

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

**IMPACTO DA AFLATOXINA B₁,
MONTMORILONITA E β-GLUCANA NA
FERMENTAÇÃO RUMINAL *In vitro***

TESE DE DOUTORADO

Marcelo Dal Pozzo

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

**IMPACTO DA AFLATOXINA B₁, MONTMORILONITA E
β-GLUCANA NA FERMENTAÇÃO RUMINAL *In vitro***

Marcelo Dal Pozzo

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Zootecnia.**

Orientador: Prof. Julio Viégas

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dal Pozzo, Marcelo
Impacto da Aflatoxina B1, Montmorilonita e
 β -Glucana na fermentação ruminal In vitro / Marcelo Dal
Pozzo.-2015.
54 p.; 30cm

Orientador: Julio Viégas
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, RS, 2015

1. Micotoxina 2. Ruminantes 3. Adsorventes de
micotoxinas 4. Fermentação ruminal I. Viégas, Julio II.
Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Marcelo Dal Pozzo. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: marcelodalpozzo@yahoo.com.br

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**IMPACTO DA AFLATOXINA B₁, MONTMORILONITA E β-GLUCANA
NA FERMENTAÇÃO RUMINAL *In vitro***

elaborada por
Marcelo Dal Pozzo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Julio Viégas (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Eduardo Bohrer de Azevedo, Dr. (UNIPAMPA)

Deise Dalazen Castagnara, Dra. (UNIPAMPA)

Régis Adriel Zanette, Dr. (UFRGS)

Roberta Farenzena, Dra. (UTFPR)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Julio Viégas e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia que acreditaram na minha capacidade. Obrigado pelos ensinamentos, amizade e pela orientação.

Aos professores Dr. Gilberto Kozloski, Dr. Janio Santurio e ao Dr. Cimélio Bayer que disponibilizaram os laboratórios para execução dos experimentos e análises.

A Dr^a Mirela Noro e a Dr^a Luciana Pötter pela amizade, orientação nas análises estatísticas e conhecimentos. Obrigado pela motivação.

Ao povo brasileiro que por meio da CAPES me apoiou financeiramente por concessão de bolsa no ano de 2011.

A UNIPAMPA/Campus Uruguaiana, por flexibilizar meus horários de trabalho, permitindo meu deslocamento a Santa Maria para execução da pós-graduação.

Aos amigos que fiz no PPGZ. Todas as amigas foram importantes, por conversas de incentivo e compartilhamento de conhecimentos. No entanto, agradeço de forma muito especial os amigos Cristiano Stefanello, Alisson Minozzo, Weiler Cerutti pela ajuda na execução do experimento.

A minha família por compreender o desafio desse estudo. A minha sogra Cléris por desempenhar o papel de mãe. A minha esposa Deise por compreender os momentos difíceis que passamos.

A minha querida mãe Gema, onde estiveres, saibas que eu a amo muito e sou-te eternamente grato por me teres gerado em teu ventre. Obrigado Mãe, pelo dom de minha vida! Obrigado pelos ensinamentos; obrigado por teres existido; obrigado pelos conselhos. Aprendi o suficiente por meio dessas suas frases: “A amizade das pessoas com quem convivemos é o bem mais precioso que podemos ter”; “Respeite o próximo, a vida, busque o entendimento”. Obrigado, sobretudo, ensinou-me a ter FÉ em Deus, e que me passou toda a tua espiritualidade e religiosidade.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições.

A Deus acima de tudo.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

IMPACTO DA AFLATOXINA B₁, MONTMORILONITA E β-GLUCANA NA FERMENTAÇÃO RUMINAL *In vitro*

AUTOR: MARCELO DAL POZZO

ORIENTADOR: JULIO VIÉGAS

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

Foram avaliados os efeitos da aflatoxina B₁ (AFB₁) (1µg/mL) e os adsorventes β-glucanas derivadas de *Saccharomyces cerevisiae* com 65% de princípio ativo (β-glu) (1mg/mL) e montmorilonita (MMT) (5mg/mL) sobre a fermentação ruminal. Foram conduzidos dois ensaios *in vitro*, no primeiro ensaio o propósito foi determinar a produção de ácidos graxos de cadeia curta, a produção de amônia em 24h de incubação. Enquanto no segundo ensaio determinou-se a produção de metano (CH₄) e os parâmetros da cinética da produção de gases (Vf = volume final de gás (ml) no tempo t; L = tempo de colonização; S = taxa de degradação (h⁻¹)) no período de 72h de incubação. Em cada ensaio seis repetições foram realizadas para os seguintes tratamentos: CONT: controle (sem AFB₁ ou adsorventes); AF: AFB₁ (1µg/mL); β-glu (1mg/mL); β-glu + AF: (1mg/mL de β-glu + 1µg/mL de AFB₁); MMT: (5mg/mL); MMT + AF: (5mg/mL de MMT + 1µg/mL de AFB₁). A quantidade produzida de AGCC foi significativamente maior no tratamento β-glu (67,7 mM) em relação aos tratamentos CONT (57,72 mM) e MMT (53,3 mM). A MMT reduziu significativamente a produção de NH₃ (9,6 mM) em relação aos tratamentos CONT (11,4 mM), AF (12,6 mM) e β-glu (12,2 mM). O tratamento β-glu produziu maior volume de gás (103,4 mL) em relação aos tratamentos CONT (89,0 mL) e MMT (91,6 mL). Também o tratamento β-glu teve maior taxa de degradação em relação aos demais tratamentos. A montmorilonita aumentou o tempo de colonização e reduziu a produção de CH₄. Os resultados deste estudo sugerem que a AFB₁ (1µg/mL) não é tóxica a fermentação ruminal. Enquanto, o uso do β-glu impacta a fermentação ruminal, aumentando a produção de AGCC. O uso de montmorilonita pode retardar a colonização bacteriana no alimento porém, não interfere significativamente na quantidade total de AGCC produzidos.

Palavras-chave: Micotoxina. Ruminantes. Adsorventes de micotoxinas. Fermentação ruminal.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

IMPACT OF AFLATOXIN B₁, MONTMORILLONITE AND β-GLUCAN ON RUMINAL FERMENTATION *In vitro*

AUTHOR: Marcelo Dal Pozzo
ADVISER: Dr. Julio Viégas
Santa Maria, February 27th, 2015.

The effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) (1 μg/mL) were evaluated and sorbents β-glucans derived from *Saccharomyces cerevisiae* with 65% of active ingredient (β-glu) (1 mg/mL) and montmorillonite (MMT) (5 mg/mL) under ruminal fermentation. Two *in vitro* assays were conducted. On the first assay the objectives were to determine the production of short chain fatty acids, the production of ammonia during 24-h *in vitro*. While on the second assay the production of methane (CH₄) and kinetic parameters based on gas production date were determined (GP_{max}= maxim gas production in t time; Lag= lag phase before gas production commenced; S= gas production rate (h⁻¹)) during 72-h *in vitro* incubation. In each assay six repetitions were made for the following treatments: CONT: control (without AFB₁ or sorbents); AF: AFB₁ (1 μg/mL); β-glu (1 mg/mL); β-glu + AF: (1 mg/mL of β-glu + 1 μg/mL of AFB₁); MMT: (5 mg/mL); MMT + AF: (5 mg/mL of MMT + 1 μg/mL of AFB₁). The amount of AGCC produced by the β-glu (67,7 mM) treatment was significantly higher about CONT (57,72 mM) and MMT (53,3 mM). treatments. On the other hand, MMT clay reduced the production of NH₃ (9,6 mM) about CONT (11,4 mM), AF (12,6 mM) and β-glu (12,2 mM). The amount of GP_{max} by the β-glu treatment was 103,4 mL, significantly higher about produced CONT (89,0 mL) e MMT (91,6 mL). There was also higher gas production rate by the β-glu treatment. The montmorillonite raised the lag phase and reduced the CH₄ production. The results of this study suggest that AFB₁ (1 μg/mL) has no toxic effect on ruminal fermentation. Whereas the β-glu impacts the ruminal fermentation by increase the AGCC produced. The montmorillonite can delay the bacterial colonization but does't effect the quantity of AGCC produced.

Keywords: Mycotoxin. Ruminant. Mycotoxins adsorbents. Ruminal fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação da aflatoxina B1 catalisada pela enzima mono-oxigenase do complexo citocromo P450 na formação do aduto de DNA.....	19
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais fungos produtores de micotoxinas em alimentos e problemas ocasionados em ruminantes	12
Tabela 2 – Percentagem da umidade relativa (%UR), equilíbrio de umidade (%) para vários grãos e sementes e fungos que podem crescer nessas condições de armazenagem	14
Tabela 3 – Dose de aflatoxina, duração e efeitos clínicos em ruminantes	20
Tabela 4 – Limites máximos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para diferentes micotoxinas em milhos e seus subprodutos	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Fungos e micotoxinas na alimentação de ruminantes	12
2.1.1	Grãos	13
2.1.2	Pastagens e forragem conservada	14
2.2	Aflatoxinas	16
2.2.1	Produção de aflatoxinas em cereais	16
2.2.2	Aflatoxinas: química e metabolismo	17
2.2.3	Excreção da aflatoxina no leite	19
2.2.4	Efeitos tóxicos da aflatoxina nos ruminantes	20
2.2.5	Metabolismo Ruminal das aflatoxinas	21
2.3	Legislação para micotoxinas	22
2.4	Aditivos antimicotoxinas	22
2.4.1	Bentonita	23
2.4.2	Glucanas	24
3	ARTIGO CIENTÍFICO: Impacto da aflatoxina b1, montmorilonita e β-glucana na fermentação ruminal in vitro	27
	RESUMO	27
	ABSTRACT	28
	INTRODUÇÃO	29
	MATERIAL E MÉTODOS	31
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

As enfermidades causadas por micotoxinas são denominadas de micotoxicoses e se caracterizam por síndromes, porém, dependendo da micotoxina, há predomínio de lesões em determinados órgãos, como fígado, rins, ovários, tecido epitelial e Sistema Nervoso Central. Em adição aos efeitos tóxicos, na produção de animais observam-se perdas econômicas devido a recusa de alimentos, baixa conversão alimentar, redução do peso corporal, aumento da incidência de doenças e interferência na capacidade reprodutiva (MOSTROM; JACOBSEN, 2011).

Algumas micotoxinas presentes na alimentação animal podem ser transferidas para produtos como o leite e seus derivados. Diante desse fato, as entidades governamentais regulamentaram limites de micotoxinas na alimentação humana e de animais. As aflatoxinas são as micotoxinas que mais geram perdas econômicas devido à alta prevalência nos alimentos, à alta toxicidade e aos baixos limites tolerados (JOUANY; DIAZ, 2005; ATANDA, 2012).

Para reduzir perdas econômicas na produção animal, por problemas sanitários ou descarte de alimentos contaminados, algumas estratégias para descontaminação de alimentos foram desenvolvidas. Atualmente, a adição de substâncias adsorventes em dietas contaminadas tem sido o método mais prático, econômico e amplamente utilizado na nutrição animal, especialmente na alimentação de suínos e aves (DIAZ; SMITH, 2005). Os ruminantes são considerados mais resistentes que monogástricos a micotoxicoses, a esse fato deve-se a capacidade de microrganismos ruminais na degradação e metabolização de algumas micotoxinas (JOUANY et al., 2009).

Os dados da literatura são divergentes quanto ao impacto das aflatoxinas sobre a fermentação ruminal. Jiang et al., (2012) sugere que o tipo de alimento influencia o impacto das aflatoxinas no processo de fermentação. Entretanto, tanto o trabalho Jiang et al., (2012) quanto os de Feher et al., (1970) e Westlake et al., (1989) utilizaram feno e, nenhum utilizou o milho ou grãos como alimento (substrato) em ensaios *in vitro* de fermentação ruminal. As aflatoxinas são produzidas, principalmente, em alimentos concentrados como os grãos (MOSTROM; JACOBSEN, 2011).

Neste contexto, o presente estudo foi realizado com o objetivo geral: avaliar *in vitro* o impacto da aflatoxina B₁ e dos adsoventes β -glu (65% de β -glucana) e da montmorilonita sobre a fermentação ruminal de uma mistura de feno de azevém e milho moído.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos e micotoxinas na alimentação de ruminantes

Dois terços da energia necessária aos ruminantes são obtidos dos ácidos graxos de cadeia curta, resultam principalmente da digestão microbiana de carboidratos no rúmen. As plantas forrageiras e com propósito para produção de grãos são fontes de carboidratos, e são usadas na alimentação de ruminantes. Estas podem ser fornecidas aos animais por meio do pastoreio ou colhidas para conservação na forma de silagem e feno. Quando utilizado os grãos, estes são colhidos separadamente da parte volumosa e armazenados. No ambiente da lavoura, do processamento e da armazenagem, os fungos produtores de micotoxinas encontram condições adequadas para infectar os alimentos (MOSTRON; JACOBSEN, 2011).

Podendo causar diversos problemas a saúde de ruminantes (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais fungos produtores de micotoxinas em alimentos e problemas ocasionados em ruminantes

Fungos (micotoxina)	Alimento	Sinais clínicos	Lesões
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A.parasiticus</i> (Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2)	milho, amendoim, caroço de algodão, soja e outros.	Desempenho reduzido, imunossupressão, hemorragias, abortos, mortalidade, aumento de enzimas hepáticas (gama glutamiltransferase), aumenta bilirrubina, hemorragias.	Fígado gorduroso, megalocitose, necrose, necrose, fibrose, hiperplasia biliar, hemorragias. 1
<i>Fusarium verticillioides</i> ; <i>proliferatum</i> (Fumonisinias B1 e B2)	Milho nas condições de campo	Reduz ingestão, produção de leite, aumenta enzimas hepáticas, ureia, nitrogênio e creatinina	Leve hepatopatia, nefrose tubular 2
<i>Fusarium graminearum</i> ; <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> (Zearalenona, zearalenol)	Grãos de cereais; espiga de milho; feno.	Hiperestrogenismo; infertilidade	Aumento da genitália 3
<i>Claviceps purpurea</i> ,	Centeio, triticale,	Vasoconstrição com perda de extremidades (orelhas, pés e	Espessamento dos vasos sanguíneos, 4

Fungos (micotoxina)	Alimento	Sinais clínicos	Lesões
<i>C.africana</i> , <i>C.cyperii</i> (Alcaloides do Ergot)	grãos, gramíneas, sorgo,	rabo); necrose de pele; Agalactia; Hipertermia; reduz produção de leite; animais ficam ofegantes.	necrose e descamação.
<i>Claviceps paspali</i> ; <i>Neothyphodium lolii</i> (Toxinas Termogênicas; Paspalitrem A e B; Lolitre B)	Gramíneas <i>Paspalum sp e Lolium perene</i>	Andar cambaleante; tremores e convulsões	5
<i>Pithomyces chartarum</i> (Esporidesmina)	Material morto de plantas; pastagem de <i>B. decumbens</i>	Fotossensibilização; edema de pele e necrose; Em ovinos lesões hepáticas e cistite	6
<i>A.glaucus</i> , <i>A.nidulellus</i> , <i>A.versicolor</i> (Esterigmatocistin a)	Trigo e cereais de inverno.	Carcinomas, diarreias sanguinolenta, queda da produção de leite	Hepáticas 7

R. = Referências; 1 = Osweiler; Trampel, (1985); 2 = Diaz et al., (2000); 3 = Jouany; Diaz, (2005); 4 = Blaney et al., (2010); 5 = Fink-Gremmls, (2005); 6 = Dalefield, (2004); 7 = Vesonder; Horn, (1985) Tabela adaptada de Mostron; Jacobsen, (2011).

2.1.1 Grãos

A maioria das espécies de fungos que causam graves doenças nas plantações crescem dentro da faixa de umidade relativa encontrada no ambiente das plantações. No entanto, algumas espécies de fungos presentes no campo que exigem pouca água, encontram nos armazéns umidade relativa em torno de 65% e condições adequadas para o crescimento. Na armazenagem, o crescimento de fungos é determinado pelo aumento de temperaturas e umidade causado pelo metabolismo fúngico (ATENDA et al., 2012). Em silos de armazenagem de grãos, a umidade pode elevar-se do preconizado (65%) porque os grãos absorvem ou perdem umidade com facilidade, o vapor úmido entre as camadas de ar circula no silo e condensa em pontos mais frios como paredes (MOSTRON; JACOBSEN, 2011). Nesses pontos a umidade eleva-se, os fungos crescem e a temperatura aumenta. O

crescimento de *A.glaucus* e *A. Candidus* é rápida e elevam a temperaturas próximo a 60°C dentro do silo de milho, aumentando ainda mais a umidade relativa em determinados pontos (MOSTRON; JACOBSEN, 2011). Na medida que grãos ganham umidade, fungos específicos crescem (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentagem da umidade relativa (%UR), equilíbrio de umidade (%) para vários grãos e sementes e fungos que podem crescer nessas condições de armazenagem

% UR	Milho, trigo e cevada (%)	Soja, ervilha e feijão (%)	Amendoim, canola e girassol (%)	Fungos
65-70	12,5	12	5	<i>Aspergillus halophilicus</i> , <i>A.restrictus</i>
70-75	14	13	6	<i>A.glaucus</i>
75-80	15	14	7	<i>A.candidus</i>
80-85	16	15	8	<i>A.flavus</i> , <i>Penicillium sp</i>
85-90	18	18	10	Fungos acima + <i>Penicillium</i>
>95	22	20	13	Leveduras/bactérias/fungos de campo

Fonte: Mostron; Jacobsen, 2011

O menor risco de crescimento fúngico na armazenagem de grãos ocorre quando os grãos estão completamente maduros na colheita, livres de danos por fungos das lavouras e da colheita mecânica, quando as lavouras são colhidas sem problemas climáticos como as chuvas (ATENDA et al., 2012). O grão intacto tem uma barreira efetiva contra infecções de fungos na armazenagem. No entanto grãos de milho infectados por fungos da lavoura como *Fusarium*, *Helminthosporium* e *Penicillium*, aumentam os riscos a danos na armazenagem e a produção de micotoxinas (MOSTRON; JACOBSEN, 2011).

2.1.2 Pastagens e forragem conservada

As pastagens são habitat de espécies de fungos causadores de enfermidades aos ruminantes, como *Claviceps purpurea*, responsável pelo ergotismo, *Pithomyces chartarum*,

produz a esporidesmina que causa eczema facial, *Neotuphodium* que causa gangrena seca e *Rhizoctonia* que produz a eslaframina e induz sialorreia nos ruminantes (LE BARS; LE BARS, 1996).

Na confecção de fenos, quando a secagem não é adequada, oferece condições para desenvolvimento de espécies de fungos hidrofílicos e tolerantes ao calor como *A. fumigatus*, espécie produtora de gliotoxina e *Stachybotrys atra*, produtora de satratoxinas G e H que causam estaquibotritotoxicose. Também, fenos e palhas com excesso de umidade (>20%) favorecem o crescimento de fungos altamente toxigênicos como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e, predispõe a produção de micotoxinas como a zearalenona, patulina e AFB₁ (SCUDAMORE; LIVESEY, 1998).

Denomina-se silagem o produto de uma fermentação anaeróbia controlada de determinada forragem verde, armazenada em uma estrutura denominada silo. Os teores de matéria seca (MS) e carboidratos solúveis interferem diretamente no processo fermentativo. Teores de MS entre 30 e 35% e de carboidratos solúveis acima de 6% contribuem para a rápida fermentação láctica e produção de ácidos orgânicos. O milho apresenta excelente condição para ensilagem porque apresenta 20-30% de carboidratos solúveis quando a MS encontra-se em 30-35% (McDONALD et al., 1991). A maioria dos fungos não se desenvolve durante a fase anaeróbica da ensilagem devido à baixa tolerância ao ambiente ácido e sem oxigênio (McDONALD et al., 1991). A presença de ar no material ensilado pode ser decorrente da dificuldade no processo de compactação ou perfurações na lona do silo (MOSTRON; JACOBS, 2011).

Um estudo no Brasil, até então inédito, conduzido por Schmidt et al., (2011) encontraram aflatoxinas em 3 de 327 amostras de silagem de milho. As contaminações apresentavam níveis inferiores a 4 ppb. Esses resultados indicam que silagens de milho podem ser consideradas de pouca relevância para a introdução de aflatoxinas na dieta de bovinos. A esse fato se deve à baixa tolerância do fungo *Aspergillus* a condições anaeróbicas e a ambientes ácidos (NOVINSKI, 2013). No entanto, em silagens produzidas e armazenadas de maneira precária sua concentração pode alcançar níveis de 87 ppb de aflatoxinas (CAVALLARIN et al., 2004).

2.2 Aflatoxinas

A palavra “aflatoxina” é a combinação de 3 palavras, “a” de *Aspergillus*, “fla” da espécie *flavus* e toxina que significa veneno (BAKIRDERE, 2012). Entretanto, as espécies *A. parasiticus* e *A. nomius* também produzem aflatoxinas (MOSS, 1998). As aflatoxinas de maior importância são denominadas de B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂), classifica-se com base na fluorescência delas sob luz ultravioleta e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada. A AFB₁ é considerada a mais tóxica e com maior poder carcinogênico das micotoxinas (IARC, 2012). A aflatoxina B1 através do sistema enzimático microsomal do fígado sofre “ativação metabólica” por quatro formas: 1) epoxidação, forma AFB₁ epóxido da aflatoxina e faz ligações covalentes com o DNA que provoca efeitos mutagênico, carcinogênico e teratogênico; 2) hidratação, forma AFB_{2a} que provoca inibição enzimática e causa imunossupressão, redução de síntese proteica e inibe fatores de coagulação sanguínea; 3) hidroxilação, produz AFM₁ e AFQ₁ que são eliminados via ovos e leite respectivamente e 4) o-dimetilação, que na forma de AFP₁ é excretado pela urina e fezes (IARC, 2012).

2.2.1 Produção de aflatoxinas em cereais

Aspergillus produtores de aflatoxinas são encontrados em todas as regiões do mundo, porém, ocorrem mais comumente nas regiões de clima quente, tropical e subtropical. Os fungos produtores de aflatoxinas, ocasionalmente, podem apodrecer espigas. Na lavoura de milho, a disseminação de esporos do fungo é favorecida em períodos de estiagens e ventos após emergência de estigmas-estilos “(cabelos)”. No entanto, a disseminação é maior durante e após a colheita. Após a infecção, o fungo inicia a colonização do grão sempre que a umidade e a temperatura favorecerem o seu desenvolvimento (Tabela 2).

As aflatoxinas são produzidas pelo metabolismo secundário dos fungos, o metabolismo primário está associado ao crescimento no substrato. A produção resulta da tripla combinação, ou seja, do fungo, do substrato e do meio ambiente (PITT; HOCKING, 1997). O milho e o amendoim são substratos adequados para o crescimento de fungos, o cultivo em condições ambientais favoráveis, a colheita e a armazenagem favorecem o

desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas (MOSS, 1998). O grão de soja apresenta lipoxigenases que inibem o crescimento da maioria das espécies de fungos toxigênicos (DOEHLERT et al., 1993). De acordo com Diener; Davis (1987) a produção de aflatoxina em cereais ocorre quando grãos apresentam 25% de umidade interna, umidade relativa do ar de 83 a 88% e temperatura de 30°C. Ribeiro et al., (2006) observaram aumento na produção de aflatoxina com o acréscimo da umidade relativa para 99%.

Os fungos *Aspergillus* produzem aflatoxinas em condições estressantes como frio, falta d'água e agressão externa causada por fungicidas. Os bolores podem ser parcialmente controlados nos grãos com uso de fungicidas, mas pode estimular a produção de toxinas (NICHOLSON et al., 2003). Também tem sido sugerido que subdoses de fungicidas podem causar a emergência de micotoxinas (PARKIN et al., 2006).

2.2.2 Aflatoxinas: química e metabolismo

As aflatoxinas são quimicamente classificadas como bisfuranocumarinas. A rota metabólica parcial proposta para síntese de AFB₁ é: acetato>ácido norsolorínico>averantina>averufanina>versiconal hemiacetal acetato>versicolorina A>esterigmatocistina>O-metilesterigmatocistina>AFB₁ (MOSTRON et al., 2011). A série G das aflatoxinas diferem quimicamente da B pela presença de um anel 3-lactona no lugar do anel ciclopentona. Uma dupla ligação 8, 9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas aflatoxinas B₁ e G₁ e não nas B₂ e G₂. Essas variações diferem as aflatoxinas estruturalmente e estão associadas também as suas atividades, sendo AFB₁ e AFG₁ mais carcinogênicas e consideravelmente mais tóxicas que AFB₂ e AFG₂ (JAIMEZ et al., 2000).

As aflatoxinas são compostos de natureza cristalina, baixo peso molecular, termoestáveis (suportam temperaturas superiores a 220°C), solúveis em soluções moderadamente polares como metanol e clorofórmio (MOSS, 1996). São destruídas totalmente na presença de soluções fortemente alcalinas, como a amônia e o hipoclorito (DIAZ; SMITH, 2005).

Os componentes lipofílicos das aflatoxinas facilitam a absorção no trato gastrointestinal. A absorção pode ocorrer ainda na boca ou esôfago, antes de entrar no rúmen (GALLO et al., 2008). As aflatoxinas são absorvidas do trato intestinal e passam para circulação porta-hepático. Os animais jovens absorvem aflatoxinas de forma mais eficiente

que animais adultos. As aflatoxinas podem ser degradadas no rúmen (UPADHAYA et al., 2009). A aflatoxina B₁ pode ligar-se reversivelmente à albumina, liberando-se da circulação para tecidos, mas não sendo acumulada nos mesmos, no entanto repetidas exposições podem produzir efeitos tóxicos. As aflatoxinas podem passar para a placenta e causar danos ao feto. A aflatoxina é eliminada por meio da bile, fezes, urina, no leite e ovos. Na maioria das espécies animais a toxina é totalmente eliminada 24 horas após a exposição (MEERDINK et al., 2004).

No fígado, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é metabolizada em aflatoxina-8,9-epóxido pela enzima citocromo P-450. A enzima glutatona S-transferase (GST) pode detoxificar a forma 8,9-epóxido por meio da ligação com glutatona, fazendo os adutos solúveis e hábeis de serem eliminados pela urina. Porém, existe uma grande variação da atividade de GST entre as espécies animais e humanos. Em humanos a atividade de GST é menor que em camundongos e ratos, indicando que humanos são mais susceptíveis a intoxicação por AFB₁ (GALTIER, 1998).

Quando não eliminado, o composto 8,9-epóxido é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente através de ligações covalentes com sítios nucleofílicos de macromoléculas como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas (LIN et al., 2006). Estas ligações determinam a formação de adutos (Figura 1), os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas (TONG et al., 2006). A formação de adutos ocorre através da ligação das AFB₁ com guaninas da molécula de DNA, na posição N7, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53 (TONG et al., 2006). A ocorrência deste tipo de alteração é característica de vários carcinomas humanos, sobretudo o hepático (TONG et al., 2006; CALONI et al., 2006).

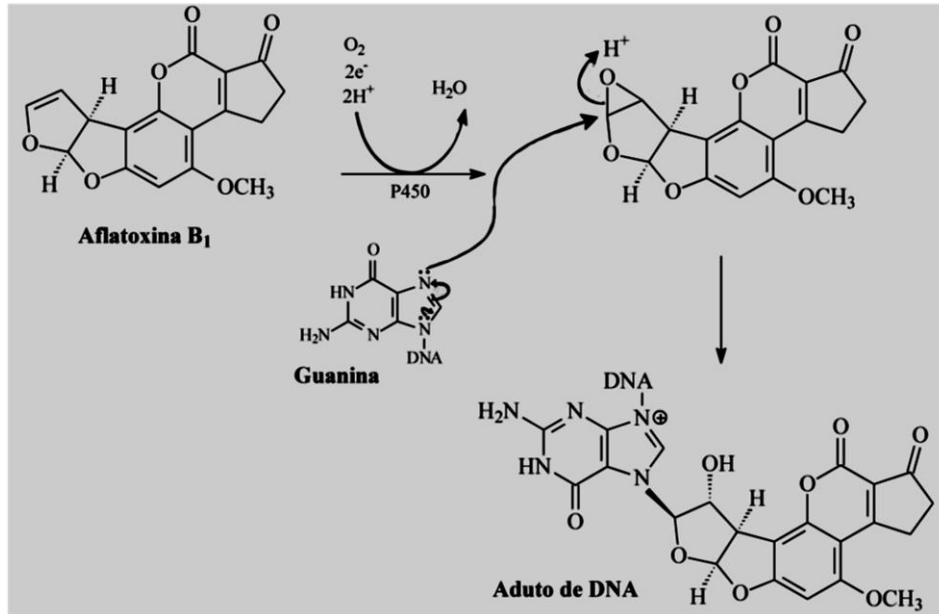


Figura 1 – Reação da aflatoxina B1 catalisada pela enzima mono-oxigenase do complexo citocromo P450 na formação do aduto de DNA

Fonte: Jardim; Caldas, (2009).

2.2.3 Excreção da aflatoxina no leite

A aflatoxina M1 (AFM1) é o principal produto excretado, na urina e no leite pode ser monitorado pela exposição. A AFB1 apresenta a maior taxa de transferência para o leite entre as micotoxinas (SPAHR et al., 2000). A transferência da toxina do sangue para o leite pode envolver a difusão passiva pela membrana celular ou transporte ativo. Em cabras, no meio do período de lactação, fornecendo uma única dose oral de 0,8 mg de AFB1/animal, teve detecção no leite 1h após a administração. O pico de concentração de AFM1 no leite ocorreu 3-6 horas após exposição e concentrações menores que o limite máximo (50ng/L ou 0,05 ppb) permitido na União Europeia ocorreram 36h após administração de AFB1 (MAZZETTE et al., 2009). Alguns estudos apresentam que a AFM1 desaparece 4 dias após a remoção da AFB1 da dieta.

A taxa de transferência para o leite pode variar, é fortemente influenciada por fatores como dieta e status de saúde do animal, especialmente de atividades enzimáticas no fígado. Utilizando dados publicados desde 1985 (10 observações coletadas de 5 experimentos), Petterson, (1998) citado por Mostron; Jacobsen, (2012) propôs a seguinte equação ($r^2= 0,915$) para estimar a transferência de AFM1 para o leite:

$$AFM1 \text{ (ng/kg de leite)} = 10,95 + 0,787 \times (\mu\text{g de AFB1 ingerida/dia}).$$

2.2.4 Efeitos tóxicos da aflatoxina nos ruminantes

Estudos que contemplaram o uso de aflatoxinas em ruminantes estão apresentados na Tabela 3, são estudos experimentais de intoxicações. A aflatoxicose crônica em bovinos está associada a sinais clínicos como redução de apetite e eficiência alimentar, queda na produção de leite e icterícia. O indicador mais sensível de aflatoxicose é o comprometimento da performance, a causa pela qual é multifatorial, envolve interações nutricionais, anorexia, alterações no metabolismo hepático de proteínas e lipídios e compromete o metabolismo hormonal (RAISBECK et al., 1991).

Tabela 3 – Dose de aflatoxina, duração e efeitos clínicos em ruminantes

Peso/animal	Dose (ppb)	dias	Descrição	Ref
189/novilhos	300	133	Alterou enzimas hepáticas	
184/novilhos	700	133	Reduziu ganho de peso e eficiência alimentar; aumento e fibrose hepática.	1
197/novilhos	1000	133	duziu ganho de peso e eficiência alimentar; morte aos 59 e 7 dias; aumento e fibrose hepática.	
183/novilhos	<456	123	Nenhum efeito no ganho de peso e imunidade (linfoblastogênese e produção de anticorpos) com uma tendência de retardar a hipersensibilidade cutânea.	2
27/cordeiros	2000	37	Reduziu ganho de peso (g) diário (79±39) vs controle (125±35). A atividade bacteriostática do soro foi reduzida; houve aumento de imunoglobulina G; leucograma normal; não alterou quantidade de leucócitos.	3
15/cordeiros	2500	21	Reduziu ganho de peso, tamanho de fígado; reduziu peso dos rins; moderada vacuolização de gordura no fígado; Aumento de gama-glutamil transferase; redução de ureia sanguínea e atividade fosfatase alcalina.	4

Ref = Referências; 1 = Keyl; Booth, (1971); 2 = Richard et al., (1983); 3 = Fernández et al., (2000); 4 = Fernández et al., (1996).

No estudo conduzido por Keyl; Booth, (1971) observaram redução no ganho de peso em novilhos, para 700 e 1000 ppb de aflatoxina no alimento foram observados ganhos diários

de 800g e 860g, portanto, menor do controle 1.139g. Também a eficiência alimentar foi reduzida, quando alimentados com 700 e 1000 ppb foram observadas 0,155 e 0,152 kg, respectivamente, de peso vivo para cada quilograma de alimento ingerido. Nesse trabalho não foi observado redução no desempenho quando animais receberam 300 ppb porque, conforme relatada pelos autores, as lesões hepáticas foram menores. Também Richard et al., (1983) não observaram efeito de redução no ganho de peso quando alimentaram novilhos com alimentos contaminados em concentrações menores de 456 ppb de aflatoxina.

Os efeitos em cordeiros foram estudados por Lewis et al., (1967) num período de cinco anos, alimentados com 1000 e 1750 ppb no concentrado. Nesse trabalho foram observados demora no crescimento, redução de fertilidade, desenvolvimento de carcinoma no fígado e tumores na região nasal. Hall et al., (1989) relataram a morte de uma vaca que pastejou uma lavoura de milho doce contaminada com 2300 ppb de aflatoxina. De acordo com Cook et al., (1986) a intoxicação aguda foi induzida em bovinos com 0,2 – 0,8 mg/kg de peso corporal.

2.2.5 Metabolismo Ruminal das aflatoxinas

A aflatoxina B₁ pode ser hidroxilada e metabolizada em aflatoxicol no rúmen, uma molécula tóxica como a original (AUERBACH et al., 1998). Estudos *in vitro* demonstraram resultados divergentes quanto à capacidade de degradação de micotoxinas pelo fluido ruminal. Kiessling et al., (1984) não observaram nenhuma degradação de AFB₁ em um período de 3 horas de incubação. Ainda nesse sentido, Westlake et al., (1987) observaram que cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* não degradaram AFB₁ nas 24h de incubação. Upadhaya et al., (2009) observaram em 3 horas de incubação, a degradação de 20 a 25% da AFB₁ quando o líquido ruminal era oriundo de cabras e de 10 a 14% no caso de bovinos. Os autores relam a hipótese de que há diferenças entre os ecossistemas ruminais dos ruminantes de diferentes espécies. Jiang et al., (2012) observaram degradação superior à 80% após 72 horas de incubação. Mathur et al., (1976) consideraram a AFB₁ tóxica para bactérias no rúmen quando observaram uma redução na densidade e alterações na morfologia de *Streptococcus bovis*. Porém, Westlake et al., (1989) observaram redução da digestão do feno de alfafa quando AFB₁ (1 e 10 ppb) foi adicionada no meio de incubação com líquido ruminal.

2.3 Legislação para micotoxinas

Aproximadamente 45 países apresentam regulamentações para limites máximos de contaminação por micotoxinas nos alimentos. No Brasil, a legislação mais recente em alimentos é a RDC 07/2011 (ANVISA, 2011), que estabelece os limites máximos para aflatoxinas (B1+B2+ G1+G2 e M1), ocratoxina A, deoxinivalenol, fumonisina (B1+B2) e zearalenona em alimentos prontos para o consumo ou matérias-primas (Tabela 4). Estes limites devem ser atendidos nos mais diferentes níveis de produção até o ano de 2016. Essa legislação permite até 0,5ppb de AFM1 no leite.

Existem diferenças significativas nas concentrações autorizadas nos diferentes países. Nos Estados Unidos, o FDA americano (*Food and Drug Administration*) estabelece níveis de segurança por categoria de animais ruminantes. Por exemplo, para gado leiteiro o limite de aflatoxinas é de 20ppb e demais ruminantes é 300ppb. Para a alimentação humana o limite é 20ppb, exceto no leite que se permite até 0,5ppb de AFM1. Enquanto na União Europeia, esses limites são 6 a 10 vezes menores (JOUANY et al., 2009).

Tabela 4 – Limites máximos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para diferentes micotoxinas em milhos e seus subprodutos

Micotoxina	Quantidade de micotoxina (ppb)
Aflatoxinas	20
Deoxinivalenol	3000
Fumonisina	5000
Zearalenona	400

Fonte: ANVISA, (2011).

2.4 Aditivos antimicotoxinas

A inclusão de adsorventes na ração é uma estratégia para reduzir a exposição do animal às micotoxinas. Os adsorventes apresentam capacidade de se ligar às micotoxinas em sítios específicos nas estruturas internas ou de superfície. Phillips et al., (1988) conduziram o primeiro estudo de adsorvente no meio entérico, observaram que a montimorilonita protegeu

as aves dos efeitos tóxicos da aflatoxina. Smith et al., (1994) e Diaz et al., (2004) observaram redução da aflatoxina M₁ no leite produzido por vacas e cabras alimentadas com adsorvente. De acordo com Phillips (1988) e Diaz et al., (2004), adsorventes são substâncias que atuam como esponjas químicas, adsorvem as micotoxinas no trato gastrintestinal e pelas fezes são eliminados, reduzem a absorção sanguínea e subsequente distribuição aos órgãos-alvos.

Desde a descoberta das micotoxicoses por volta dos anos 60, pesquisadores têm desenvolvido técnicas com intuito de reduzir os efeitos destes inevitáveis contaminantes nos alimentos. Diversas medidas para descontaminar alimentos têm sido adotadas. Essas medidas incluem inibição fungica, fermentação, separação física, tratamento térmico (torrefação), irradiação, amonização, ozonização e uso de adsorventes. Nenhum método está livre de desvantagens, incluindo custos, larga escala de uso e apenas sucesso parcial (DIAZ; SMITH, 2005).

De acordo com o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal (MAPA, 2004), os adsorventes são substâncias capazes de fixar moléculas, estando classificados no grupo de aditivos tecnológicos. Segundo Avantaggiato et al., (2005), a Comunidade Europeia preconiza a utilização de adsorventes. Nenhum produto em potencial como aluminossilicatos, carvão ativado, bentonita, leveduras e glucomanas está licenciado pelo Food Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América, esses produtos são comercializados como antiaglutinantes (MOSTROM et al., 2011).

Avantaggiato et al., (2005) afirmam que a eficácia da adsorção depende da estrutura química de ambos, adsorvente e micotoxina. Estes autores ressaltam que o fator mais importante da adsorção é a estrutura física do adsorvente, ou seja, carga elétrica total e sua distribuição, tamanho dos poros na molécula e área de superfície. De outro lado, as propriedades da molécula das micotoxinas, como polaridade, solubilidade, forma e distribuição das cargas elétricas também constituem fatores importantes da adsorção. A montmorilonita e o β -glucano são eficientes adsorventes das aflatoxinas, e são incluídos em baixas quantidades em rações (DIAZ et al., 2004).

2.4.1 Bentonita

A fórmula química geral da montmorilonita é dada pela $M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}-(OH)_4$. Os tamanhos de suas partículas variam de 2 μ m a tamanhos bastante pequenos como 0,1 μ m

em diâmetro, com tamanho médio de 0,5 μm e formato de placas ou lâminas, pertence ao grupo dos filossilicatos cujas placas são caracterizadas por estruturas constituídas por duas folhas tetraédricas de sílica com uma folha central octaédrica de alumina, que são unidas entre si por átomos de oxigênio comuns a ambas as folhas (PAIVA et al., 2007).

As placas da montmorilonita apresentam perfil irregular, são muito finas, tem tendência a se agregarem no processo de secagem, e apresentam boa capacidade de delaminação quando colocada em contato com a água (PAIVA et al., 2007). O empilhamento dessas placas é regido por forças polares relativamente fracas e por forças de van der Waals, e entre essas placas existem lacunas denominadas de galerias ou camadas intermediárias ou interlamelares nas quais residem cátions trocáveis como Na^+ , Ca^{2+} , Li^+ , fixos eletrostaticamente e com a função de compensar cargas negativas geradas por substituições isomórficas que ocorrem no reticulado, como por exemplo, Al^{3+} por Mg^{2+} ou Fe^{2+} , ou Mg^{2+} por Li^+ (PAIVA et al., 2007).

A montmorilonita adsorve AFB_1 através de ligações iônicas de sódio ou cálcio que estão ligando as camadas destes filossilicatos (DESHENG et al., 2005). Sua capacidade de adsorver AFB_1 foi verificada por Desheng et al., (2005), encontraram que a quantidade máxima de adsorção em solução aquosa a pH 2 e 8 foi de 613,5 μg (80%) e 628,9 μg (90%) de AFB_1/g de montmorilonita, respectivamente. Spotti et al., (2005) verificaram que 100% da AFB_1 foi adsorvida em um experimento *in vitro* com líquido ruminal, nesse incluíram AFB_1 (200 ng/ml) e também bentonita (25 mg/ml).

2.4.2 Glucanas

As glucanas, utilizadas como adsorventes de micotoxinas, são derivadas principalmente da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em frangos de corte e suínos jovens, onde o consumo alimentar pode limitar o desempenho econômico, é importante que aditivos alimentares não nutritivos ocupem um pequeno espaço na dieta. Nesse sentido, a alta afinidade pela toxina e a capacidade de adsorção das glucanas permite utilizá-las em baixas concentrações (< 0,1% na dieta), causando mínimo impacto na densidade da dieta (DIAZ; SMITH, 2005).

A parede celular das leveduras consiste principalmente de proteínas e polissacarídeos. Os dois principais açúcares, glicose e manose, estão presentes em concentrações iguais. A

superfície externa da molécula é composta de uma mistura de manose-proteína, já a sua superfície interna contém glucanas com ligações β -(1,3), principalmente, e algumas ligações β -(1,6). Os polissacarídeos, proteínas e lipídeos presentes na parede exibem numerosos mecanismos de adsorção assim como, ligações de hidrogênio, ligações iônicas ou interações hidrofóbicas (YIANNIKOURIS et al., 2003).

Segundo Banlunara et al., (2005) as glucanas esterificadas apresentam uma área de superfície de 22.000 m²/ Kg, apresentando grande número de poros de diferentes tamanhos que podem se ligar a uma ampla variedade de substâncias. As glucanas têm considerável habilidade de ligação com várias micotoxinas, sendo eficazes em baixos níveis de inclusão (ARAVIND et al., 2003).

As pesquisas iniciais com a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* foram realizadas por Stanley et al., (1993). A partir desse trabalho, várias pesquisas com parede celular íntegra permitiram a identificação dos componentes específicos da parede da levedura responsáveis pela interação com as micotoxinas. A modificação nas técnicas de processamento tem permitido a produção de parede celular específica e modificada com habilidade para adsorver diferentes micotoxinas (DAWSON et al., 2001 apud DIAZ; SMITH, 2005).

Estudos “in vitro” têm permitido caracterizar as interações entre os adsorventes derivados da parede celular de leveduras e a micotoxina específica. Diluições em série de aflatoxina adsorvidas a glucomananas de levedura claramente demonstraram que a adsorção da micotoxina é um processo concentração-dependente-reversível e que as aflatoxinas não são modificadas durante o processo de adsorção (DAWSON et al., 2001 apud DIAZ; SMITH, 2005).

Segundo Diaz; Smith (2005), a adsorção de aflatoxina é influenciada pelo pH no ambiente aquoso, sendo que a adsorção máxima ocorre a pH de aproximadamente 4.0. Além do pH, as concentrações de fosfato também exercem influência no mecanismo de ligação. Assim, pH e concentração ótima de fosfato, fatores consistentes com as condições fisiológicas do trato gastrintestinal, indicam que o ambiente no intestino favorece a adsorção, não impedindo as interações com o adsorvente.

Os estudos de equilíbrio entre a ligação de β -glucana e toxina livre revelaram que ocorrem dois tipos de interações químicas, identificadas como ligações químicas fracas, assim como, ligações de hidrogênio e de van der Waals. Já, estudos de ressonância nuclear magnética e de modelagem molecular mostraram que os grupos hidroxil da molécula de ZEA

estão envolvidos nestas interações e que há complementariedade geométrica entre ZEA e a hélice simples das $\beta(1,3)$ D-glucanas (YIANNIKOURIS et al., 2003).

Alguns pesquisadores têm desenvolvido testes “in vitro” para avaliar a capacidade de adsorção das glucanas a diferentes micotoxinas obtendo resultados promissores. Diaz et al., (2002) testando diferentes agentes adsorventes de AFB₁, encontraram que glucomanana esterificada podia ligar em torno de 97% da AFB₁, sugerindo desta maneira, o seu provável potencial para adsorver AFB₁ “in vivo”. Da mesma forma, Freimund et al., (2003) avaliando a capacidade de adsorção de uma $\beta(1,3)$ - D-glucana modificada, a ZEA e T-2, observaram que o composto modificado com hexadeciltrimetilamônio apresentou excelente capacidade em adsorver ZEA (183 mg/g). Embora tenha adsorvido T-2 de forma menos eficiente, os autores sugerem que esta glucana modificada constitui-se num promissor agente adsorvente para esta micotoxina.

3 ARTIGO CIENTÍFICO: Impacto da aflatoxina b₁, montmorilonita e β-glucana na fermentação ruminal *in vitro*

Impacto da aflatoxina b₁, montmorilonita e β-glucana na fermentação ruminal *In vitro*¹

Impact of aflatoxin b₁, montmorillonite and β-glucan on ruminal fermentation *In vitro*

Marcelo Dal² Pozzo; Julio Viégas².

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da aflatoxina B₁ (AFB₁) e dos adsorventes montmorilonita (MMT) e β-glucanas (β-glu) sobre a fermentação ruminal *in vitro*. Foram conduzidos dois ensaios sob delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos, CONT: controle (sem AFB₁ ou adsorventes); AF: AFB₁ (1 μg/mL); β-glu (1 mg/mL); β-glu + AF: (1 mg/mL de β-glu + 1 μg/mL de AFB₁); MMT: (5 mg/mL); MMT + AF: (5 mg/mL de MMT + 1 μg/mL de AFB₁), com seis repetições por tratamento. No primeiro ensaio determinou-se a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), a produção de amônia (NH₃) em 24h de incubação. No segundo ensaio, em 72h de incubação determinou-se a produção de metano (CH₄) e os parâmetros da cinética da produção de gás: (GP_{max}= máxima produção de gás no tempo t; Lag= fase lag que ocorre antes da máxima colonização); S=taxa da produção de gás (h⁻¹) durante 72-h de incubação *in vitro*. A quantidade produzida de AGCC foi significativamente maior no tratamento β-glu (67,7 mM) em relação aos tratamentos CONT (57,72 mM) e MMT (53,3 mM). A MMT reduziu significativamente a produção de NH₃ (9,6 mM) em relação aos tratamentos CONT (11,4 mM), AF (12,6 mM) e β-glu (12,2 mM). O tratamento β-glu

¹ Artigo nas normas da Revista Ciência Rural da UFSM.

² Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Zootecnia, Campus Universitário, prédio 78, CEP 97105-900, Santa Maria, RS. E-mail: marcelodalpozzo@gmail.com, viegas100@yahoo.com.br.

1 produziu maior volume de gás (103, 4 mL) em relação aos tratamentos CONT (89,0 mL) e
2 MMT (91,6 mL). Também o tratamento β -glu teve maior taxa de degradação em relação aos
3 demais tratamentos. A montmorilonita aumentou o tempo de colonização e reduziu a
4 produção de CH_4 . Os resultados sugerem que a AFB_1 não reduz a quantidade de AGCC.
5 Enquanto, o uso do β -glu impacta a fermentação ruminal, aumentando a produção de AGCC.
6 O uso de montmorilonita pode retardar a colonização bacteriana no alimento porém, não
7 interfere significativamente na quantidade total de AGCC produzidos.

8

9 **Palavras-chave:** Micotoxina. Ruminantes. Adsorventes de micotoxinas. *In vitro* gás.

10

11 **ABSTRACT**

12 Aimed to evaluate the effects of aflatoxin B₁ (AFB_1) and sorbents montmorilonite (MMT)
13 and β -glucans (β -glu) under ruminal fermentation *in vitro*. Two *in vitro* assays were
14 conducted under statistical completely randomized design with six treatments CONT: control
15 (without AFB_1 or sorbents); AF: AFB_1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); β -glu (1 mg/mL); β -glu + AF: (1 mg/mL of
16 β -glu + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of AFB_1); MMT: (5 mg/mL); MMT + AF: (5 mg/mL of MMT + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of
17 AFB_1) with six replications per treatment. On the first assay the objectives were to determine
18 the production of short chain fatty acids (AGCC), the production of ammonia during 24-h *in*
19 *vitro*. While on the second assay the production of methane (CH_4) and kinetic parameters
20 based on gas production date were determined: (GPmax= maxim gas production in t time;
21 Lag= lag phase before gas production commenced; S=gas production rate (h^{-1})) during 72-h *in*
22 *vitro* incubation. The amount of AGCC produced by the β -glu (67,7 mM) treatment was
23 significantly higher about CONT (57,72 mM) and MMT (53,3 mM). treatments. On the other
24 hand, MMT clay reduced the production of NH_3 (9,6 mM) about CONT (11,4 mM), AF (12,6
25 mM) and β -glu (12,2 mM). The amount of GPmax by the β -glu treatment was 103,4 mL,

1 significantly higher about produced CONT (89,0 mL) e MMT (91,6 mL). There was also
2 higher gas production rate by the β -glu treatment. The montmorilonite raised the lag phase
3 and reduced the CH₄ production. The results of this study suggest that AFB₁ (1 μ g/mL) has no
4 toxic effect on ruminal fermentation. Whereas the β -glu impacts the ruminal fermentation by
5 increase the AGCC produced. The montmorilonite can delay the bacterial colonization but
6 does't effect the quantity of AGCC produced.

7

8 **Key Words:** Mycotoxin. Ruminant. Mycotoxins adsorbents. Ruminal fermentation.

9

10 **INTRODUÇÃO**

11 As aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) são metabólitos produzidos por linhagens de
12 *Aspergillus*, fungos que se desenvolvem especialmente em grãos de cereais. Nos animais, o
13 poder toxigênico da aflatoxina B₁ (AFB₁) é o maior entre as aflatoxinas. Após absorvidas,
14 sofrem metabolização no fígado e são excretadas via urina, fezes e leite. Por isso, o fígado é o
15 órgão mais afetado pelos efeitos tóxicos. Os animais sofrem perdas com a intoxicação aguda
16 ou crônica, ou com efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. O metabólito
17 aflatoxina M₁, eliminado no leite, pode oferecer riscos à saúde de seus consumidores. No
18 leite, esse resíduo pode atingir valores superiores a 0,5 μ g/L, limite máximo permitido pela
19 legislação brasileira (ANVISA, 2011).

20 Para amenizar os prejuízos ocasionados pelas aflatoxinas podem ser utilizados os
21 adsorventes, são substâncias capazes de fixar moléculas ou íons por meio de interações
22 químicas e físicas. A montmorilonita (MMT) e componentes da parede celular de
23 *Saccharomyces cerevisiae* apresentam boa capacidade de adsorver micotoxinas. Um dos
24 componentes da parede celular de *S.cerevisiae* são polissacarídeos denominados de beta
25 glucanas (β -glu). As ligações β (1-3 e 1-6) e a estruturação tridimensional em forma de hélice,

1 habilitam esse polissacarídeo a adsorver micotoxinas de forma eficiente. As interações entre
2 AFB₁ e β -glu ocorrem por meio de ligações de hidrogênio e através de pontes de van der
3 Waals (YANNIKOURIS et al. 2006). A MMT adsorve AFB₁ através de ligações iônicas de
4 sódio ou cálcio que estão ligando as camadas destes filossilicatos (DESHENG et al. 2005).

5 A MMT apresentou capacidade de adsorver 90% de AFB₁ em meio aquoso
6 (DESHENG et al. 2005). Já as β -glucanas adsorveram até 94,8% de AFB₁ (YANNIKOURIS
7 et al. 2006). Para esse estudo, esses dois adsorventes foram escolhidos pela aplicabilidade em
8 adsorver micotoxinas da dieta e reduzir a absorção no trato gastrointestinal do animal.

9 Os alimentos utilizados nas dietas de ruminantes os predispõe a contaminação com
10 aflatoxinas, principalmente quando alimentos concentrados são incluídos nas dietas. Estes
11 animais são considerados menos sensíveis aos efeitos tóxicos da aflatoxina do que
12 monogástricos porque, de forma parcial no rúmen, as aflatoxinas sofrem a ação da microbiota
13 ali presente e o potencial toxigênico sofre redução (JIANG et al. 2012). Por esse fato, gerentes
14 e nutricionistas de fábricas de ração, normalmente, decidem destinar alimentos mais
15 contaminados a essas espécies e os alimentos menos contaminados para monogástricos.
16 Também, há regulamentos que permitem fornecer dietas com nível de contaminação (até 300
17 ppb) para ruminantes destinados ao abate, enquanto para monogástricos e gado leiteiro o
18 limite máximo é 20 ppb (FDA, 2014).

19 A ação antimicrobiana das micotoxinas no ecossistema ruminal ainda é pouco
20 conhecida. Outro fato importante a esse tema é relatado por JIANG et al. (2012) que,
21 sugeriram um impacto menos negativo das aflatoxinas na fermentação ruminal de alimentos
22 mais concentrados do que volumosos. Entretanto, na literatura, foram observados que os
23 principais trabalhos apresentam investigações *in vitro* usando apenas alimentos volumosos
24 com feno de uma forrageira, sem resultados para uso de grãos de cereais, que são largamente
25 utilizados na alimentação de ruminantes. Entre estes estudos, o estudo de FEHR et al. (1970)

1 observaram que a quantidade de AGCC resultante da fermentação ruminal *in vitro* foi
2 reduzida na dose de 0,5µg/mL de aflatoxinas. Enquanto, WESTLAKE et al., (1989)
3 observaram que AFB₁ (1µg/mL e 10µg/mL) inibiu em mais de 50% a digestão do feno de
4 alfafa. No estudo com novilhas, Cook et al. (1986) observaram que a motilidade ruminal,
5 incluindo amplitude e frequência de contrações, foram reduzidas após administração de 200 e
6 800 µg de AFB₁ por Kg de dieta. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o impacto
7 da AFB₁, MMT e β-glu na fermentação ruminal *in vitro*.

8

9 MATERIAL E MÉTODOS

10 Em dois ensaios de digestibilidade *in vitro*, o experimento foi conduzido no
11 Laboratório de Nutrição de Ruminantes da Universidade Federal de Santa Maria. No primeiro
12 ensaio (Ensaio 1) a incubação do substrato foi interrompida nas 24h, quando coletou-se
13 amostras para análise de AGCC e NH₃. Enquanto no segundo ensaio (Ensaio 2) objetivou-se
14 avaliar a cinética da produção de gases e a quantificar o CH₄ nas amostras de gás, o tempo de
15 incubação foi interrompido nas 72h de incubação. Os ensaios foram realizados em garrafas de
16 120 mL. A cada garrafa foi adicionado o substrato (0,2g de milho moído + 0,3g de feno de
17 azevém) e uma solução com nutrientes de Menke (MENKE et al., 1979). Também, a cada
18 garrafa foi adicionado o inoculo, ou seja, o fluído ruminal (10 mL). Em ambos ensaios sob
19 delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos:

- 20 1) Controle (CONT) as garrafas receberam o alimento, a solução de nutrientes (40 mL) e o
21 inoculo.
- 22 2) Aflatoxina (AF) as garrafas receberam o alimento, a solução de nutrientes (39 mL), o
23 inoculo e uma solução de AFB₁ (1 mL) na concentração de 50 µg/mL.
- 24 3) β-glucana (β-glu), as garrafas receberam o alimento, a solução de nutrientes (40 mL), o
25 inoculo e 50 mg de β-glu.

- 1 4) β -glu + AF, nesse tratamento as garrafas receberam o alimento, a solução de nutrientes
2 (39 mL), o inóculo, as mesmas quantidades da solução de AFB₁ do tratamento AF e a β -
3 glucana do tratamento β -glu.
- 4 5) Montmorilonita (MMT), as garrafas receberam o alimento, a solução de nutrientes (40
5 mL), o inóculo e 250 mg de MMT.
- 6 6) MMT + AF, nesse tratamento as garrafas receberam o alimento, a solução de nutrientes
7 (39 mL), o inóculo, as mesmas quantidades da solução de AFB₁ do tratamento AF e a
8 montmorilonita do tratamento MMT.

9 Incubação in vitro: Previamente a inoculação, as garrafas contendo o alimento, a β -
10 glucana e a montmorilonita foram seladas com tampas de borracha e armazenadas em
11 geladeira (4°C) por 12h. Após esse período as garrafas com conteúdo foram aquecidas em
12 banho-térmico até atingir 39°C, então o filtrado do fluido ruminal (10 mL) foi acrescentado a
13 cada garrafa. Na sequência, as garrafas foram tapadas e lacradas conforme MINOZZO (2013).
14 Após dois minutos, a agitação do banho-térmico (120xg) foi parada até o tempo (\pm 5min),
15 momento no qual 1 mL da solução com AFB₁ foi adicionada com auxílio de uma seringa e
16 agulha. Alguns frascos contendo apenas fluido ruminal e solução com nutrientes foram
17 incubados como “brancos” e os valores dos produtos dessa fermentação foram descontados
18 dos frascos com os tratamentos.

19 Preparo da solução de AFB₁: Foram solubilizados 5 mg de AFB₁ liofilizada (Sigma-
20 Aldrich Fine Chemicals, St Louis, MO, USA) em 5 mL de metanol absoluto (Sigma-Aldrich
21 Fine Chemicals, St Louis, MO, USA). Na sequência essa solução foi diluída em água
22 deionizada estéril até formar uma solução de 50 μ g/mL.

23 Preparo do substrato: Foi utilizado feno de azevém (*Lolium multiflorum*) e grãos de
24 milho (*Zea mays*) colhidos na região sul do Brasil e livres de aflatoxinas, conforme análise
25 realizada no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de

1 Santa Maria. As amostras desses alimentos foram secadas em estufa com ar forçado a 55-
2 60°C por um período de 72 horas e depois moídas passando através de peneiras de 2 mm.

3 Animal e preparo do fluido ruminal: Um novilho da raça holandesa, com fístula
4 ruminal foi usado como doador do fluido ruminal. O novilho tinha acesso livre a água, recebia
5 30kg de alimentos (silagem de milho, milho moído, farelo de soja e premix de minerais com
6 vitaminas), divididos em duas refeições iguais às 8:00 e às 17:00 horas. O fluido ruminal foi
7 coletado duas horas após a alimentação da manhã. Depois de colhido, foi filtrado em oito
8 camadas de gaze conforme UPADHAY et al. (2009). Este filtrado de fluido ruminal foi
9 mantido em temperatura de 39°C sob constante gaseificação com CO₂ durante o período
10 precedente (± 5 minutos) de sua adição às garrafas.

11 Procedimentos e amostragem no ensaio 1: No ensaio 1, nos tempos 6h, 12h e 24h da
12 incubação, foram realizadas as leituras da pressão de gás e no tempo 24h foram coletadas
13 amostras (1mL) do conteúdo fermentado de cada frasco. Para cada amostra do fluido ruminal
14 fermentado obtido das garrafas foi misturado com 0,3mL de 2,5g/L de uma solução de ácido
15 meta fosfórico, centrifugadas a 10.000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (0,5 mL) foi
16 coletado e congelado -20°C para posterior análise quantitativa de NH₄ e dos AGCC conforme
17 MINOZZO (2013).

18 Os AGCC foram determinados por meio do cromatógrafo de gás SHIMADZU,
19 modelo GC-2014, equipado com detector de ionização de chama (DIC). A coluna capilar
20 utilizada foi do modelo HP-INNOWax 19091N-213 (30m, 0,32mm, 0,5 μ m). A temperatura de
21 trabalho do injetor foi de 200°C e do detector de 250°C. A injeção foi no modo “split” com
22 relação 1:30, utilizando o nitrogênio como gás de arraste. A curva de calibração externa foi
23 feita com padrões cromatográficos (Chem Service, West Chester, PA, EUA) de ácido acético
24 (99,5%; CAS 64-19-97), propiônico (99%; CAS 79-09-4), butírico (98,7%; CAS 107-92-6. A
25 concentração de NH₃ foi determinada nas amostras mediante colorimetria com um

1 fotocolorímetro modelo LGS 53, Bel photonics, utilizando a reação do indofenol conforme
2 Bal et al. 2000.

3 Procedimentos e amostragem no ensaio 2: Para interpretação das leituras de pressão
4 (em psi= pressão por polegada quadrada) foi desenvolvida, conforme metodologia usada por
5 MINOZZO (2013), a seguinte equação:

6

7

$$V = 4,9515p + 0,656;$$

8

9 onde, V = volume de gás (mL); p = pressão mensurada (psi). Essa equação permite
10 transformar psi por mililitro de gás. A produção total de gás foi considerada como a soma das
11 produções parciais de cada leitura.

12 Nos tempos 3h, 6h, 9h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h e 72h da incubação, foram realizadas
13 as leituras da pressão de gás e o volume de gás foi estimado. A produção total de gás foi
14 considerada como a soma das produções parciais de cada leitura. As médias de volumes
15 acumulados, nas repetições de cada tratamento, foram usadas para estimar os padrões da
16 fermentação microbiana conforme o modelo unicompartmental descrito por Schofield et al.
17 (1994): $V_t = V_f \times (1 + \exp(2-4 \times S \times (t-L)))^{-1}$, onde V_f é o volume final de gás (mL) no tempo
18 t, S é a taxa de degradação (h^{-1}) e L é o tempo de colonização. Esse modelo foi ajustado pelo
19 procedimento não-linear do SAS (2001).

20 Para quantificação do metano (CH_4) por cromatografia gasosa foram coletadas 4
21 amostras de 10 mL do gás, de cada tratamento, acumulado entre os tempos 0-6h, 6-12h, 18-
22 24h e 24-48h. As amostras (10 mL) de gás foram coletadas com auxílio de seringa e agulha,
23 armazenadas em tubos tipo “extiner” com vácuo. A quantificação de CH_4 foi realizada
24 empregando-se o cromatógrafo gasoso Shimadzu 2014 modelo Greenhouse equipado com
25 três colunas empacotadas operando à 80°C, utilizando N_2 como gás de arraste (25 mL/min),
26 injetor (250°C) com amostragem direta de 1 mL e detector de captura de elétrons (DCE) com

1 Ni63 à 325°C. No DCE utilizou-se uma mistura de 5% de Argônio/Metano (P5) como gás
2 “make-up” para melhorar a detecção de N₂O.

3 Para calcular a quantidade de CH₄, produzida em cada intervalo de leitura, foi
4 utilizada a seguinte equação matemática utilizada: $Px_iV = n_iRT$; onde P = pressão do sistema
5 (atmosférica); x_i = fração molar do gás; V = volume de gás produzido; n_i = número de mols
6 do gás (metano); R = constante dos gases ideais; T = temperatura (SILVA et al. 2011). Os
7 resultados de volume de gás produzido e da concentração de CH₄ por cromatografia gasosa
8 foram adicionados a equação, sendo assim, foi possível estimar a quantidade de CH₄
9 produzido nos intervalos de tempo da incubação.

10 Análise estatística: Os dados foram analisados no programa IBM SPSS 19.0, usando
11 uma análise de variância ($Y_i = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$, onde: Y_i = efeito calculado, μ = média, T_i = efeito
12 do tratamento, ε_{ij} = erro) e suas médias contrastadas pelo teste de Tukey. As diferenças foram
13 consideradas significativas quando $P < 0,05$.

14

15 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

16 As menores produções de AGCC foram observadas nos tratamentos MMT (55,4 mM)
17 e AF + MMT (55,4 mM), essas médias foram significativamente menores que as produções
18 observadas nos tratamentos β -glu (67,71 mM), AF + β -glu (65,2 mM) e AF (64,6 mM). As
19 médias dos tratamentos β -glu e AF + β -glu foram significativamente maiores que a do
20 tratamento CONT (57,7 mM). A representação média (%) do ácido acético para o tratamento
21 MMT (62,9 %) foi significativamente maior que a do tratamento β -glu (61,0%). As
22 proporções médias de ácido propiônico foram semelhantes entre os tratamentos. Enquanto a
23 representação média (%) da produção de ácido butírico foi significativamente maior para o
24 tratamento β -glu (13,1%) em relação aos tratamentos CONT (11,3%), AF (10,9%) e MMT
25 (11,4%). A quantidade (mM) de NH₃ foi reduzida de forma significativa no tratamento MMT

1 (9,6 mM) em relação aos tratamentos β -glu (12,2 mM), AF (12,6 mM) e CONT (11,3 mM)
2 (Tabela 1).

3 Na tabela 2 observamos que o maior volume de gás (mL) foi produzido pelo
4 tratamento β -glu (103,4 mL), foi significativamente maior que o tratamento CONT (89,0 mL)
5 e MMT (91,6 mL). O tempo de colonização no tratamento MMT (6,2h) foi retardado de
6 forma significativa em relação aos tratamentos CONT (4,8h), AF (4,4h) e β -glu (4,33h).
7 Também a produção de CH_4 foi significativamente menor no tratamento MMT (33,0 mM) em
8 relação aos tratamentos CONT (36,3%), AF (35,90%) e β -glu (35,68%).

9 A maior e expressiva produção de AGCC e volume de gás no tratamento β -glu podem
10 ser explicados pela degradação de β -glucanas no meio ruminal. De acordo com
11 YIANNIKOURIS et al. (2006), as principais glucanas que constituem a parede celular de
12 *S.cerevisae* são os β -glucanos com ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,6. No rúmen, algumas
13 bactérias podem produzir β -1,3 glucanases que rompem essa complexa estrutura e
14 disponibiliza moléculas de glicose para o metabolismo bacteriano (SELINGER et al. 1996).
15 Na literatura não foram encontrados trabalhos investigando os produtos resultantes da
16 fermentação ruminal de β -glucanas. O produto usado no presente estudo continha 65% de β -
17 glucanas e outros constituintes da parede celular de *S.cerevisae* podem estar envolvidos nos
18 resultados obtidos. Conforme DOBICKI et al. (2006), a utilização da parede celular de
19 *S.cerevisae* na alimentação de vacas leiteiras aumentou o número de bactérias e a produção
20 diária de leite.

21 A influência de adsorventes de natureza argilosa como a montmorilonita sobre
22 indicadores de fermentação ruminal foi investigada em outros estudos (WALLACE &
23 NEWBOLD, 1991; RAHMAN, 2010; WALTZ et al., 1998; AITCHISON et al., 1986). A
24 redução na quantidade de CH_4 nas 24h, observada no presente estudo, possivelmente foi
25 decorrente da menor atividade das bactérias metanogênicas. Conforme WALLACE &

1 NEWBOLD (1991) a bentonita desfavoreceu a viabilidade de protozoários responsáveis em
2 abrigar bactérias metanogênicas, prejudicando a relação de simbiose dessas bactérias com a
3 população de protozoários. De acordo com o relato ABDEL-RAHMAN, (2010), a redução
4 significativa da quantidade de NH_3 pode ser relacionada à capacidade de armazenamento de
5 NH_3 pela bentonita e/ou a redução da atividade proteolítica e desaminativa pelos protozoários.
6 WALTZ et al. (1998) relataram que a adição de 0,75% de bentonita na dieta de ovinos,
7 alimentados com alto teor de grãos, aumentou a quantidade de AGCC e o pH ruminal foi
8 estabilizado mais próximo da neutralidade. Também, AITCHISON et al., (1986) não
9 observaram redução na quantidade de AGCC no fluido ruminal quando 2mg/mL de bentonita
10 foi adicionada, em avaliação conduzida *in vitro*. A quantidade de montmorilonita no meio
11 ruminal em altas concentrações parece influenciar a atividade fermentativa, como no presente
12 estudo que aumentou o tempo de colonização.

13 Poucos trabalhos (JIANG et al., 2012, WESTLAKE et al., 1989, FEHR et al., 1970)
14 encontrados na literatura tratam da possível atividade antimicrobiana da AFB_1 e, os resultados
15 de alguns parâmetros avaliados são divergentes ao efeito da AFB_1 sobre as bactérias ruminais
16 e na digestão ruminal *in vitro* de alimentos. De acordo com JIANG et al. (2012) a AFB_1 não
17 afetou a digestão da matéria seca *in vitro* (DMSIV) da alfafa na dose de 0,96 $\mu\text{g/mL}$ mas,
18 reduziu a quantidade de ácidos graxos voláteis (AGVs). Contrariamente, WESTLAKE et al.
19 (1989) observaram que AFB_1 (1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$) inibiu em mais de 50% a digestão do feno
20 de alfafa. No estudo de FEHR et al. (1970) observaram que a quantidade total (mM) de
21 AGCC foi reduzida e a proporção (%) de acetato foi reduzida na dose de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de
22 aflatoxinas. Como no estudo de JIANG et al. (2012), no presente estudo a AFB_1 não afetou
23 significativamente o volume de gás produzido e não alterou a proporção (%) molar dos ácidos
24 acético, propiônico e butírico.

1 De forma contrária ao presente estudo, FEHR et al. (1970) e JIANG et al. (2012)
2 observaram reduções significativas nas quantidades de NH₃. Conforme REYNAL et al.
3 (2007) a concentração de NH₃ é resultado do balanço entre hidrólise de proteínas do alimento
4 e a da utilização pelas bactérias ruminais. Portanto, espera-se pela redução da NH₃ no meio de
5 incubação se as bactérias ruminais são inibidas pela AFB₁. A NH₃ é essencial para o
6 crescimento de populações de bactérias que degradam carboidratos fibrosos. Entretanto, o fato
7 da AFB₁ reduzir a produção da NH₃ nos trabalhos de FEHR et al. (1970) e JIANG et al.
8 (2012), esses não relacionaram o fato a redução da digestão da matéria seca de alimentos
9 fibrosos.

10 As diferenças, encontradas entre o presente estudo e os de FEHR et al. (1970) e
11 JIANG et al. (2012) com relação a presença de AFB₁ no meio de fermentação ruminal, podem
12 ser explicadas pela qualidade do substrato utilizado. Enquanto esses trabalhos utilizaram
13 fenos de espécies forrageiras de alfafa e azevém ricos em celulose, no presente estudo
14 utilizou-se uma mistura de feno de azevém (60%) e milho moído (40%). As principais
15 bactérias que fermentam a celulose, encontrada principalmente em alimentos mais fibrosos,
16 são gram positivas. Na literatura científica não é relato o mecanismo de ação da AFB₁ sobre
17 bactérias que fermentam celulose como a *Ruminococcus sp.* ou a susceptibilidade dessa
18 bactéria frente a AFB₁. Entretanto, a susceptibilidade de bactérias não ruminais frente à AFB₁
19 (30 µg/mL) foi demonstrada por BURMEISTER & HESSELTINE, (1966), que observaram
20 maior sensibilidade ao grupo de bactérias gram positivas. Também, MATHUR et al (1976)
21 observaram que a AFB₁ (50 µg/mL) inibiu o crescimento de *Streptococcus bovis* (Gram
22 positiva) do meio ruminal. JIANG et al. 2012 observaram que houve interação significativa
23 entre o efeito AFB₁ e o tipo de substrato. A fermentação do feno de alfafa teria sofrido
24 impacto mais negativo (reduziu quantidade de AGVs) em relação a fermentação do feno de

1 azevém. BROWN et al., (2006) observaram que a quantidade de fibra na dieta pode modificar
2 a fermentação ruminal, a população e composição de microrganismos no rúmen.

3

4 **CONCLUSÕES**

5 O tratamento aflatoxina (AF) não impactou de forma negativa a fermentação ruminal
6 *in vitro*. Os adsorventes β -glu (65% de β -glucanas; 1 mg/mL) e MMT (montmorilonita) 5
7 mg/mL impactam a fermentação ruminal *in vitro* de substratos. O β -glu aumenta
8 significativamente a quantidade de ácidos graxos de cadeia curta e a representação do ácido
9 butírico. A MMT retarda a colonização das bactérias no substrato.

10

11 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 12 ABDEL-RAHMAN, M. A. *In vitro* Manipulation of Rumen Fermentation Efficiency by
13 Fumaric acid – Bentonite Coupled Addition as an Alternative to Antibiotics. **Journal of**
14 **Agricultural Science**, v. 2, p. 174-180, 2010. Disponível em: <[http://www.ccsenet.org/](http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/4695/4968)
15 [journal/index.php/jas/article/view/4695/4968](http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/4695/4968)> Acesso em: 24 março. 2015. doi:
16 10.5539/jas.v2n2p174.
- 17 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de Diretoria
18 Colegiada nº. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados para micotoxinas em
19 alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 09 mar. 2011.
20 Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm> >. Acesso em: 03 abr. 2013.
- 21 AITCHISON, E. M., ROWE, J. B., RIX, G. S. Effect of Bentonite Clays on Rumen
22 Fermentation and Diet Digestibility. **Proceeding Nutrition Society Australian**, v. 11, p. 111-
23 114, 1986. Disponível em: <[http://apjcn.nhri.org.tw/server/apjcn/procnutsoc/1980-1989/](http://apjcn.nhri.org.tw/server/apjcn/procnutsoc/1980-1989/1986/1986%20p111-114.pdf)
24 [1986/1986%20p111-114.pdf](http://apjcn.nhri.org.tw/server/apjcn/procnutsoc/1980-1989/1986/1986%20p111-114.pdf)> Acesso em: 24 março. 2015.

- 1 BAL, M. A. et al. Crop processing and chop length of corn silage: effects on intake, digestion,
2 and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83 n. 6, p. 1264-1273,
3 2000. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020074993](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030200749939)
4 [9](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030200749939)> Acesso em: 24 março. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74993-9.
- 5 BROWN, M. S., PONCE, C. H., PULIKANTI, R. Adaption of beef cattle to high concentrate
6 diets: performance and ruminal metabolism. **Journal Animal Science**, v. 84 (Suppl.), p. 25-
7 33, 2006. Disponível em: <[https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/](https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/articles/84/13_suppl/E25?highlight=&search-result=>)
8 [articles/84/13_suppl/E25?highlight=&search-result=>](https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/articles/84/13_suppl/E25?highlight=&search-result=>) Acesso em: 24 março. doi:/2006.841
9 3_supplE25x.
- 10 BURMEISTER, H. R. & HESSELTINE, C. W. Survey of the Sensitivity of Microorganisms to
11 Aflatoxin. **Applied Microbiology**, v. 14, p. 403-404, 1966. Disponível em: <[http://aem.](http://aem.asm.org/content/14/3/403.full.pdf)
12 [asm.org/content/14/3/403.full.pdf](http://aem.asm.org/content/14/3/403.full.pdf)> Acesso em: 24 março.
- 13 DESHENG, Q. et al. 2005. Adsorption of aflatoxin B1 on montmorillonite. **Poultry Science**.
14 84, 959-961, 2005. Disponível em: <<http://ps.oxfordjournals.org/content/84/6/959.full.pdf>>
15 Acesso em: 24 março. doi:10.1093/ps/84.6.959.
- 16 DIAZ, D. E. & SMITH, T. K., 2005. Micotoxin sequestering agents: practical tools for the
17 neutralization of mycotoxins. In: DIAZ, E. D. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham
18 University Press, Nottingham, U.K., pp. 323-339.
- 19 DOBICKI, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* preparations in the feeding of cows and their
20 effect on milk yield and composition well as rumen microorganisms. **Electronic Journal**
21 **Polish Agricultural Universities**, v. 9, p. 48, 2006. Disponível em: <[http://ps.oxford](http://ps.oxfordjournals.org/content/84/6/959.full.pdf)
22 [journals.org/content/84/6/959.full.pdf](http://ps.oxfordjournals.org/content/84/6/959.full.pdf)> Acesso em: 24 março.
- 23 European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the safety and efficacy of
24 bentonite (dioctahedral montmorillonite) as feed additive for all species. **EFSA Journal**, v. 9,

- 1 24p. 2011. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2007.htm>> Acesso
2 em: 24 março. doi:10.2903/j.efsa.2011.2007.
- 3 FEHR, M. M., DELAGE, J., ROCHE, M. J. Effet de l'aflatoxine sur les fermentations dans le
4 rumen. **C. R. Acad. Sc. Paris**, série D, p. 550-553, 1970.
- 5 Food and Drug Administratio. 2014. Disponível em: <[http://www.fda.gov/ICECI/](http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074703.htm)
6 [ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074703.htm](http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074703.htm)>. Acesso em:
7 30/10/2014.
- 8 JIANG, Y. H. et al. Effect of aflatoxin B1 on in vitro ruminal fermentation of rations high in
9 alfalfa hay or ryegrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 175, p. 85-89, 2012.
10 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840112001307>>.
11 Acesso em 24/03/2015. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.03.021.
- 12 MATHUR, C. F., SMITH, R. C., HAWKINS, G. E. Growth and Morphology of
13 *Streptococcus bovis* and of Mixed Rumen Bacteria in the Presence of Aflatoxin B₁, In Vitro.
14 **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 455-458, 1976. Disponível em: <<http://www.science>
15 [direct.com/science/article/pii/S0022030276842269](http://www.science.com/science/article/pii/S0022030276842269)>. Acesso em 24/03/2015. Doi:
16 10.3168/jds.S0022-0302(76)84226-9.
- 17 MENKE, K. H. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of
18 ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in
19 vitro. **Journal of Agricultural Science**, v. 93, p. 217-222, 1979. Disponível em:
20 <[http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=4823332&fileI](http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=4823332&fileId=S0021859600086305)
21 [d=S0021859600086305](http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=4823332&fileId=S0021859600086305)>. Acesso em 24/03/2015 Doi: 10.1017/S0021859600086305.
- 22 MINOZZO, A. **Efeito de ácidos orgânicos ou monensina sódica sobre a fermentação**
23 **ruminal**. 2013. 52p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós Graduação em
24 Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

- 1 REYNAL, S. M. et al. Omasal flow of soluble proteins, peptides and free amino acids in dairy
2 cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminal degradabilities. **Journal of**
3 **Dairy Science**, v. 90, p.1887–1903, 2007. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/
4 science/article/pii/S0022030207716764](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207716764)>. Acesso em 24/03/2015. Doi: 10.3168/jds.2006-158.
- 5 SELINGER, L. B., FORSBERG, C. W., CHENG, K. J. The Rumen: A Unique Source of
6 Enzymes for Enhancing Livestock Production. **Anaerobe**, v. 2, n. 5, p. 263-284, 1996.
7 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996496900360>>.
8 Acesso em 24/03/2015. Doi:10.1006/anae.1996.0036.
- 9 SILVA, L.S. Dinâmica da emissão de metano em solos sob cultivo de arroz irrigado no Sul do
10 Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. 35, n. 2, p. 473-481, 2011.
11 Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-06832011000200016&script=
12 sci_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-06832011000200016&script=sci_arttext)>. Acesso em 24/03/2015. Doi: 10.1590/S0100-06832011000200016.
- 13 UPADHAYA, S. D., SUNG, H. G., LEE, C. H. Comparative study on the aflatoxin B₁
14 degradation ability of rumen fluid from Holstein steers and Korean native goats. **Journal of**
15 **Veterinary Science**, v. 10, p. 29-34, 2009. Disponível em: <[http://www.vetsci.org/journal/
16 view.html?uid=513&vmd=Full](http://www.vetsci.org/journal/view.html?uid=513&vmd=Full)>. Acesso em: 24/03/2015. Doi: 10.4142/jvs.2009.10.1.29.
- 17 WALLACE, R. J. & NEWBOLD, C. J. Effect of bentonite on fermentation in the rumen
18 simulation technique (Rusitec) and rumen ciliate protozoa. **Journal of Agriculture Science**
19 **Cambridge**, v. 116, p. 163-168, 1991. Disponível em: <[http://journals.cambridge.org/action/
20 displayAbstract?fromPage=online&aid=4802004](http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=4802004)>. Acesso em: 23/03/2015. Doi: 10.1017/
21 S0021859600076279.
- 22 WALTZ, L. S. Effects of fish meal and sodium bentonite on daily gain, wool growth, carcass
23 characteristics, and ruminal and blood characteristics of lambs fed concentrate diets. **Journal**
24 **of Animal Science**, v. 76, p. 2025-2031, 1998. Disponível em: <<https://www.animalscience>

- 1 publications.org/publications/jas/articles/76/8/2025>. Acesso em: 23/03/2015. Doi: 1998.76
2 82025x.
- 3 WESTLAKE, K., MACKIE, R. I., DUTTON, M. F. Effects of Several Mycotoxins on
4 Specific Growth Rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and Toxin Degradation In Vitro. **Applied**
5 **Environmental Microbiology**, v. 53, p. 613-614, 1987, 1987.
- 6 WESTLAKE, K., MACKIE, R. I., DUTTON, M. F. In vitro metabolism of mycotoxins by
7 bacterial protozoal and ovine ruminal fluid preparations. **Animal Feed Science and**
8 **Technology**, v. 25, p. 169–178, 1989. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037784018990117X>>. Acesso em: 23/03/2015. Doi: 10.1016/0377-
9 8401(89)90117-X.
10 8401(89)90117-X.
- 11 YIANNIKOURIS, A. et al. Chemical and conformational study of the interactions involved in
12 mycotoxin complexation with beta-D-glucans. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1147-1155, 2006.
13 Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm050968t>>. Doi: 10.1021/bm050968t.
14

1 Tabela 1 – Produção média de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), amônia (NH₄) em 24h
 2 de incubação in vitro.

Parâmetros	Tratamentos						SEM	P
	CONT	AF	β -glu	AF+ β -glu	MMT	AF+ MMT		
AGCC (mM)	57,7 ^{bc}	64,6 ^{ab}	67,71 ^a	65,2 ^a	53,28 ^c	55,4 ^c	3,99	<0,001
Acético (%)	61,9 ^{ab}	62,6 ^{ab}	61,0 ^b	61,7 ^{ab}	62,9 ^a	61,4 ^{ab}	3,02	0,031
Propiônico (%)	23,8 ^a	23,6 ^a	23,3 ^a	23,1 ^a	23,4 ^a	23,8 ^a	0,77	0,65
Butírico (%)	11,3 ^{bc}	10,9 ^c	13,1 ^a	12,9 ^{ab}	11,4 ^{bc}	12,5 ^{ab}	0,76	<0,001
NH ₃ (mM)	11,3 ^{ab}	12,6 ^a	12,2 ^a	11,5 ^{ab}	9,6 ^c	10,3 ^{bc}	0,84	<0,001

SEM = Erro Padrão Médio; Tratamentos: CON= Controle; AF = Aflatoxina B₁; β -glu = β -glucano; AF+ β -glu = Aflatoxina B₁ + β -glucano; MMT = montmorilonita; AF+MMT = montmorilonita + aflatoxina B₁.

3

4

5

6

1 Tabela 2 – Cinética da produção de gás em 72h e Representação média (%) de CH₄ no gás
 2 para os intervalos dos tempos: 0-6h; 6-12h; 18-24h e 24-48h.

Parâmetros	Tratamentos						SE	P
	CON	AF	β -glu	AF+ β -glu	MMT	AF+ MMT		
Vf gás (mL)	89,0 ^b	96,6 ^{ab}	103,4 ^a	102,8 ^a	91,6 ^b	96,6 ^{ab}	2,46	<0,001
S (h ⁻¹)*100	4,1 ^{bc}	3,8 ^c	4,61 ^a	4,34 ^{ab}	4,2 ^{bc}	3,3 ^d	1,25	<0,001
L (h)*100	4,8 ^{bc}	4,4 ^{bc}	4,33 ^{bc}	4,25 ^c	6,2 ^a	5,3 ^{ab}	0,32	<0,001
CH ₄ (%)	36,3 ^a	35,9 ^a	35,68 ^a	34,9 ^{ab}	33,0 ^b	30,4 ^c	0,87	<0,001

SE = Erro Padrão; Tratamentos: CON= Controle; AF = Aflatoxina B₁; β -glu = β -glucano; AF+ β -glu = Aflatoxina B₁ + β -glucano; MMT = montmorilonita; AF+MMT = montmorilonita + aflatoxina B₁. Cinética da produção de gás: Vf = volume final de gás (ml) no tempo t; L = tempo de colonização (h); S = taxa de degradação (h⁻¹).

3

4

5

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dose da AFB₁ do presente estudo foi definida com base no trabalho de JIANG et al (2012) que observaram impactos da AFB₁ quando a dose foi de 0,96 µg/mL. Esses autores e FEHR et al. (1970) estudaram o impacto da AFB₁ no processo de fermentação em dietas com diferentes taxas de degradação, porém, todos eram fenos. Em ambos estudos observaram impacto negativo da toxina. Observaram impacto maior quando maior o teor de celulose na dieta. Simulando uma situação para um bovino adulto, com rúmen com capacidade 100 litros, na dose usada nesse experimento (1µg/mL) o animal teria consumido 100.000µg. HALL et al. (1989) relatam um caso com mortalidade de bovinos quando a contaminação natural de grão de milho foi 2.300ppb (2.300µg de AFB₁ para cada kg de milho). Para atingir a mesma concentração de AFB₁ no rúmen, como no presente estudo (1µg/mL), um bovino com capacidade ruminal de 100 litros precisaria no seu conteúdo ruminal da quantidade de 43,47kg desse milho do milho no estudo de de HALL et al., (1989).

Provavelmente a concentração máxima de AFB₁ no estudo de HALL et al. (1989) não atingiu a concentração do atual estudo, entretanto, causou a mortalidade de animais. Diante dos resultados do presente estudo, permite-se afirmar que a concentração, no meio ruminal, de 1µg/mL, que uma dose alta perante a estudos de casos clínicos não impacta a fermentação ruminal entretanto poderia causar a mortalidade de animais provavelmente por lesões em órgão como o fígado.

A quantidade usada de β-glu (1 mg/mL) se simular essa concentração para a situação prática de um bovino adulto com rúmen de capacidade 100 litros, teríamos 100.000 mg (1kg) de β-glu nesse rúmen. Como recomendação prática usa-se 0,1% desse tipo de produto no alimento concentrado, dessa forma é improvável atingir a concentração usada nesse estudo no ambiente ruminal. Em futuros trabalhos *in vivo* deverá ser investigado se o uso da dose de 0,1% apresentará a capacidade de estimular a fermentação ruminal, aumentando a produção de AGCC e conseqüentemente melhoras no desempenho dos animais. Como apresentada na discussão desse trabalho, suspeitou-se que bactérias do rúmen apresentaram capacidade de uso desse produto como fonte de energia. Em futuros trabalhos *in vivo* é necessário investigar se esse produto apresenta, de fato, capacidade de proteger os animais dos efeitos tóxicos de aflatoxinas pela capacidade de adsorção ou se a toxina ficaria livre no ambiente ruminal pelo fato da degradação do produto.

No mesmo sentido de simulação *in vivo* para a MMT (5 mg/mL) representaria 5 kg do produto no rúmen de um bovino de 100 litros de capacidade. A recomendação prática para produtos dessa natureza é de 0,5% no alimento concentrado. Mesmo que nesse estudo tenha sido demonstrado que o tempo de colonização ou fase “lag” aumentou na estimativa da cinética da produção de gás e que a produção de CH₄ e NH₃ foram reduzidos, deve-se ter cautela ao interpretar esses resultados como efeitos negativos. Apesar da extrapolada concentração usada, a produção de AGCC não foi reduzida de forma significativa.

Os futuros trabalhos deverão investigar *in vivo* se doses maiores das recomendações práticas, 0,1% para produtos como o β-glu e 0,5% para MMT apresentarão viabilidade para o desempenho zootécnico e econômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada nº.7, de 18 de fevereiro de 2011. **Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 09 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 03 abr. 2013.

ARAVIND, K. L. et al. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 571-576, 2003.

ATANDA, S. A. et al. Mycotoxin Management in Agriculture: a Review. **Journal Animal Science Advances**, v. 2, sup. 3.1, p. 250-260, 2012.

AUERBACH, H. et al. Biodegradation of aflatoxin B1 by bovine rumen micro-organism *in vitro* and its effects on rumen fermentation. **Revue de Médecine Veterinaire**, v. 149, p. 573. 1998.

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

BAKIRDERE, S. Aflatoxin species: their health effects and determination methods in different foodstuffs. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 675-685, 2012.

BANLUNARA, W.; BINTVIHOK, A.; KUMAGAI, S. Immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in duckling liver fed with aflatoxina B₁ and esterified glucomannan. **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 954-957, 2005.

BLANEY, B. J.; RYLEY, M. J.; BOUCHER, B. D. Early harvest and ensilage of forage sorghum infected with ergot (*Claviceps africana*) reduced the risk of livestock poisoning. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 311-312, 2010.

CALONI, F. Aflatoxin M1 absorption and cytotoxicity on human intestinal *in vitro* model, **Toxicon**, v. 47, n. 4, p. 409-415, 2006.

CAVALLARIN, L.; BORREANI, G., TABACCO, E. Mycotoxin occurrence in farm maize silages in northern Italy. In: **20th General Meeting of the European Grassland Federation**, 21-24 June 2004, Luzern, Switzerland, Proceeding... Luzern, Switzerland, 2004, p. 1023-1025, 2004.

COOK, W. O. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: Rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, p. 1817-1825, 1986.

DALEFIELD, R. Sporidesmin. In: PLUMLEE, K. H. **Clinical veterinary toxicology**. St Louis (MO): Mosby; p. 264-668, 2004.

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

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

DIAZ, D. E. Aflatoxin binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. **Mycopathologia**, v. 156, n. 3, p. 223-226, 2002.

DIAZ, D. E. et al. Aflatoxin Binder II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v. 157, p. 233-241, 2004.

DIAZ, D. E. et al. Effect of fumonisin on lactating dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 83, n. 5, p. 1171, 2000.

DIENER, U. L.; DAVIS, N. D. Biology of *A. flavus* and *A. parasiticus*. In: ZUBER, M. S.; LILLEHOJ, E. B.; RENFRO, B. L. (Org.). **Aflatoxin in Maize**. Mexico City, Proceeding of the Workshop, CIMMYT, 1987, p. 33-40.

DOEHLERT, D. C. et al. Evidence implicating the lipoxygenase pathway in providing resistance to soybeans against *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 83, p. 1473-1477, 1993.

FEHR, M. M.; DELAGE, J.; ROCHE, M. J. Effet de l'aflatoxine sur les fermentations dans le rumen. **C. R. Acad. Sc. Paris**, série D, n. 3, p. 550-553, 1970.

FERNÁNDEZ, A. et al. Alterations in the performance, haematology and clinical biochemistry of growing lambs fed with aflatoxin in the diet. **Journal Applied Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 85-91, 1996.

FERNÁNDEZ, A. et al. Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 64, n. 1, p. 53-58, 2000.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in forages. In: Diaz, D. E. (Org.). **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, Nottingham University Press, 2005, p. 249-268.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; RYS, P. Efficient adsorption of the mycotoxin zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 38, n. 3, p. 243-255, 2003.

GALLO, A.; MOSCHINI, M.; MASOERO, F. Aflatoxins absorption in the gastro- intestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows. **Italian Journal Animal Science**, v. 7, n. 1, p. 53-63, 2008.

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue de médecine vétérinaire**, v. 149, p. 549-554, 1998.

HALL, R. F.; HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M. Aflatoxicosis in cattle pastured in a field of sweet corn. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 194, n. 7, p. 938, 1989.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Agents Classified by the IARC Monographs. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>>. Acessado em 30 de setembro de 2014.

JAIMEZ, J. et al. Review: application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis, **Journal Chromatography**, v. 882, n. 1, p. 1-10, 2000.

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

JIANG, Y. H.; YANG, H. J.; LUND, P. Effect of aflatoxin B1 on *in vitro* ruminal fermentation of ratio high in alfalfa hay or ryegrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 175, n. 175, p. 85-89, 2012.

JOUANY, J. P.; DIAZ, E. D. Effects of mycotoxins in ruminants. In: DIAZ, E. D. (Org.). **The Mycotoxin Blue Book**, Nottingham, Nottingham University Press, 2005, p. 295-322.

JOUANY, J. P.; YIANNIKOURIS, A.; BERTIN, G. Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminants products. **Options Méditerranéennes**, v. 85, n. 85, p. 205-224, 2009.

KEYL, A. C.; BOOTH, A. N. Aflatoxin effects in livestock. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 599-604, 1971.

KIESSLING, K. H. et al. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1070-1073, 1984.

LE BARS, J.; LE BARS, P. Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. **Veterinary Research**, v. 27, n. 4, p. 383-394, 1996.

LEWIS, F.; MARKSON, L. M.; ALLCROFT, R. The effect of feeding toxic groundnut meal to sheep over a period of five years. **Veterinary Record**, v. 80, p. 312-314, 1967.

LIN, W. C. et al. Inhibitory effect of CDA-II, a urinary preparation, on aflatoxin B(1)-induced oxidative stress and DNA damage in primary cultured rat hepatocytes. **Food Chemistry Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 546-551, 2006.

MATHUR, C. F.; SMITH, R. C.; HAWKINS, G. E. Growth and Morphology of *Streptococcus bovis* and of Mixed Rumen Bacteria in the Presence of Aflatoxin B1, In Vitro. **Journal of Dairy Science**. v. 59, n. 3, p. 455-458, 1976.

MAZZETTE, A. et al. Excretion of aflatoxin M1 in milk of goats fed diets contaminated by aflatoxin B1. **Italian Journal Animal Science**, v. 8, n. 2, p. 631-633, 2009.

McDONALD, P. **The biochemistry of silage**. New York: John Wiley & Sons, 1981. p. 226.

MEERDINK, G. L. Aflatoxins. In: PLUMLEE, K. H. (Org). In: **Clinical veterinary toxicology**. St. Louis, Mosby, 2004, p. 231-235.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução normativa nº 13**, de 30 de novembro de 2004. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>>. Acesso em 15/10/2014.

MOSS, M. O. Mycotoxins. **Mycological Research**. v. 100, n. 5, p. 513-523, 1996.

MOSTROM, M. S.; JACOBSEN, B. J. Ruminant Mycotoxicosis. **Veterinary Clinical Food Animal**. v. 27, p. 315-344, 2011.

NESBITT, B. F. et al. *Aspergillus flavus* and Turkey x disease: toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. **Nature**. v. 195, n. 15, p. 1062-1063, 1962.

NICHOLSON, P. Molecular tools to study epidemiology and toxicity of *Fusarium* head blight of cereals. **European Journal of Plant Pathology**. v. 109, p. 691-703, 2003.

NOVINSK, C. O. **Composição de Micotoxinas e Bromatologia de Silagens de Milho em Silos de Grande Porte Utilizando Imagens em Infravermelho**. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/31219/R%20-%20D%20-%20CHARLES%20ORTIZ%20NOVINSKI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acessado em 05 de março de 2015.

OSWEILER, G. D.; TRAMPEL, D.W. Aflatoxicosis in feedlot cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 187, p. 636-637, 1985.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. An overview on organophilic clays: properties, routes of preparation and applications. **Applied Clay Science**, 2007.

PARKIN, C. S. et al. The deposition of fungicides on ears to control *Fusarium* ear blight and the mycotoxin contamination of grain. **Aspects of Applied Biology**, In Press, 2006.

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

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London, Chapman & Hall, 1997, 593 p.

RAISBECK, M. F.; ROTTINGHAUS, G. E.; KENDALL, J. D. Effects of naturally occurring mycotoxins on ruminants. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (Org.). **Mycotoxins and animal foods**, Boca Raton (FL), CRC Press, 1991, p. 647-677.

RIBEIRO, J. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. **Letters in Applied Microbiology**. v. 42, n. 2, p. 179-184, 2006.

RICHARD, J. L. et al. Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes, and on tissue residues in steers. **American Journal Veterinary Research**. v. 44, n. 7, p. 1294-1299, 1983.

SCHMIDT, P. et al. Níveis de micotoxinas em silagens de milho em cinco bacias leiteiras do Brasil. In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 48., Belém, 2011. **Anais**. Belém: UFRA, 2011.

SCUDAMORE, K. A.; LIVESEY, C. T. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review. **Journal Science Food Agricultural**. v. 77, n. 1, p. 1-17, 1998.

SMITH, E. E. et al. Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxina M1 residue in dairy goat milk and effects on milk production and components. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 677-682, 1994.

SPAHR, U.; WALTHER, B.; SIEBER, R. Transfert des mycotoxines dans le lait: Vue d'ensemble. **Revue Suisse Agricole**. v. 32, n. 2, p. 75-78, 2000.

SPOTTI, M. Aflatoxin B1 binding to sorbents in bovine ruminal fluid. **Veterinary Research Communicate**. v. 29, p. 507-515, 2005.

STANLEY, V. G. et al. The use of *Scharyomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**. v. 72, n. 10, p. 1867-1872. 1993.

TONG, W. M. et al. Aflatoxin-B exposure does not lead to p53 mutations but results in enhanced liver cancer of hupki (human p53 knock-in) mice. **International Journal of Cancer**. v. 119, n. 4, p. 745-749, 2006.

UPADHAYA, S. D. et al. Comparative study on the aflatoxin B1 degradation ability of rumen fluid from Holstein steers and Korean native goats. **Journal Veterinary Science**. v. 10, n. 1, p. 29-34, 2009.

VESONDER, R. F.; HORN, B. W. Sterigmatocystin in dairy cattle feed contaminated with *Aspergillus versicolor*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 49, p. 234-235, 1985.

WESTLAKE, K. et al. Effects of several mycotoxins on the specific growth rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and toxin degradation in vitro. **Applied Environmental Microbiology**. v. 53, n. 3, p. 613-614, 1987.

WESTLAKE, K. et al. *In vitro* metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine rumen fluid preparations. **Animal Feed Science Technology**. v. 25, n. 1, p. 169-178, 1989.

YIANNIKOURIS, A. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with beta-D-glucans. **Biomacromolecules**. v. 7, p. 1147-1155, 2006.

YIANNIKOURIS, A. et al. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 783-788. 2003.