idade o efeito de 1% do adsorvente aluminossilicato de cálcio e sódio em dietas contendo aflatoxinas B1 adicionada na ração (4 ppm). Os autores constataram que o consumo de ração e o ganho de peso foi inalterado quando adicionado o adsorvente em dietas contaminadas, não diferindo da dieta controle.

Mas de acordo com Lopes *et al.* (2006) que avaliando a contaminação por aflatoxinas adicionadas na ração (3 ppm) e três níveis de adsorvente a base de bentonita sódica (0,1; 0,3 e 0,5%), concluíram que a adição de 3ppm de aflatoxina na ração dos frangos reduziu o consumo de alimento, o ganho de peso e piora na conversão alimentar, e a inclusão dos 0,3% de bentonita sódica como adsorvente foi suficiente para diminuir os efeitos negativos das aflatoxinas.

4.3 Órgãos

As dietas com a aflatoxinas diminuíram o ganho de peso dos frangos de corte e aumentaram os pesos reais e relativos do fígado, moela, coração e baço. Ocorreu um aumento relativo do peso do fígado com uso da dieta contendo aflatoxinas (Tabela 7). A

acentuada infiltração de gordura depende da dose e do tempo de intoxicação, podendo o órgão chegar a 68% de aumento de peso, segundo Merkley *et al.* (1987). No nosso experimento o peso do órgão aumentou 81% quando comparado com o grupo controle. De qualquer maneira, a síntese hepática de gordura e o transporte desta para outras áreas do organismo são seriamente afetados.

As aflatoxinas biotransformadas tem a capacidade de se ligar ao DNA e RNA hepáticos prejudicando a síntese proteica e lipídica (SANTURIO *et al.*, 2000), ocasionando a formação de fígado gorduroso e conseqüentemente aumento no se peso.

Aravind *et al.* (2003), que em experimento com frangos de corte com dietas contendo milho contaminado naturalmente (168 ppb de aflatoxina, 8,4 ppb de ocratoxina, 54 ppb de zearalenona, e 32 ppb da toxina T-2) com ou sem adição de adsorvente, os autores observaram aumento do peso relativo do fígado, corroborando com o presente estudo.

Nos grupos que receberam a adição de BCM, pode-se observar uma redução no peso relativo destes mesmos órgãos, indicando a redução na absorção e, conseqüentemente, dos efeitos negativos causados pelas aflatoxinas.

Batina (2004) em experimento com frangos de corte intoxicados com aflatoxina (5 ppm) e adsorvente a base de montmorilonita sódica observou que houve alteração nos valores bioquímicos, sendo que a dieta com a aflatoxina causou diminuição dos níveis séricos de colesterol, creatinina, proteínas totais e aumento nos níveis de ALT indicando lesão hepática.

4.4 Bioquímica

No presente estudo, a maioria dos parâmetros bioquímicos avaliados não apresentaram diferenças estatísticas (tabela 8) entre o grupo que recebeu apenas AFB1 e os grupos que receberam AFB1+BCM. Isto também pode ser observado na pesquisa de outros autores, que avaliaram os parâmetros bioquímicos para frangos de corte alimentados com 50 ppb de aflatoxinas com suplementação de bentonita sódica, e também observaram que não houve diferença estatística nas variáveis proteína total, albumina, globulina e AST (MAGNOLI *et al.*, 2011).

Contudo, em contraste à estudos prévios (MAGNOLI *et al.*, 2011), houve um decréscimo significativo nos níveis séricos de potássio nos grupos que receberam

aflatoxina e BCM em conjunto. Nos grupos que receberam apenas aflatoxinas, os níveis séricos de potássio não se diferenciaram estatisticamente do grupo controle.

Características como a estrutura física, a CTC e a superfície de atuação do AAM são importantes fatores para a escolha de um bom adsorvente de micotoxinas. Os bons resultados obtidos se devem muito às características do material estudado, onde a argila apresenta alta CTC, grande superfície de contato (devido a sua pequena granulometria) e pH de 8,5, conforme preconizado por Araba (1992), onde indica que as melhores argilas são as que apresentam pH abaixo de 9,0.

5 CONCLUSÕES

1 – A inclusão de 3 mg/kg de aflatoxinas produziu efeitos deletérios expressivos nas aves do experimento que receberam apenas toxina.

2 – A inclusão de 0,25% e 0,5% de bentonita cálcica nas rações contaminadas com aflatoxinas a 3 mg/kg melhorou os parâmetros avaliados e o índice produtivo dos grupos tratados.

3 – A argila bentonita cálcica pode ser utilizada como aditivo adsorvente de micotoxinas para tratamento e controle de rações contaminadas com aflatoxinas em frangos de corte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKANDE, K., ABUBAKAR, M., ADEGBOLA, T., & BOGORO, S. Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: A review. **Pakistan Journal of Nutrition**, 5(5), 398-403, 2006.

ARABA, M. & WYATT, R.D. Effects of sodium bentonite, hydrated sodium calcium aluminosilicate (Novasil), and Ethacal on aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 70 (Suppl. 1), p.6. 1991.

ARAVIND, K.S.; PATIL, V.S.; DEVEGOWDA, G. et al. Efficacy of Esterified Glucomannan to Counteract Mycotoxicosis in Naturally Contaminated Feed on Performance and Serum Biochemical and Hematological Parameters in Broilers. **Poultry Science**, v. 82, n. 9, p. 571-576, 2003.

ATANDA, S. A., AINA, J. A., AGODA, S. A., & U. OE, P. PO. Mycotoxin Management in Agriculture: a Review. **Journal of Animal Science Advances**, 2(Suppl. 3.1), 250-60, 2012.

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.

BAILLY, J. D., & GUERRE, P. Mycotoxins in meat and processed meat products. **In: Toldrá F (ed.). Safety of Meat and Processed Meat, Food Microbiology and Food Safety**, New York, Springer, 83-124, 2009.

BAKIRDERE, S., BORA, S., BAKIRDERE, E., AYDIN, F., ARSLAN, Y., KOMESLI, O., et al. Aflatoxin species: their health effects and determination methods in different foodstuffs. **Central European Journal of Chemistry**, 10(3), 675-85, 2012.

BATINA, P. M. **Perfil bioquímico de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxina com e sem a adição de montmorilonita sódica na dieta**

alimentar. 30 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

BATINA, P. N., LOPES, S. A., SANTURIO, J. M., DE SOUZA, C., & MARTINS, D. B. The effects of the addition of sodic montmorillonite on the feeding diet on the biochemical profile of broiler chicken intoxicated by aflatoxin. **Ciência Rural**, 35(4), 826-31, 2005.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July 2003.

BONNA, R.J. et al. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate and activated charcoal in reducing the toxicity of dietary aflatoxin to mink. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 20, p. 441-447. 1991.

BUENO, D.J. et al. In vitro binding of zearalenone to different adsorbents. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p. 613 - 615. 2005.

CHUNG, T.K. & BAKER, D.H. Phosphorus utilization in chicks fed hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 1992 – 1998. 1990.

DALVI, R.R.; ADEMOYERO, A.A. Toxic effects of aflatoxin B1 in chickens given feed contaminated with *Aspergillus flavus* and reduction of the toxicity by activated charcoal and some chemical agents. **Avian Diseases**, v. 28, n. 1, p. 61 - 69. 1984.

DALVI, R.R.; MCGOWAN, C. Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chickens by purified aflatoxin B1 and its reversal by activated charcoal, phenobarbital, and reduced glutathione. **Poultry Science**, v. 63, n.3, p. 485 - 491. 1984.

DAVIDSON et al. Hydrated sodium calcium aluminosilicate decreases the bioavailability of aflatoxin in the chickens. **Poultry Science**, v. 66 (suppl. 1), p. 89. 1987.

DESCHENG, Q. et al. Adsorption of aflatoxin B1 on montmorillonite. **Poultry Science**, v. 84, p. 959 – 961. 2005.

DIAZ, D.E.; SMITH, T.K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralization of mycotoxins. In: DIAZ, E.D. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham University Press, Nottingham. p. 323 - 339. 2005.

DIAZ, D.E. Aflatoxin binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. **Mycopathologia**, v. 156, p. 223 - 226. 2002.

DIAZ, D. E., HAGLER, W. M., JR HOPKINS, B. A., & WHITLOW, L. W. Aflatoxin Binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. **Mycopathologia**, 156(3), 223-6, 2003.

DIAZ DE, HAGLER JR. WM, BLACKWELDER JT, et al., Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia** 157:233–241, 2004.

DIAZ, D.E.; SMITH, T.K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralization of mycotoxins. In: DIAZ, E.D. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham University Press, Nottingham. p. 323 - 339. 2005.

DOER, J.A. Effect of an aluminosilicate on broiler chickens during aflatoxicosis. **Poultry Science**, v. 68 (Suppl. 2), p. 45. 1989.

DVORAK, M. Ability of bentonite and natural zeolite to adsorb aflatoxin from liquid media. **Veterinary Medicine (Praha)**, v. 34, p. 733 – 741. 1989.

DWYER, M.R. et al. Effects of inorganic adsorbents and cyclopiazonic acid in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 76, p. 1141 – 1149. 1997.

EDRINGTON TS, SARR AB, KUBENA LF, et al., Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS), acidic HSCAS, and activated charcoal reduce urinary excretion of aflatoxina M1 in turkey poult. **Toxicology Letters**, 8:115–122, 1996.

EUROPEAN MYCOTOXINS AWARENESS NETWORK. The Aflatoxins. Disponível em <http://services.leatherheadfood.com/eman/Factsheet.aspx?ID=6>, acessado em 08 out, 2013.

FAO, Worldwide regulations for mycotoxins in 1995: A Compendium. FAO Food and Nutrition Paper. 64, 1997.

FIALHO, M. B. **Mecanismo de ação de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desenvolvimento de *Guignardia Citricarpa*, agente casual da pinta preta dos citros.** 120 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

FOOD-INFO. <http://www.food-info.net/es/tox/afla.htm>, 21 dez, 2013.

GALVANO F, PIETRI A, BERTUZZI T, et al., Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **Journal of Food Protection**, 61: 469–475, 1998.

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.

GRAY, S.J. et al. Interactive effects of sodium bentonite and coccidiosis with monensin or salinomycin in chicks. **Poultry Science**, v. 77, p. 600 – 604. 1998.

HARVEY, R.B. et al. Efficacy of zeolitic ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 37, n. 1, p. 67 – 73. 1993.

HUFF, W.E. et al. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxina and ochratoxin A. **Poultry Science**, v. 71, n. 1, p. 64 - 69. 1992.

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 170 - 188. 2001.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Agents Classified by the IARC Monographs*, 1-105, Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>, acessado em 28 jun, 2013.

JARD G, LIBOZ T, MATHIEU F, et al. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. **Food Additives and Contaminants**, 28: 1590-1609, 2011.

KUBENA, L.F. et al. Diminution of aflatoxiicosis in growing chickens by dietary addition of a hydrated, sodium calcium aluminosilicate. **Poultry Science**, v. 69, n. 5, p. 727 – 735. 1990a.

KUBENA, L.F. et al. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 72, n. 4, p. 651 – 657. 1993a.

KUBENA, L.F. et al. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T – Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. **Poultry Science**, v. 77, p. 1502 - 1509. 1998.

KUBENA, L.F. et al. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxina and diacetoxyscirpenol. **Poultry Science**, v. 72, n.1, p. 51 – 59. 1993b.

KUBENA, L.F. et al. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T -2 toxin. **Poultry Science**, v. 69, n. 7, p. 1078 – 1086. 1990b.

KUBENA, L.F. et al. Mudulation of aflatoxicosis in growing chickens by dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Poultry Science**, v. 67 (Suppl. 1), p. 106. 1988.

KUTZ RE, SAMPSON JD, POMPEU LB. Efficacy of Solis, NovasiPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M1 levels in milk of early to mid-lactation dairy cows fed aflatoxin B1. **Journal of Dairy Science**, 92: 3959-3963, 2009.

LEDOUX, D.R. et al. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 78, p. 204 – 210. 1999.

MAGNOLI, A.P.; MONGE, M.P.; MIAZZO, R.D. et al. Effect of low levels of aflatoxin B1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. **Poultry Science**, v. 90, n. 4, p. 48-58, 2011.

MAIA, P. P., BASTOS, M. E. P., & DE SIQUEIRA. Aflatoxins in pet foods- A Review. **Revista da FZVA**, 14(1), 235-257, 2007.

MERKLEY, J. W. et al. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. **Poultry Science**, v. 66, n. 3. p. 59-67, 1987.

MIAZZO, R.; PERALTA, M. F.; MAGNOLI, C. et al. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. **Poultry Science**. v. 84, n. 5, p. 1-8, 2005.

MIAZZO, R. et al. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. **Poultry Science**, v. 84, p. 1 – 8, 2005.

MIAZZO, R. et al. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxina in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, p. 1 – 6, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 30 DE NOVEMBRO DE 2004. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/do/consultaLei?op=list&back=>> . Acessado em 26 out. 2013.

MOSS, M. O. Mycotoxins. **Mycological Research**, 100(5), 513-23, 1996.

PAPP, E., -OTTA, K. H., ZÁRAY, G., & MINCSOVICS, E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. **Microchemical Journal**, 73(1-2), 39-46, 2002.

PARLAT, S.S.; YILDIZ, A.O; OGUZ, H. Effect of clinoptilolite on performance of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during experimental aflatoxicosis. **British Poultry Science**, v. 40, p. 494 – 500. 1999.

PASHA TN, FAROOQ MU, KHATTAK FM, et al., Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, 132: 103-110, 2007.

PHILLIPS et al. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. **Poultry Science**, v. 67, n. 2, p. 243 - 247. 1988.

PHILLIPS, T.D. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin – induced disease. **Toxicological Sciences**, v. 52 (Suppl), p. 118 – 126. 1999.

PHILLIPS, T. D.; LEMKE, S.L.; GRANT, P.G. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. IN: DEVRIES, J.W.; TRUCKSESS, M.W.; JACKSON L.S. **Mycotoxins and Food Safety**. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. v. 504, p. 157 – 171. 2002.

PHILLIPS TD, AFRIYIE-GYAWU E, WILLIAMS J, et al., Reducing human exposure to aflatoxina through the use of clay: A review. **Food Additives and Contaminants**, 25: 134-135, 2008.

PHILLIPS, T.D.; SARR, A.B.; GRANT, P.G. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. **Journal of Natural Toxins**, v. 3, n. 4, p. 204 – 213. 1995.

PIMPUKDEE K., KUBENA L.F., BAILEY C.A., et al. Aflatoxin-induced toxicity and depletion of hepatic vitamin A in young broiler chicks: Protection of chicks in the presence of low levels of Novasil plus in the diet. **Poultry Science**, 3:737-744, 2004.

RAMOS, A.J. & HERNÁNDEZ, E. In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of absorption isotherms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 62, p. 263 - 269. 1996.

RAMOS, A.J. & HERNÁNDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 65, p. 197 - 206. 1997.

RAMOS GIRONA, A. J., SILLUÉ, S. M., & ALMENAR, V. S. Micotoxinas. Introducción histórica. Ramos Girona AJ (ed.). **Micotoxinas y micotoxicosis**, Madrid, AMV Ediciones, 1-18, 2011.

RESOLUÇÃO RDC N° 7/2011. Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. De 18 fev. 2011. <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html> , acessado em 26 out. 2013.

SABATER-VILAR M, MALEKINEJAD H, SELMAN MHJ, et al., In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxins. **Mycopathologia** 163: 81–90, 2007.

SANTOS, V. M. **Avaliação da adição de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* de aflatoxina B1 na ração para frangos de corte na fase inicial.** 31p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

SANTURIO, J.M. et al. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. **British Poultry Science**, v. 40, n. 1, p. 115 – 119. 1999.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n.1, p. 516-635, abr., 2000.

SCHEIDELER, S.E. Effect of various types of aluminosilicate an aflatoxin on aflatoxin toxicity, bird performance and mineral status. **Poultry Science**, v. 68 (Suppl. 1), p. 203. 1989.

SCHEIDELER, S.E. Effects of various types aluminosilicates and aflatoxin B1 on aflatoxin toxicity, chick performance, and mineral status. **Poultry Science**, v. 72, n. 2, p. 282– 288. 1993.

SOVA, Z. et al. Hematological and histological response to the diets containing aflatoxin B1 and zeolite in broilers of domestic fowl. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 60, p. 31 - 40. 1991.

THIEU, N. Q., & PETTERSSON, H. In vitro evaluation of the capacity of zeolite and bentonite to adsorb aflatoxin B1 in simulated gastrointestinal fluids. **Mycotoxin Research**, 24, 124-9, 2008.

US FEDERAL DRUG AGENCY (FDA), Office of Regulatory Affairs (ORA) Compliance Policy Guides (CPG) 7126.33 Sec. 683.100—Action Levels for Aflatoxin in Animal Feeds, Issued Nov 21, 1979, Reissued Oct 1, 1980, Revised Aug 15, 1982, May 18, 1989, and Aug 28,” 1994. Disponível em: www.fda.gov. Acessado em

26.out.2013.

YENER N, BICER C, ONAL M, et al., Simultaneous determination of cation exchange and surface area of acid activated bentonite powders by methylene blue sorption. **Applied Surface Science**, 224: 2534-2539, 2012.

ZAGHINI, A.P. et al. Aflatoxin B1 oral administration of laying hens: effects on hepatic MFO activities end efficacy of a zeolite to prevent aflatoxicosis B1. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 149, p. 668. 1998.