

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE
FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS
CONTENDO AFLATOXINAS E/OU ARGILA CLINOPTILOLITA
NATURAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberto Marinho Maciel

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE FRANGOS
DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO AFLATOXINAS
E/OU ARGILA CLINOPTILOLITA NATURAL**

Por

Roberto Marinho Maciel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS, Brasil

2006

Maciel, Roberto Marinho, 1963-

M152p

Perfil eletroforético das proteínas séricas de frangos de corte alimentados com dietas contendo aflatoxinas e/ou argila clinoptilolita natural / por Roberto Marinho Maciel; orientador Sonia Terezinha dos Anjos Lopes. Santa Maria, 2006.

47 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2006.

1. Medicina veterinária 2. Proteína sérica 3. Clinoptilolita
4. Aflatoxina 5. Frango de corte 6. Perfil eletroforético I.
Lopes, Sonia Terezinha dos Anjos, orient. II. Título

CDU: 619:636.52/.58

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2006

Todos os direitos autorais reservados a Roberto Marinho Maciel. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor. Endereço: Rua Álvaro Hoppe, 60 Ap. 202, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-410 Fone (0xx)55 3226 7223. e-mail roberto.marinho@uol.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE FRANGOS
DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO AFLATOXINAS
E/OU ARGILA CLINOPTILOLITA NATURAL**

Elaborada por
Roberto Marinho Maciel

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**

Janio Moraes Santurio, Dr. (UFSM)

Claudete Schmidt, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 15 de agosto de 2006

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me proporcionou a saúde e a energia necessárias para seguir em frente.

À minha família, que é a razão única da minha persistência.

À minha orientadora, professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, a minha eterna gratidão, por tudo que me ensinou, por ter confiado no meu trabalho e oportunizado o meu crescimento profissional.

Ao professor Carlos Mario Severo Cunha, um amigo, cujo apoio e palavras de incentivo, me ajudaram a manter forte o espírito.

Ao professor Janio Moraes Santurio, um grande aliado e provedor de grande parte dos meios, sem os quais seria impossível viabilizar esse trabalho.

À professora Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, pelo apoio incondicional, sem o qual, esse trabalho não teria se materializado.

À mestranda Danieli Brolo Martins, uma grande amiga e profissional de escol, que muitas vezes abdicou de seu tempo livre, para me auxiliar com a pesquisa.

Aos professores José Henrique Souza da Silva e Paulo Alberto Lovatto, pela inestimável ajuda na análise estatística.

À Dona Devanir, médica veterinária e abnegada funcionária do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, pela grande experiência que me transmitiu.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela solidariedade.

Aos professores, alunos e funcionários do Hospital Veterinário, pela amizade.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO AFLATOXINAS E/OU ARGILA CLINOPTILOLITA NATURAL

Autor: Roberto Marinho Maciel
Orientadora: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de agosto de 2006

Aflatoxinas são metabólitos de fungos, que podem causar danos à saúde do animal, resultando em redução da produção e afetando à indústria avícola, pela diminuição da taxa de crescimento e péssima conversão alimentar. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil eletroforético das proteínas séricas de frangos de corte alimentados com dietas contendo aflatoxinas e/ou argila clinoptilolita natural. Foram utilizados 528 frangos de corte, machos, da linhagem Ross, distribuídos em 6 tratamentos com 4 repetições cada: T₁ – testemunha (ração sem aflatoxinas ou clinoptilolita), T₂ – ração com 5ppm de aflatoxinas, T₃ – ração com 0,25% de clinoptilolita, T₄ – ração com 5ppm de aflatoxinas e 0,25% de clinoptilolita, T₅ – ração com 0,5% de clinoptilolita e T₆ – ração com 5ppm de aflatoxinas e 0,5% de clinoptilolita. Os animais ficaram alojados em 24 boxes, e submetidos aos tratamentos do 1º ao 42º dia, quando foram sacrificados. Foram analisadas as proteínas totais, as frações albumina, alfa 1, alfa 2, beta e gama. Com exceção das médias da fração gama, o teste de Tukey revelou diferenças significativas (P<0,05) nas médias de todas as proteínas totais e frações protéicas nos tratamentos onde as aflatoxinas estavam presentes. A ação das aflatoxinas nas proteínas totais ocorre na síntese de albumina e globulinas (frações alfa e beta). As gamaglobulinas não são afetadas pelas aflatoxinas. Em relação ao controle, as aves alimentadas com dietas com aflatoxinas e clinoptilolita apresentaram baixos (P<0,05) níveis de proteína total, albumina e globulinas (alfa e beta). Conclui-se que as aflatoxinas alteram o perfil eletroforético e a clinoptilolita adicionada na ração, não é capaz de evitar essa alteração.

Palavras-chave: proteínas séricas, clinoptilolita, aflatoxinas, frangos de corte, perfil eletroforético.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ELECTROPHORESIS PROFILE OF SERUM PROTEINS IN BROILERS FED WITH DIETS CONTAINING AFLATOXINS AND/OR NATURAL CLINOPTILOLITE CLAY

Author: Roberto Marinho Maciel
Advisor: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes
Date and Defense Place: Santa Maria, 15 of august of 2006

Aflatoxins are metabolites from fungi, that may be injurious to animal health, resulting in reduced production and affecting poultry industry by decrease the growth rate and worsening feed conversion. A study was carried out to evaluate the electrophoresis profile of serum protein in broilers fed with diets containing aflatoxins and natural clinoptilolite clay. A total of 528 male broilers Ross were used, distributed in 6 treatments with 4 replications each: T1 – control (without aflatoxins or clinoptilolite), T2 –5ppm of aflatoxins, T3 –0.25% of clinoptilolite, T4 – 5ppm of aflatoxins and 0.25% of clinoptilolite, T5 –0.5% of clinoptilolite and T6 – 5ppm of aflatoxins and 0.5% of clinoptilolite. The broilers were placed in 24 boxes and submitted to treatments from 1 to 42 days, when they were slaughtered. Were analyzed the total proteins, albumin fractions, alpha 1, alpha 2, beta and gamma. The aflatoxins decreased ($P<0.05$) total protein, albumin, and globulins (alpha and beta fractions). However, no effect ($P<0.05$) of aflatoxins was observed about gamma fraction. The clinoptilolite no modify ($P<0.05$) the serum proteins. Related to control, broilers fed with diets containing aflatoxins and clinoptilolite presented low ($P<0.05$) levels of total protein, albumin, and globulins (alpha and beta fractions). In conclusion, aflatoxins change the electrophoresis profile and clinoptilolite is not able to protect against this change.

Key words: clinoptilolite, aflatoxin, broiler, electrophoresis profile.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição estimada das dietas basais da fase inicial, crescimento e final de frangos de corte.....	52
TABELA 2 – Concentrações séricas de proteínas totais, albumina, alfa globulina 1(α 1), alfa globulina 2 (α 2), beta-globulina (β) e gama globulina (γ) em frangos de corte alimentados com dietas contendo aflatoxinas e/ou clinoptilolita natural.....	53
TABELA 3 – Relação albumina/globulina, observada no soro de frangos de corte alimentados com dietas contendo aflatoxinas e/ou clinoptilolita natural.....	54

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Fórmula estrutural da aflatoxina B ₁	18
FIGURA 2 - Ligação da aflatoxina B ₁ com o DNA.....	20
FIGURA 3 - Estrutura da zeólita.....	25
FIGURA 4 - Proteínas séricas separadas em bandas eletroforéticas.....	28
FIGURA 5 - Padrão linear da eletroforese.....	28
FIGURA 6 - O sistema imunológico.....	33

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
INTRODUÇÃO.....	11
CAPÍTULO 1.....	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
CAPÍTULO 2.....	38
PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO AFLATOXINAS E/OU ARGILA CLINOPTILOLITA NATURAL.....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira destacou-se nas últimas décadas por uma trajetória de incremento tecnológico expressivo. A cadeia produtiva de frangos de corte assegura ao país uma posição de destaque no cenário mundial de produtores de carne de frango. O modelo de produção integrada de frango teve um grande sucesso, sendo responsável pelo crescimento e baixo custo de produção (GIROTTO & MIELE, 2004). A produção de carne de frango no primeiro semestre de 2006 ficou próxima de 4,6 milhões de toneladas, o que representou um crescimento de 3,4% em relação ao mesmo período de 2005. Em junho de 2006, o Brasil produziu aproximadamente 727 mil toneladas de carne de frango. Desse total, foram exportadas aproximadamente 185 mil toneladas. Após apresentarem uma expansão próxima de 13% no primeiro mês de 2006, as exportações brasileiras de carne de frango exibiram uma retração ao longo dos últimos cinco meses, o que representou uma redução de quase 10% no volume total exportado, no primeiro semestre de 2006 (AVISITE, 2006).

A inserção e a manutenção dos nossos produtos avícolas no mercado externo, em níveis competitivos, dependem da constante busca tanto da qualidade quanto do menor custo de produção. As barreiras sanitárias impostas pelos países importadores de carne de frango, exigem cuidados extremos, que começam na escolha da matéria-prima utilizada na alimentação das aves. A maior preocupação será sempre prevenir a contaminação desses produtos, porém, uma vez que a mesma já tenha ocorrido, os esforços são direcionados para minimizar ao máximo os efeitos e prejuízos dela decorrentes.

Dentre as várias possibilidades de contaminação de produtos utilizados como matéria-prima na formulação de rações, as micotoxinas têm destaque, principalmente as aflatoxinas. Vários métodos têm sido empregados na tentativa de anular ou reduzir, a níveis aceitáveis, a ação

das aflatoxinas. Minerais com propriedades adsorventes, como a clinoptilolita, vêm sendo testados, como opção de redutores da ação das aflatoxinas. A eletroforese pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico, através da análise das alterações do perfil eletroforético das proteínas séricas das aves.

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus*, *A. parasiticuse* e *A. nominus* (MOSS, 1998). Os efeitos das aflatoxinas no organismo animal incluem carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade e hepatotoxicidade (BRADBURN & COKER, 1993).

A absorção de aflatoxinas ocorre por difusão passiva através do intestino, difundindo-se rapidamente por todos os tecidos do organismo (RAMOS & HERNANDEZ, 1996). Uma vez em contato com o tecido hepático, as aflatoxinas dão início à inibição da síntese protéica, o que resulta na diminuição do nível de proteínas plasmáticas, principalmente da albumina e das globulinas alfa e beta (SANTIN, 2000). As aflatoxinas podem interagir com o DNA nos hepatócitos de mamíferos e aves, formando um composto denominado AB₁-DNA, quando se combinam com o DNA. A aflatoxina B₁ causa a inibição da síntese de DNA, correlacionada com a dose utilizada (ZAVIERO & CONTRERAS, 2005).

A técnica da eletroforese permite a determinação das frações protéicas, na proporção em que são encontradas, no soro ou no plasma. As proteínas séricas se separam em um campo elétrico, em função de seus diferentes pontos isoelétricos. Após a coloração, essas bandas são escaneadas por um densitômetro e traduzidas em um traçado eletroforético. A interpretação da curva eletroforética permite o cálculo da porcentagem de participação de cada fração protéica (BUSH, 2004).

A albumina, sintetizada no fígado, é a mais abundante das proteínas séricas. Com um peso molecular de 70.000, a albumina é a primeira proteína a sair da corrente sanguínea, em caso

de dano tecidual. Tem grande importância na regulação e manutenção da pressão colóide-osmótica do sangue. Como a albumina consegue estabelecer ligações reversíveis com um grande número de substâncias, tem um importante papel como proteína de transporte (SCHALM et al., 1975). Assim a albumina é responsável pelo transporte de ácidos graxos, cálcio, magnésio, zinco, cobre, bilirrubina, ácido úrico, vitamina A e C, hormônios sexuais e no caso específico das aves, dos hormônios tireoideanos. As beta-globulinas são constituídas em sua grande maioria por transferrina, uma glicoproteína responsável pelo controle da absorção do ferro no intestino e a sua distribuição no organismo. A ceruloplasmina é uma alfa-globulina responsável pelo transporte do cobre e que possui ação enzimática sobre as aminas, fenóis, enóis e íons ferrosos, através de processos de catalização (BACILA, 2003). As imunoglobulinas são produzidas pelos plasmócitos e linfócitos B, presentes no tecido linfóide, sendo constituídas pelos anticorpos IgG, IgA, IgE, IgD e IgM (BUSH, 2004).

As argilas zeólitas podem ser usadas como adsorventes eficazes de agentes tóxicos, principalmente as aflatoxinas presentes na ração (PHILLIPS, 1999). As zeólitas são minerais, naturais ou sintéticos, que apresentam estrutura constituída por canais e cavidades interconectadas de dimensões moleculares. A clinoptilolita é uma das 40 espécies de zeólitas naturais conhecidas. A alta capacidade de adsorção da clinoptilolita decorre de sua grande superfície interna, cerca de $300\text{m}^2/\text{g}$ (LUZ, 1995).

A relação albumina/globulina nas aves é um indicador de alta significância clínica, para se avaliar a resposta inflamatória em caso de enfermidade (KANEKO, 1997). Na presença de infecções, a relação albumina/globulina, se altera, invertendo-se os valores pelo incremento que ocorre na concentração das imunoglobulinas (BACILA, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil eletroforético das proteínas séricas totais de frangos de corte com 42 dias, alimentados com dietas com aflatoxinas e/ou argila clinoptilolita.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No primeiro semestre de 2004, o Ministério da Saúde do Quênia (MSQ), registrou 317 casos de insuficiência hepática aguda em sua população, sendo que desse total, 125 pessoas vieram a óbito. O Instituto de Pesquisas Médicas do Quênia, na ocasião, testou as amostras de soro dos pacientes para todos os vírus com potencial de causar algum tipo de doença hepática. Como os resultados foram negativos, o MSQ redirecionou as investigações para a intoxicação provocada por aflatoxinas, fato de ocorrência comum, com as pessoas que se alimentavam com o milho da região (BAUMGARTNER et al., 2005). As amostras de milho recolhidas na região do surto, revelaram concentrações de aflatoxinas B₁, na ordem de 4.400ppb, ou seja, cerca de 220 vezes acima do limite de 20ppb, preconizado pelo governo do Quênia (ONSONGO, 2004). Alimentos contaminados com micotoxinas, que são produtos tóxicos de fungos ambientais, quando ingeridos, podem causar importantes conseqüências negativas à saúde humana ou animal (SANTURIO, 2000).

A intoxicação de seres humanos com micotoxinas, não é um fenômeno recente. Durante a Segunda Guerra Mundial, soldados russos que ingeriram grãos contaminados com fungos, sofreram importantes necroses dérmicas, associadas com hemorragias e destruição da medula óssea. Contudo, os esforços para compreender os efeitos das micotoxinas, só avançaram de fato, após a morte de uma grande quantidade de perus ingleses, pela Doença X dos Perus, em 1960 (DEVEGOWDA & MURTHY, 2005). A morte dos perus na Inglaterra, no início da década de 1960, após a ingestão de torta de amendoim contaminada com *Aspergillus parasiticus*, importada do Brasil, motivou intensamente a pesquisa, o que resultou na descoberta das

aflatoxinas (SANTURIO, 2000). As micotoxinas de importância na avicultura, são produzidas principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, tanto antes, quanto durante a colheita. Inclusive na fase de armazenamento, se as condições forem propícias ao desenvolvimento dos fungos (DEVEGOWDA & MURTHY, 2005).

O milho, na avicultura, tem grande importância, pois compõe perto de 60% da ração inicial de frangos de corte, respondendo com aproximadamente 65% da energia metabolizável e com cerca de 22% da proteína (DALE, 1994). O elevado conteúdo em carboidratos, principalmente o amido, além de outros componentes como proteínas e ácidos graxos, faz do milho um importante produto comercial. Contudo, sob condições inadequadas de armazenamento, pode sofrer perdas no valor quantitativo e qualitativo, devido principalmente ao ataque de pragas e fungos, desde o campo até o momento de consumo (LOPES et al., 1988). Grãos de milho quebrados, partidos ou trincados, resultam de danos mecânicos sofridos durante as fases da colheita, transporte, limpeza e secagem. A quantidade aumenta se os teores de umidade dos grãos forem baixos (PUZZI, 1986). A ação contínua de insetos como o gorgulho *Sitophilus zeamais* e a traça *Sitotroga cerealella*, além de causar prejuízos como a redução severa do peso do grão, o que deprecia o valor comercial do produto, em função da diminuição do valor nutricional do cereal, atua como agente disseminador de fungos, uma vez que o metabolismo desses insetos, aumenta a umidade e a temperatura da massa de grãos (GARCIA et al., 2000). Os grãos de má qualidade têm o valor nutritivo prejudicado em relação ao grão normal, por alteração da composição química, diminuição da biodisponibilidade de alguns nutrientes, presença de fatores anti-nutricionais e proliferação de fungos com ou sem produção de micotoxinas (ROSTAGNO, 1993).

Os principais fungos capazes de invadir e danificar sementes, grãos, fibras naturais e seus subprodutos são divididos em classes como fungos de campo, intermediários e de

armazenamento (LAZZARI, 1993). As principais espécies de fungos de campo são dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*, que têm a capacidade de alterar a aparência dos grãos (PUZZI, 1986). A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é fundamentada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o desenvolvimento dos mesmos. Também não é absoluta, pois é estabelecida em seus hábitos de crescimento e locais onde os danos ocorrem. Os fungos do campo requerem um alto teor de umidade. Eles invadem os grãos e as sementes durante o amadurecimento, sendo o dano causado antes da colheita. Esses fungos não se desenvolvem normalmente no processo de armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (MILLER, 1995).

Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*, são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados os produtos agrícolas. Causam danos ao produto, somente se as condições de armazenamento forem impróprias à manutenção da qualidade do mesmo. Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus*, *A. ochraceus* e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum* e *P. verrucosum*), são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (SINHA & SINHA, 1991). Um dos grandes problemas na armazenagem dos grãos e por consequência da preparação das rações, está relacionado com a presença das micotoxinas (STRINGHINI et al., 2000).

As principais micotoxinas que têm importância na produção avícola são: as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (*Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*); ácido ciclopiazônico (*Aspergillus flavus*); ocratoxina (*Aspergillus ochraceus*); esterigmatocistina (*Aspergillus*

versicolor); ocratoxina (*Penicillium viridicatum*); citrina (*Penicillium citrinum*); toxina T-2, toxina HT-2 e diacetoxyscirpenol (DAS) (*Fusarium tricinctum*); deoxinivalenol ou vomitoxina (DON) e 15-monoacetoxyscirpenol (15-MAS) (*Fusarium graminearum* e *F. solani*); fumonisinas B₁ e B₂ (*Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*); moniliformina (*Fusarium moniliforme*) e zearalenona (*Fusarium graminearum* e *F. roseum*) (DEVEGOWDA & MURTHY, 2005).

As aflatoxinas (Figura 1), podem ser encontradas em praticamente todos os grãos e cereais utilizados para o consumo humano e animal. Cereais como o milho, trigo, cevada, arroz e sorgo, dentre outros, são passíveis de serem infestados por fungos, podendo ser detectados níveis elevados de aflatoxinas (SANTIN, 2000). As aflatoxinas, são metabólitos secundários produzidos por fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (KURTZMAN et al., 1987). Apesar de até o momento terem sido isolados 17 compostos pertencentes ao grupo das aflatoxinas, o termo aflatoxinas refere-se habitualmente a quatro substâncias do grupo de metabólitos bis-furano-cumarina, que são denominados B₁, B₂, G₁, G₂, sendo que estes podem ocorrer de maneira isolada ou em conjunto (OMS, 1983).

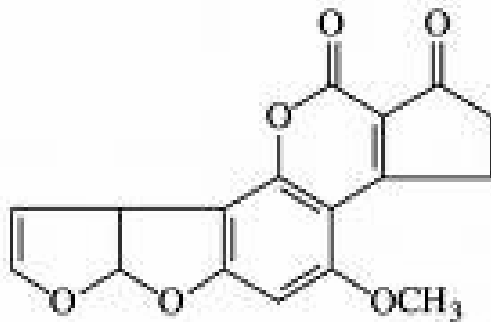


Figura 1- Fórmula estrutural da aflatoxina B₁.

Na produção avícola, patos e perus são as espécies mais sensíveis às aflatoxinas, podendo ser observada uma mortalidade significativa em lotes de perus, já as poedeiras são consideradas menos susceptíveis (SANTIN, 2000). As aflatoxinas caracterizam-se como um problema freqüente para produção avícola. Sua ação tóxica que determina os piores resultados de

desempenho, inclui a redução da atividade de enzimas pancreáticas e a diminuição da concentração de bile (WYATT, 1993). As aflatoxinas antagonizam o metabolismo de vitaminas, proteínas, aminoácidos, lipídios e carboidratos, agindo sobre coenzimas ou complexos enzimáticos, principalmente no fígado, alterando a estrutura química do DNA (BURDITT et al., 1983).

A absorção de aflatoxinas ocorre por difusão passiva através do intestino, difundindo-se rapidamente por todo o organismo, de modo que, cerca de três horas após a alimentação as aflatoxinas B₁ e B₂ já podem ser encontradas em todos os tecidos, principalmente na moela e no fígado (RAMOS & HERNANDES, 1996). A absorção das aflatoxinas é rápida, porém a excreção é lenta (SANTIN, 2000). No primeiro dia de contaminação, a concentração de aflatoxinas é elevada no fígado, rins e órgãos reprodutores. Supõe-se que esse fato decorra da função excretora desses órgãos. As aflatoxinas só são detectadas nos excrementos, sete dias após a ingestão (SAWHNEY et al., 1973).

Uma vez absorvida, a aflatoxina B₁ é imediatamente ligada, de forma reversível, à albumina e às demais proteínas plasmáticas, em menor grau. O tecido hepático é o principal alvo das aflatoxinas, ligadas ou não às proteínas plasmáticas (SANTURIO, 2000).

A síntese das proteínas ocorre em um sistema protéico que envolve, entre outros compostos citoplasmáticos, os três tipos de RNA existentes. O RNA mensageiro (RNAm), que tem um peso molecular de 1.10^6 , e contém as informações necessárias à biossíntese das proteínas corporais. O RNA transportador (RNAt), tem um peso molecular de no máximo 30.000. Sendo o menor e de maior mobilidade dos três tipos de RNA, tem a função de transportar os alfa-aminoácidos até o ribossoma e ao RNAm, para que ocorra a síntese das proteínas. O RNA ribossômico (RNAr) tem apenas função estrutural. O RNAm é uma seqüência de trincas de nucleotídeos (códon). O RNAt possui na parte final de seu braço intermediário, uma seqüência de

três nucleotídeos (anticódon). Tanto o códon, quanto o anticódon, têm seqüências complementares, que se unem durante o processo da síntese protéica. O papel da RNA-polimerase é de, através da ação de outras inúmeras enzimas, formar o RNA a partir da transcrição do DNA (RIEGEL, 2001).

Uma vez dentro do núcleo do hepatócito, as aflatoxinas ligam-se ao DNA (Figura 2), e passam a inibir a RNA-polimerase, o que tem por consequência a redução da síntese de proteínas. Essa capacidade de ligação com o DNA de qualquer célula, confere às aflatoxinas a característica de potentes substâncias carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas. Um dos principais efeitos dessas toxinas é a inibição da síntese protéica, causando assim uma redução no nível das proteínas plasmáticas, principalmente as alfa e beta globulinas, além da albumina. Cerca de uma hora após a ingestão do alimento contaminado com aflatoxinas, já ocorre inibição da síntese protéica “*in vitro*”, em decorrência da acentuada inibição de RNA-polimerase (SANTIN, 2000).

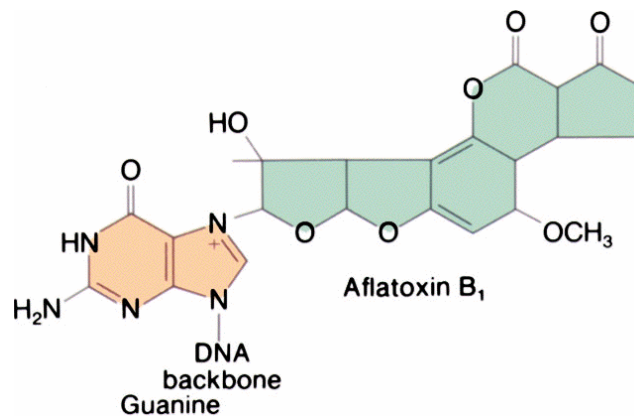


Figura 2 – Ligação da aflatoxina B₁ com o DNA.

A intoxicação com aflatoxinas pode ser aguda ou crônica, dependendo da dose de toxina ingerida, o tempo de exposição, idade e do estado de saúde do animal. A forma mais comum de intoxicação é a crônica, que se reflete principalmente em um péssimo desempenho, além da presença de outras síndromes patológicas (esteatose, carcinomas hepáticos, artrofia da

bursa de Fabricius e o timo), que se manifesta em depressão, anorexia, icterícia e hemorragias múltiplas, sendo acompanhada de alta mortalidade. Já a intoxicação aguda em aves, ocorre quando a dose da toxina situa-se entre 6-16ppm (SCUSSEL, 1998).

O estudo microscópico das alterações no tecido hepático, revela uma infiltração gordurosa generalizada, acompanhada por megalocitose dos hepatócitos e também pela hiperplasia das células dos ductos biliares, o que indica lesões hepáticas crônicas (SANTIN, 2000).

A presença de fungos nas rações ou nos grãos, pode representar importantes perdas em termo da qualidade nutricional (KESHAVARZ, 1987). No Brasil, o Ministério da Saúde estabelece o limite de 30ppb de aflatoxinas (B_1+B_2) em alimentos de consumo humano, e o Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabelece o limite de 20ppb de aflatoxinas totais ($B_1+B_2+G_1+G_2$) para matérias-primas de alimentos e rações (CALDAS et al., 2002). A melhor forma de impedir a produção das micotoxinas, bem como de seus efeitos deletérios, é controlar o crescimento dos fungos, diminuir a presença de insetos nas plantações de grãos, bem como, monitorar a umidade durante a armazenagem das matérias-primas e rações (KRABBE, 1995). Quando porém as micotoxinas já estão presentes, qualquer medida aplicada com o intuito de reduzir os efeitos deletérios dessas substâncias, torna-se difícil e onerosa (SANTIN, 2000).

As estratégias que visam eliminar ou reduzir os níveis de contaminação de micotoxinas nos alimentos, incluem métodos químicos, biológicos e físicos. A opção por qualquer um desses métodos, procura atender aos seguintes requisitos: efetividade na remoção, destruição e inativação das micotoxinas; ausência de efeitos tóxicos ou carcinogênicos; a manutenção da palatabilidade e a preservação das propriedades nutricionais dos alimentos. Além disso, o método escolhido, deve ser viável tanto tecnologicamente, quanto economicamente (DIAZ & SMITH, 2005).

Os métodos químicos consistem em degradar estruturalmente ou inativar as micotoxinas. Para isso emprega-se ácidos, bases, aldeídos, agentes oxidantes e vários tipos de gases, como a amonização usada na detoxificação de fumonisinas (NORRED et al., 1993).

Os métodos biológicos de controle de micotoxinas, são aqueles que utilizam microorganismos como leveduras, bolores e bactérias, para modificar e/ou inativar as toxinas fúngicas (SANTIN, 2000).

Os métodos físicos de controle das micotoxinas utilizam a inativação térmica, radiação gama, segregação por densidade, extração por solventes e a adsorção com diversos tipos de substâncias minerais (SANTIN, 2000). Nos últimos anos vários minerais que contêm sílica, os aluminossilicatos (aluminas, zeólitas, sílicas, filossilicatos e filossilicatos modificados), têm sido indicados como adsorventes de micotoxinas (SCHEIDELER, 1993). O uso de adsorventes nas rações com o intuito de amenizar as perdas causadas pelas micotoxinas tem-se mostrado como um dos métodos preventivos mais promissores (SANTIN, 2000).

Os adsorventes além de prevenir ou limitar a absorção das micotoxinas no trato gastrointestinal, devem ser efetivos contra vários tipos de micotoxinas, uma vez que os alimentos normalmente encontram-se contaminados com mais de uma delas (DIAZ & SMITH, 2005).

A eficácia da adsorção depende da estrutura química de ambos, adsorvente e micotoxina. Nos adsorventes, o fator mais importante da adsorção é a estrutura física, ou seja a carga elétrica total e sua distribuição, tamanho dos poros na molécula e principalmente a área de superfície. Já nas micotoxinas, a adsorção depende da solubilidade, da polaridade da molécula e da distribuição das cargas elétricas (AVANTAGGIATO et al., 2005).

O principal mecanismo de adsorção desses minerais, está relacionado com a troca de cargas entre o adsorvente e a micotoxina. Entretanto, como as estruturas das micotoxinas são diferentes, a eficácia desse processo não é a mesma para todas as toxinas dos fungos (KUBENA

et al., 1991). Além de existir uma considerável variação na capacidade de absorção dos diversos aluminosilicatos, em relação às distintas estruturas de micotoxinas, deve-se observar se o aluminosilicato empregado, tem a possibilidade de adsorver outros componentes da dieta (vitaminas, minerais, promotores de crescimento e coccidiostáticos), o que deixaria as aves susceptíveis a micoplasmose e coccidiose (SHRYOCK et al., 1994). Atualmente o mercado especializado dispõe de uma ampla variedade de produtos adsorventes. A maioria apresenta grande poder de adsorção “*in vitro*”. Contudo, testes “*in vivo*”, são necessários para confirmar a eficácia ou não, de adsorção do produto (AVANTAGGIATO et al., 2005).

Em 1756 o mineralogista Axel Frederick Consted descobriu a stilbita, um mineral pertencente ao grupo das zeólitas. O termo zeólita é grego, e significa pedra que ferve (CLARKE, 1980). Em 1845, Way descobriu que determinados tipos de solos tinham a propriedade de reter sais de amônia, e Breck constatou que os silicatos hidratados de alumínio no solo eram os responsáveis pela troca iônica. Em 1925, Weigel e Steinhof foram os primeiros a constatar que a zeólita chabazita adsorvia seletivamente moléculas orgânicas menores e rejeitava as maiores (LUZ, 1995). Em 1932 McBain criou o conceito de “peneira molecular”, utilizado na classificação de sólidos porosos e capazes de adsorver seletivamente moléculas cujo tamanho permite sua entrada nos canais (LUNA & SCHUCHARDT, 2001).

Os minerais silicatos compreendem o maior e mais complexo grupo de agentes adsorventes de micotoxinas. Este grupo se subdivide em duas subclasses, os filosilicatos (montmorilonita, caolinita e ilita) e os tectosilicatos, na qual estão incluídas as zeólitas (DIAZ & SMITH, 2005). As zeólitas são consideradas os materiais mais promissores na busca do catalisador ideal. O mecanismo desse catalisador funcionaria como uma pinça molecular, imobilizando cada molécula de substrato na posição apropriada para romper somente a ligação

química necessária a fim de formar o produto esperado com altíssima atividade e seletividade absoluta (SHELDON, 1997).

Segundo a definição clássica, o termo zeólitas abrange somente aluminossilicatos cristalinos hidratados de estrutura aberta, constituída por tetraedros de SiO_4 e AlO_4 ligados entre si pelos átomos de oxigênio (BRECK, 1974). A presença de um átomo de metal no centro da estrutura tetraédrica (HUWING et al., 2001), torna a molécula carregada negativamente, o que promove a atração de cátions para o interior da mesma (DIAZ & SMITH, 2005).

As zeólitas têm sido utilizadas principalmente como adsorventes para a purificação de gases e como trocadores iônicos em detergentes, e mostram-se extremamente úteis como catalisadores no refino de petróleo, na petroquímica, e na síntese de produtos orgânicos cujas moléculas possuem diâmetro inferior a 10\AA (LUNA & SCHUCHARDT, 2001).

As zeólitas englobam um grande número de minerais naturais e sintéticos que apresentam características comuns (LUZ, 1995). Zeólitas são caracterizadas por sua habilidade para perder e absorver água sem danificar a sua estrutura cristalina (DIAZ & SMITH, 2005). São aluminossilicatos hidratados de metais alcalinos ou alcalinos terrosos, principalmente sódio, potássio, magnésio e cálcio, estruturados em redes cristalinas tridimensionais, compostas de tetraedros do tipo TO_4 ($T = \text{Si}, \text{Al}, \text{B}, \text{Ge}, \text{Fe}, \text{P}, \text{Co} \dots$), unidos nos vértices através de átomo de oxigênio. A estrutura das zeólitas (Figura 3), apresenta canais e cavidades interconectadas de dimensões moleculares, nas quais se encontram os íons de compensação, moléculas de água ou outros adsorvatos e sais. Esse tipo de estrutura microporosa confere às zeólitas uma superfície interna muito grande, quando comparada à sua superfície externa. A estrutura da zeólita permite a transferência de matéria entre os espaços intracristalinos, no entanto, essa transferência é limitada pelo diâmetro dos poros das zeólitas. As moléculas só podem ingressar ou sair do espaço

intracristalino, se tiverem dimensões inferiores a um certo valor crítico, que varia de uma zeólita para outra (LUZ, 1995).

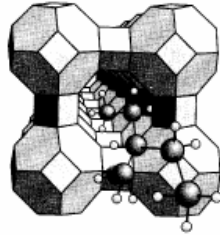


Figura 3 - Estrutura da Zeólita.

Para caracterizar uma zeólita é necessário fazer um estudo de laboratório, utilizando diferentes técnicas, que determinam as suas propriedades físicas, composição química, estrutura cristalina e morfologia. A alta eficiência de adsorção das zeólitas está relacionada com a grande superfície interna, devido à sua estrutura cristalina ser caracterizada por cavidades espaçadas. A mordenita tem uma superfície interna de $400\text{m}^2/\text{g}$ e a clinoptilolita tem $300\text{m}^2/\text{g}$. A grande capacidade de troca catiônica das zeólitas deve-se ao desequilíbrio de cargas que atrairão o cátion mais próximo, de maneira a manter a neutralidade. A propriedade de troca catiônica da zeólita é função da relação Si e Al. A capacidade é expressa em número de cátions por unidade de massa ou volume, disponível para troca. A propriedade catalítica está relacionada principalmente com as superfícies ativas da estrutura das zeólitas, com o sistema interno de passagens e vazios, o tamanho das cavidades interna e a propriedade de troca catiônica (LUZ, 1995).

As zeólitas naturais são formadas a partir da precipitação de fluidos contidos nos poros, tal como nas ocorrências hidrotermais, ou pela alteração de vidros vulcânicos. As condições de temperatura, pressão, atividade das espécies iônicas e pressão parcial da água são fatores determinantes na formação das diferentes espécies de zeólitas. Existem cerca de 40 espécies de zeólitas naturais conhecidas, no entanto apenas algumas espécies são amplamente

utilizadas. Dentre essas se incluem a mordenita, clinoptilolita, heulandita, phillipsita, erionita e chabazita (LUZ, 1995).

A maioria das ocorrências de zeólitas pode ser encontrada em um dos seis ambientes geológicos: salino ou lagos alcalinos, solos alcalinos, diagenético, sistema aberto, hidrotermal e sedimentos marinhos. No Brasil, até o momento, não se tem notícia de depósitos naturais de zeólitas, em exploração comercial, existindo apenas pesquisas sobre ocorrências que não apresentam possibilidades de aproveitamento econômico. Os basaltos e diabásicos da bacia do Paraná, são muitas vezes portadores de vários tipos de zeólitas (analcima, chabazita, thomsonita, clinoptilolita, natrolita, scolecita, mesolita, laumontita, stilbita, stellerita e heulandita) (LUZ, 1995).

O sangue é formado por um grande volume de matriz fluida. A fração fluída do sangue é denominada de plasma. Depois da remoção do fibrinogênio e da fibrina, o fluido remanescente é denominado soro (BANKS, 1992). O plasma forma de 55 a 70 volumes por cento do sangue total. Além da água, seu constituinte maior, contém, em solução, gases e outros componentes minerais, bem como, considerável variedade de constituintes orgânicos nitrogenados (não protéicos e protéicos) e não nitrogenados. Enzimas, hormônios, vitaminas e seus derivados coenzimáticos, metabólitos variados, bem como produtos do metabolismo terminal e de detoxicação (BACILA, 2003).

Muitas das características atribuídas ao plasma são uma função dos seus componentes protéicos, os quais auxiliam na manutenção da pressão osmótica intravascular (pressão coloidosmótica), no transporte de vários constituintes plasmáticos (hormônios, produtos residuais), no mecanismo de coagulação e na proteção do corpo pelos anticorpos humorais (imunoglobulinas). As proteínas estão entre as macromoléculas biológicas mais abundantes e também são extremamente versáteis em suas funções (LEHNINGER et al., 1995).

Existem numerosas técnicas amplamente utilizadas para o fracionamento das proteínas séricas. A técnica de precipitação salina por solubilidade química diferencial permite uma separação grosseira da albumina e das globulinas. A albumina é mais frequentemente determinada por um método químico (biureto) que reage com átomos de nitrogênio ou com um corante (verde de bromocresol ou púrpura de bromocresol) que se liga preferencialmente à albumina (RAVEL, 1997).

A eletroforese é a prova de triagem mais comumente utilizada para avaliar as anormalidades das proteínas séricas. A relação albumina/globulinas, determinada por método químico, era amplamente utilizada antes da disponibilização da técnica de eletroforese. A estrutura básica de resultados obtidos pela técnica de eletroforese, apresentam certas diferenças, decorrentes de diferenças nos fatores técnicos e ao tipo de material utilizado na migração eletroforética. Cada método possui suas vantagens e desvantagens quanto à facilidade de execução, custo ou sensibilidade a certas frações protéicas. Contudo, todos os métodos são capazes de identificar as áreas em que ocorrem desvios das proteínas séricas, cuja importância diagnóstica é por vezes, igual à dos próprios diagnósticos (RAVEL, 1997).

A eletroforese é o método de separação de proteínas, que se baseia na migração das mesmas em um campo elétrico. Este método permite também a visualização dos grupos protéicos (LEHNINGER et al., 1995). A eletroforese separa moléculas pela carga elétrica de certas configurações atômicas estruturais e tem a capacidade de subdividir as globulinas, porém mais em grupos do que em proteínas individuais (RAVEL, 1997). A força que move a macromolécula protéica é o potencial elétrico. A mobilidade eletroforética da molécula é expressa pela relação entre a velocidade da partícula e o potencial elétrico (LEHNINGER et al., 1995).

A eletroforese de proteínas é geralmente realizada em géis de polímeros entrecruzados com poliacrilamida. O gel de poliacrilamida age como uma peneira molecular, reduzindo a

velocidade de migração das proteínas em proporção aproximada à massa ou peso molecular de cada uma delas (LEHNINGER et al., 1995). Outros materiais como o papel de filtro, acetato de celulose e o gel de agarose também podem ser utilizados. Normalmente a eletroforese das proteínas séricas exibe bandas (Figura 4), que correspondem a albumina, alfa-1 e alfa-2-globulinas, beta-globulinas e gamaglobulinas. O densitômetro traduz a quantidade de proteínas ou a densidade dessas bandas num padrão linear (Figura 5), que representa a quantidade de substância presente. O acetato de celulose, o papel de filtro e o gel de agarose são os métodos laboratoriais clínicos de escolha e de rotina (RAVEL, 1997).

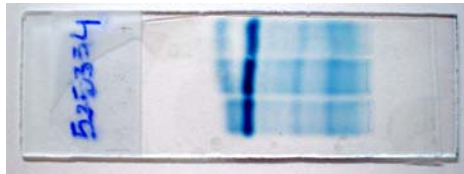


Figura 4 – Proteínas séricas separadas em bandas eletroforéticas.

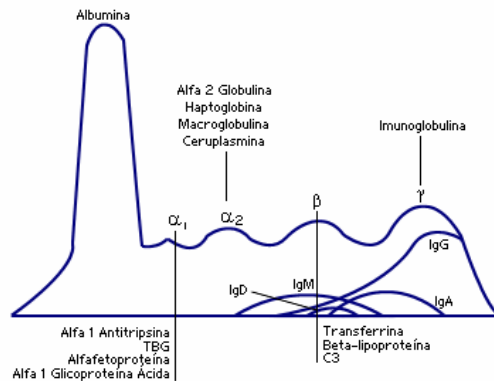


Figura 5 - Padrão linear da eletroforese.

As proteínas séricas são separadas em quatro a seis grupos maiores de uma ou mais bandas, de acordo com as suas habilidades de migrar através do acetato de celulose ou agarose em um campo elétrico. O grau de migração para o ânodo (carga terminal positiva) é justificado pela mudança de forma da massa de proteínas, após a passagem da corrente elétrica. No soro dos mamíferos domésticos, a albumina é a que mais se desloca, porque é pequena e muito aniônica.

Proteínas pequenas nem sempre se deslocam muito, devido uma marcante falta de carga negativa. Já outras globulinas (alfa-2-globulina), embora sejam maiores, têm um deslocamento maior, em decorrência de sua carga elétrica negativa (STOCKHAM & SCOTT, 2002).

As proteínas plasmáticas formam complexa mistura de diversos componentes que se distinguem entre si em propriedades e funções. As frações principais, presentes tanto no plasma dos mamíferos como no das aves, mostram mobilidade eletroforética com padrões similares, apesar de que as aves contêm concentração de proteína mais baixa, em média de 4g/100mL, do que a dos mamíferos, cerca de 7g/mL (BACILA, 2003). As proteínas séricas consistem em albumina e globulinas, quer na forma livre ou atuando como proteínas transportadoras (RAVEL, 1997).

Em sua maioria as moléculas de globulina são consideravelmente maiores do que as de albumina, apesar da quantidade total de albumina ser, em condições normais, de duas a três vezes o nível de globulina. A albumina parece ser mais ativa na manutenção da pressão oncótica do soro, onde normalmente é cerca de quatro vezes mais importante do que a globulina, sendo responsável por cerca de 80% da pressão oncótica do plasma. As globulinas exercem funções mais variadas do que a albumina e formam o principal sistema de transporte de várias substâncias, além de constituir o sistema de anticorpos, as proteínas de coagulação, o complemento e certas substâncias de função especial, como as proteínas de reação aguda (RAVEL, 1997).

As frações albumina e fibrinogênio das proteínas plasmáticas são produzidas pelo fígado. Cerca de três-quartos das globulinas também são produzidas nesse órgão. O resto das globulinas é produzida nas células do sistema linfático. O plasma é a fonte imediata de proteínas quando as proteínas teciduais são esgotadas. As proteínas plasmáticas dos espaços intersticiais são assimiladas pelos macrófagos por pinocitose (BANKS, 1992).

As proteínas plasmáticas são digeridas até os seus aminoácidos constituintes, os quais são secretados e usados localmente ou transportados para o sangue para a distribuição por todo o corpo. A quantidade de aminoácidos disponíveis no sangue está em equilíbrio dinâmico com as proteínas plasmáticas circulantes e com as teciduais (BANKS, 1992).

A albumina é a mais abundante proteína plasmática. É monomérica, contendo cerca de 600 resíduos de aminoácidos e é estabilizada por 17 ou 18 ligações dissulfeto. A albumina mostra grande afinidade para ânions, sendo responsável pelo transporte de ácidos graxos. Liga-se também ao cálcio, e pode estar envolvida no transporte do magnésio, do zinco e do cobre, assim como da bilirrubina, ácido úrico, hormônios sexuais, vitamina A e C, além de outras substâncias. Nas aves os hormônios tireoideanos são ligados somente à albumina enquanto que nos mamíferos a maior parte se liga a uma pré-albumina e à alfa-globulina (BACILA, 2003).

A elevação do nível de albumina sérica é muito rara, exceto na desidratação. A maioria das alterações consiste em reduções. A desnutrição resulta em níveis diminuídos de albumina, provavelmente devido à falta de aminoácidos essenciais, mas possivelmente em consequência da síntese hepática deficiente. Pode ocorrer perda direta de albumina sérica da corrente sangüínea em consequência de hemorragias, exsudatos ou extravasamento no trato gastrointestinal na presença de várias enteropatias perdedoras de proteínas. Na síndrome nefrótica verifica-se uma acentuada redução dos níveis séricos de albumina devido a uma perda direta na urina. A albumina quase sempre diminui rapidamente em muitas doenças agudas graves ou lesões (RAVEL, 1997).

Quase 90% da banda eletroforética das alfa-1-globulinas, é ocupada pelas alfa-1-antitripsina. Os 10% restantes incluem as alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-fetoproteína e certas proteínas transportadoras, como a proteína de ligação do cortisol (transcortina) e a globulina de ligação da tiroxina (localizada junto à área entre a alfa-1 e a alfa-2). As alfa-2-globulinas incluem

a haptoglobina, a alfa-2-macroglobulina e a ceruloplasmina (RAVEL, 1997). A ceruloplasmina é uma alfa-2-globulina responsável pelo transporte do cobre no plasma e também pela regulação da sua absorção e distribuição pelo corpo. Possui atividade enzimática, catalisando oxidação de aminas, fenóis, enóis e íon ferroso pelo oxigênio molecular. A conversão do íon ferroso a férrico pode estar relacionada com a sua incorporação na transferrina (BACILA, 2003). Esta região eletroforética raramente está deprimida, já que a diminuição de um componente, geralmente é compensada pelos demais componentes que se encontram dentro da faixa de referência. Os níveis de haptoglobina apresentam-se diminuídos na hepatopatia grave, em pacientes submetidos a estrogenerioterapia, na anemia megaloblástica e, inclusive, quando aparece hemoglobina livre no sangue, conforme observado na hemólise ou em consequência da reabsorção de um grande hematoma localizado fora do sistema vascular. Os níveis de ceruloplasmina apresentam-se diminuídos na desnutrição, na síndrome nefrótica e na enteropatia com perda de proteínas. Os níveis de ceruloplasmina aumentam em consequência da estrogenerioterapia. Tanto os níveis de haptoglobina quanto os de ceruloplasmina estão aumentados nos numerosos distúrbios que produzem o padrão de reação aguda, observando-se uma elevação da alfa-2. Além da lesão aguda, existem doenças que quase sempre produzem aumento de alfa-2 (RAVEL, 1997).

A zona das beta-globulinas contém transferrina, beta-lipoproteína e vários componentes do complemento (RAVEL, 1997). A transferrina ou siderofilina é a glicoproteína responsável pelo transporte do ferro no plasma. Forma parte considerável da fração da beta-globulina. Por eletroforese, em amido ou em gel de poliacrilamida, 3 ou 4 faixas de transferrina são encontradas. Tais variações são herdadas e cerca de seis fenótipos já foram identificados. O mesmo polimorfismo genético foi encontrado na ovotransferrina, uma proteína muito similar encontrada no albumen do ovo. Experimentos com aves imaturas demonstram que o ferro plasmático se liga só à transferrina e é rapidamente transferido para as células eritróides da

medula óssea. Nesse processo a molécula da transferrina se adere à superfície do glóbulo vermelho em desenvolvimento por cerca de 1 minuto, quando o ferro é então removido e incorporado à célula. A apotransferrina é então deslocada, retornando ao plasma para repetir o processo (RAVEL, 1997). A transferrina também pode controlar a absorção do ferro no intestino e a sua distribuição no corpo (BACILA, 2003). A redução no nível de beta-globulinas não é muito comum. A transferrina quase sempre está diminuída na desnutrição protéica. Em muitas condições pode ocorrer aumento das beta-globulinas. O aumento dos níveis de transferrina produzido pela anemia ferropriva crônica, o nível de hemoglobina livre no soro ou o fibrinogênio do sangue não totalmente coagulado, pode produzir um pico semelhante a espiga de milho na região beta, similar a um pico monoclonal (RAVEL, 1997).

Os danos causados ao sistema imunológico, ocupam posição de destaque, pois expõem os animais à uma infinidade de doenças (SANTIN, 2000). A saúde e o bem-estar da ave, dependem de um sistema imunológico (Figura 6), que proporcione uma eficaz proteção contra a invasão de microorganismos, parasitas, fungos, vírus ou qualquer molécula de natureza estranha ao organismo. Existem dois tipos de função imunológica: a natural e a adquirida. A imunidade natural, também denominada de sistema imunológico inato, inclui as barreiras físicas naturais (pele e a camada mucosa do trato gastrointestinal), moléculas específicas (aglutininas, proteínas de fase aguda e lisozimas), fagocitose e destruição de patógenos por macrófagos e neutrófilos e também pela ação de lise, proporcionada por linfócitos denominados de células matadoras naturais. A imunidade adquirida ou imunidade específica, consiste da imunidade humoral e da imunidade celular. A imunidade humoral é mediada por anticorpos que são liberados por linfócitos B, na corrente sangüínea. Esses anticorpos são responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de antígenos específicos. A imunidade celular é baseada no reconhecimento pelos linfócitos T (SURAI & DVORSKA, 2005).

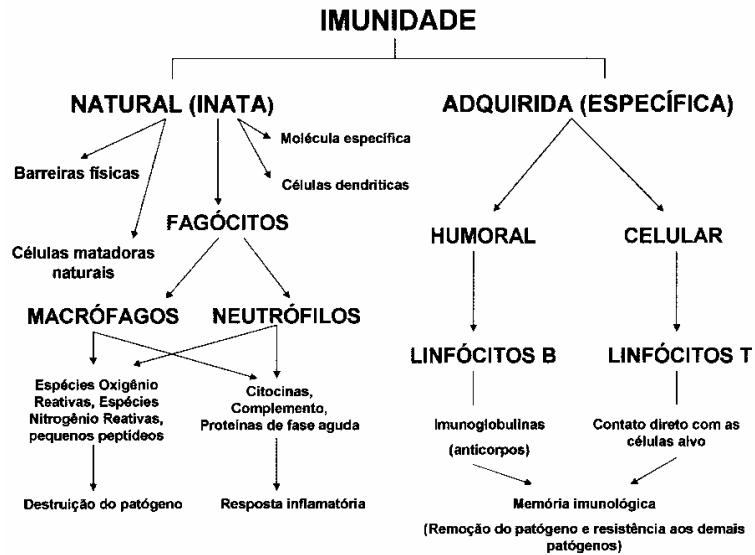


Figura 6 – O sistema imunológico.

Muitas toxinas ambientais são imunossupressoras. As aflatoxinas aumentam a suscetibilidade das aves à *Salmonella*, como resultado de uma depressão da atividade fagocítica (TIZARD, 2002). A imunossupressão causada pela aflatoxina B₁, tem sido bem demonstrada em várias espécies domésticas (galinhas, perus, suínos e ovinos), além de animais de laboratório e sistemas “*in vitro*”. As aflatoxinas são agentes tóxicos que afetam primariamente a imunidade celular e a função fagocítica. Portanto a aflatoxina B₁, além de diminuir a atividade dos linfócitos, pode também comprometer o auxílio dos macrófagos à atividade dos linfócitos. Macrófagos expostos à aflatoxina B₁, têm a produção de óxido nítrico significativamente reduzida (MOON et al., 1998). A aflatoxina B₁ pode ser transferida da galinha para o ovo. Assim sendo, os progênitos de galinhas que consumiram dieta contaminada com aflatoxina B₁, podem ter uma elevação na suscetibilidade para doenças, devido a supressão da imunidade humoral e celular (QURESHI et al., 1998).

Em sua primeira classificação, os anticorpos eram nomeados de acordo com a sua característica funcional em lisinas, promotoras da lise de bactérias, protozoários, eritrócitos;

opsoninas, promotoras de fagocitose e as precipitinas, anticorpos capazes de formar precipitado com o antígeno. Entretanto, tal subdivisão, é apenas funcional já que os anticorpos são componentes do soro sanguíneo e, dependendo das circunstâncias, podem atuar de modo diverso como lisina, aglutinina, opsonina, etc (BACILA, 2003).

As aves possuem nódulos linfáticos pouco desenvolvidos, como as tonsilas cecais. Nesses animais o baço atua como o principal órgão formador de anticorpos. Além dos nódulos linfáticos do baço e da medula óssea, as aves possuem outros órgãos linfóides importantes, tais como o timo, a bursa de Fabricius, as placas de Peyer e outros nódulos linfóides do trato alimentar (BACILA, 2003). Nas aves, os precursores dos linfócitos B e T, têm origem na medula óssea. O desenvolvimento dos linfócitos B ocorre na bursa de Fabricius, já os linfócitos T, se desenvolvem no timo (LAHTALA, 1998).

Os anticorpos ou imunoglobulinas, são produzidos pelos linfócitos, denominados de células B. As células B são encontradas no córtex dos linfonodos, na zona marginal do baço, na medula óssea e nas placas de Peyer. Somente um pequeno número circula no sangue. Cada célula B possui um grande número de receptores antigênicos idênticos, podendo dessa maneira, somente se ligar e responder a um antígeno simples (TIZARD, 2002).

A formação de anticorpos se constitui em sofisticado mecanismo de defesa do organismo animal (BACILA, 2003). Cada célula B é coberta com cerca de 200.000 a 500.000 receptores antigênicos idênticos (BCR). O BCR é um complexo de múltiplas glicoproteínas. Os anticorpos são simplesmente formas solúveis do BCR secretadas pelas células B, nos fluidos corpóreos (TIZARD, 2002).

As moléculas de anticorpos aparecem no soro sanguíneo e em determinados tecidos de um animal vertebrado em resposta à presença do antígeno, uma molécula estranha, que pode ser uma proteína ou outra substância (LEHNINGER et al., 1995). Quando um antígeno entra no

corpo, ele poderá estimular uma célula B por meio de receptores específicos. Um clone de células B que é capaz de responder a um único epítipo, é denominado de clonótipo. Animais recém-nascidos, têm um número razoavelmente pequeno de diferentes clonótipos, mas esse número aumenta à medida que o animal amadurece. No animal adulto o número de células B, dentro de um dado clonótipo varia como resultado da exposição a antígenos diferentes por toda a vida do animal. À medida que o indivíduo envelhece, os clonótipos mais utilizados estarão expandidos, já os clonótipos, cujos antígenos raramente são encontrados, estarão em pequenas quantidades (TIZARD, 2002).

Os anticorpos são proteínas com moléculas em forma de Y, consistindo de quatro cadeias polipeptídicas. Cada molécula tem dois sítios de ligação que são complementares a características estruturais específicas da molécula de antígeno e anticorpo (LEHNINGER et al., 2002). Existem cinco classes de imunoglobulinas diferentes (isótipos), que diferem quanto ao uso das cadeias pesadas. A imunoglobulina G (IgG), é encontrada em altas concentrações no soro. A imunoglobulina M (IgM), é a segunda maior classe em quantidade de concentração, e a imunoglobulina A (IgA), é a terceira. A imunoglobulina D (IgD), assim como a imunoglobulina E (IgE), são normalmente encontradas em baixa concentração sérica (TIZARD, 2002).

Uma célula B apropriadamente estimulada aumentará de volume e se dividirá repetidamente. Algumas das suas células de progênie desenvolvem um retículo endoplasmático rugoso, aumentam as suas taxas de síntese e começam a secretar grande quantidade de imunoglobulinas. Dentro de alguns dias, a célula muda para a síntese de uma outra classe de imunoglobulina. Essa mudança ocorre enquanto uma célula B encontra-se no centro germinativo e resulta em uma alteração da produção de IgM para a produção de IgG, IgA, ou IgE. Essa mudança de classe é o resultado da deleção dos segmentos gênicos da cadeia pesada não

importantes e também da associação dos genes da região variável com os próximos genes da região constante disponíveis (TIZARD, 2002).

Nas aves, entre o 5º e o 7º dia de incubação, as células precursoras surgem na membrana do saco vitelino e migram para o timo e a bursa. Essas células se diferenciam dentro da bursa, onde ao 12º dia, se desenvolvem os folículos, sendo que aos 14 dias, os linfócitos com IgM de superfície já podem ser detectados. Os linfócitos com IgG de superfície se desenvolvem no 21º dia, aproximadamente no momento da eclosão. Já as imunoglobulinas IgA, surgem no intestino, 3 a 7 dias após a eclosão (TIZARD, 2002).

As aves recém-eclodidas, ao saírem do ambiente estéril do ovo, exigem uma assistência imunológica temporária. Esse suporte imunológico se dá pela transferência de imunoglobulinas séricas, da galinha para a gema, enquanto o ovo ainda se encontra no ovário. Na fase fluida da gema, a IgG, é encontrada em níveis equivalentes aos do soro da galinha. A medida que o ovo desce do oviduto, ocorre a aquisição de IgM e IgA, provenientes das secreções ovidutais com a albumina. A IgG detectada na circulação do pinto, é absorvida da gema, à medida que ele se desenvolve. A IgM e a IgA maternas provenientes da albumina se difundem no líquido amniótico, de forma que quando o pinto eclode, ele já possui IgG no seu soro e a IgM e IgA no seu intestino. Esses anticorpos maternos comprometem a eficácia de uma vacinação, até que desapareçam entre 10 e 20 dias após a eclosão (TIZARD, 2002).

As aves da linhagem OS, hipotireóideas, apresentam deficiência seletiva de IgA. Já as aves da linhagem UCD 140, apresentam deficiência seletiva de IgG, conhecida como disgamaglobulinemia hereditária. Essas aves apresentam níveis de imunoglobulinas normais por cerca de 50 dias após a eclosão, a partir de então, o nível de IgG diminui. Contudo os níveis de IgM e IgA aumentam (TIZARD, 2002).

A região gama é constituída predominantemente por anticorpos do tipo IgG. Os anticorpos IgA, IgM, IgD e IgE encontram-se sob a área de junção beta-gama. Essa região encontra-se diminuída na presença de hipogamaglobulinemia e agamaglobulinemia, que podem ser primárias ou secundárias (RAVEL, 1997).

As hepatopatias constituem um grupo significativo responsável pela elevação de gama. Na hepatite verifica-se, classicamente, um aumento distinto e relativamente leve dos níveis de beta-globulinas e gamaglobulinas, com redução da albumina. Em cerca de 90% dos episódios de cirrose, bem estabelecida, existe uma elevação da gama. Porém em cerca de 10% dos pacientes com cirrose, histologicamente bem estabelecida, não se observa nenhuma elevação eletroforética da gama. O padrão mais sugestivo consiste na elevação da gamaglobulina de base ampla, juntamente com a fusão da beta e gamaglobulina, sem a separação dos dois picos (ponte beta-gama). Na icterícia obstrutiva, pode-se verificar certo grau de elevação de alfa-2, beta e gama (RAVEL, 1997).

CAPÍTULO 2

PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO AFLATOXINAS E/OU ARGILA CLINOPTILOLITA NATURAL

ELECTROPHORESIS PROFILE OF SERUM PROTEINS IN BROILERS FED WITH DIETS CONTAINING AFLATOXINS AND/OR NATURAL CLINOPTILOLITE CLAY

Roberto Marinho Maciel¹ Sonia Terezinha dos Anjos Lopes² Janio Moraes Santurio³

Alexandre Pires Rosa⁴ Marta Maria Medeiros Frescura Duarte⁵

Danieli Brolo Martins¹ Mauren Picada Emanuelli¹

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil eletroforético das proteínas séricas de frangos de corte alimentados com dietas contendo aflatoxinas e/ou argila clinoptilolita natural. Foram utilizados 528 frangos de corte, machos, da linhagem Ross, distribuídos em 6 tratamentos com 4 repetições cada: T₁ – testemunha (ração sem aflatoxinas ou clinoptilolita), T₂ – ração com 5ppm de aflatoxinas, T₃ – ração com 0,25% de clinoptilolita, T₄ – ração com 5ppm de aflatoxinas e 0,25% de clinoptilolita, T₅ – ração com 0,5% de clinoptilolita e T₆ – ração com 5ppm de aflatoxinas e 0,5% de clinoptilolita. Os animais ficaram alojados em 24 boxes, e submetidos aos tratamentos do 1º ao 42º dia, quando foram sacrificados. Foram analisadas as proteínas totais, as

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: roberto.marinho@uol.com.br. Autor para correspondência.

² Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

³ Departamento de Microbiologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Zootecnia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁵ Departamento de Análises Clínicas, Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), Cruz Alta, RS, Brasil.

frações albumina, alfa 1, alfa 2, beta e gama. Com exceção das médias da fração gama, o teste de Tukey revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) nas médias de todas as proteínas totais e frações protéicas nos tratamentos onde as aflatoxinas estavam presentes. A ação das aflatoxinas nas proteínas totais ocorre na síntese de albumina e globulinas (frações alfa e beta). As gamaglobulinas não são afetadas pelas aflatoxinas. Em relação ao controle, as aves alimentadas com dietas com aflatoxinas e clinoptilolita apresentaram baixos ($P < 0,05$) níveis de proteína total, albumina e globulinas (alfa e beta). Conclui-se que as aflatoxinas alteram o perfil eletroforético e a clinoptilolita adicionada na ração, não é capaz de evitar essa alteração.

Palavras-chave: proteínas séricas, clinoptilolita, aflatoxinas, frangos de corte, perfil eletroforético.

ABSTRACT

A study was carried out to evaluate the electrophoresis profile of serum protein in broilers fed with diets containing aflatoxins and natural clinoptilolite clay. A total of 528 male broilers Ross were used, distributed in 6 treatments with 4 replications each: T1 – control (without aflatoxins or clinoptilolite), T2 –5ppm of aflatoxins, T3 –0.25% of clinoptilolite, T4 –5ppm of aflatoxins and 0.25% of clinoptilolite, T5 –0.5% of clinoptilolite and T6 – 5ppm of aflatoxins and 0.5% of clinoptilolite. The broilers were placed in 24 boxes and submitted to treatments from 1 to 42 days, when they were slaughtered. Were analyzed the total proteins, albumin fractions, alpha 1, alpha 2, beta and gamma. The aflatoxins decreased ($P < 0.05$) total protein, albumin, and globulins (alpha and beta fractions). However, no effect ($P < 0.05$) of aflatoxins was observed about gamma fraction. The clinoptilolite no modify ($P < 0.05$) the serum proteins. Related to control, broilers fed with diets containing aflatoxins and clinoptilolite presented low ($P < 0.05$) levels of total protein,

albumin, and globulins (alpha and beta fractions). In conclusion, aflatoxins change the electrophoresis profile and clinoptilolite is not able to protect against this change.

Key words: clinoptilolite, aflatoxin, broiler, electrophoresis profile.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus*, *A. parasiticuse* e *A. nominus* (MOSS, 1998). Os efeitos das aflatoxinas no organismo animal incluem carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade e hepatotoxicidade (BRADBURN & COKER, 1993).

A absorção de aflatoxinas ocorre por difusão passiva através do intestino, difundindo-se rapidamente por todos os tecidos do organismo (RAMOS & HERNANDEZ, 1996). Uma vez em contato com o tecido hepático, as aflatoxinas dão início à inibição da síntese protéica, o que resulta numa diminuição do nível de proteínas plasmáticas, principalmente da albumina e das globulinas alfa e beta (SANTIN, 2000). As aflatoxinas podem interagir com o DNA e o RNA nos hepatócitos dos mamíferos e das aves, formando um composto denominado AB₁-DNA, quando se combinam com o DNA. A aflatoxina B₁ causa a inibição da síntese de DNA, correlacionada com a dose utilizada (ZAVIERO & CONTRERAS, 2005).

A técnica da eletroforese permite a determinação das frações protéicas, na proporção em que são encontradas, no soro ou no plasma. As proteínas séricas se separam em um campo elétrico, em função de seus diferentes pontos isoelétricos. Após a coloração, essas bandas são escaneadas por um densitômetro e traduzidas em um traçado eletroforético. A interpretação da curva eletroforética permite o cálculo da porcentagem de participação de cada fração protéica (BUSH, 2004).

A albumina é uma proteína de alta densidade, sendo responsável pelo transporte de ácidos graxos, cálcio, magnésio, zinco, cobre, bilirrubina, ácido úrico, vitamina A e C, hormônios sexuais e no caso específico das aves, dos hormônios tireoideanos. As beta-globulinas são constituídas em sua grande maioria por transferrina, uma glicoproteína responsável pelo controle da absorção do ferro no intestino e a sua distribuição no organismo. A ceruloplasmina é uma alfa-globulina responsável pelo transporte do cobre e que possui ação enzimática sobre as aminas, fenóis, enóis e íons ferrosos, através de processos de catalização (BACILA, 2003). As imunoglobulinas são produzidas pelos plasmócitos e linfócitos B, presentes no tecido linfóide, sendo constituídas pelos anticorpos IgG, IgA, IgE, IgD e IgM (BUSH, 2004).

As argilas zeólitas podem ser usadas como adsorventes eficazes de agentes tóxicos, principalmente as aflatoxinas presentes na ração (PHILLIPS, 1999). As zeólitas são minerais, naturais ou sintéticos, que apresentam estrutura constituída por canais e cavidades interconectadas de dimensões moleculares. A clinoptilolita é uma das 40 espécies de zeólitas naturais conhecidas. A alta capacidade de absorção da clinoptilolita decorre de sua grande superfície interna, cerca de $300\text{m}^2/\text{g}$ (LUZ, 1995).

A relação albumina/globulina nas aves é um indicador de alta significância clínica, para se avaliar a resposta inflamatória em caso de enfermidade (KANEKO, 1997). Na presença de infecções, as relações albumina/globulina, se alteram, invertendo-se os valores pelo incremento que ocorre na concentração das imunoglobulinas (BACILA, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil eletroforético das proteínas séricas totais de frangos de corte com 42 dias, alimentados com dietas com aflatoxinas e/ou argila clinoptilolita.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 528 aves da linhagem Ross, machos, provenientes do incubatório do laboratório de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As aves foram alojadas em 24 boxes, com 22 animais cada. Nos primeiros 21 dias, o período de luminosidade foi de 24 horas. A partir de então a iluminação passou a ser apenas luz natural. Durante o experimento a água foi fornecida a vontade. O fornecimento da ração foi realizado de acordo com a fase de desenvolvimento da ave (Tabela 1).

O desenho experimental foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 4 repetições: (T₁) Controle: dieta normal, (T₂): dieta com 5ppm de aflatoxinas, (T₃): dieta com 0,25% de clinoptilolita, (T₄): dieta com 5ppm mais 0,25% de clinoptilolita, (T₅): dieta com 0,5% de clinoptilolita e (T₆): dieta com 5ppm de aflatoxinas mais 0,5% de clinoptilolita.

A constituição das aflatoxinas utilizadas no experimento foi: 80% B₁, 12% B₂, 5% G₁ e 3% G₂, e foram produzidas pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI, UFSM), a partir do *Aspergillus parasiticus*, cepa NRRL 2999, via fermentação do arroz, segundo o método de SHOTWELL et al (1966). O adsorvente clinoptilolita natural foi fornecido pelo LAPEMI.

Após 42 dias foram retiradas, aleatoriamente, 3 frangos de cada um dos 24 boxes. As 72 aves foram dessensibilizadas com corrente elétrica e imediatamente sacrificadas, sendo coletados, de cada animal, 10mL de sangue, sem anticoagulante, por punção cardíaca. Após centrifugação, o soro obtido foi acondicionado e armazenado a -20°C para posterior análise eletroforética das proteínas séricas.

A eletroforese foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas LABIMED, localizado em Santa Maria, Rio Grande do Sul. As proteínas totais foram dosadas no analisador de química seca VITROS 950, a separação e a quantificação das frações das proteínas totais do soro foram realizadas pela técnica de eletroforese em fita de acetato de celulose, sendo a leitura e

o cálculo do fracionamento eletroforético realizados no densitômetro para eletroforese Z – 30/C com separação manual das frações protéicas: albumina, alfa-globulinas, beta-globulinas e gamaglobulinas.

Os dados obtidos foram analisados pelo GLM ANOVA do SAS. Eventuais diferenças significativas ao nível de 5% foram comparadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados expressos na tabela 2 demonstram as médias das proteínas totais e suas frações protéicas, encontradas no soro de frangos de corte com 42 dias e que receberam dietas sem e com aflatoxinas e/ou clinoptilolita.

O valor médio da proteína sérica total, encontrado no tratamento 1, foi de 3,43g/dL. Esse valor ficou próximo de 3,17g/dL, encontrado, nas mesmas condições, tanto por BATINA et al. (2005), quanto por FRANCISCATO (2006), quando realizaram experimentos com aflatoxinas, na mesma espécie e sexo, porém utilizando raça e adsorvente diferentes. Entretanto, OGUZ et al. (2002), ao trabalhar com a mesma espécie e linhagem, encontrou 3,04g/dL. A adição de 5ppm de aflatoxinas na ração, resultou na redução de 51,90% na síntese de proteína total. O que expressa uma hipoproteïnemia significativa ($P < 0,05$). BATINA et al. (2005), utilizando a mesma dose de aflatoxinas, observaram uma redução na síntese de proteína total de 33,69%. FRANCISCATO (2006), observou um declínio de 44,79% na síntese de proteína total, ao utilizar 3ppm de aflatoxinas. OGUZ et al. (2002), observaram, na proteína sérica total, uma elevação de 12,5%, ao utilizarem 50ppb de aflatoxinas, e uma redução de 2,6%, ao utilizarem 100ppb da mesma micotoxina.

A redução no nível de proteínas totais, um dos principais efeitos das aflatoxinas, ocorre pela inibição da síntese protéica (SANTIN, 2000). As aflatoxinas têm a habilidade de se ligarem de forma covalente com constituintes intracelulares da célula hepática, principalmente DNA e RNA, comprometendo a síntese de proteínas (SANTURIO, 2000). Após 1 hora da ingestão das aflatoxinas, já ocorre inibição na síntese protéica *in vitro*, devido a uma acentuada inibição da RNA-polimerase (SANTIN, 2000). Os efeitos deletérios das aflatoxinas sobre a síntese de proteína, não são explicados apenas pela dose de aflatoxinas utilizada. Fatores como desbalanceamento nutricional, erros de manejo, variações extremas na temperatura, condições das camas utilizadas, assim como a qualidade dos pintos alojados, têm grande importância na resposta das aves ao nível de aflatoxinas exposto (SANTURIO, 2000). Esses fatores não tiveram influência durante o experimento. Quanto maior o nível de estresse, menor será a dose de aflatoxinas necessária para comprometer o desempenho dos animais (DOERR et al., 1983).

As médias das proteínas totais, nos tratamentos em que foram adicionadas clinoptilolita à ração, não sofreram variações significativas ($P>0,05$). O que demonstra que a clinoptilolita utilizada como adsorvente, nas duas concentrações, foi inerte ao organismo durante sua permanência no trato gastrintestinal da ave, corroborando com os dados de PAPAIOANNOU et al. (2004), quando citam que as dietas suplementadas com zeólitas são bem toleradas pelos animais.

A dose de aflatoxinas empregada, 5ppm, está no intervalo de letalidade para a espécie (2 a 6,3ppm), e foi utilizada nessa alta concentração para compensar o baixo nível de estresse oferecido às aves durante o experimento. A adição da clinoptilolita, nas concentrações de 0,25 e 0,5%, na ração contaminada com aflatoxinas, não demonstrou resultados significativos na proteção da síntese protéica ($P>0,05$).

A média da fração da albumina encontrada foi de 1,77g/dL, o que representa 51,60% do total das proteínas séricas. As globulinas somavam 1,66g/dL, respondendo pelos 48,40% restantes. Esses resultados diferem de BATINA et al. (2005) e FRANCISCATO (2006) que utilizando métodos cinéticos para a análise bioquímica das proteínas, encontraram respectivamente médias de 1,26g/dL e 1,16g/dL para a albumina e 2,45g/dL e 2,01g/dL para as globulinas. OGUZ et al. (2002), encontraram a média de 1,79g/dL para a albumina. Embora se trate de animais da mesma espécie, sexo e faixa etária, essas divergências são justificadas por RAVEL (1997), quando diz que as diferentes técnicas disponíveis para o fracionamento das proteínas séricas, podem não fornecer valores idênticos para todas as frações protéicas ou proteínas individuais.

As alterações observadas nas concentrações de proteína total se devem primariamente a aumentos ou diminuições na concentração de albumina. As globulinas têm menor influência nessas variações (BUSH, 2004). A falta de aminoácidos essenciais à síntese, decorrente de uma desnutrição, pode concorrer para a diminuição dos níveis de albumina (RAVEL, 1997). O efeito das aflatoxinas nos frangos é maior na fase de crescimento, ou seja, durante os primeiros 21 dias (SANTURIO, 2000). A composição estimada das dietas basais nas 3 fases de desenvolvimento das aves é apresentada na tabela 1. Durante os primeiros 21 dias, a proporção de proteína disponível na ração foi a mais elevada. A ação das aflatoxinas foi mais acentuada na fração da albumina, que teve uma diminuição de 63,30% em sua concentração sérica, ao passar de 1,77g/dL, observado no tratamento 1, para 0,65g/dL, verificado no tratamento 2. As observações de BATINA et al. (2005) indicam uma diminuição de 51,60% nos níveis de albumina sérica em relação ao controle. FRANCISCATO (2006), verificou uma diminuição sérica de 31,90%, nessa mesma fração. OGUZ et al. (2002), observaram a elevação da albumina, em 9,50% e 8,94%, nos tratamentos com 50ppb e 100ppb de aflatoxinas, respectivamente. A clinoptilolita, nas duas

concentrações, não interferiu significativamente na ação das aflatoxinas, na síntese da albumina ($P>0,05$), como mostra a tabela 2.

A média das proteínas, observadas na fração das beta-globulinas, foi de 0,64g/dL, o que corresponde a 18,70% das proteínas totais. A ação das aflatoxinas sobre a região das beta-globulinas, levou a uma diminuição de 45,30% nos seus níveis séricos ($P<0,05$). Essa diminuição pode comprometer o transporte do ferro no plasma (BACILA, 2003). Nas aves o ferro plasmático se liga apenas à transferrina, sendo rapidamente transferido para as células eritróides da medula óssea. A transferrina também pode controlar a absorção de ferro no intestino e a sua distribuição no organismo. A média das beta-globulinas não inclui o fibrinogênio, que foi consumido na formação do coágulo. Embora a eletroforese possa ser realizada com o plasma sangüíneo, é muito mais indicado utilizar o soro, que não contém fibrinogênio, justamente porque a presença do fibrinogênio pode obscurecer a região de transição entre a fração das beta-globulinas e a fração das gamaglobulinas na curva eletroforética (THOMAS, 2000). Essa observação é reforçada por RAVEL (1997), quando diz que o fibrinogênio do sangue não totalmente coagulado, pode produzir um pico, na região beta, simulando um pico monoclonal.

As alfa globulinas constituíram 16,33% do total de proteínas séricas encontradas nesse experimento. O valor médio da fração alfa dois, 0,44g/dL, é quase 4 vezes maior que o valor médio da fração alfa um, 0,12%. As aflatoxinas reduziram, significativamente ($P<0,05$), os níveis séricos nas duas frações de alfa globulinas, sendo a média de 52,30% na fração alfa dois e 50% na fração alfa um. A diminuição das alfa globulinas é verificada nos estádios finais da cirrose hepática (THOMAS, 2000). Tanto a haptoglobina quanto a ceruloplasmina, proteínas da fração alfa, estão diminuídas nas hepatopatias graves e estados de desnutrição (RAVEL, 1997).

A análise das gamaglobulinas, revelou que o valor médio das mesmas é de 0,45g/dL, o que corresponde à 13,12% do total das proteínas séricas. A presença das aflatoxinas provocou uma redução numérica de 13,3% no nível desses anticorpos, o que está de acordo com SWAMY & DEVEGOWDA (1998), quando afirmam que as aflatoxinas reduzem o nível dos anticorpos na circulação. A adição da clinoptilolita no tratamento 6, manteve a média da fração gama bem próxima à do controle, sem significância ($P>0,05$). Esse resultado difere de MARIN et al. (2003), quando observaram que o nível das gamaglobulinas de aves expostas a 70 μ g/kg de aflatoxinas, sofreram uma elevação de 24,70%, ao subir de 0,73g/dL, no grupo controle, para 0,91g/dL, no grupo com as aflatoxinas. De acordo com MARIN et al. (2003), o processo inflamatório decorrente da exposição a doses subclínicas de aflatoxinas, induziu um discreto aumento na fração das gamaglobulinas.

A imunodepressão resultante da ação das aflatoxinas, afeta a capacidade da ave em sintetizar anticorpos e substâncias humorais como o interferon, a citocina e as proteínas do sistema complemento (AZZAM & GABAL, 1998). Segundo DEVEGOWDA & MURTHY (2005), as aflatoxinas além de diminuírem o número de leucócitos em circulação, também reduzem suas habilidades de fagocitose. As aflatoxinas afetam o perfil imunológico, porém sem suprimir completamente a produção de anticorpos (ZAVIERO & CONTRERAS, 2005). Estas alterações diminuem a capacidade do organismo em oferecer resistência às enfermidades, o que compromete as respostas produtivas do lote (PIER, 1992). Os efeitos das aflatoxinas ao sistema imunológico da ave expõem o animal a uma infinidade de doenças (SANTIN, 2000).

A relação albumina/globulina, conforme demonstrada na tabela 3, foi de 1,2, no tratamento 1. Esse resultado é semelhante ao de MARIN et al. (2003), que encontrou 1,11, ao trabalhar com frangos de corte na mesma faixa etária. Com a adição de 5ppm de aflatoxinas,

houve um declínio de 44,60% no índice da albumina/globulina. Essa diminuição na relação albumina/globulina, tem origem nas diferentes variações observadas nas frações da albumina e das globulinas, o que comprova a ação das aflatoxinas no fígado, único local de síntese da albumina. As globulinas, que têm outras fontes de síntese, tiveram uma diminuição menos acentuada nos níveis séricos. A adição de clinoptilolita nas duas concentrações, não alterou o índice da relação albumina/globulina, porque o adsorvente não interferiu na síntese protéica.

Novos estudos serão necessários, para elucidar as causas que levaram o adsorvente clinoptilolita, nas concentrações de 0,25 e 0,5%, a não alcançar um nível de proteção mais elevado, quando utilizado em dietas contendo 5ppm de aflatoxinas.

CONCLUSÕES

A adição de 5ppm de aflatoxinas na dieta de frangos de corte diminui as proteínas séricas totais, a síntese de albumina e globulinas (frações alfa e beta), mas não afeta o nível das gamaglobulinas.

A adição de clinoptilolita na dieta de frangos de corte, nas concentrações de 0,25 e 0,5%, não altera o perfil eletroforético das proteínas séricas totais.

A adição de 5ppm de aflatoxinas e clinoptilolita, nas concentrações de 0,25 e 0,5%, nas dietas de frangos de corte diminui as proteínas séricas totais, a síntese de albumina e globulinas (frações alfa e beta), mas não afeta o nível das gamaglobulinas.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Análises Clínicas LABIMED, Santa Maria-RS; ao Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da UFSM-RS; ao Laboratório de Pesquisas Micológicas LAPEMI, UFSM-RS e ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, UFSM-RS.

REFERÊNCIAS

- AZZAM, A.H., GABAL, M.A. Aflatoxin and immunity in layer hens. **Avian Pathology**, New York, n.27, p.570-577, 1998.
- BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. São Paulo: Robe, 2003. 583p.
- BATINA, P.N. et al. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.826-831, 2005.
- BRADBURN, N., COKER, R.D. Aflatoxin cotamination in maize. **Tropical Science**, London, v.33, n.44, p.418-428, 1993.
- BUSH, B.M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. 376p.
- DEVEGOWDA, G., MURTHY, T.N.K. Mycotoxins: effects on poultry performance and health. In: DIAZ, D.E. **The mycotoxin blue book**. England: Nottingham University Press, 2005. 349p.
- DOERR, J.A. et al. Effects of low levels chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, Texas, n.62, p.1971-1977, 1983.
- FRANCISCATO, C. **Avaliação dos minerais séricos e da função hepática de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxina e submetidos a diferentes concentrações de montmorilonita sódica na dieta**. Santa Maria, 2006. 26p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
- KANECO, J.J. Serum Proteins and the dysproteinemias. In: KANECO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5ed. San Diego: Academic Press, 1997. Cap.5, p.117-138.

- LUZ, A.B. Zeólitas: propriedades e usos industriais. **Série Tecnologia Mineral**, Rio de Janeiro, n.68, p.4-28, 1995.
- MARIN, F.P. et al. Aflatoxina B1, selenio y saccharomyces cerevisiae em la respuesta inmune de pollos de engorde em el estado Zulia, Venezuela. **Revista Científica**, Venezuela, v.13, n.5, p.360-370, 2003.
- MOSS, M.O. Recent studies of micotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, United Kingdom, v.84, p.62S-76S, 1998.
- OGUZ, H. et al. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Research in Veterinary Science**, Amsterdã, n.73, p.101-103, 2002.
- PAPAIIOANNOU, D.S. et al. A field study on the effect of dietary use of a clinoptilolite-rich tuff, alone or in combination with certain antimicrobials, on the health status and performance of weaned, growing and finishing pigs. **Research in Veterinary Science**, London, n.76, p.19-29, 2004.
- PHILLIPS, T.D. Dietary clay in chemoprevention of aflatoxin-induced disease. **Toxicological Science**, Britsh, n.52, p.118-126, 1999.
- PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**, Stanford, v.70, p.3964-3967, 1992.
- RAMOS, A.J., HERNANDEZ, E. In situ absorption of aflatoxins in rats small intestine. **Mycopathologia**, Netherlands, v.134, p.27-30, 1996.
- RAVEL, R. **Laboratório clínico – aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara&Koogan, 1997. 616p.
- SANTIN, E. Micotoxicoses. In: JÚNIOR, A.B.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. Cap.6, p.379-387.

- SANTURIO, J.M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.2, n.1, p.1-12, 2000.
- SHOTWELL, O.L. et al. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology**, Michigan, v.14, n.3, p.425-429, 1966.
- SWAMY, H.V.L.N., DEVEGOWDA, G. Ability of mycosorb to counteract aflatoxicosis in commercial broilers. **Indian Journal Poultry Science**, New Delhi, n.33, p.273-278, 1998.
- THOMAS, J.S. Protein electrophoresis. In: FELDMAN, B. F. et al. **Schalm`s veterinary hematology**. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap.135. p.899-903.
- ZAVIERO, D., CONTRERAS, M. Impacto de hongos y micotoxinas em las aves. **Industria Avícola**, Illinois, v.52, n.7, p.899-903, 2005.

Tabela 1 – Composição estimada das dietas basais da fase inicial, crescimento e final de frangos de corte.

Composição química	Fases (dias)		
	Inicial	Crescimento	Final
	1 – 21	22 – 36	36 – 42
Proteína bruta (%)	22,00	20,00	20,00
Energia metabolizável (kcal/kg)	3050	3100	3200
Cálcio (%)	1,00	0,96	0,90
Fósforo útil (%)	0,45	0,45	0,40
Lisina (%)	1,30	1,17	1,10
Metionina (%)	0,56	0,54	0,52
Metionina + Cisteína (%)	0,92	0,89	0,88
Treonina (%)	0,80	0,71	0,71
Triptofano (%)	0,20	0,22	0,22

Tabela 2 – Concentrações séricas de proteínas totais, albumina, alfa globulina 1 (α 1), alfa globulina 2 (α 2), beta-globulina (β) e gama globulina (γ) em frangos de corte alimentados com dietas contendo aflatoxinas e/ou clinoptilolita natural.

Aflatoxinas (ppm)	Clinoptilolita (%)	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	α 1 (g/dL)	α 2 (g/dL)	β (g/dL)	γ (g/dL)
0	0	3,43±0,42 ^a	1,77±0,21 ^a	0,12±0,04 ^{ab}	0,44±0,16 ^a	0,64±0,13 ^a	0,45±0,21
5	0	1,65±0,78 ^b	0,65±0,38 ^b	0,06±0,05 ^b	0,21±0,12 ^c	0,35±0,14 ^c	0,39±0,18
0	0,25	3,36±0,40 ^a	1,75±0,14 ^a	0,16±0,07 ^a	0,37±0,09 ^{ab}	0,55±0,12 ^{ab}	0,53±0,23
5	0,25	1,65±0,88 ^b	0,70±0,50 ^b	0,06±0,05 ^b	0,22±0,11 ^c	0,34±0,14 ^c	0,33±0,15
0	0,5	3,45±0,35 ^a	1,80±0,18 ^a	0,16±0,08 ^a	0,45±0,07 ^a	0,57±0,16 ^{ab}	0,46±0,15
5	0,5	2,01±0,76 ^b	0,82±0,36 ^b	0,08±0,08 ^b	0,25±0,11 ^{bc}	0,42±0,15 ^{bc}	0,44±0,20

Médias, nas colunas, seguidas de letras diferentes, são estatisticamente significativas ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Tabela 3 – Relação albumina/globulina, observada no soro de frangos de corte alimentados com dietas contendo aflatoxinas e/ou clinoptilolita natural.

Aflatoxinas (ppm)	Clinoptilolita (%)	Albumina (g/dL)	Globulinas (g/dL)	Relação A/G
0	0	1,77±0,21 ^a	1,66±0,17 ^a	1,12±0,08 ^a
5	0	0,65±0,38 ^b	1,00±0,19 ^b	0,62±0,05 ^b
0	0,25	1,75±0,14 ^a	1,61±0,09 ^{ac}	1,11±0,03 ^a
5	0,25	0,70±0,50 ^b	0,95±0,17 ^b	0,68±0,09 ^b
0	0,5	1,80±0,18 ^a	1,64±0,05 ^a	1,10±0,02 ^a
5	0,5	0,82±0,36 ^b	1,19±0,19 ^{bc}	0,60±0,03 ^b

Médias, nas colunas, seguidas de letras diferentes, são estatisticamente significativas ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONT, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food additives and contaminants**, Oxford, v.22, n.4, p.379-388, 2005.

AVISITE. **Avisite estatísticas e preços – produção, exportação e disponibilidade interna de carne de frango**. Disponível em:< <http://www.avisite.com.br/economia/prodfran.asp>>. Acesso em: 24 jul. 2006.

AZZAM, A.H.; GABAL, M.A. Aflatoxin and immunity in layer hens. **Avian Pathology**, New York, n.27, p.570-577, 1998.

BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Robe, 2003. 583p.

BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1992. 629p.

BATINA, P.N. et al. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.826-831, 2005.

BAUMGARTER, E.A. et al. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenia, 2004. **Environmental Health Perspectives**, Raleigh, v.113, n.12, p.1779-1783, 2005.

BRADBURN, N.; COKER, R.D. Aflatoxin contamination in maize. **Tropical Science**, London, v.33, n.44, p.418-428, 1993.

BRECK, D.W. **Zeolite molecular sieves**. Nova Iorque: Wiley, 1974. 173p.

BURDITT, S.J. et al. Survey of molds and mycotoxins for their ability to cause feed refusal in chickens. **Poultry Science**, Texas, n.62, p.2187-2191, 1983.

BUSH, B.M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. 376p.

CALDAS, E.D. et al. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, n.36, p.319-323, 2002.

CLARKE, C. Zeolites: take off for the tuff guys. **Industrial Minerals**, Arizona, feb, p.21-32, 1980.

DALE, N. Efeitos da qualidade no valor nutritivo do milho. In: **Conferência apinco 1994 de ciência e tecnologia avícolas**. São Paulo: FACTA, 1994. p.67-72.

DEVEGOWDA, G.; MURTHY, T.N.K. Mycotoxins: their effects in poultry and some practical solutions. In: DIAZ, D.E. **The mycotoxin blue book**. England: Nottingham University Press, 2005. 349p.

DIAZ, D.E.; SMITH, T.K. Micotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralization of mycotoxins. In: DIAZ, D.E. **The mycotoxin blue book**. England: Nottingham University Press, 2005. 349p.

DOERR, J.A. et al. Effects of low levels chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, Texas, n.62, p.1971- 1977, 1983.

FRANCISCATO, C. **Avaliação dos minerais séricos e da função hepática de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxina e submetidos a diferentes concentrações de montmorilonita sódica na dieta**. 2006. 26f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

GARCIA, M.J.D.M. et al. Desenvolvimento de insetos em milho armazenado em sistema vedado. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.67, n.1, p.1-14, 2000.

GIROTTO, A.F.; MIELE, M. Estudos da Embrapa – situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. **Avicultura Industrial**, São Paulo, n.1129, p.1-15, 2004. Disponível em: <[http:// www.aviculturaindustrial.com.br/site/imprimir.asp?ID=12024&tipo_tabela=prod](http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/imprimir.asp?ID=12024&tipo_tabela=prod)>. Acesso em: 28 fev. 2006.

HUWING, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different absorbents. **Toxicology letters**, Amsterdã, v.122, p.170-188, 2001.

KANECO, J.J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: KANECO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. Cap.5, p.117-138.

KESHAVARZ, K. Formulação de rações e manejo de alimentação. **Avicultura Industrial**, São Paulo, v.77, n.926, p.27-31, 1987.

KRABBE, E.L. **Efeito do desenvolvimento fúngico em grãos de milho durante o armazenamento e do uso de ácido propiônico sobre as características nutricionais e o desempenho de frango de corte**. 1995. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

KUBENA, L.F. et al. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poults during aflatoxicosis. **Poultry Science**, Texas, n.70, p.1823-1830, 1991.

KURTZMAN, C.P. et al. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Swofford, n.53, p.147-158, 1987.

LAHTALA, M. Chicken CD4, CD8ab, and CD8aa T cell co-receptor molecules. **Poultry Science**, Texas, n.77, p.1858-1873, 1998.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: [s.n.], 1993. 140p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.

LOPES, D.C. et al. Perda de peso e mudanças na composição química do milho (*Zea mays*. L.) devido ao carunchamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v.17, n.4, p.367-371, 1988.

LUNA, F.; SCHUCHARDT, U. Modificação de zeólitas para uso em catálase. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.6, p.885-892, 2001.

LUZ, A.B. Zeólitas: propriedades e usos industriais. **Série Tecnologia Mineral**, Rio de Janeiro, n.68, p.3-24, 1995.

MARIN, F.P. et al. Aflatoxina B₁, selenio y saccharomyces cerevisiae em la respuesta inmune de polos de engorde em el estado Zulia, Venezuela. **Revista Científica**, Venezuela, v.13, n.5, p.360-370, 2003.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, United Kingdom, v.31, n.1, p.1-16, 1995.

MOON, E.Y. et al. Aflatoxin B₁-induced suppression of nitric oxide production in murine peritoneal macrophages. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, United Kingdom, n.55, A, p.517-530, 1998.

MOSS, M.O. Recente studies of micotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, United Kingdom, v.84, p.62S-76S, 1998.

NORRED, W.P. et al. Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moliniforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Philadelphia, n.38, p.309-328, 1993.

OGUZ, H. et al. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Research in Veterinary Science**, Amsterdã, n.73, p.101-103, 2002.

OMS. Organización panamericana de la salud. Criterios de la salud ambiental. Washington: **Micotoxinas**, n.11, 1983. 131p.

ONSONGO, J. Outbreak of aflatoxin poisoning in Kenya. **EPI/IDS Bulletin**, East African, v.5, p.3-4, 2004.

PAPAIOANNOU, D.S. et al. A field study on the effect of dietary use of a clinoptilolite-rich tuff, alone or in combination with certain antimicrobials, on the health status and performance of

weaned, growing and finishing pigs. **Research in Veterinary Science**, London, n.76, p.19-29, 2004.

PHILLIPS, T.D. Dietary clay in chemoprevention of aflatoxin-induced disease. **Toxicological Science**, Britsh, n.52, p.118-126, 1999.

PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**, Stanford, v.70, p.3964-3967, 1992.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 603p.

QURESHI, M.A. et al. Dietary exposure of broiler breeders to aflatoxin results in immune dysfunction in progeny chicks. **Poultry Science**, Texas, n.77, p.812-819, 1998.

RAMOS, A.J.; HERNANDEZ, E. In situ absorption of aflatoxins in rat small intestine. **Mycopathologia**, Netherlands, v.134, p.27-30, 1996.

RAVEL, R. **Laboratório clínico-aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 616p.

RIEGEL, R.E. **Bioquímica**. 3.ed. São Leopoldo: Editora Unisinos, 2001. 547p.

ROSTAGNO, H.S. Disponibilidade de nutrientes em grãos de má qualidade. In: **Conferência apinco 1993 de ciência e tecnologia avícolas**. Campinas: FACTA, 1993. p.129-139.

SANTIN, E. Micotoxícoses. In: JÚNIOR, A.B.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e micotoxícoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.2, n.1, p.1-12, 2000.

SAWHNEY, D.S. et al. The metabolism of ¹⁴C aflatoxins in laying hens. **Poultry Science**, Texas, n.52, p.1302-1309, 1973.

SCHALM, O.W. et al. **Veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975. 807p.

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

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Editora Insular, 1998. 144p.

SHELDON, R.A. In: GRASSELLI, R.K. et al. **3rd world congress on oxidation catalysis**. Amsterdã: Elsevier, 1997. 403p.

SHOTWELL, O.L. et al. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology**, Michingan, v.14, n.3, p.425-429, 1966.

SHRYOCK, T.R. et al. Effect of bentonite incorporated in a feed ration with tilmicosin in the prevention of induced mycoplasma gallisepticum airsacculitis in broiler chickens. **Avian Diseases**, Georgia, n.38, p.501-505, 1994.

SINHA, K.K.; SINHA, A.K. Effect of Sitophilus oryzae infestation on Aspergillus flavus infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **Journal of Stored Products Research**, United Kingdom, v.27, n.1, p.65-68, 1991.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. USA: Iowa State Press, 2002. 610p.

STRINGHINI, J.H. et al. Efeito da qualidade do milho no desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v.29, n.1, p.191-198, 2000.

SURAI, P.F.; DVORSKA, J.E. Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. In: DIAZ, D.E. **The mycotoxin blue book**. England: Nottingham University Press, 2005. 349p.

SWAMY, H.V.L.N.; DEVEGOWDA, G. Ability of mycosorb to counteract aflatoxicosis in commercial broilers. **Indian Journal Poultry Science**, New Delhi, n.33, p.273-278, 1998.

THOMAS, J.S. Protein electrophoresis. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap. 135. p.899-903.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária uma introdução**. São Paulo: Roca, 2002. 532p.

WYATT, R.D. Formas practicas para diminuir exitosamente las pérdidas por micotoxicosis. **Avicultura Profesional**, Sonora, v.11, n.2, p.64-67, 1993.

ZAVIERO, D.; CONTRERAS, M. Impacto de hongos y micotoxinas em las aves. **Industria Avícola**, Illinois, v.52, n.7, p.899-903, 2005.