

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

EFEITO DE DIFERENTES ADITIVOS

ANTI-MICOTOXINAS NA INTOXICAÇÃO

EXPERIMENTAL POR AFLATOXINAS

EM FRANGOS DE CORTE

Águida Aparecida de Oliveira

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EFEITO DE DIFERENTES ADITIVOS ANTI-MICOTOXINAS
NA INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR AFLATOXINAS
EM FRANGOS DE CORTE**

ÁGUIDA APARECIDA DE OLIVEIRA

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

E Co-Orientação da Professora
Lilia Renée Cavaglieri

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Março de 2014.

636.0895954
O48e
T

Oliveira, Águida Aparecida de, 1984-
Efeito de diferentes aditivos
anti-micotoxinas na intoxicação
experimental por aflatoxinas em
frangos de corte / Águida Aparecida
de Oliveira. - 2014.
104 f.: il.

Orientador: Carlos Alberto da
Rocha Rosa.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2014.

Bibliografia: f. 83-96.

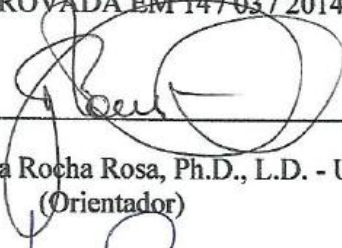
1. Frango - Toxicologia - Teses.
2. Toxicologia experimental - Teses.
3. Aflatoxina - Teses.
4. Micotoxinas - Teses.
5. Micotoxinoses - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

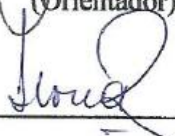
ÁGUIDA APARECIDA DE OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

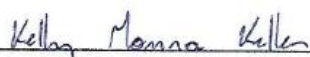
TESE APROVADA EM 14/03/2014



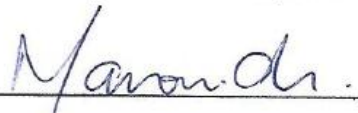
Carlos Alberto da Rocha Rosa, Ph.D., L.D. - UFRRJ
(Orientador)



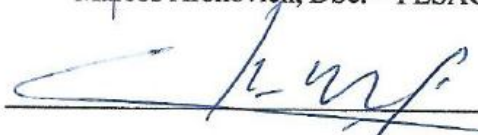
Lilia Renée Cavaglieri, DSc.- UNRC - Argentina



Kelly Moura Keller, DSc. – UFMG




Marcos Aronovich, DSc. – PESAGRO/RJ



Airton Antonio Castagna, DSc. – PESAGRO/RJ



Fernando Queiroz de Almeida, DSc. – UFRRJ



Carina Maricel Pereyra, DSc. - UNRC - Argentina

Dedico este trabalho ao meu pai Aginaldo, ao meu irmão Aginaldo Júnior e ao meu marido Alexandre por todo amor, e por terem acreditado sempre em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha saúde e força, e pela saúde da minha família e amigos, pela luz e sinais que recebi quando tudo parecia difícil ou perdido. Pelo meu crescimento e por todas as mudanças incríveis em minha vida neste período de doutorado. Obrigada Senhor, pois minhas preces foram sempre ouvidas.

Agradeço aos animais, nossa fonte de estudo, foco de profissão e dignos de todo o respeito possível.

A minha família, que me educou com amor e me ensinou a ser uma pessoa gentil, batalhadora, de caráter, sem nunca deixar de ser humilde. Minha mãe Maria das Graças de Oliveira (*in memoriam*), meu pai Aginaldo Dias de Oliveira, e meu irmão Aginaldo Dias de Oliveira Júnior; vocês foram e sempre serão meus exemplos de vida, vitória e amor!

Ao meu marido Alexandre Luís Rodrigues Pinto de Assis, pelo amor e carinho, pelos infinitos incentivos, por me ensinar a perseverança e otimismo, e me mostrar que não se vai a lugar algum sem muito trabalho, e que não podemos nos deixar abater pelos problemas. Amo você!

Ao Professor Carlos Alberto da Rocha Rosa pela orientação, pela amizade e pela oportunidade ímpar de ingressar no laboratório e poder me desenvolver como aluna e profissional da pesquisa.

À amiga Kelly Moura Keller, grande professora e que em muitos momentos foi a luz do meu trabalho e a força que eu precisava. Agradeço por sua amizade, sua ajuda nos momentos difíceis e sua vontade de me ensinar.

Às Professoras da Universidad Nacional de Río Cuarto pela grande atenção e por todos os ensinamentos passados com carinho, principalmente a professora Lilia Renée Cavaglieri, que me ajudou ao longo do trabalho.

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa gerada.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias Professor José Luis Fernando Luque Alejos, e ao secretário do curso Arthur Santiago Junior, pela disponibilidade, atenção prestada e compreensão nos momentos difíceis ao longo dos semestres.

A cada professor doutor, componente da minha banca de avaliação final. Cada um contribuiu de forma significativa neste trabalho.

Aos professores Armando Sales e Aparecida Alves do Nascimento pelo apoio na conclusão do meu doutorado, e por me receberem tão bem na minha nova etapa profissional como assistente técnica do laboratório de Histologia Animal e Embriologia da UFRRJ.

Aos amigos que nessa jornada de estudos e trabalho, cada qual ao seu jeito, me apoiaram, me entenderam e estiveram comigo: Adriana Ventura, Andréa Kill, Camila Franco Basalo, Carla Valéria Rocha de Oliveira, Fernanda Alcântara, Márcia Nascimento, Cristiane Nascimento, Paula Alves, Meine Anny Cruz da Silva, Bruna da Silva Narciso, Ilza Coelho, Luciene Santos Batista, entre outros.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM), pois sei que foi difícil passar fins de semana, feriados e até noites inteiras trabalhando no experimento: Beatriz Dias Queiroz, Bruno da Silva de Vasconcelos, Carla Alves Soleiro, Dalila da Costa Gonçalves, Érica de Oliveira Souza Dias, Francine Siqueira dos Santos, Luiz Antônio Moura Keller, Lucila Maria Teixeira Nunes, Mayara Calatroni Bosi, Renata Quintela Assad, Thais Ferreira Fagundes, Vinícius Machado dos Santos. E um agradecimento especial às amigas Michele Valadares Deveza e Tatiana Xavier de Almeida, pela grande amizade mesmo fora das salas de aula e do laboratório, a quem devo muito obrigada pelo carinho, horas de conversa e conselhos mesmo ao telefone, pelo ombro amigo na dificuldade, e pela ajuda em muitos momentos da minha vida pessoal. E a Danielle Fabião Gomes Moreira Leitão, pela companhia, apoio e amizade em uma época que só podíamos contar uma com a outra. Obrigada amigas!

E a todos aqueles que de alguma forma participaram, estiveram comigo de presença e de coração, e que não foram citados, mas não foram esquecidos, obrigada por tudo!

RESUMO

OLIVEIRA, Águida Aparecida de. 2014. **Efeito de diferentes aditivos anti-micotoxinas na intoxicação experimental por aflatoxinas em frangos de corte**. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de três aditivos anti-micotoxinas (AAMs) à base de parede celular de levedura (PCL), em condições de intoxicação experimental por aflatoxina B₁ (AFB₁) em frangos de corte até os 21 dias de idade. Os produtos foram identificados como AAM A (100% de PCL da cepa A), AAM B (100% PCL da cepa B) e AAM C (70% de PCL da cepa A + 30% de bentonita sódica). Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, sendo os tratamentos de cada análise individual constituídos por: T01 (dieta base), T02 (0,2% de AAM), T03 (1,012 mg Kg⁻¹ AFB₁) e T04 (1,012 mg Kg⁻¹ de AFB₁ + 0,2 % de AAM). Os parâmetros avaliados foram peso vivo, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, peso absoluto dos órgãos, comprimento total de intestinos, peso relativo e histopatologia de fígado e rins, e análise bioquímica sanguínea – aspartato amino transferase, alanina-amino-transferase, ácido úrico e proteínas totais. A adição de 1,012 mg Kg⁻¹ (ppm) de AFB₁ na dieta dos frangos de corte no presente estudo foi capaz de alterar negativamente os parâmetros zootécnicos, afetar a concentração de ácido úrico, diminuir peso absoluto de órgãos linfóides, causar aumento aparente de comprimento de intestinos, causar degeneração gordurosa no fígado com áreas dispersas de necrose, e nefrose tubular renal. E nas mesmas condições experimentais a adição de AAM A e AAM B atenuaram tais efeitos, exceto pela diminuição de peso de órgãos linfóides. O AAM C não conseguiu amenizar os efeitos. A mistura de AAMs inorgânico e orgânico provavelmente continha quantidades insuficientes de ambos os produtos, ou interagiram impedindo a adsorção da AFB₁ da dieta dos frangos. O presente estudo reforça a presença dos efeitos negativos que as aflatoxinas causam aos frangos de corte e sugere o uso dos aditivos à base de PCL como boa alternativa, atentando para o fato de que a cepa da levedura interfere na qualidade do AAM; e demonstra o efeito negativo do uso de misturas de AAMs inorgânicos e orgânicos. Mais estudos devem ser realizados acerca do assunto para melhor esclarecer o mecanismo de ação destes aditivos, incluindo estudos *in vivo* com AAMs e co-ocorrência de micotoxinas, pesquisa de micotoxinas na matéria fecal e resíduos em carne e ovos.

Palavras-chave: adsorventes, avicultura, fungos, fígado, rins, levedura.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Águida Aparecida de. **Effect of different anti-mycotoxin additives on broiler chickens intoxicated with aflatoxin B₁**. 2014. 104 p. Thesis. (Doctor's Degree in Veterinary Sciences, Animal Health) Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

This study aimed to evaluate the performance of three different anti mycotoxin additives (AMA) based on yeast cell wall (YCW) in performance of broiler chickens intoxicated with aflatoxin B₁ (AFB₁) until 21 days of age. The products were identified as the AMA A (100% YCW strain A), AMA B (100% YCW strain B) and AMA C (70 % YCW strain A + 30% bentonite). The experimental design was randomized blocks, with treatments of each analysis consisting of: T01 (aflatoxin free diet), T02 (0.2% AAM), T03 (1.012 mg Kg⁻¹ AFB₁) and T04 (1.012 mg Kg⁻¹ AFB₁ + 0.2% AAM). The parameters evaluated were body weight, weight gain, feed intake, feed conversion, absolute organ weight, intestine length, relative weight and histopathology of liver and kidneys, and blood biochemistry analysis - aspartate amino transferase, alanine amino transferase, uric acid and total protein. 1.012 mg Kg⁻¹ of AFB₁ in the diet of broilers in this study could negatively alter the performance parameters and affect the concentration of uric acid, lower absolute weight of lymphoid organs, apparent increase in length intestines, liver fatty degeneration and the emergence of scattered areas of necrosis in liver and renal tubular nephrosis. And at the same conditions, the AMA 1 and AMA 2 (0.2%) attenuated these effects, except for a decrease in weight of lymphoid organs. AAM C failed to mitigate the effects. A mixture of organic and inorganic AMAs probably contains insufficient amounts of both products, or interaction prevented the adsorption of AFB₁ in broiler's diet. This study confirms the negative effects that aflatoxins cause to broiler chickens and suggests additives based on YCW as good alternative, with attention to the fact that the yeast strain interferes with the quality of the AMAs; and demonstrates the negative effect of mixtures of inorganic and organic AMAs. More studies should be conducted on the subject to clarify the action mechanism of these additives, including *in vivo* studies with AMAs and co-occurrence of mycotoxins, and evaluate the mycotoxin presence in faeces, meat and eggs.

Key words: adsorbents, aviculture, fungi, liver, kidney, yeast.

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
Tabela 1: Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Aspergillus</i> que contaminam produtos vegetais, com destaque para as principais produtoras de aflatoxinas.....	14
Tabela 2: Composição bromatológica da ração balanceada.....	35
Tabela 3: Composição dos aditivos anti-micotoxinas.....	38
Tabela 4: Relação entre temperatura ótima do galpão (°C), umidade relativa e idade dos frangos de corte.....	50
Tabela 5: Média do peso absoluto dos órgãos dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto A.....	68
Tabela 6: Média do peso absoluto dos órgãos dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto B.....	69
Tabela 7: Média do peso absoluto dos órgãos dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto C.....	70
Tabela 8: Média do peso relativo de fígado e rins dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto A.....	75
Tabela 9: Média do peso relativo de fígado e rins dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto B.....	76
Tabela 10: Média do peso relativo de fígado e rins dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto C.....	77
Tabela 11: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.....	78
Tabela 12: Alterações histopatológicas observadas nos rins dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.....	80

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1: Exemplo de instalação no Brasil para a criação de grande número de aves para corte.....	5
Figura 2: Principais países exportadores da carne de frango no mundo (a) e maiores países produtores de carne de frango no mundo (b).....	6
Figura 3: Micrografia eletrônica do gênero <i>Aspergillus</i> (200 x).....	13
Figura 4: <i>Aspergillus flavus</i> crescendo sobre um grão de milho.....	15
Figura 5: Microscopia (400 x) de <i>Aspergillus parasiticus</i> (à esquerda) e <i>Aspergillus flavus</i> (à direita).....	16
Figura 6: Micrografia eletrônica (21000 x) de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , a levedura mais estudada no mundo.....	16
Figura 7: Esquema de parede celular de levedura.....	17
Figura 8: Estruturas química das quatro principais aflatoxinas	21
Figura 9: Graus de modificação de cor e tamanho em fígados de frangos de corte causados por degeneração gordurosa equivalentes a concentração de aflatoxinas: A - controle ; B - 1 mg Kg ⁻¹ ; C - 2 mg Kg ⁻¹ ; D - 3 mg Kg ⁻¹	22
Figura 10: Micrografia (200 x) de amostras de rim de frangos de corte intoxicados com ocratoxinas, exemplificando: 5- hemorragia intersticial maciça; 6 – áreas de necrose com invasão leucocitária...	23
Figura 11: Micrografia (400 x) de amostras de fígado de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas; E: aparência normal de órgão; G: degeneração gordurosa e congestão dos vasos centro-lobulares.....	24
Figura 12: Micrografia (400 x) de amostras de fígado de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas: A – congestão da veia centro-lobular; B- glóbulos de gordura caracterizando uma degeneração esteatosa; C-fibrose periportal; D- proliferação anormal de ductos biliares.....	24
Figura 13: Metabolismo das aflatoxinas no organismo das aves.....	25
Figura 14: Lesões orais provocadas por toxina T-2 em frango de corte.....	28

Figura 15:	Em A1 e A2 – unidades de β -glucanos encontrados em parede de leveduras e alguns cereais; B- estrutura de parede celular de levedura.....	31
Figura 16:	Núcleo de aflatoxinas aos 10 dias de crescimento.....	34
Figura 17:	Esquema de uso de Mycosep [®] 226 AflaZon.....	34
Figura 18:	Galpão experimental do NPMM da UFRRJ preparado para experimento <i>in vivo</i> com frangos de corte.....	37
Figura 19:	Gaiolas do galpão separadas por andares identificados, cada andar alojou nove animais.....	39
Figura 20:	Gráfico da média de peso vivo dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	42
Figura 21:	Gráfico da média de peso vivo dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	44
Figura 22:	Gráfico da média de peso vivo dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	46
Figura 23:	Gráfico do ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	48
Figura 24:	Dados da temperatura durante o experimento <i>in vivo</i>	49
Figura 25:	Gráfico da média de ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	51
Figura 26:	Gráfico da média de ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de	

	Duncan ($p \leq 0,05$).....	53
Figura 27:	Gráfico do consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	54
Figura 28:	Gráfico do consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	56
Figura 29:	Gráfico do consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	57
Figura 30:	Gráfico da conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A; Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	58
Figura 31:	Gráfico da conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B; Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	60
Figura 32:	Gráfico da conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C; Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	61
Figura 33:	Gráfico das análises bioquímicas dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto A: Os valores de AST estão expressos em $UI L^{-1} 10^{-3}$, os de ALT em $UI L^{-1} 10^{-1}$, os de ácido úrico em $mg dL^{-1}$, e o de proteínas totais em $g dL^{-1}$; Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....	62
Figura 34:	Gráfico das análises bioquímicas dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto B: Os valores de AST estão	

	expressos em UI L ⁻¹ 10 ⁻³ , os de ALT em UI L ⁻¹ 10 ⁻¹ , os de ácido úrico em mg dL ⁻¹ , e o de proteínas totais em g dL ⁻¹ ; Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05).....	65
Figura 35:	Gráfico das análises bioquímicas dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto C: Os valores de AST estão expressos em UI L ⁻¹ 10 ⁻³ , os de ALT em UI L ⁻¹ 10 ⁻¹ , os de ácido úrico em mg dL ⁻¹ , e o de proteínas totais em g dL ⁻¹ ; Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05).....	66
Figura 36:	Aspecto macroscópico típico de fígados das aves dos quatro tratamentos pertencentes à avaliação do produto A.....	72
Figura 37:	Aspecto macroscópico típico de fígados das aves dos quatro tratamentos pertencentes à avaliação do produto B.....	73
Figura 38:	Aspecto macroscópico típico de fígados das aves dos quatro tratamentos pertencentes à avaliação do produto C.....	74
Figura 39:	Micrografia de amostras de fígado das aves: A – Fígado controle, disposição normal de hepatócitos e espaço porta normal; B – Desorganização celular e necrose individual de hepatócitos; C – Área de necrose focalmente extensa; D – Necrose, proliferação e acúmulo de células basofílicas ao redor de canalículos biliares.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AAM	Aditivo Anti-Micotoxina
AF	Aflatoxinas
AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
APCs	Antibióticos Promotores de Crescimento
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATA	Aleukia Tóxica Alimentar
BHA	Hidroxiutilanisol
BHT	Hidroxibutiltoueno
CA	Conversão Alimentar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DON	Deoxinivalenol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FB₁	Fumonisina B ₁
FDA	Food and Drug Administration
FOS	Frutoligossacarídeos
GPD	Ganho de Peso Diário
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MOS	Mananoligossacarídeos
NPMM	Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas
PG	Propilgalato
OMS	Organização Mundial de Saúde
OLS	Oligossacarídeos
OTA	Ocratoxina
PCL	Parede Celular de Levedura
PSA	Projeto Sanidade Animal
PV	Peso Vivo

GRAS Generally Recognised as Safe
TGI Trato Gastrointestinal
UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hipótese.....	3
1.2 Objetivo Geral.....	3
1.3 Objetivos Específicos.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 A Avicultura no Brasil e no Mundo.....	5
2.2 Promotores de Crescimento, Probióticos e Prebióticos na Avicultura Mundial.....	7
2.3 Os Fungos	12
2.4 Micotoxinas e a Micotoxicologia.....	17
2.5 Micotoxinas na Avicultura.....	20
2.5.1 Aflatoxinas.....	20
2.5.2 Fumonisinias.....	26
2.5.3 Ocratoxina A.....	26
2.5.4 Tricotecenos.....	27
2.6 Aditivos Anti-Micotoxinas.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Produção do Núcleo de Contaminação por Aflatoxinas.....	34
3.2 Local do Experimento.....	36
3.3 Experimento <i>In Vivo</i>	38
3.4 Análises Pós Experimento <i>In Vivo</i>	40
3.5 Análises Estatísticas.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Quantificação do Núcleo de Aflatoxinas.....	41
4.2 Avaliação do Peso Vivo e Ganho de Peso Diário das Aves.....	41
4.3 Avaliação do Consumo de Ração das Aves.....	54
4.4 Avaliação da Conversão Alimentar das Aves.....	58
4.5 Análises Bioquímicas Realizadas a partir de Amostras de Sangue Colhidas das Aves.....	62
4.6 Avaliação do Peso Absoluto dos Órgãos (Fígado, Moela, Baço, Coração, Bursa) e Mensuração do Intestino.....	67

4.7 Avaliação do Aspecto Macroscópico do Fígado e Peso Relativo de Fígado e Rins.....	71
4.8 Alterações/Lesões Histopatológicas Observadas em Fígado e Rins.....	77
5 CONCLUSÕES.....	81
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
8 APÊNDICES.....	97

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é o ramo da agricultura que trata principalmente da criação de frangos de corte e galinhas poedeiras, e tem se destacado em território nacional por condições favoráveis de clima e área, organização da mão de obra e, biossegurança, tornando o Brasil um dos principais pólos avícolas do mundo. Toda evolução na avicultura de corte brasileira ocorreu em três décadas, e atualmente nosso país é o terceiro colocado em produção de carne de frango e maior exportador mundial deste produto. Logo, problemas de sanidade que afetam as criações devem ser tratados com mais cautela, tendo em vista os enormes prejuízos que causam em criações de larga escala, dentre estes problemas encontram-se as micotoxinas. Essas toxinas são produtos gerados durante o metabolismo secundário após o crescimento indesejável de algumas espécies de fungos filamentosos.

O crescimento fúngico pode ocorrer em uma grande diversidade de alimentos, e os cereais constituintes da ração são um perfeito substrato de crescimento. É claro que o manejo preventivo do crescimento fúngico por boas práticas agrícolas e de fabricação (de rações e insumos agrícolas) é o ideal, porém nem sempre todo esforço é capaz de evitar por completo a contaminação.

Muitas são as micotoxinas que afetam as aves, como aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas e tricotecenos, e diversas são as espécies de fungos atualmente conhecidas como capazes de produzir uma ou mais toxinas, em função do substrato, da cepa fúngica envolvida, da temperatura, umidade relativa e atividade aquosa, dentre outros fatores. Os fungos que as produzem se desenvolvem bem usando os grãos e cereais como substratos, tais como milho, e outros produtos base da fabricação de rações e não se pode também descartar a possibilidade desse crescimento fúngico na ração terminada, dependendo das suas condições de transporte, embalagem e armazenagem. E o pior, a grande estabilidade química das micotoxinas lhes permite a persistência no alimento mesmo após a morte dos fungos pelos processos comuns de industrialização e embalagem. Dentre as espécies toxígenas isoladas a partir de cereais em nosso país destacam-se as pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

Dentre as micotoxinas que afetam a avicultura mundial, as aflatoxinas, produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, merecem especial atenção.

São micotoxinas hepatotóxicas, imunossupressoras, que afetam direta e negativamente parâmetros como consumo de alimento e ganho de peso e conseqüentemente geram muitos prejuízos ao setor avícola. Os principais tipos de aflatoxinas identificados são B₁, G₁, B₂ e G₂, em ordem de toxidez. Quando esta micotoxina é ingerida pelos animais pode depositar-se em músculos ou ser excretada no leite, e estes alimentos tornam-se veículos de micotoxicose secundária. A aflatoxina B₁ (AFB₁) inclusive já é reconhecidamente um perigoso hepatocarcinógeno para animais e humanos. A legislação brasileira (BRASIL, 1996) admite um nível máximo de contaminação por aflatoxinas totais (AF) equivalente a 20 µg Kg⁻¹ (ppb), referente a qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou ingrediente de rações destinadas ao consumo animal. Para alimentos destinados ao consumo humano o limite máximo tolerado varia de 1 µg Kg⁻¹ (cereais para alimentação infantil) a 20 µg Kg⁻¹ (milho e farinhas de milho e derivados) (BRASIL, 2011), mas esses níveis ainda são altos se comparados com os adotados pela União Européia, principalmente para alimentação animal, e com o tempo, o ideal seria a diminuição desses limites estabelecidos.

Uma solução para diminuir a biodisponibilidade das aflatoxinas na alimentação animal é o uso de antioxidantes sintéticos e adsorventes inorgânicos de micotoxinas, como aluminossilicatos e as bentonitas. Apesar do avanço dos estudos nessa área, não está completamente estabelecida qual a segurança da presença desses tipos de compostos químicos nos alimentos, e as possibilidades de obtenção de novos compostos, que cumpram com os requisitos ambientais e os requerimentos de segurança alimentar são escassas.

Segundo a Portaria nº 13 de 24 de Maio de 2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), foi sugerida a substituição do termo “adsorvente de micotoxinas” pela denominação geral aditivos anti-micotoxinas (AAM), deixando bem claro que essa denominação incluía os produtos que, adicionados ao alimento para animais, eram capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou bio-transformar as micotoxinas (BRASIL, 2006). A maior parte dos AAMs exerce dentro do animal um efeito de quimio-adsorção, e devem ter capacidade para unir-se de uma forma eficaz às micotoxinas e bloqueá-las no trato gastrointestinal, dando lugar a compostos estáveis e irreversíveis que posteriormente serão eliminados pelas fezes. Desta forma, a bio-disponibilidade da micotoxina fica reduzida, evitando os efeitos indesejáveis que esta produz.

Um desses produtos evidenciados como eficiente AAM é a PCL: A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* possui como constituintes os mananos, responsáveis pela propriedade prebiótica da parede (modificação da microflora e melhoria da integridade intestinal, e modulação do sistema imune principalmente), e a porção de β-glucanos, que

também teria a capacidade de estimular o sistema imune, porém sua função de interesse neste estudo é a de adsorver micotoxinas ingeridas na dieta. Estes AAMs são capazes de ligar-se eficientemente a diversas micotoxinas, como aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona. Porém os resultados dos estudos são diversos, mostrando que provavelmente mais fatores interferem para a eficiência da adsorção, como diferenças entre cepas da levedura, condições ambientais, e quantidade glucomanas esterificadas na composição do aditivo.

É necessária a busca de novos AAMs que cumpram os requisitos ambientais e de segurança e que sejam altamente eficazes contra os efeitos tóxicos das micotoxinas, já que estas afetam negativamente a produtividade da avicultura no Brasil. A PCL é um aditivo que além de seguro já é utilizado na alimentação animal há décadas por ser considerado um prebiótico capaz de melhorar o desempenho de frangos. Frente a isso, este trabalho propõe-se a avaliar três diferentes aditivos anti-micotoxinas em uma intoxicação experimental por aflatoxinas em frangos de corte até os 21 dias de idade. Cada um dos três tem sua constituição particular, porém todos possuem como base a PCL, mais especificamente parede celular de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Com base nisso propõe-se:

1.2 Hipótese

AAMs à base de PCL incorporados na alimentação animal são capazes de reduzir os efeitos da aflatoxicose em frangos de corte, porém a composição geral do produto influencia na capacidade adsortiva do AAM.

1.3 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de três diferentes AAM à base de PCL em condição de intoxicação experimental por aflatoxinas em frangos de corte até os 21 dias de idade.

1.4 Objetivos Específicos

- a) Produção do núcleo de contaminação por AFB₁ em arroz;
- b) Formação dos grupos experimentais dos ensaios *in vivo*;
- c) Calcular ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar;

d) Comparar peso absoluto dos órgãos, mensuração de intestinos, e peso relativo de fígado e rins;

e) Proceder com análises bioquímicas enzimáticas hepática e renal;

f) Avaliação macroscópica e histopatológica de fígado e rins;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Avicultura no Brasil e no Mundo

A avicultura é um ramo da agricultura que trata da criação de frangos de corte e galinhas para a postura dentre outras, e tem se destacado nas últimas décadas no Brasil como um dos setores agrícolas que apresenta maior dinamismo. O seu crescimento é decorrente, sobretudo, dos avanços tecnológicos nas áreas de genética, nutrição, sanidade e manejo, os quais possibilitaram a instalação de uma indústria altamente eficiente e competitiva em todo o mundo, particularmente no Brasil. Em um sistema com elevado grau de tecnificação e instalações (Figura 1), tal como ocorre na avicultura de modo geral, qualquer fator que afete negativamente a produção, determina enormes prejuízos aos produtores (FRANCISCATO et al., 2006; ROSMANINHO; OLIVEIRA; BITTENCOURT, 2001). Um exemplo disto foi a recente propagação do vírus influenza A (H1N1), em que até 31 de julho de 2009 foi reportado oficialmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS), um total acumulado de mais de 16 mil casos confirmados por laboratórios oficiais, com mais de mil mortes, em todos os continentes. A indústria avícola brasileira não foi acometida (SILVA, 2009).



Figura 1: Exemplo de instalação no Brasil para a criação de grande número de aves para corte

Fonte: RUSSO; FREITAS, 2014

A evolução do Brasil no setor foi tão grande, que no início da década de 70, eram necessários entre 65 e 70 dias para o crescimento e engorda de um frango de corte, que atingia um peso médio final de 1,62 Kg, com um consumo aproximado de 2,2 a 2,4 Kg de ração para 1,0 Kg de ganho de peso, sendo a mortalidade média de 6 a 7%. Atualmente um frango de corte atinge o abate em média com 2,50 kg de peso vivo, aos 42 dias de idade, com conversão alimentar de 1,7 Kg de ração para cada Kg de ganho de peso e uma mortalidade média entre 3 e 5% (SILVA, 2009).

O Brasil é o maior exportador e terceiro produtor (Figura 2) de carne de frangos do mundo e o sétimo produtor de ovos. Somos o terceiro maior produtor de carne de frango, atrás apenas de Estados Unidos e da China, dois dos principais exportadores do produto, respondendo por cerca de 45% das exportações mundiais. O sucesso da carne de frango brasileira é tão grande que ela é consumida em cerca de 150 países.

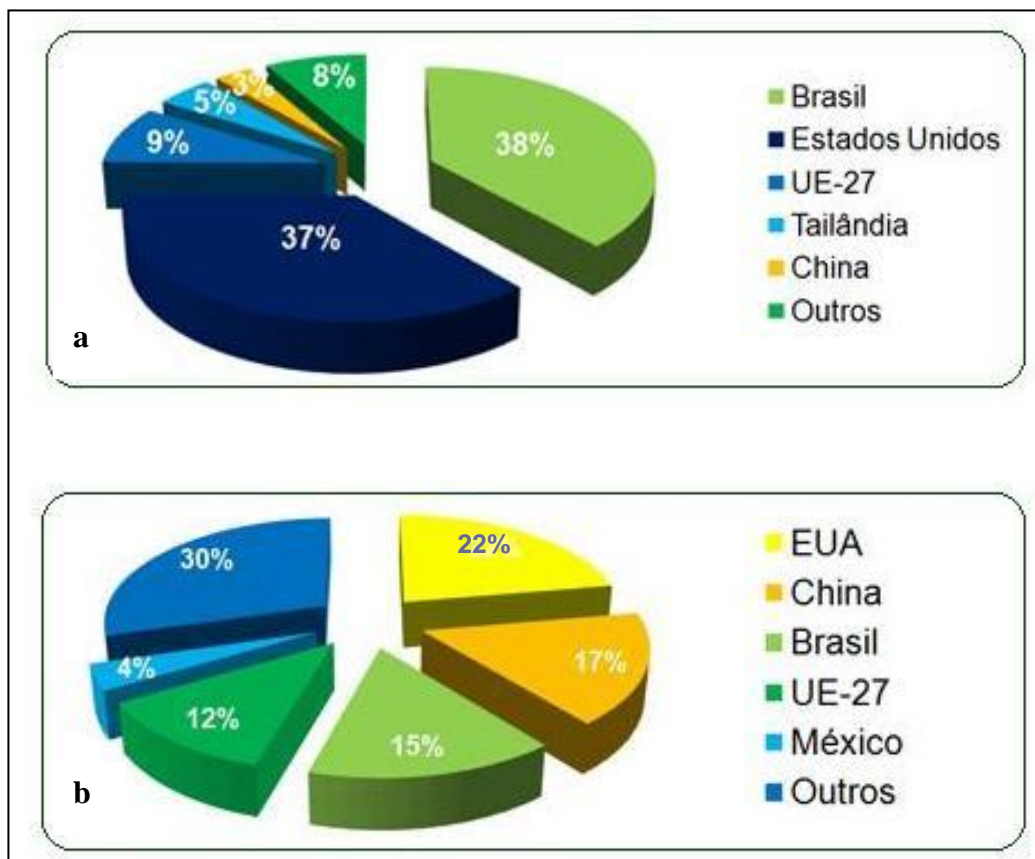


Figura 2: Principais países exportadores da carne de frango no mundo (a) e maiores países produtores de carne de frango no mundo (b).

Fonte: BRAZILIAN CHICKEN (2009)

Segundo Homero (2010), o estado do Rio de Janeiro foi o berço da avicultura nacional no início dos anos 70, e hoje seu volume de produção está abaixo da média nacional, mesmo sendo um grande estado consumidor. Potencial não falta, porém uma das soluções é promover, junto aos criadores, educação em higiene, controle sanitário, técnicas de manejo e os cuidados necessários no processamento, armazenamento e comercialização dos produtos.

2.2 Promotores de Crescimento, Probióticos e Prebióticos na Avicultura Mundial

Nos anos 50, pesquisadores descobriram que dosagens subclínicas de antimicrobianos na ração de aves melhoravam sensivelmente o crescimento e a eficiência de produção. Atualmente, algumas dessas substâncias ainda são utilizadas em razão dos benefícios que apresentam na melhora da eficiência alimentar, diminuição da mortalidade e melhoria do bem-estar das aves. Por outro lado, há uma preocupação crescente de que o uso dessas baixas concentrações de antimicrobianos provoque prevalência de microrganismos resistentes, e a resistência possa ser transferida aos microrganismos patogênicos responsáveis por doenças em humanos (DIONIZIO et al., 2002).

Os antibióticos promotores de crescimento (APCs) são capazes de combater o crescimento bacteriano, possibilitando maior aproveitamento dos alimentos oferecidos às aves, tendo em vista que estes são direcionados ao desenvolvimento da musculatura, e não para manutenção do sistema imune. A eficácia na utilização desses produtos está diretamente relacionada a um bom manejo e suporte nutricional correto (SOUZA, 2009). Eles podem funcionar por vários mecanismos de ação propostos: por efeito direto sobre o metabolismo animal para aqueles que são absorvidos pela parede intestinal; por não recrutar a ação da resposta imune humoral; por efeito nutricional, na ação sobre bactérias que competem por diversos nutrientes com o hospedeiro; por efeito direto sobre o controle de bactérias patogênicas (RUTZ; LIMA, 2001).

O primeiro questionamento envolvendo APCs surgiu na Grã-Bretanha ainda em 1969. Devido ao aumento na ocorrência de amostras de *Salmonella Typhimurium* resistentes a vários antibióticos. O célebre Relatório Swann foi apresentado por cientistas ao Parlamento Inglês recomendando que drogas como as tetraciclinas e as penicilinas, úteis para tratamentos em humanos, fossem banidas como APCs. O uso de tetraciclinas e penicilinas como APCs foi banido em vários países da Europa entre 1972 e 1974, porém continua permitido nos Estados Unidos e outros países. No Brasil, está suspenso o uso de avoparcina e a fabricação, importação e uso de cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona (BRASIL, 2008).

Os aditivos atualmente autorizados no Brasil como promotores de crescimento de frangos de corte são: avilamicina, eritromicina, haloquinol, colistina, flavomicina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina, espiramicina e enramicina (BRASIL, 2008).

Na década de 1980, a ocorrência de amostras de bactérias multiresistentes em geral chamou atenção, levando a Suécia a banir voluntariamente de forma inovadora os APCs em 1986. Esta atitude foi pioneira no uso de princípio de precaução, do qual a Comunidade Européia tem se valido mais que os Estados Unidos, em geral adeptos de tomadas de atitudes frente a conclusões definitivas. Vários relatórios têm recomendado a redução ou eliminação do uso de APCs nos Estados Unidos. Porém, um comitê da Administração de Drogas e Medicamentos (*Food and Drug Administration - FDA*) concluiu, em 1998, não haver informação conclusiva de que o uso de APCs são a causa da resistência em bactérias que infectam humanos. Baseados nesta conclusão, os Estados Unidos não baniram APC algum, embora alguns compostos, como a avoparcina, nunca tenham sido liberados para uso. Em 1995, 93% das rações de frangos continham pelo menos um APC nos Estados Unidos, enquanto em 2002 apenas 60% eram formuladas com APCs, indicando que outros fatores, além das disposições legais do país, estão induzindo à redução de seu uso. Duas cadeias de lanchonetes, pelo menos, passaram a ter normas rígidas quanto ao uso de drogas em rações, o que pode ter funcionado como uma forma de restrição (EMBRAPA, 2010).

Em geral, o bloco americano defende a utilização de antibióticos, já o europeu defende a eliminação de sua utilização. A preocupação é que, bactérias de resistência simples ou múltipla, tal como salmonelas, que são patogênicas para humanos podem ser transferidas de animais ou produtos animais para o homem. Além disso, plasmídios-R (fatores de transferência de resistência a drogas) podem ser transferidos de bactérias *Escherichia coli* para patógenos humanos, produzindo agentes resistentes a vancomicina, como aconteceu com o *Staphylococcus aureus*, por exemplo. É interessante observar que aqueles que se opõem a ação européia de banir o uso de antibióticos como promotores de crescimento justificam dizendo que se trata unicamente de barreira de mercado, sem base científica. E para alguns cientistas, a preocupação do ponto de vista veterinário de que banir a utilização de aditivos antimicrobianos possa resultar no reaparecimento de certos problemas de saúde animal. Por outro lado, os que defendem banir a utilização de APCs sustentam a sua hipótese dizendo que o uso sub-terapêutico prolongado pode reduzir a eficiência de agentes antimicrobianos a níveis terapêuticos usados no tratamento de doenças animais e humanas. Apesar das diferentes opiniões e evidências científicas, vários autores mencionam casos de resistência cruzada. Em conclusão, o uso de APCs para animais tem sido exposto a debates assíduos

(RUTZ; LIMA, 2001). Nesse contexto houve uma grande abertura e evolução no campo de pesquisas da busca de um substituto a altura dos APCs. Merecem destaque os probióticos, prebióticos e simbióticos.

A primeira informação sobre leites fermentados, influenciando a saúde humana, foi publicada por Ilya Metchnikoff (1907), pesquisador do Instituto Pauster de Paris, após observar a longevidade de camponeses búlgaros e atribuir o fato à dieta constituída basicamente de leite fermentado. Pesquisando os componentes do leite, Metchnikoff isolou o *Bacillus bulgaricus*, identificado depois como *Lactobacillus bulgaricus* (LODDI, 2001).

Estima-se que cerca de 90% da microbiota seja composta por bactérias facultativas (aeróbicas e anaeróbicas) e produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.), incluídas as bactérias exclusivamente aeróbicas como *Bacterioides* spp., *Fusobacterium* spp. e *Eubacterium* spp. Os 10 % restantes desta flora são constituídos de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, entre estas *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. e outras. O desequilíbrio, em favor das bactérias indesejáveis, resulta em infecção intestinal severa que, em alguns casos, podem ser fatais (SOUZA, 2009). Portanto, o uso de produtos probióticos contendo células de *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* podem exercer um bom efeito contra a colonização de bactérias patogênicas.

Probióticos são suplementos alimentares que contêm bactérias ou leveduras vivas e que promovem efeitos benéficos ao hospedeiro, por favorecerem o equilíbrio da microbiota intestinal. Apresentam eficácia comprovada sobre a produtividade e saúde animal. Desde a década de 1990 eles vêm sendo utilizados nas criações comerciais de frangos de corte (FARIA et al., 2009). Para serem considerados probióticos, os microorganismos devem ser capazes de sobreviver no ecossistema intestinal e possibilitar, ao organismo, os benefícios da sua presença (SOUZA, 2009). Para os pintinhos eclodidos em incubatórios, sem a oportunidade de receber da ave mãe e do ambiente a microflora natural, a susceptibilidade a microorganismos patogênicos é maior. Logicamente, esse desequilíbrio foi contornado ao longo dos anos pelo uso de APCs, e atualmente o uso de probióticos se torna uma ótima solução (LODDI, 2001). Conclui-se daí, que, quanto mais cedo os animais receberem uma administração de probióticos, melhor será para o desempenho.

Os resultados de pesquisas com probióticos, até o momento, são bastante contraditórios quanto à sua eficiência. Essa contradição observada entre os trabalhos justifica-se mediante os dados obtidos em relação à idade do animal, tipo de probiótico utilizado,

viabilidade de microrganismos a serem agregados às rações e as condições de armazenamento delas (GRANGEIRO, 2012).

A importância da microflora intestinal no controle de agentes patogênicos pode ser explicada pelo princípio da exclusão competitiva. O estabelecimento de uma flora microbiana pode ser interpretada como complementar a funções digestivas do hospedeiro ao aumentar a gama de enzimas digestivas e, em condições normais, fornecer uma barreira contra a invasão de patógenos. A fim de avaliar a eficiência de um probiótico, o mecanismo de ação deve ser definido a fim de que testes apropriados possam ser adotados e os parâmetros corretos medidos (RUTZ; LIMA, 2001; SANTOS; GRANGEIRO, 2012). A maneira de atuação não é completamente entendida, mas inferências incluem: a) influência na atividade metabólica intestinal; b) promoção de competição exclusiva com bactérias patogênicas; c) estimulação do sistema imune; d) supressão da produção de amônia; e) antagonismo direto (produção de ácidos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio).

Os microrganismos utilizados como probióticos são *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. faecium*, bactérias Gram positivas produtoras de ácido láctico, habitantes naturais do trato gastrointestinal e que agem efetivamente como probióticos, aderindo ao epitélio intestinal e colonizando o trato (FERREIRA; KUSSAKAWA, 1999; SANTOS; GRANGEIRO, 2012).

Os probióticos são alternativas, de certa forma, viáveis aos promotores de crescimento antimicrobianos na alimentação de frangos de corte. Apesar disso, ainda há a necessidade de outros estudos para identificar eventuais diferenças entre os probióticos existentes no mercado brasileiro. Inúmeros fatores podem interferir na resposta dos frangos frente aos probióticos, como, por exemplo, idade do lote, desafio sanitário, tipo de microrganismo, agente anticoccidiano, criação em gaiolas ou piso, entre outros (FARIA et al., 2009). Outra forte alternativa em substituição dos APCs são os prebióticos.

Embora o termo prebiótico tenha sido adotado somente em 1995, os estudos sobre eles são mais antigos. Na década de 1950, a descoberta de que o leite humano possui compostos que atuam como inibidores da adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial e potencializam o crescimento das populações de bifidobactérias e lactobacilos, aliviando os sintomas de encefalopatia hepática em bebês incentivou outras explorações sobre o efeito do consumo de compostos não digestíveis na microbiota intestinal (LIMA, 2008).

Para uma substância ser classificada como prebiótico, ela não pode ser hidrolisada ou absorvida na parte superior do trato gastrointestinal, e deve ser um substrato seletivo para um limitado número de bactérias comensais benéficas do cólon, as quais terão crescimento e/ou

metabolismo estimulados, sendo capaz de alterar a microflora intestinal favorável e induzir efeitos benéficos intestinais ou sistêmicos ao hospedeiro. Principais prebióticos: alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, peptídeos, proteínas, álcoois de açúcares e os oligossacarídeos (DIONIZIO et al., 2002). Na literatura, existem relatos da administração de prebióticos na forma de ração, sendo esta a mais praticada devido sua praticidade. A administração em água também é recomendada e usada para experimentos (SOUZA, 2009).

A principal forma de ação dos prebióticos é sobre a modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro. Os efeitos resultantes do uso de prebióticos são evidenciados pelo crescimento das populações microbianas benéficas, pela melhora nas condições luminiais, promovendo o aumento da superfície de absorção da mucosa intestinal, no sistema imune e melhora no desempenho animal (ARAÚJO et al., 2007). Estudos demonstram a capacidade de prebióticos à base de PCL melhorando o consumo de alimento, conversão alimentar e principalmente o peso vivo em frangos de corte (ALBINO et al., 2006; FLEMMING; FREITAS, 2005; GRAHAM; MCCRACKEN, 2005; KAMALZADEH; HOSSEINI; MORADI, 2009).

As substâncias que têm sido mais estudadas como aditivos na alimentação animal são os oligossacarídeos (OLS): especialmente mananoligossacarídeos (MOS) e frutoligossacarídeos (FOS). São produtos comerciais obtidos por hidrólise parcial, ácida ou enzimática, de polissacarídeos ou por reações de transglicosilação. Porém, eles também podem ser obtidos diretamente de sua fonte natural (vegetais, leite, PCL). Neste caso, os alimentos usados na formulação das dietas devem fornecer níveis de OLS suficientes para garantir a sua atuação como agentes prebióticos (GRAHAM; MCCRACKEN, 2005).

Os mecanismos dos MOS são mais complexos, pois são derivados da parede celular interna de leveduras e seu primeiro modo de atuação é ligando-se a certas bactérias patogênicas na área gastrointestinal. Essas bactérias ligadas aos MOS não podem aderir à infecção iniciada no intestino. Algumas bactérias não possuem em suas membranas celulares sítios de ligação para fixação dos OLS, como, por exemplo, a bactéria da classe Clostridia que causa a enterite necrótica no intestino (SOUZA, 2009). A concentração desta bactéria, porém também é reduzida quando os MOS são administrados, o que demonstra um segundo mecanismo de atuação, a modulação ou preparação do sistema imune para uma infecção (ARAÚJO et al., 2007).

Assim sendo, os MOS adicionados à dieta podem aderir às fímbrias bacterianas, bloqueando adesão das bactérias à superfície intestinal. Muitos OLS, quando administrados aos animais, alcançam o cólon sem sofrerem degradação, fornecendo um substrato

particularmente disponível para bactérias benéficas (ARAÚJO et al., 2007). Estudos listam três modos de ação para os MOS: a) adsorção de bactérias patogênicas contendo fímbria (mecanismo receptor análogo ao do epitélio da parede intestinal), b) melhoria da saúde da parede intestinal (integridade e altura dos vilos) e c) estímulo à modulação imunogênica (atua como um antígeno não patogênico tendo um efeito adjuvante) (ARAÚJO et al., 2007). E agora também se atribui a capacidade de adsorver micotoxinas, a fração de β -glucanos da parede, mais especificamente. Logo, podemos dizer que adsorventes à base de parede de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, possuem glucomananos esterificados, e são capazes de ligar-se eficientemente a diversas micotoxinas, como aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona (ABREU et al., 2008; ROSSI et al., 2013; SANTIN et al., 2003).

Os FOS adicionados às rações fornecem carboidratos fermentáveis para as bactérias benéficas nativas que habitam o trato gastrointestinal, minimizando as populações de bactérias patogênicas, como a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., por exclusão competitiva (SOUZA, 2009).

Lima (2008) afirma que os prebióticos são compostos biologicamente seguros à saúde humana e animal, o que justifica seu uso alternativo em substituição a certas drogas veterinárias usadas na prevenção de alterações do trato gastrointestinal e/ou como promotoras do crescimento.

Mais recentemente deu-se início ao uso do termo simbióticos que é a combinação de probiótico e prebiótico. O produto pode melhorar a sobrevivência da flora, pela disponibilidade do seu substrato que leva a uma fermentação, bem como pela complementação da flora benéfica. Dessa forma essa associação possibilita a potencialização de ambos os componentes, sendo estes considerados como aditivos alimentares, que atuam como alimentos funcionais. Dietas suplementadas com MOS ou combinação de MOS com acidificante e probiótico propiciam ganho de peso, conversão alimentar e altura de vilosidades ao nível de duodeno semelhantes a dietas suplementadas com antibióticos (ARAÚJO et al., 2007).

2.3 Os Fungos

Fungos são organismos eucariotos pertencentes ao Reino Fungi, capazes de utilizar uma grande variedade de substratos para obter carbono orgânico, possuem adaptações a uma grande variedade de condições de vida. Por isso, colonizam inúmeros *habitats* (águas doces e salgadas, terra, madeira, estrume, resíduos queimados) e desempenham diversas funções nos

ecossistemas, como decompositores ou parasitas, por exemplo. Por isso são comumente isolados do solo e alimentos. Podemos dividi-los em unicelulares, como leveduras e pluricelulares, que são os fungos filamentosos e basidiomicetos (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2000).

Com a evolução das técnicas moleculares o Reino Fungi sofreu mudanças no arranjo dos vários filos nas últimas décadas. O sub filo Eumycota (fungos verdadeiros) agora reconhece quatro divisões: os Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* se enquadram dentro da divisão Ascomycota, são fungos dotados de septos regulares, e os conídios não estão em esporângios (BRUNS et al., 1993; BRUNS; WHITE; TAYLOR, 1991). O gênero *Aspergillus* compreende muitas espécies benéficas na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos e talvez seja o gênero fúngico mais conhecido no mundo. É um fungo filamentoso que apresenta como característica peculiar conidióforos que formam uma vesícula precedida das fiálides e dos conídios, e em alguns casos, da métula antes das fiálides (Figura 3).



Figura 3: Micrografia eletrônica do gênero *Aspergillus* (200x).

Fonte: PRESCOTT; HARLEY; KLEIN (2002).

Por esta razão o gênero foi catalogado em 1729 pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli, que atribuiu-lhe este nome ao observar sua micromorfologia e encontrar semelhanças com seu instrumento de ofício, o *aspergillum* (borrifador de água santa) (KLICH, 2002). Possuem ações positivas e negativas ao homem. Por exemplo, *Aspergillus niger* é importante na fabricação da progesterona e ácido cítrico; *A. oryzae* na fabricação do saquê (vinho de arroz), enquanto que cepas de *A. fumigatus* são patógenos e produtores de micotoxinas (toxinas produzidas por fungos) e *A. flavus*, *A. niger* e *A. ochraceus* são alguns exemplos (Tabela 1) de produtores de micotoxinas (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009).

Tabela 1. Potencial toxígeno das principais espécies de *Aspergillus* que contaminam produtos vegetais, com destaque para as principais produtoras de aflatoxinas.

Espécies de <i>Aspergillus</i>	Micotoxinas
<i>A. aculeatus</i>	Ácido Secalônico D
<i>A. candidus</i>	Ácido Kójico, Candidulina, Terfenilina, Xantoacina
<i>A. clavatus</i>	Citochalasina E, Patulina, ClavatoI, Triptoquivalonas
<i>A. carbonarius</i>	Rubrofusarina B, Ocratoxina A
<i>A. carneus</i>	Citrinina
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B₁ e B₂ , Aflatrem, Ácido Aspergílico, Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico, Aflavininas, Ácido 3-Nitropropilônico, Paspalininas
<i>A. fumigatus</i>	Fumitremorgens A e C, Gliotoxinas, Fumigaclavinas, Fumitoxinas, Fumigatinas, Fumagilinas, Espinulosinas, Triptoquivalinas, Verruculogem
<i>A. niger</i> agregados	Ocratoxinas, Malforminas, Naftoquinonas
<i>A. niveus</i>	Citrinina
<i>A. nomius</i>	Aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂), Ácido Aspergílico, Ácido Kójico
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas, Ácido Penicílico, Ácido Kójico, Ácido Secalônico A, Xantomegnina, Viomeleina
<i>A. oryzae</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico, Ácido 3-Nitropropilônico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) , Ácido Aspergílico, Ácido Kójico, Aflavininas
<i>A. tamaritii</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico
<i>A. terreus</i>	Citrinina, Patulina, Citreoviridina, Mevinolina, Territrems, Ácido Terréico, Terramide A
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina, Versicolorinas, Nidulotoxinas
<i>A. wentii</i>	Metilxantonas, Ácido 3-Nitropropilônico, Ácido Kójico

Fonte: PITT; HOCKING (2009).

As principais espécies produtoras de aflatoxinas são pertencentes ao gênero *Aspergillus*: *A. flavus* e *A. parasiticus*. *Aspergillus flavus* é mais comumente isolado de grãos e cereais, porém ambos são contaminantes de alimentos. Macroscopicamente ambos apresentam conídios abundantes com uma coloração que varia do verde ao verde-oliva (Figura 4), com um suave micélio branco. Porém a maioria das cepas de *A. parasiticus* apresenta colônias de coloração oliva escuro ou verde bem escuro. O reverso é pálido, e em algumas colônias de *A. flavus* pode ser alaranjado, podendo haver presença de exsudato transparente e esclerócios (estruturas de resistência fúngica). O aspecto das colônias é pulverulento, podendo aparentar flocoso no caso de *A. flavus* (SAMSON et al., 2000).



Figura 4: *Aspergillus flavus* crescendo sobre um grão de milho

Fonte: CORNELL UNIVERSITY (2005).

Microscopicamente ambos apresentam vesículas esféricas e radiadas. *A. flavus* geralmente é bisseriado, mas pode se apresentar unisseriado como *A. parasiticus*, e a principal diferença entre eles é a rugosidade bem notada dos conídios e às vezes das estipes de *A. parasiticus* (Figura 5) (KLICH, 2002; PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2000).

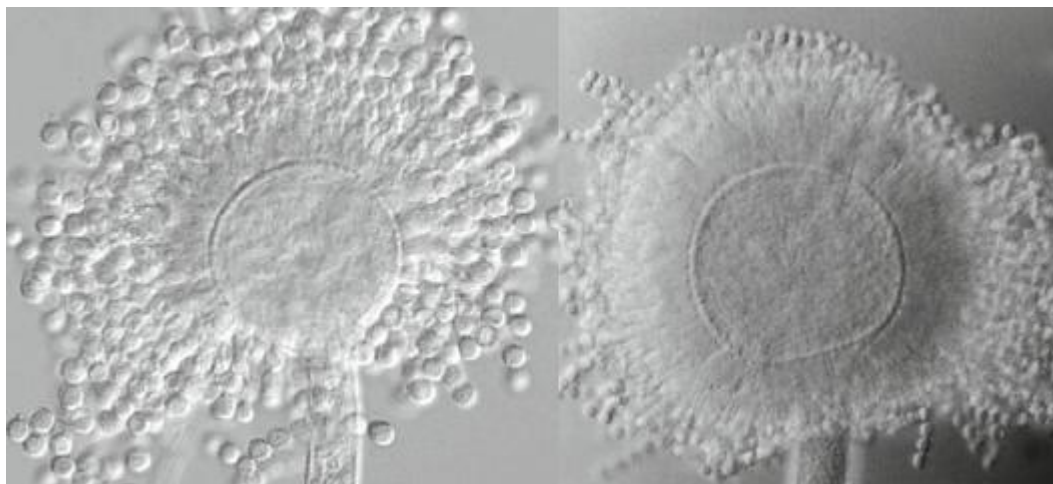


Figura 5: Microscopia (400 x) de *Aspergillus parasiticus* (à esquerda) e *Aspergillus flavus* (à direita).

Fonte: PITT; HOCKING (2009).

Os fungos unicelulares são representados pelas leveduras. Elas podem reproduzir-se por brotamento ou fissão binária, e podem ser aeróbicos obrigatórios ou anaeróbicos facultativos (leveduras de interesse para uso na nutrição animal). Na ausência de oxigênio, algumas leveduras obtêm sua energia pela conversão de carboidratos em etanol e gás carbônico (fermentação). A levedura mais estudada no mundo é *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6), conhecida como levedura de panificação, microorganismo considerado seguro (*Generally Recognised As Safe* - GRAS), não patógeno, não cancerígeno e não invasivo (PITT; HOCKING, 2009; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

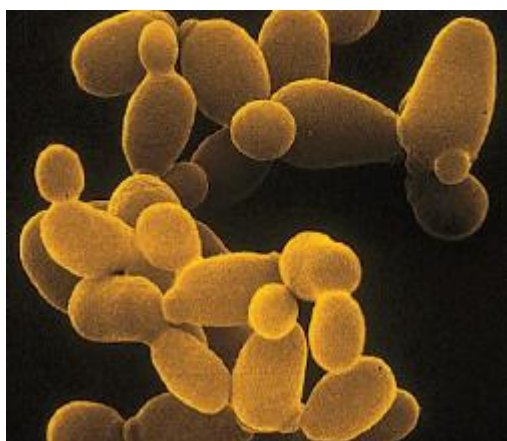


Figura 6: Micrografia eletrônica (21000 x) de *Sacharomyces cerevisiae*, a levedura mais estudada no mundo.

Fonte: PRESCOTT; HARLEY; KLEIN (2002).

As leveduras têm sido usadas pelo homem há milhares de anos para a produção de pão, vinho e outros produtos alimentícios, sendo ainda um sub-produto da produção de cerveja e mais recentemente, da produção de etanol. Sua utilização na nutrição animal tem sido feita considerando-se sua composição nutricional. Tais produtos incluem leveduras vivas, mortas, parede celular, conteúdo celular e leveduras enriquecidas por minerais. O conteúdo celular, utilizado na alimentação de animais como prebiótico, é isolado após autólise ou hidrólise ácida e contém peptídeos, proteínas e nucleotídeos. O resíduo da parede celular (Figura 7) é formado basicamente por dois carboidratos: mananos e β -(1,3), (1,6) glucanos, ambos indigeríveis pelas enzimas do trato gastrointestinal dos animais. Constituem mais da metade da parede celular de levedura: em média, de 27% a 30% do peso seco da levedura cada um, porém suas quantidades variam de acordo com a cepa (GRAHAM; MCCRACKEN, 2005).

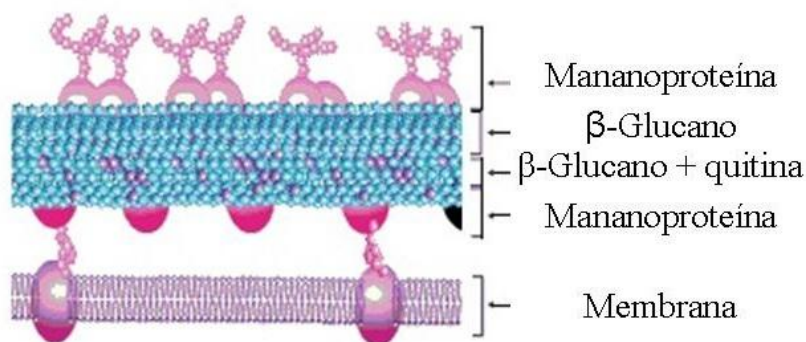


Figura 7: Esquema de parede celular de levedura.

Fonte: www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles

2.4 Micotoxinas e a Micotoxicologia

A micotoxicologia pode ser definida como o estudo das micotoxinas, dos fungos produtores e das medidas de prevenção e controle. Micotoxinas são metabólitos tóxicos de baixo peso molecular, produzidas como resultado do metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos. É o maior problema de saúde de caráter crônico que pode ser veiculado pela alimentação (DAGHIR, 2008). Observamos sua presença em uma grande diversidade de produtos agrícolas, e os gêneros que abrangem a maioria das espécies produtoras de micotoxinas são: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (SASSAHARA; YANAKA; NETTO, 2003). Porém, só apenas há algumas décadas o mecanismo de ação dessas toxinas foi

esclarecido, tendo assim o conceito completo de que fungos filamentosos crescendo em alimentos produzem micotoxinas, e que estas são capazes de afetar órgãos e sistemas como o fígado, rins, sistema nervoso, endócrino, e imune (PITT; HOCKING, 2009). Há muitos séculos se conhece a toxicidade de certos fungos. Na década de 1850, relacionou-se a ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* com as características clínicas do ergotismo, e foi levantada a possibilidade de haver risco à saúde humana e animal pela ingestão de alimentos mofados (SANTURIO, 2000). É a micotoxicose mais antiga de que se tem conhecimento, vários surtos da doença ocorreram na Europa durante a Idade Média. A contaminação do centeio por este fungo era tão comum que estava inclusive representado nas ilustrações da espécie de centeio. As micotoxinas de *Claviceps purpurea* produzem uma sensação de fogo nas extremidades do corpo (mãos e pés) e alucinações, podendo levar à morte (SERRA, 2005).

A primeira descoberta relevante para o mundo sobre a importância dos metabólitos secundários produzidos por fungos foi graças a descoberta de Alexander Fleming em 1929, ao perceber as potencialidades antibióticas da penicilina, produzida pela espécie *Penicillium notatum*. A relevância da descoberta a exploração da penicilina como agente terapêutico na cura contra doenças bacterianas (SERRA, 2005). Esta foi uma feliz descoberta, porém muitos metabólitos produzidos por fungos apresentam alta toxidez a homens e animais.

O fato de que a ingestão de cereais contaminados com fungos podia levar a doenças foi também reconhecido na Rússia, devido à ingestão de cereais que foram deixados nos campos após o Inverno. A aleukia tóxica alimentar (ATA) é uma toxicose que cursa com gastroenterite, inflamação das mucosas e até sintomas neurológicos. A história conturbada de guerras da Rússia nem sempre permitiu a existência de mão-de-obra para a colheita dos campos, o que se verificou na segunda guerra mundial e nos anos que a seguiram. Entre 1942-1947, verificaram-se violentos surtos de ATA, levando à morte milhares de pessoas (SERRA, 2005; KRÜGER, 2006).

Foi na década de 60 que ocorreu o fato mais marcante da história das micotoxinas. Mais de cem mil perus morreram na Inglaterra por causa considerada indeterminada, causando um prejuízo enorme aos criadores das aves. Enquanto o fator determinante da doença era desconhecido, reportava-se a ela como “doença X dos perus” (SARGEANT et al., 1961; CAMPOS, 1999). As investigações procederam, e a hipótese levantada sobre um agente externo causador, veiculado pelo alimento, levou ao exame dos ingredientes pela produção de extratos a partir de vários solventes, paralelamente a pesquisa microbiológica. Foi assim que se descobriu que a causa era uma toxina, produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*. O nome

dado a micotoxina foi inspirado no nome do fungo produtor - aflatoxina - que estava ricamente presente no amendoim, ingrediente importado do Brasil presente na ração dos animais (SARGEANT et al., 1961). A partir deste ocorrido, diversos cientistas reuniram esforços e moveram suas pesquisas para a elucidação deste tema complexo que é a micotoxicologia. Hoje sabe-se que dentre as micotoxinas que contaminam os alimentos, as mais estudadas e de maior importância econômica são as aflatoxinas, a zearalenona, os tricotecenos, as fumonisinas e a ocratoxina A (SASSAHARA; YANAKA; NETTO, 2003).

Recentemente foi reportado no Brasil um surto de beribéri ocasionado por uma micotoxina. Beribéri é uma doença carencial que pode ter outras causas, neste caso, a toxina citreoviridina, produzida pelo fungo *Penicillium citreonigrum*, inibe a absorção da vitamina B₁ pelo organismo, o que causa o beribéri. A doença levou mais de 40 pessoas a morte e deixou cerca de 550 doentes nos anos de 2006 e 2007 no Maranhão. Sua ocorrência era conhecida por estar implicada na ocorrência de surtos de beribéri, por ingestão de arroz contaminado por este fungo no Japão em 1910, e quase cem anos depois o surto foi elucidado e contornado graças aos esforços de micotoxicologistas e outros pesquisadores no Brasil (ROSA et al., 2010).

A gravidade das micotoxicoses depende, entre outros fatores, da sua toxidez, do grau e tempo de exposição, da idade e do estado nutricional do indivíduo. Micotoxinas são também consideradas graves problemas em nível sócio-econômico, sendo responsáveis por elevadíssimas perdas econômicas na produção de cereais, na redução do valor nutricional dos alimentos e ainda nas conseqüentes perdas devidas a doenças e mortes de animais e até mesmo de grupos de animais alimentados com rações contaminadas (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006). Geralmente, a contaminação por micotoxinas se associa ao manejo inadequado das plantações, colheita, armazenamento e transporte em condições inapropriadas. Os principais fatores a se considerar na produção de micotoxinas por fungos em grãos são: umidade e temperatura (ASTORECA et al., 2009; ROSA et al., 2006).

As micotoxicoses podem ser primárias e secundárias. A micotoxicose primária ocorre com o consumo direto dos produtos contaminados, e a secundária ocorre ao se ingerir leite, carne, ovos ou derivados de animais que ingeriram alimento contaminado. A micotoxicose não é contagiosa e o tratamento com drogas produz pouco ou nenhum efeito. Geralmente se apresenta como surto associado com um alimento ou forragem específica, onde o exame do material suspeito revela a atividade fúngica (LILLEHOJ, 1991). A principal via de contaminação é a digestiva, porém também é descrita a via aérea, onde diversas micotoxinas já foram detectadas em grãos de poeira orgânica e esporos de fungos. Foi relatado que estas

substâncias podem penetrar os alvéolos pulmonares, causando alterações imunológicas e inflamatórias locais, entre outros efeitos (SORENSEN, 1999).

A identificação das espécies fúngicas contaminantes é um importante sinalizador quanto à presença de micotoxinas nos substratos, e indica o caminho para prevenir a sua produção. Entretanto, a identificação desses fungos nem sempre estão ligados à detecção de micotoxinas no produto analisado, pois, cepas dentro de uma mesma espécie podem não possuir a capacidade para síntese de micotoxinas, logo, sugere-se a realização do perfil toxígeno das espécies isoladas (FARIAS et al., 2000).

2.5 Micotoxinas na Avicultura

As micotoxinas que mais afetam a avicultura são as aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas e T-2 toxina. As aflatoxinas têm como alvo o sistema hepático, causando profundas alterações na síntese de proteínas nas aves. São atualmente as mais estudadas devido aos maiores impactos sobre o desempenho produtivo e reprodutivo das aves e conseqüentemente maior impacto econômico. Em segundo estão as fumonisinas, tendo sua atuação na interferência sobre a síntese dos esfingolipídios, principais constituintes da membrana celular. A ocratoxina A tem sua ação principalmente no sistema renal das aves, afetando a filtração glomerular. E dentre os tricotecenos, a toxina T-2 provoca lesões necróticas orais e alterações no sistema nervoso (DAGHIR, 2008).

2.5.1 Aflatoxinas

Aflatoxinas são micotoxinas produzidas principalmente por duas espécies fúngicas do gênero *Aspergillus*: *A. flavus* e *A. parasiticus*, que se desenvolvem naturalmente em gêneros alimentícios, como por exemplo, amendoim, milho, arroz, feijão e trigo. Alguns substratos são extremamente favoráveis ao crescimento de fungos aflatoxigênicos e à formação de aflatoxinas. A contaminação natural de cereais, sementes oleaginosas, amêndoas, amendoim e especiarias é ocorrência comum em inúmeros países (FREIRE et al., 2007). Em 1993, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) considerou as aflatoxinas como carcinogênicas para humanos (grupo 1) (IARC, 1993).

O fungo *A. flavus* é capaz de produzir as aflatoxinas B₁ e B₂, sendo a aflatoxina B₁ a mais freqüente e mais tóxica, é também reconhecida como o mais potente hepatocarcinógeno para homem e animais. Já *A. parasiticus* é capaz de produzir as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

ocorrendo principalmente nas Américas e na África. Caracterizam-se por apresentar alta lipossolubilidade, baixo peso molecular, instabilidade à luz ultravioleta e estabilidade a altas temperaturas (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2000). Em função dessas características, são substâncias facilmente absorvidas no trato gastrointestinal das aves (DAGHIR, 2008). Ao alcançar a circulação sanguínea, podem ligar-se de forma reversível às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, sendo então distribuída aos diversos órgãos, como músculos, rins, tecido adiposo e fígado, e é neste órgão onde ocorre a maior parte do processo de biotransformação das aflatoxinas. A AFB₁ é a que apresenta maior poder toxígeno, seguida de G₁, B₂ e G₂ (Figura 8) (SAMSON et al., 2000).

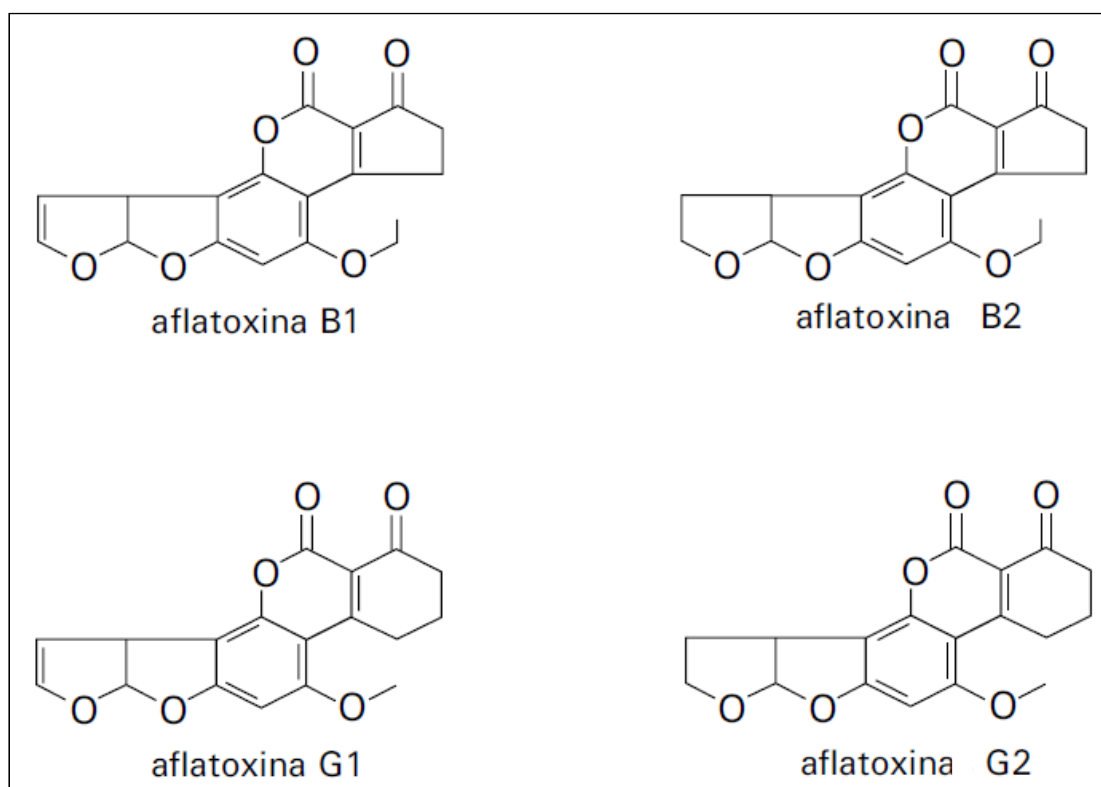


Figura 8: Estruturas química das quatro principais aflatoxinas.

Fonte: FREIRE et al. (2007).

Quando alimentos contendo aflatoxinas são consumidos pelas aves, rapidamente as toxinas são absorvidas, acometendo o fígado (Figura 9), degenerando-o, tornando-o pálido e com volume aumentado (ARAVIND et al., 2003; CARDOSO, 2007; GIACOMINI et al., 2006; LOPES et al., 2006; MIAZZO et al., 2005; SANTIN et al., 2003; RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010; TEDESCO et al., 2004). Os principais sinais clínicos em aves intoxicadas por aflatoxinas incluem anorexia, letargia, palidez da crista, barbela e pés e sinais

nervosos (DAGHIR, 2008). Estudos demonstram que a perda de peso e a diminuição do consumo são sinais comuns em frangos de corte intoxicados com aflatoxinas (CARDOSO, 2007; GIACOMINI et al., 2006; LOPES et al., 2006; MIAZZO et al., 2005; SANTIN et al., 2003; TEDESCO et al., 2004; VALDIVIA et al., 2001; ZHAO et al., 2010).

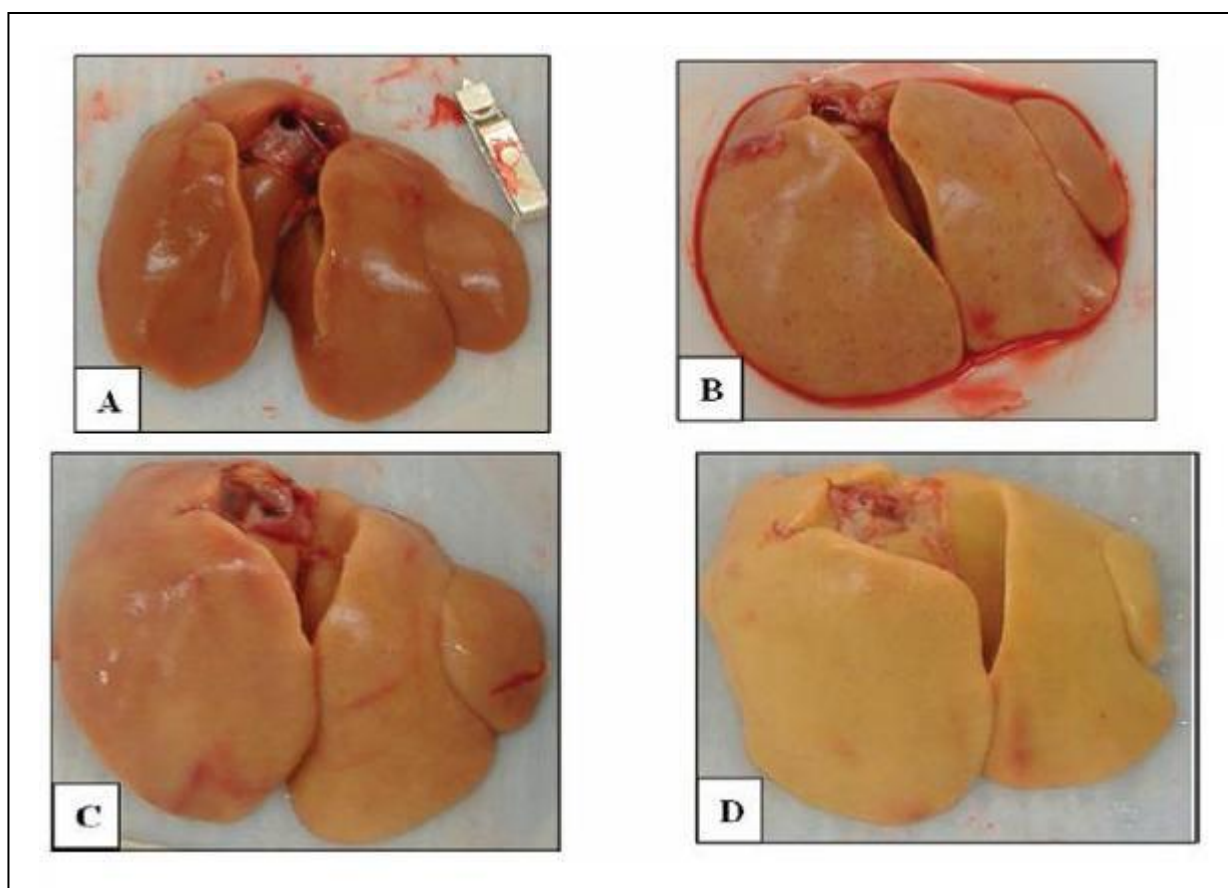


Figura 9: Graus de modificação de cor e tamanho em fígado de frangos de corte causados por degeneração gordurosa equivalentes a concentração de aflatoxinas: A- controle negativo; B – 1 mg Kg⁻¹ de aflatoxina; C – 2 mg Kg⁻¹ de aflatoxina; D – 3 mg Kg⁻¹ de aflatoxina.

Fonte: ZHAO et al. (2010).

Os efeitos deletérios destas micotoxinas em frangos são mais intensos na fase inicial de criação das aves (até os 21 dias de vida), porém o reflexo negativo sobre o ganho de peso é persistente, comprometendo assim toda a criação (FRANCISCATO et al., 2006; GIACOMINI et al., 2006; MIAZZO et al., 2005; ORTATATLI et al., 2005; RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010; ROSA et al., 2001; SANTIN et al., 2003). Outros órgãos como intestino, baço, linfonodos e rins também podem sofrer alterações, principalmente em animais monogástricos como as aves e os suínos (MARIN et al., 2002; ORTATATLI et al., 2005). No caso dos rins

pode ocorrer aumento do tamanho, invasão leucocitária e hemorragia intersticial, alterações que também são vistas em casos de ocratoxicose (Figura 10), além de nefrose tubular renal (AWAAD et al., 2011; VALDIVIA et al., 2001).

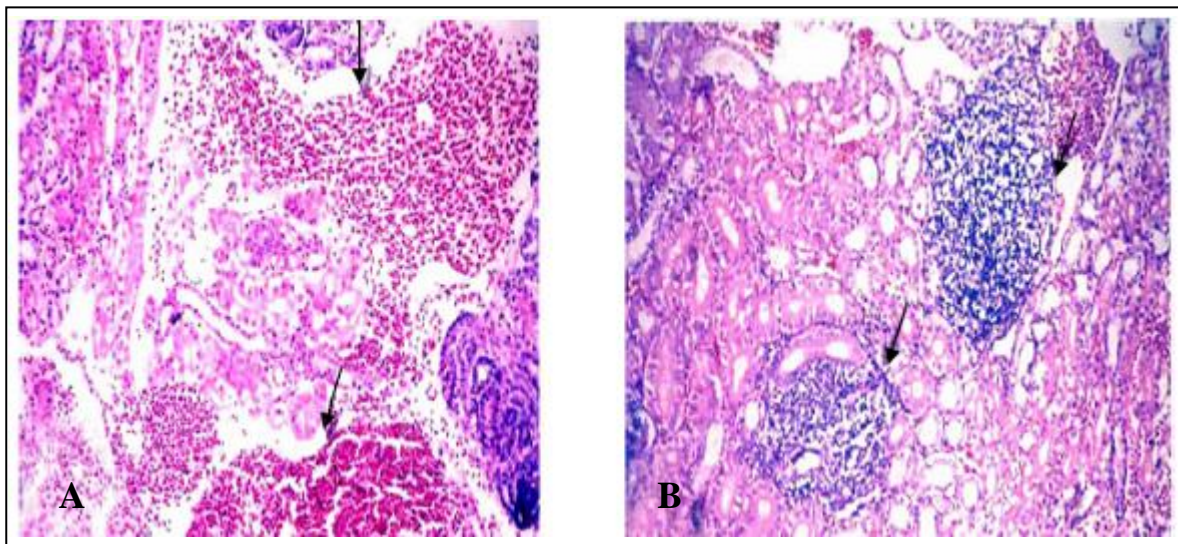


Figura 10: Micrografia (200 x) de amostras de rim de frangos de corte intoxicados com ocratoxinas, exemplificando: 5- hemorragia intersticial maciça; 6 – áreas de necrose com invasão leucocitária.

Fonte: AWAAD et al. (2011).

A degeneração gordurosa hepática (Figura 11) e proliferação dos ductos biliares (Figura 12) são as alterações microscópicas observadas (ORTATATLI et al., 2005; RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010; VALDIVIA et al., 2001; ZHAO et al., 2010) e induzem diversas alterações séricas, constatadas principalmente por coagulopatias, diminuição das concentrações de proteínas totais, albumina, colesterol, glicose, ácido úrico, fósforo inorgânico e cálcio e aumento da atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST), (BATINA et al., 2005; DAGHIR, 2008; FRANCISCATO et al., 2006; GIACOMINI et al., 2006; RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010; TESSARI et al., 2006; VALDIVIA et al., 2001). A bursa e timo, órgão linfóides, são diminuídos e ocorrem modificações na coloração e textura (TESSARI et al., 2006).

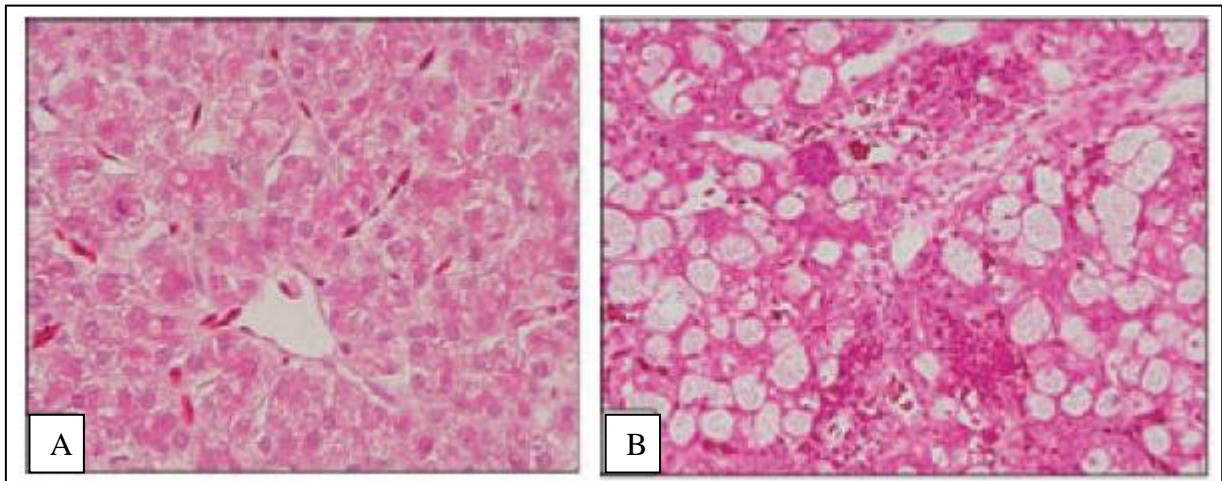


Figura 11: Micrografia (400 x) de amostras de fígado de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas. A: aparência normal do órgão; B: degeneração gordurosa e congestão dos vasos centro-lobulares.

Fonte: ZHAO et al., (2010)

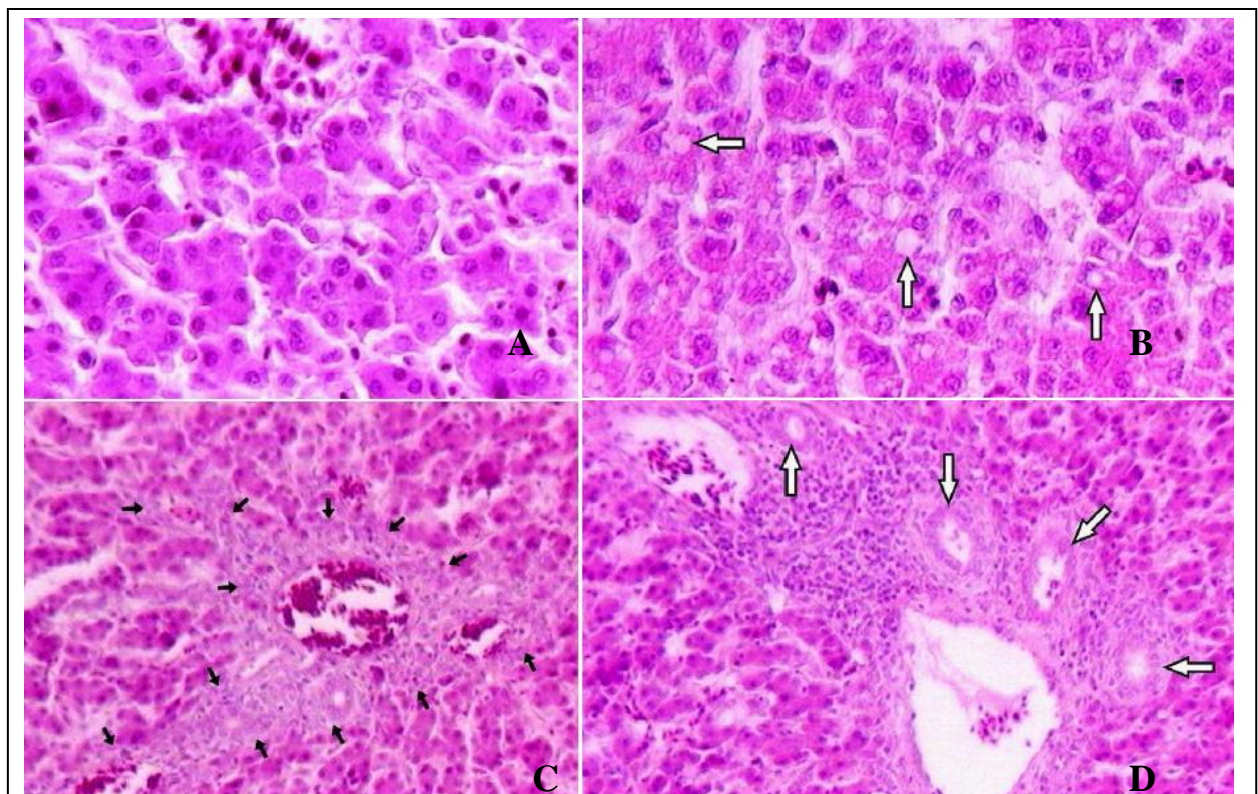


Figura 12: Micrografia (400 x) de amostras de fígado de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas: A- congestão da veia centro-lobular; B- glóbulos de gordura caracterizando uma degeneração esteatosa; C- fibrose periportal; D- proliferação anormal de ductos biliares.

Fonte: ORTATATLI et al. (2005).

A biotransformação das aflatoxinas em compostos ainda mais tóxicos (Figura 13), leva à diminuição da produção de sais biliares, o que compromete o metabolismo de lipídios, aumentando a excreção de gordura, e como consequência queda no desempenho produtivo dos animais (SANTURIO, 2000).

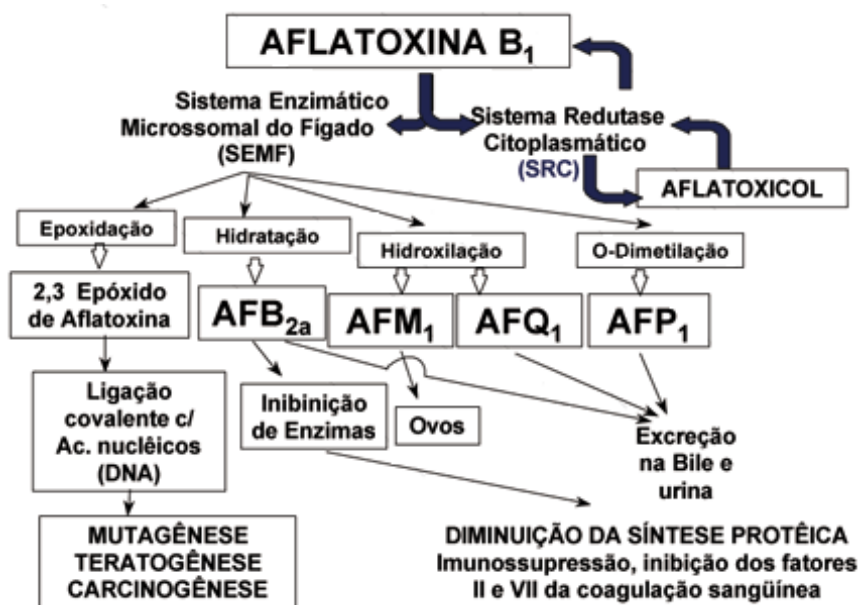


Figura 13: Metabolismo das aflatoxinas no organismo das aves.

Fonte: SANTURIO (2000).

A legislação brasileira (BRASIL, 1996) admite um nível máximo de contaminação por aflatoxinas totais equivalente a $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (ppb), referente a qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou ingrediente de rações destinadas ao consumo animal. Para alimentos destinados ao consumo humano o limite máximo tolerado varia de $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (cereais para alimentação infantil) a $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (milho e farinhas de milho) (BRASIL, 2011), mas esses níveis ainda são altos se comparados com os adotados pela União Européia, que é de $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para alimentação humana e $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para rações prontas para consumo animal (UNIÃO EUROPÉIA, 2001). Com base em esforços mútuos de produtores e governo o ideal seria a diminuição desses limites estabelecidos.

2.5.2 Fumonisinias

A fumonisinina B₁ (FB₁) é o principal metabólito produzido pelos fungos *Fusarium proliferatum*, e *F. verticillioides* (SWAMY, 2004), sendo este último o principal produtor, além de ser uma micotoxina muito difundida no milho, que constitui hoje a base da alimentação animal, e em aves têm associação com redução do desempenho, imunidade e levar a mortalidade, comprometendo principalmente a criação industrial (LI et al., 1999). As fumonisinias são estruturalmente similares aos esfingolipídios. Assim, o mecanismo de toxicidade consiste na inibição da ceramida sintetase, enzima responsável pela síntese de esfingolipídios. Essa inibição acarreta aumento da concentração de esfinganina e esfingosina no soro dos animais expostos a esta micotoxina (LEDOUX; WEIBKING; ROTTINGHAUS, 1997).

Estudos demonstram que fumonisinias são capazes de diminuir o desempenho de frangos de corte, causar aumento do peso de órgãos como fígado, pulmão e rins, provocar diarreia e em alguns casos raquitismo. Na análise histopatológica observamos necrose hepática multifocal e hiperplasia biliar (DAGHIR, 2008; LEDOUX; WEIBKING; ROTTINGHAUS, 1997), porém tais efeitos dependem das condições de criação e quantidade de fumonisinias na dieta. Li et al. (1999) em seus estudos por exemplo, não observaram queda no desempenho zootécnico em frangos alimentados com 200 µg Kg⁻¹ de FB₁, entretanto observaram diminuição na imunidade humoral e na supressão de linfócitos, concluindo assim que a imunossupressão é um dos grandes prejuízos causados pelas FB₁, e esta pode potencialmente piorar o desempenho dos animais. E Miazzi et al. (2005), somente observaram piora no ganho de peso e na conversão alimentar quando 200 mg Kg⁻¹ de FB₁ foram administrados na dieta juntamente com 2,5 mg Kg⁻¹ de AFB₁, porém a FB₁ isolada não produziu efeitos.

2.3.3 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) é uma nefrotoxina com grande impacto na produção aviária e suína, responsável pela denominada nefropatia micotóxica nestes animais (SCUSSEL, 1998). Em frangos de corte, achados patológicos incluem desidratação grave e emagrecimento, hemorragias proventricular e visceral, com depósitos brancos de urato ao longo da cavidade do corpo e órgãos internos. Como o órgão alvo é o rim, há alteração da função renal através da necrose e ruptura dos túbulos proximais (DAGHIR, 2008), alteração do volume dos rins,

alteração da osmolaridade da urina, aumento do volume de urina, diminuição do *clearance*, diminuição da atividade enzimática do rim e desenvolvimento de adenomas e tumores renais (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).

As principais espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA são *A. ochraceus* (DAGHIR, 2008), *A. niger* agregados, *A. carbonarius*. Algumas espécies de *Penicillium* sp. também podem produzir ocratoxinas, como *P. verrucosum*, no entanto em nosso país, com regiões de clima tropical e subtropical, destacam-se as espécies *A. ochraceus*, *A. niger* agregados e *A. carbonarius* (SCUSSEL, 1998).

Segundo a Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer (IARC), a OTA foi classificada como pertencente à categoria 2b, isto é, um possível carcinógeno para o homem com evidências para animais (LEGARDA; BURDASPAL, 1998). Baseada na sua carcinogenicidade, a OMS propôs um limite máximo de OTA de 5 µg Kg⁻¹ (ppb) em cereais (ABARCA et al., 2001). Resíduos da OTA foram encontrados no fígado, rim e músculo de aves dias após a exposição, mas não em ovos, gordura ou pele. Sugere-se então a importância da manutenção dos baixos níveis de ocratoxina no conteúdo da alimentação, pois esta pode se acumular em tecidos de aves e seus efeitos cancerígenos ao homem não podem ser excluídos (DAGHIR, 2008).

2.5.4 Tricotecenos

As micotoxinas deste grupo são produzidas por diversos gêneros de fungos: *Fusarium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon*, e *Trichothecium*, do qual o nome tricoteceno foi derivado. Apesar do grande número destes compostos na natureza, somente pequena quantidade, menos de 10, têm sido detectados a partir de contaminação natural em alimentos, tais como desoxinivalenol (DON), nivalenol, toxina T-2, diacetoxiscirpenol e toxina HT-2. (DAGHIR, 2008; FREIRE et al., 2007). Entre estas a de maior preocupação no cenário da avicultura é a toxina T-2.

T-2 é um tricoteceno produzido por *Fusarium tricinctum*. Em estudos iniciais lidar com tricotecenos em aves, foi visto que lesões necróticas e alterações no sistema nervoso (como posicionamento anormal de asas e convulsões) podem ser produzidas em frangos jovens alimentados com uma dieta contendo esta toxina. Estes estudos mostraram que o grau de necrose oral foi dose-dependente, e que este foi o principal efeito da intoxicação por T-2 (Figura 14) (DAGHIR, 2008).



Figura 14: Lesões orais provocadas por toxina T-2 em frango de corte.

Fonte: TECSA (2010).

As lesões ocorreram a partir de doses que não foram capazes de prejudicar o ganho de peso, consumo de ração ou mesmo a eficiência alimentar. Estas lesões aparecem em primeiro lugar no palato duro, ao longo da margem da língua, e depois em torno do canto do bico. São lesões altas, branco-amareladas e algumas vezes com textura caseosa (DAGHIR, 2008).

2.6 Aditivos Anti-Micotoxinas

O primeiro ponto a se pensar para controle das micotoxinas é prevenção. Toda a prevenção e controle do crescimento fúngico consiste em controlar seu ambiente por boas práticas agrícolas e de fabricação. A seleção das sementes, rotação de culturas, cuidados no campo e com maquinário, procedimentos corretos de secagem, armazenamento e transporte são alguns dos pontos-chave a se trabalhar quando se trata de prevenção. Mesmo com a conscientização do risco das micotoxinas e de como prevenir o problema, pesquisas demonstram a presença de fungos e micotoxinas em uma grande diversidade de alimentos destinados a humanos e animais. No caso da avicultura, há diversos relatos da contaminação do alimento produzido e destinado às aves por aflatoxinas e da colonização por fungos aflatoxígenos (ALMEIDA et al., 2009; DAGHIR, 2008; DALCERO et al., 1997; DALCERO et al., 1998; KHAN et al., 2011; MAGNOLI, et al., 1998; ROSA et al., 2006; ROSMANINHO; OLIVEIRA; BITTENCOURT, 2001; ROSSI et al., 2013; SALLE et al., 2001), o que ressalta a importância de estudos sobre alternativas para a prevenção da aflatoxicose na avicultura, que consiste, como para outras micotoxinas, na prevenção do

estabelecimento de fungos, e no uso de aditivos fungicidas e antimicotoxígenos. No caso de aflatoxinas, também já se sabe a correlação que existe entre níveis de zinco no alimento e aumento da produção da aflatoxina pelos fungos produtores, logo um controle mais rigoroso dos níveis de zinco na fabricação de alimento é uma medida que também auxilia a inibir a produção da toxina (DAGHIR, 2008).

Décadas foram dedicadas à pesquisa sobre o assunto e atualmente diversos fungicidas encontram-se em uso, contudo sua segurança nos alimentos não está completamente estabelecida, e as possibilidades de obtenção de novos compostos, que cumpram com os requisitos ambientais e os requerimentos de segurança são escassas (GOPALKRISHNAN; BANUMATHI; SURESH, 1997).

Antioxidantes sintéticos, como o hidroxibutilanisol (BHA), o hidroxibutiltolueno (BHT), e o propilgalato (PG), são comumente utilizados em alimentos para prevenir ou retardar a oxidação lipídica, evitando assim o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas. Contudo, presume-se que são possíveis carcinógenos (MADHAVI; SALUNKHE, 1996).

Desde o início dos anos noventa, estudos têm sido dirigidos para o uso de adsorventes de aflatoxinas, naturais ou sintéticos, na tentativa de minimizar os efeitos da ingestão de alimento contaminado e da toxidez das aflatoxinas nas aves (OGUZ et al., 2002).

Segundo a Portaria nº 13 de 24 de Maio de 2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), foi proposto ao Ministério pelo grupo técnico de trabalho sobre micotoxinas em alimentação animal a substituição do termo “adsorvente de micotoxinas” pela denominação geral “Aditivos anti-micotoxinas” (AAM), deixando bem claro que essa denominação inclui os produtos que, adicionados ao alimento para animais, são capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou bio-transformar as micotoxinas. Para serem considerados AAM e entrarem no mercado, produtos novos devem passar por ensaios individuais *in vitro* e *in vivo* a fim de garantir a seguridade, capacidade e inocuidade do produto em relação à saúde animal (BRASIL, 2006).

O funcionamento dos adsorventes inorgânicos baseia-se no fato das toxinas se ligarem a estes produtos através de cargas elétricas, fazendo com que as toxinas não sejam absorvidas pelos animais, e sejam eliminadas nas fezes. São argilas de origem vulcânica, como aluminossilicatos e as bentonitas, adicionados à ração animal (FRANCISCATO et al., 2006; LOPES et al., 2006). Um dos inconvenientes do uso de substâncias inorgânicas adsorventes de micotoxinas é sua inespecificidade em sua capacidade de adsorção, já que podem seqüestrar moléculas de alto valor nutritivo da dieta (FRANCISCATO et al., 2006).

Adsorventes à base de PCL, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, possuem glucomananas esterificadas, e são capazes de ligar-se eficientemente a diversas micotoxinas, como aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona (ABREU et al., 2008; ARAVIND et al., 2003; SANTIN et al., 2003). A PCL de *S. cerevisiae* que já é usada nas rações como aditivo prebiótico (GIBSON; ROBERFRONID, 1995), possui como constituintes as mananos, proteínas e β -glucanos (Figura 15). Os mananos são os responsáveis pela propriedade prebiótica da parede já explicada anteriormente, como a modificação da microflora, melhoria da integridade intestinal, e redução do *turnover* e modulação do sistema imune no lúmen intestinal. A porção de β -glucanos também teria a capacidade de estimular os glóbulos brancos do sistema imune, porém sua função nobre seria a de adsorver micotoxinas ingeridas na dieta (GRAHAM; MCCRACKEN, 2005; YIANNIKOURIS et al., 2003).

Yiannikouris et al. (2003) demonstrou uma grande correlação entre a capacidade de adsorção de zearalenona e a concentração de β -glucanos na parede celular (Figura 15) da levedura. Aravind et al. (2003) observou que ração contaminada com aflatoxina, ocratoxina, zearalenona e T-2 reduziu consumo (7%) e peso (9%) aos 35 dias, mas a inclusão de glucomananos esterificados recuperou consumo e peso a valores similares ao controle, além de maior peso e conversão (3,5 e 5%) quando glucomananos esterificados foram adicionados ao controle. Chowdhury e Smith (2004) observaram maior produção de ácido úrico plasmático e menor produção de ovos (10% em 12 semanas) pela presença de fusariotoxinas e a inclusão de glucomananos esterificados restaurou a produção e o ácido úrico a níveis normais.

Estudos anteriores demonstram a capacidade desses aditivos em recuperar o peso corporal e melhorar o consumo de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas (BENITES et al., 2008), como também diminuir ou anular lesões causadas no fígado, rins (ARAVID et al., 2003) e normalizar as concentrações de proteínas séricas, níveis de ácido úrico, AST e ALT. Porém os resultados dos estudos são diversos, mostrando que provavelmente mais fatores interferem para a eficiência da adsorção, como diferenças entre cepas da levedura, condições ambientais, e quantidade glucomananas esterificadas na composição do aditivo.

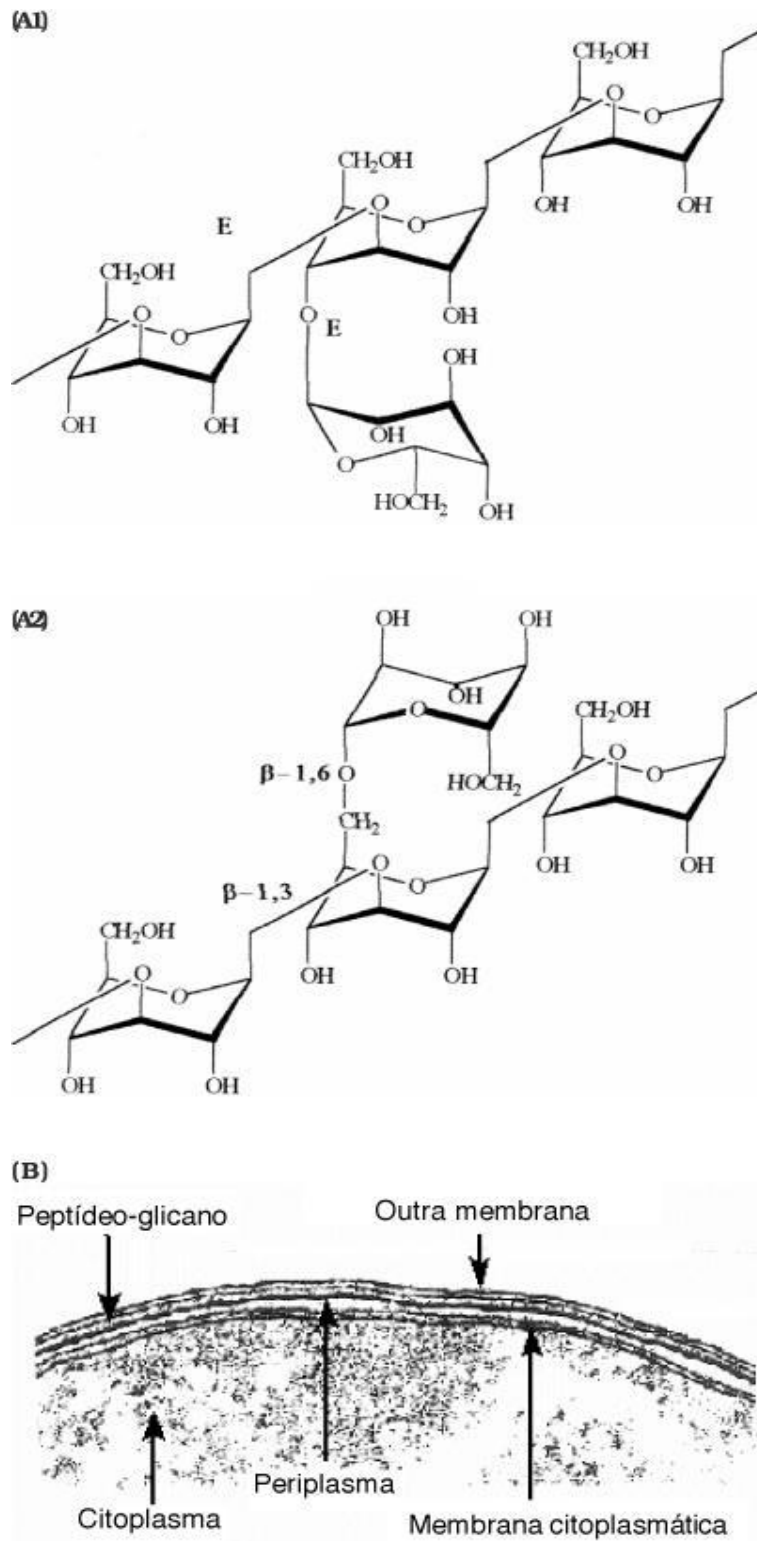


Figura 15: Em A1 e A2 – unidades de β -glucanos encontrados em parede de leveduras e alguns cereais; B – estrutura de parede celular de levedura.

Fonte: PARK et al. (2003).

Porém a capacidade adsortiva se dá graças a reações enzimáticas de hidroxilação, de-epoxilação ou deacetilação. Os produtos à base de PCL, mesmo possuindo constituição básica semelhante, são diferentes e podem variar quanto à capacidade de adsorção e devem ser testados individualmente para serem considerados como AAM (MALLMANN; DILKIN, 2007). Diversos trabalhos demonstraram a capacidade adsortiva *in vitro*, e demonstraram que diferentes cepas agem de forma diferente (KELLER, 2012; YIANNIKOURIS et al., 2003; YIANNIKOURIS et al., 2004). O desafio atual é demonstrar essa capacidade também *in vivo*, com doses baixas como as que ocorrem a campo, e com outras variáveis em questão, como manejo sanitário, alimentação, idade do animal, dentre outras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção do Núcleo de Contaminação por Aflatoxinas

O núcleo de aflatoxinas (Figura 16) foi produzido nos laboratórios do NPMM/UFRRJ (Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), a partir da fermentação controlada de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, tendo como substrato o arroz polido, de acordo com Shotwell et al. (1966), com modificações.

Todo o núcleo de AFB₁ foi autoclavado, seco a 50°C e triturado. A micotoxina foi extraída e purificada através de coluna MycoSep[®] 226 AflaZon (Figura 16) de acordo com as informações do fabricante¹, sendo em seguida quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Após a quantificação, o núcleo foi incorporado à ração das aves em proporção conveniente utilizando um misturador mecânico tipo “Y”. Após esta etapa, uma nova extração e quantificação por CLAE foi realizada a fim de se obter a concentração final de 1 mg Kg⁻¹ de AFB₁ na ração experimental.

Os extratos foram quantificados em CLAE de fase reversa, com detector de UV-visível (λ 365 nm), coluna C18 (Microsorb MV, Varian; 150 x 4,6mm x 5 μ m); a fase móvel (metanol: água: acetonitrila, 60: 20: 20) foi bombeada a um fluxo de 0,7 mL min⁻¹; o volume de injeção foi de 20 μ L e o tempo de retenção foi cerca de 14 \pm 1 min. O limite de detecção da análise foi de 1 ng g⁻¹.

¹ Romer Labs Diagnostic GmbH, Áustria



Figura 16: Núcleo de aflatoxinas aos 10 dias de crescimento

Fonte: Acervo pessoal

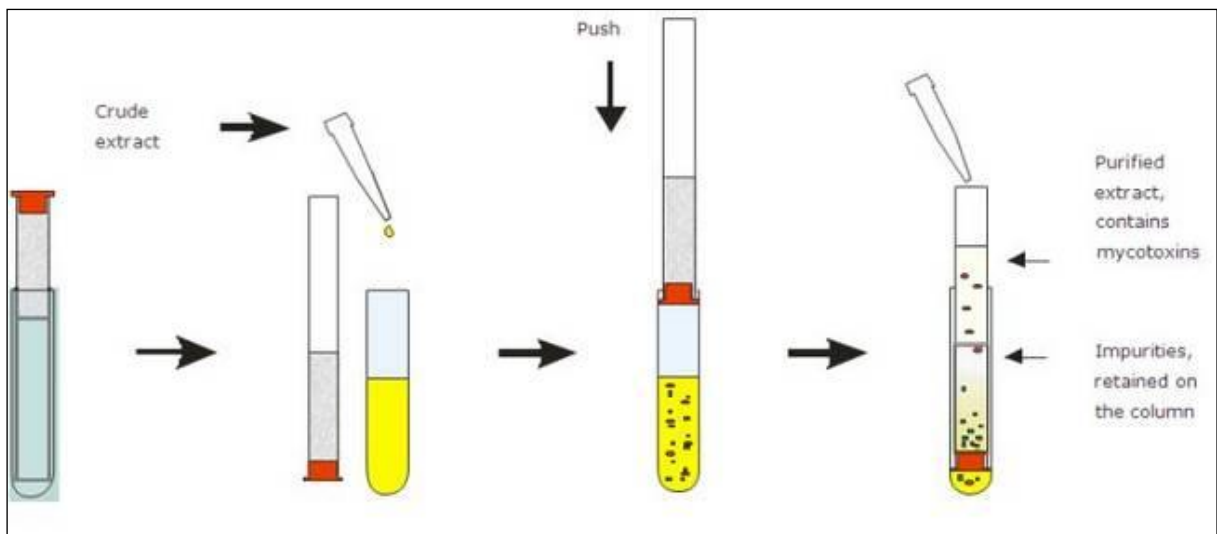


Figura 17: Esquema de uso Mycosep® 226 AflaZon

Fonte: <http://www.romerlabs.com/en/products/columns.html>

Antes de se obter a mistura núcleo e ração, toda a ração foi analisada também pela mesma metodologia descrita acima, para certificar-se da ausência de micotoxinas. Após a quantificação, o núcleo foi incorporado à ração das aves em proporção conveniente utilizando um misturador mecânico tipo “Y”. Após esta etapa, uma nova extração e quantificação

também foi realizada a fim de se obter a concentração final de 1 mg Kg⁻¹ de aflatoxinas ração experimental.

A ração utilizada foi a ração comercial denominada de FFC002-inicial, No Ramo Corte Inicial - Ração para Alimentação de Aves de Corte Inicial (No Ramo Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, São José do Vale do Rio Preto/RJ), cuja composição está relacionada na Tabela 2.

Tabela 2: Composição bromatológica da ração balanceada.

Macro Ingredientes	Unidade	Fase Inicial (1-21 dias)
Milho Moído PB 8,0%	g	641,7
Farelo de Soja 46% / 80%	g	289,0
Farinha de Carne 40%	g	53,3
Cloreto de sódio	g	2,6
Calcário Calcítico 38%	g	4,3
Micro Ingredientes	Unidade	Fase Inicial (1-21 dias)
Premix Vitamínico/Mineral	g	4,0
Bicarbonato de Sódio	g	1,4
DL-Metionina	g	1,1
L-Lisina	g	2,6
TOTAL (Macro + Micro)	g	1000
Níveis Nutricionais	Unidade	Fase Inicial (1-21 dias)
Proteína Bruta	%	21,0
Extrato Etéreo	%	3,6
Fibra Bruta	%	3,0
Matéria Mineral	%	5,2
Cálcio	%	1,0
Fósforo Total	%	0,7
Fósforo Digestível	%	0,5
Energia Metabolizável Aparente	Kcal/Kg	2958,1
Lisina Total	%	1,3

Metionina Total	%	0,6
Metionina + Cistina Total	%	1,0
Treonina Total	%	0,8
Triptofano Total	%	0,2
Lisina Digestível	%	1,2
Metionina Digestível	%	0,6
Metionina + Cistina Digestível	%	0,8
Treonina Digestível	%	0,7
Triptofano Digestível	%	0,2
Sódio	%	0,2
Potássio	%	0,8
Cloro	%	0,3
Na+K-Cl	MEq	209,0

3.2 Local do Experimento

O local dos ensaios *in vivo* foi o Galpão Experimental (Figura 17) do NPMM pertencente às dependências do PSA (Projeto Sanidade Animal) convênio EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) - UFRRJ, localizado na cidade de Seropédica. A UFRRJ está situada a 22°46' latitude Sul, 43°41' longitude Oeste e altitude de 33 m. A média da temperatura durante o ano está em torno de 24°C, a umidade relativa média do ar ao longo do ano está em torno de 70 % (BEHLING et al., 2009).

CROQUI EXPERIMENTAL

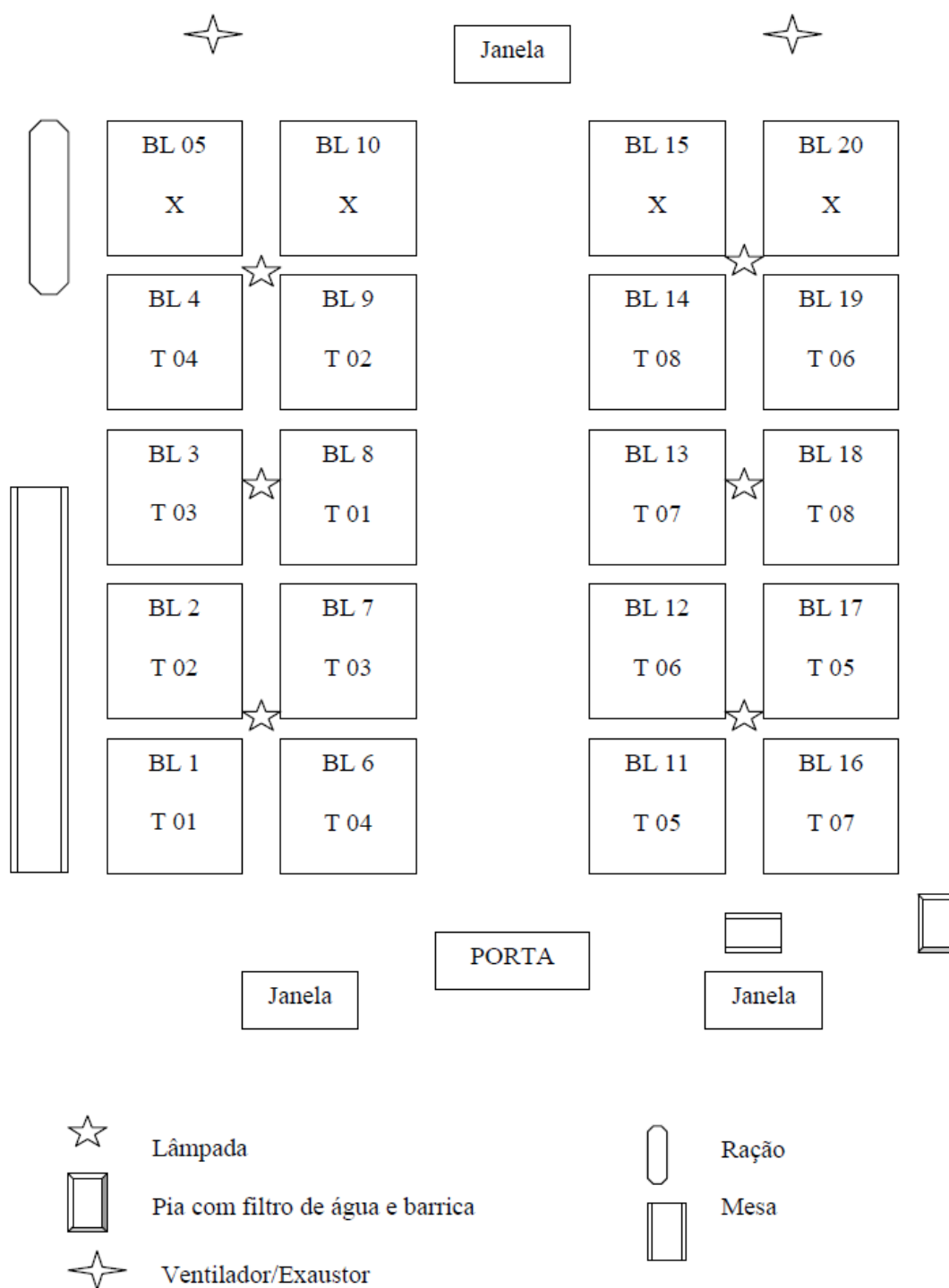


Figura 18: Galpão experimental do NPMM da UFRRJ preparado para experimento *in vivo* com frangos de corte.

3.3 Experimento *In Vivo*

Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, sendo no total oito tratamentos no galpão, e cada tratamento representado por dois blocos. Porém a avaliação estatística de cada período (semana) e de cada produto separadamente foi feita em quatro tratamentos, sempre constituídos por: T01 (dieta sem aflatoxinas, ou dieta base - DB), T02 (DB + 0,2 % de AAM), T03 (1 mg Kg⁻¹ de AFB₁), T04 (1 mg Kg⁻¹ de AFB₁ + 0,2 % de AAM). Todas as dietas foram fornecidas às aves *ad libitum*, assim como a água. Os animais foram alojados em baterias de gaiolas metálicas, compostas de quatro andares, cada gaiola era provida de bebedouro tipo *nipple* e um comedouro tipo calha.

A proporção de aflatoxina utilizada, o número de animais por tratamento e todas as análises foram realizadas de acordo com o estabelecido pelo MAPA, dentro da Portaria nº 13 de 24 de Maio de 2006, e a porcentagem de adsorvente utilizada foi adotada segundo resultados obtidos em ensaios *in vitro* anteriores (KELLER, 2012). Os três AAMs foram fornecidos por uma empresa brasileira, e sua composição explicada brevemente na Tabela 3. A composição química aproximada do produto A foi 25% β-glucanos, 19% mananos, 27% proteínas, 1% de fósforo, 20% de gorduras, e a do produto B foi de 21% β-glucanos, 17% mananos, 29% proteínas, 1 % de fósforo, 23% de gorduras. A composição química aproximada do produto C foi 15% β-glucanos, 10% mananos, 22% de proteínas, 1% fósforo, 15% de gorduras, 23% de SiO₂, 12% Al₂O₃, 2% de CaO e vestígios de MgO, Na₂O, Fe₂O₃, P₂O₅, K₂O (Tabela 4).

Tabela 3: Composição dos aditivos anti-micotoxinas.

Produto	Composição
A	100% parede de levedura Cepa “A”
B	100% parede de levedura Cepa “B”
C	70% parede de levedura Cepa “A” + 30 % bentonita sódica

Foram utilizados 576 frangos de corte, machos, da linhagem Cobb. Os animais foram recebidos com um dia de idade, vacinados contra a Doença de Marek, NewCastle e Gumboro, com peso médio de 46 g e alojados em gaiolas (Figura 19). As aves foram distribuídas em oito tratamentos, 72 animais por tratamento (9 por gaiola, 36 por bloco, 2 blocos por tratamento). A observação clínica dos animais e aferição das temperaturas do ambiente e da gaiola foi feita três vezes ao dia e para o aquecimento das aves nos primeiros dias de vida foram instaladas lâmpadas incandescente de 40W, uma em cada gaiola. Foram calculados o peso vivo, ganho de peso diário, consumo de ração, e conversão alimentar das aves de todos os tratamentos aos 7, 14 e 21 dias de idade. Aos 21 dias de idade as aves foram abatidas (após jejum médio de 6 h), sendo avaliados o peso vivo no momento do abate, o peso relativo do fígado em relação ao peso vivo, e o peso relativo do rim em relação ao peso vivo, segundo Giacomini et al. (2006) com modificações.



Figura 19: Gaiolas do galpão separadas por andares identificados, cada andar alojou nove animais.

Fonte: Acervo pessoal

3.4 Análises Pós Experimento *In Vivo*

Foram calculados o peso absoluto de coração, moela, fígado, rins, bursa e baço das aves, e o peso relativo de fígado e rins. Foi realizada também a mensuração dos intestinos das aves.

Amostras de fígado e rins de oito animais por tratamento foram coletadas para avaliação histopatológica. Para isso, os órgãos foram coletados e acondicionados em formol 10% tamponado nas primeiras 24 h, e após em álcool 70%. Os fragmentos de tecidos foram processados de acordo com as técnicas histopatológicas usuais e os tecidos corados com hematoxilina- eosina (GIACOMINI et al., 2006).

Cerca de 5 mL de sangue foi colhido no momento da degola, durante o procedimento do abate, em tubos sem anticoagulante para análises bioquímicas. As provas bioquímicas foram realizadas a partir do soro separado por centrifugação e estocado a -20°C, em fotômetro automático para bioquímica A15 – BioSystems®. Foram avaliadas as proteínas totais, AST e ALT para avaliação hepática e ácido úrico para avaliação renal. Os reagentes bioquímicos também pertenciam a marca BioSystems®.

3.5 Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância com nível de significância para informar as diferenças de 5%. As comparações estatísticas foram realizadas entre controles e tratamentos segundo teste estatístico de Duncan. As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (*SAS Institute, Cary, NC*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação do Núcleo de Aflatoxinas

A ração comercialmente obtida estava livre de alta contaminação por micotoxinas, não foram observados níveis acima do limite de detecção para aflatoxinas, fumonisina, ocratoxina e zearalenona. O núcleo de aflatoxinas produzido continha 30 mg Kg⁻¹ de AFB₁ e foi necessário realizar uma mistura de 0,5 Kg de núcleo para cada 14,5 Kg de ração comercial, para alcançar a concentração final de 1 mg Kg⁻¹ de AFB₁. Todos os extratos foram analisados em CLAE de fase reversa, com os parâmetros cromatográficos já listados em material e métodos. O total de aflatoxinas na ração final foi de 86% AFB₁, 5% AFG₁, 6% AFB₂, e 3% AFG₂.

4.2 Avaliação do Peso Vivo e Ganho de Peso Diário das Aves

As médias de peso vivo dos quatro tratamentos na avaliação do produto A, no 1º dia e aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 20.

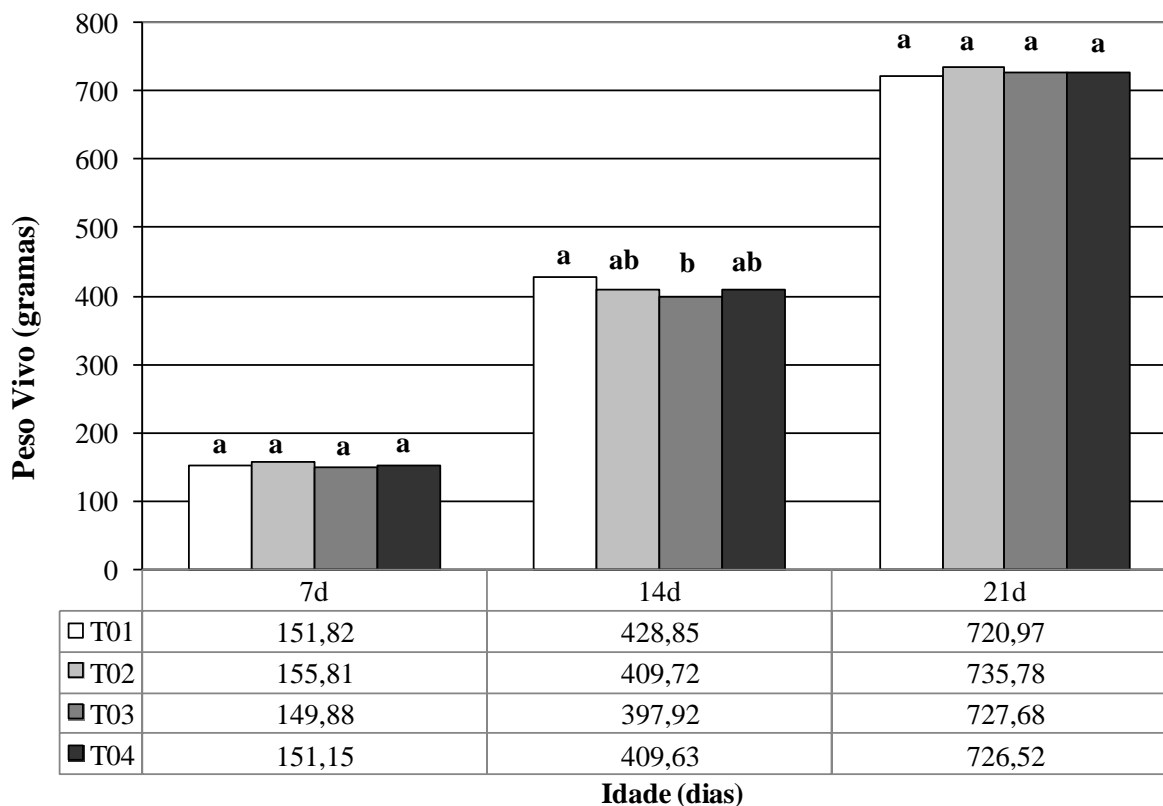


Figura 20: Gráfico da média de peso vivo dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Com relação ao peso vivo das aves ao 1º dia de idade, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos na avaliação dos três produtos, homogeneidade de lotes que é ideal em qualquer trabalho científico.

Os efeitos negativos da aflatoxina sobre os frangos é bem notado a partir dos 14 dias de idade, e isso ao longo do trabalho foi observado para todos os parâmetros zootécnicos, na avaliação dos três produtos. Esta observação está de acordo com o dito por Rosa et al. (2001), que até os 21 dias os efeitos das aflatoxicoses em frangos são mais notados, como é o caso do presente estudo.

Na análise do produto A aos 14 dias, a menor média de peso vivo apresentada pertenceram às aves do T03, e o maior peso vivo às aves do T01, o tratamento controle. O grupo T03 apresentou peso vivo 7,2 % menor que o grupo controle. Se essa redução de peso se mantivesse estável até os 45 dias em uma granja pequena, cada ave perderia cerca de 40

gramas, em um lote de mil aves a perda seria de 40 Kg ou de mais de 100 reais se o lote chegasse a ser vendido, considerando o valor do peso vivo do frango em 2014 (AVISITE, 2014). Porém a tendência é que o produto suavize cada vez mais essa perda de peso, constatado pela observação das aves aos 21 dias, em que a redução de peso foi de menos de 1%.

As demais médias nesta fase também não diferiram significativamente entre si. Não houve também qualquer diferença estatística significativa nas outras fases do estudo entre tratamentos. Este efeito negativo da aflatoxina sobre frangos de corte já foi reportado anteriormente por diversos autores: Tedesco et al. (2004), que usando $0,8 \text{ mg Kg}^{-1}$ de AFB₁ verificaram redução no peso vivo de cerca de 8,0 % nos animais intoxicados durante todo o período experimental de 35 dias; Miazzi et al. (2000), que testaram uma concentração de $2,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ aos 33 dias de tratamento e obtiveram uma redução de 11,0% no peso vivo das aves intoxicadas; Valdivia et al. (2001) reportou a redução de 11% no peso vivo e também no ganho de peso de frangos de corte aos 21 dias de idade utilizando 3 mg Kg^{-1} de aflatoxina em um estudo acerca da N-acetilcisteína como AAM no México. De maneira geral, ao observar os resultados das literaturas citadas percebe-se uma perda maior de peso nas aves à medida que aumenta-se a concentração de aflatoxinas na ração.

Aos 14 dias também é possível observar o produto A suavizar a perda de peso provocada pela aflatoxicose. O produto foi capaz de melhorar em 3,0 % a perda de peso do grupo T04 em relação ao grupo intoxicado. Esses resultados concordam com os de outros autores: Zhao et al. (2010), que pesquisaram, em Chicago (Estados Unidos), o efeito isolado e combinado de aluminossilicato de cálcio e sódio e PCL na reversão dos efeitos da aflatoxina na dieta de frangos até os 21 dias de idade ($1 \text{ e } 2 \text{ mg Kg}^{-1}$). Como resultados ele demonstrou que a aflatoxina nas duas concentrações era capaz de diminuir o peso vivo das aves, e que ambos os produtos revertem o efeito negativo, porém na concentração de toxina mais alta a PCL não reverteu os efeitos negativos no desempenho das aves.

O uso dos gráficos no presente trabalho teve o intuito de mostrar leves diferenças, mesmo que a estatística não a considere significativa. Neste caso observamos um maior peso vivo (em 0,77 %) nas aves que receberam apenas o produto A aos 21 dias, pertencentes ao T02, evidenciando o caráter prebiótico do produto.

O presente estudo concorda com os estudos de Albino et al. (2006), que reportaram o efeito prebiótico da parede celular de *Sacharomyces cerevisiae*, aumentando o peso vivo em frangos de corte aos 42 dias de idade em 2,7%; com os estudos de Kamalzadeh; Hosseini; Moradi (2009) que comprovaram em sua pesquisa que $1,0 \text{ g Kg}^{-1}$ é a melhor concentração

para melhorar peso vivo, consumo e conversão alimentar em frangos de corte do que 0,5 g Kg⁻¹ ou 1,5 g Kg⁻¹. Porém Kamalzadeh; Hosseini; Moradi (2009) não utilizaram toxinas em sua pesquisa.

As médias de peso vivo dos quatro tratamentos na avaliação do produto B, no 1º dia e aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 21.

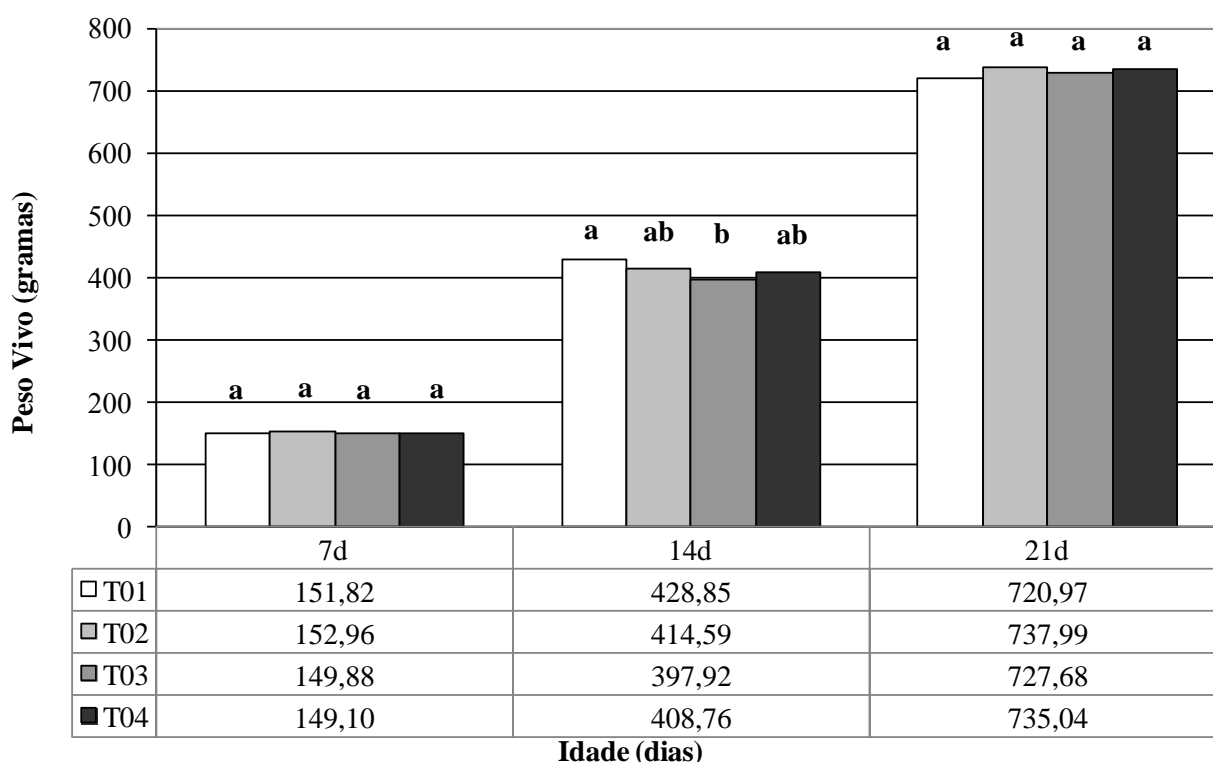


Figura 21: Gráfico da média de peso vivo dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Os resultados vistos com relação ao peso vivo das aves em relação ao produto B são muito similares aos vistos anteriormente para o produto A, do ponto de vista estatístico foram os mesmos resultados: apenas aos 14 dias de idade temos diferenças estatísticas significativas de médias, com a menor sempre correlacionada ao efeito negativo da aflatoxicose, e a maior sendo atribuída às aves do grupo controle. Aos 14 dias o produto B também foi capaz de suavizar os efeitos negativos da aflatoxicose, 2,9 % maior em relação ao grupo intoxicado. E

também é visto suave tendência no gráfico de aumento de peso proporcionado às aves do T02 (1,95 %), relativo ao efeito prebiótico do produto B aos 21 dias, porém sem diferenças estatísticas notadas.

Os polissacarídeos presentes na PCL são prebióticos, promovem um ambiente intestinal saudável e estimula respostas imunológicas, o que pode refletir em melhor desempenho zootécnico. Em relação aos produtos A e B não houve diferenças estatísticas, porém visualmente no gráfico a tendência é de uma maior peso para as aves suplementadas.. Estes resultados concordam com os de Benites et al. (2008), que avaliando o desempenho de aves em Honduras alimentadas com duas diferentes marcas de produtos à base de *Sacharomyces cerevisiae*, não observaram diferença significativa no peso vivo e no ganho de peso das aves que receberam um dos produtos testado; fato interessante já que a quantidade utilizada foi mais que o dobro da utilizada no presente estudo (0,5 g Kg⁻¹).

Pode-se dizer que, os produtos A e B foram capazes de suavizar o efeito negativo da redução de peso vivo das aves causado pela aflatoxicose induzida.

As médias de peso vivo dos quatro tratamentos na avaliação do produto C, no 1º dia e aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 22.

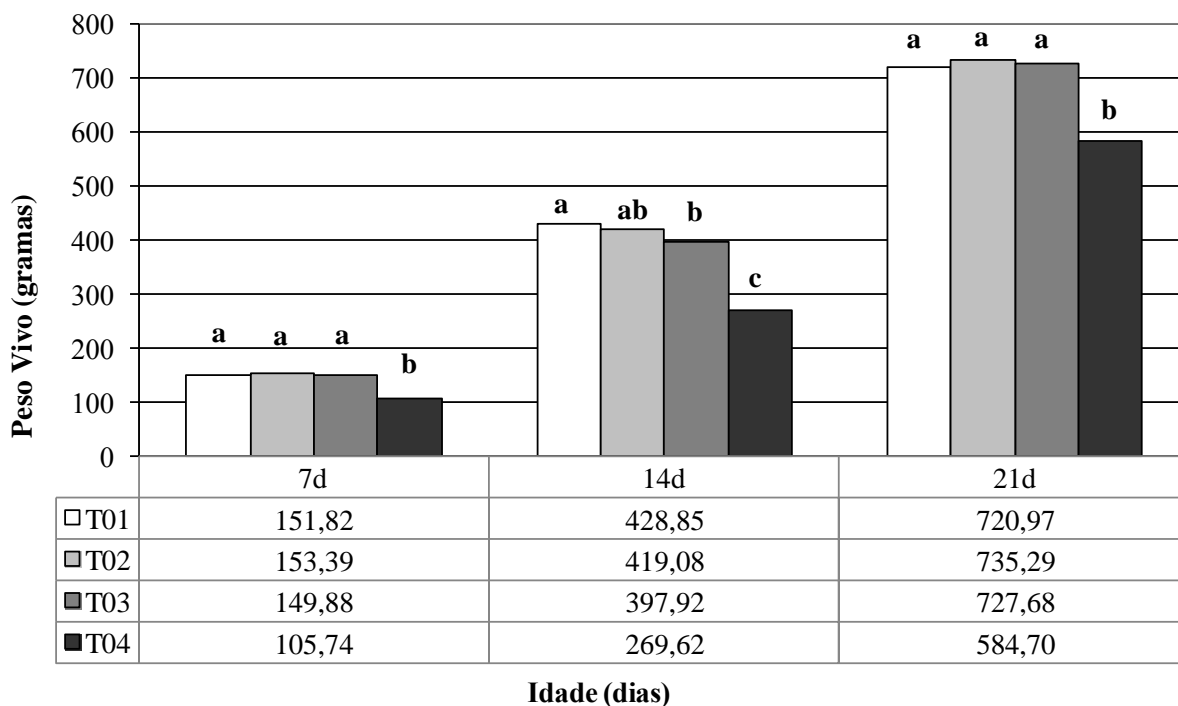


Figura 22: Gráfico da média de peso vivo dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Resultados atípicos foram obtidos na avaliação do produto C. Já aos 7 dias de idade foram observadas diferenças estatísticas significativas entre tratamentos, porém as menores médias de peso vivo foram vistas para os animais do T04, que consumiram a mistura da toxina mais o produto C (30,3 % menor em relação ao controle e 29,5 % menor em relação ao T03). O melhor peso vivo observado aos 14 dias foram relativos aos animais do grupo controle. Nem isoladamente o produto C foi capaz de melhorar o peso vivo das aves, logo ele não evidenciou caráter prebiótico neste ensaio *in vivo*.

Os gráficos revelam o mesmo resultado das tabelas com mais ênfase. Aos 14 dias a mistura de aflatoxinas mais produto C diminuiu as médias de peso vivo em 32,3 %, muito abaixo do que só a aflatoxina isolada conseguiu fazer e 37,1 % menor do que o grupo controle. Nenhum trabalho obtido em literatura reportou algo parecido.

Algumas bentonitas são eficientes como agentes sequestrantes para aflatoxinas, mas não todas, necessitam de testes. Elas reduzem a biodisponibilidade da toxina no trato gastrointestinal das aves, quando incorporadas nas rações. Sua capacidade adsorviva se dá graças a cargas elétricas, e não se dá somente com micotoxinas, mas com outros componentes da dieta como algumas vitaminas. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a eficácia de bentonita de sódio natural para adsorver aflatoxina a partir de solução aquosa. Porém, a capacidade de ligação destes adsorventes varia com a fonte reológica, e até mesmo entre lotes de uma dada fonte, pois cada amostra é única. Além disso, outros fatores podem influenciar na sua adsorção, tais como co-ocorrência de micotoxinas e pH do meio em que se encontra (MAGNOLI et al., 2008). A origem da bentonita da amostra não foi conhecida. É muito provavelmente este efeito não desejado do produto C deve-se a incapacidade da bentonita em adsorver a aflatoxina ou simplesmente porque tanto a bentonita, como a PCL estavam em quantidades inferiores às necessárias para promover o efeito adsorvivo, ou ainda a bentonita e a PCL se agregaram, de forma que nenhuma das duas conseguiu adsorver a aflatoxina da dieta.

As médias de ganho de peso dos quatro tratamentos na avaliação do produto A aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 23

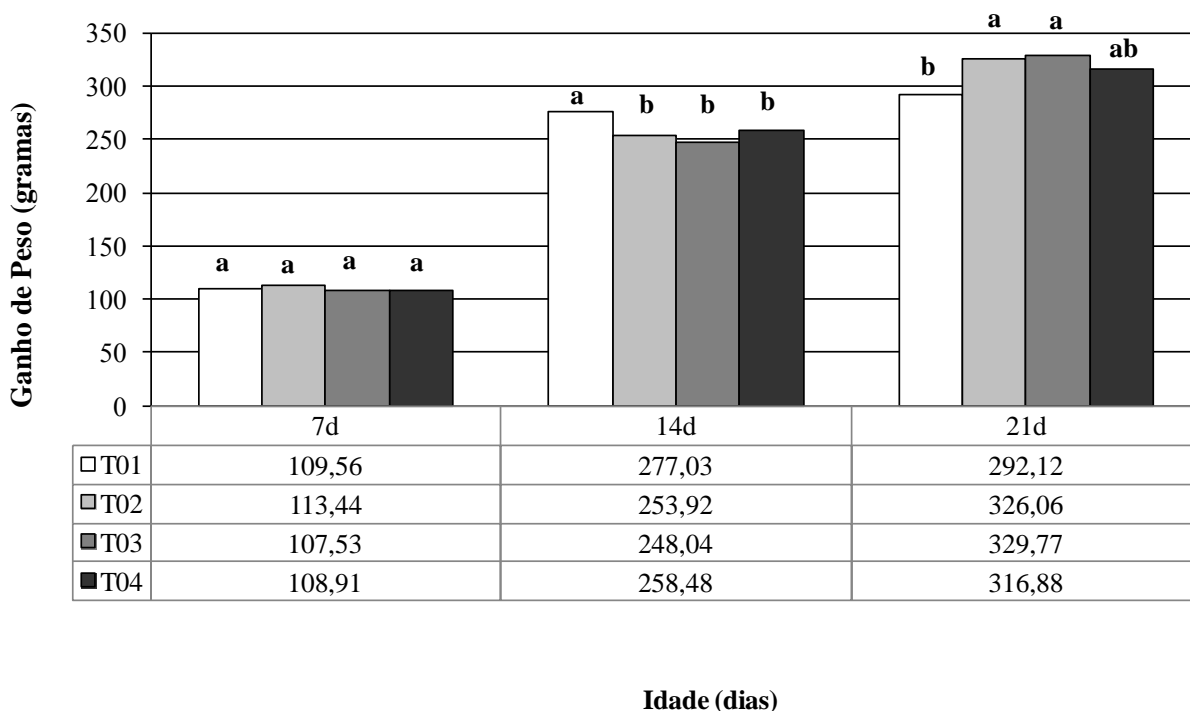


Figura 23: Gráfico do ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05).

Aos 7 dias não se evidenciam diferenças entre tratamentos. Aos 14 dias de idade as aves do grupo controle apresentaram maior média de ganho de peso, e neste aspecto o produto A não foi capaz de melhorar o parâmetro testado. As outras médias se igualam entre si e diferem da média do grupo T01. No gráfico nota-se uma tendência de menor ganho de peso para o grupo intoxicado.

Notam-se também diferenças estatísticas entre tratamentos aos 21 dias de idade: as maiores médias pertenceram aos grupos T02 e T03. E enquanto que aos 14 dias o grupo controle apresentou ganho de peso 9,0 % maior que o grupo T02 e 11,7 % maior que o grupo T03, aos 21 dias o ganho de peso do grupo controle foi 10,4 % menor que o grupo T02 e 11,4 % menor que o grupo T03. Porém este resultado não deve ser observado isoladamente, mas sim em conjunto com outros fatores, com especial atenção às condições de temperatura ambiente e do galpão no período do experimento (Figura 24). Embora fosse esperado que as aves dos grupos não intoxicados apresentassem um ganho de peso um pouco maior, as altas temperaturas influenciaram negativamente o ganho de peso, como podemos concluir com a

observação da temperatura ideal de conforto térmico de frangos (Tabela 4) em comparação com as temperaturas médias do período (Figura 24). Mesmo com a utilização de nebulizadores e ventiladores, e em casos de temperatura elevada animais com bom peso tendem a ter o menor desempenho. É importante salientar que o parâmetro ganho de peso foi significativamente prejudicado pelas altas temperaturas, mas o peso vivo não.

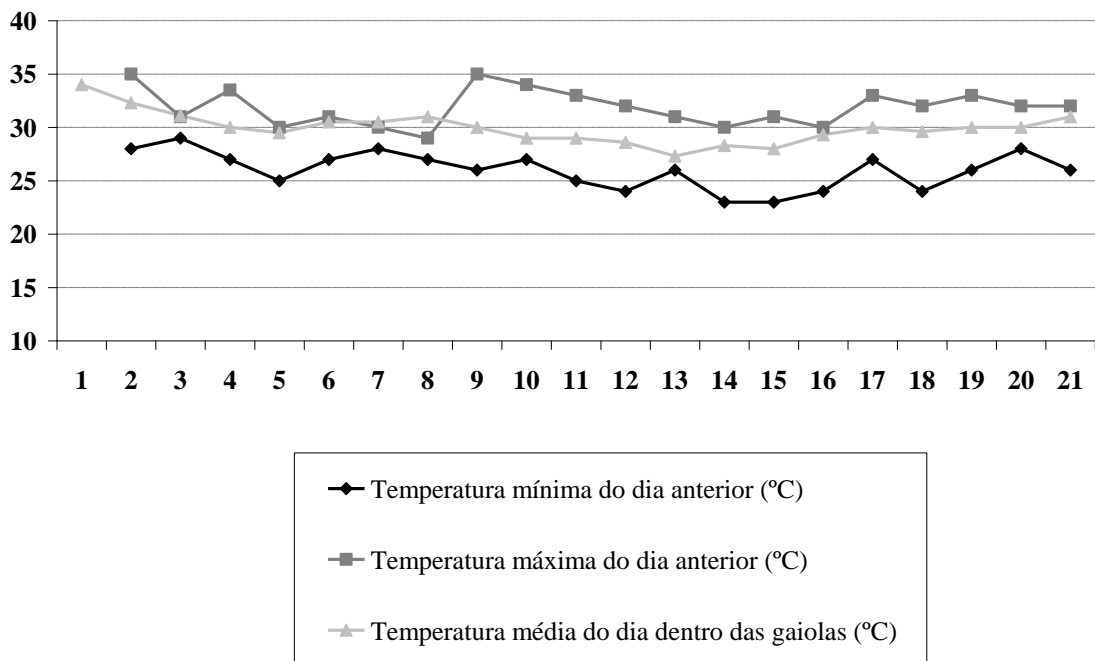


Figura 24: Dados da temperatura durante o experimento *in vivo*.

Tabela 4: Relação entre temperatura ótima do galpão (°C), umidade relativa e idade dos frangos de corte.

IDADE DIAS	> 80%	70%	60%	50%	< 40%
1	33	33	33	33	35
2	32	32	32	32	34
3	31	31	31	31	33
4	30	30	30	30	32
5	30	30	30	30	32
6	29	29	29	29	31
7	29	29	29	29	31
8	28	29	29	29	31
9 - 12	27	28	28	29	31
13 - 16	26	27	27	29	31
17 - 20	25	26	26	28	30
21 - 24	24	25	26	27	29
25 - 30	23	24	25	27	29
31 - 35	22	23	25	26	28
> 35	21	22	24	25	27

Fonte: http://www.granjaplanalto.com.br/MANUAL_MOD%20REV.%2003_18_09_06.pdf

Observando o ganho de peso das aves aos 14 dias, onde a temperatura ambiente ainda não havia interferido, a ingestão de aflatoxinas diminuiu em 10,4 % o ganho de peso das aves. Estes resultados estão de acordo com Santin et al. (2003), que realizaram um experimento com diferentes tratamentos e dietas contendo 0,5 mg Kg⁻¹ de AFB₁ e 0,1 % de parede de *S. cerevisiae*, não observaram redução do ganho de peso das aves que ingeriram somente AFB₁ aos 42 dias de vida (idade distinta da usada no presente experimento), porém a PCL melhorou o peso vivo em cerca de 3,2%, até no grupo intoxicado.

Os resultados atuais também se assemelham com os de Cardoso (2007), que estudou o efeito de diferentes dietas em frangos de corte até 21 dias com 2 mg Kg⁻¹ de AFB₁ e a piperina como AAM, e observou redução de cerca de 9,0 % no ganho de peso vivo do grupo intoxicado; com os de Tedesco et al. (2004), que usando 0,8 mg Kg⁻¹ de AFB₁ verificaram redução no ganho de peso dos animais intoxicados durante todo o período experimental de 35 dias; com os de Lopes et al. (2006), que no Brasil testou bentonita sódica em frangos de corte até os 42 dias de idade e reportou na terceira semana redução de 42 % no ganho de peso vivo

das aves intoxicadas com 3 mg Kg⁻¹ de aflatoxina, a 0,3% de bentonita sódica foi a concentração de adsorvente que apresentou melhores resultados. Esses resultados também estão de acordo com os encontrados por Miazzo et al. (2000), que testaram uma concentração de 2,5 mg Kg⁻¹ de aflatoxinas aos 33 dias de tratamento e obtiveram uma redução de 11% no ganho de peso das aves intoxicadas; e Giacomini et al. (2006), que avaliando desempenho de frangos de corte intoxicados com 3 mg Kg⁻¹ de aflatoxinas e sem AAM na dieta durante 42 dias, reportaram menor ganho de peso para as aves intoxicadas;

As médias de ganho de peso dos quatro tratamentos na avaliação do produto B aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 25.

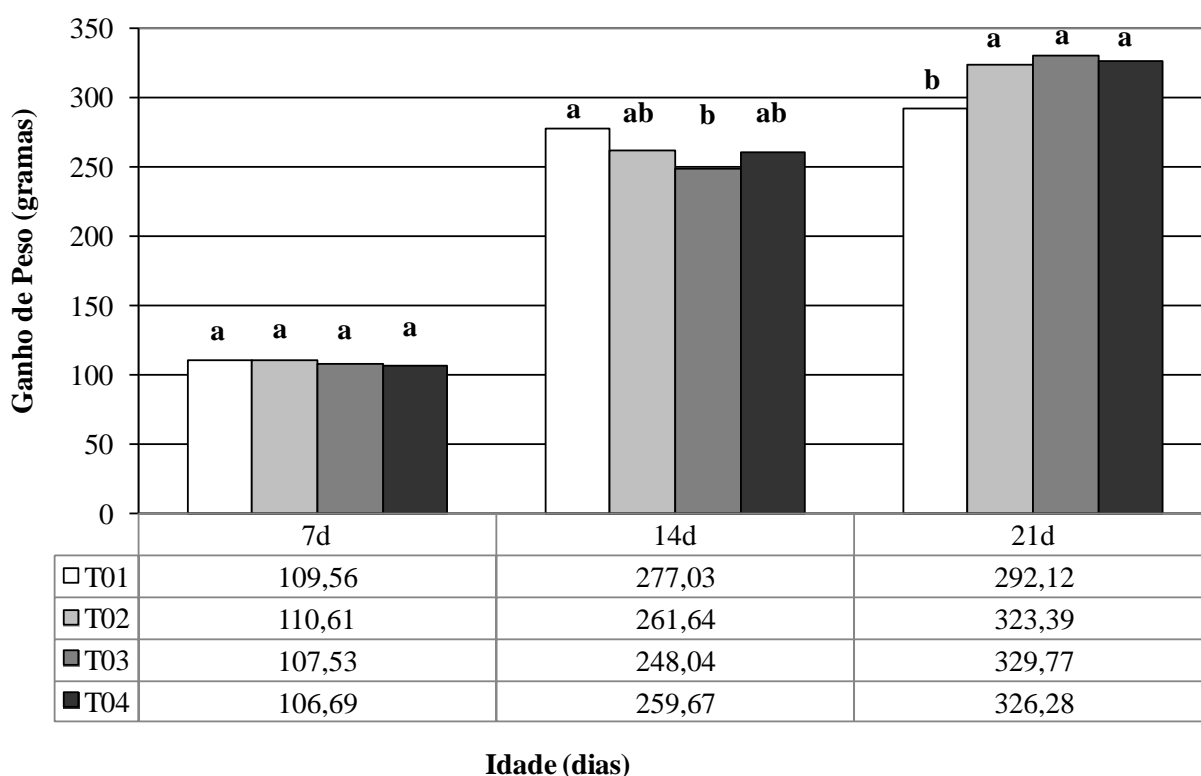


Figura 25: Gráfico da média de ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p<0,05).

Aos 7 dias não se evidenciam diferenças entre tratamentos. E aos 14 dias o grupo controle teve a maior média de ganho de peso, e o grupo T03, com a menor das médias de ganho de peso. A média do grupo T02 se iguala com a do grupo T04 estatisticamente, efeito do AAM minimizando a perda de peso pela aflatoxicose induzida. Este perfil de resultado é o esperado. Porém Santin et al. (2003), que no Brasil realizaram um experimento com diferentes tratamentos e dietas contendo 0,5 mg Kg⁻¹ de AFB₁ e 0,1 % de parede de *Saccharomyces cerevisiae*, não observaram redução de ganho de peso das aves que ingeriram somente AFB₁ aos 42 dias de vida, idade distinta da usada no presente experimento. Os autores afirmam que a concentração de toxina utilizada pode ter sido baixa, e foi exatamente a metade da utilizada no presente experimento.

Aos 21 dias de idade as altas temperaturas também influenciaram negativamente o ganho de peso do grupo controle em relação aos demais. As médias dos outros grupos se igualam entre si.

As médias de ganho de peso dos quatro tratamentos na avaliação do produto C aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 26.

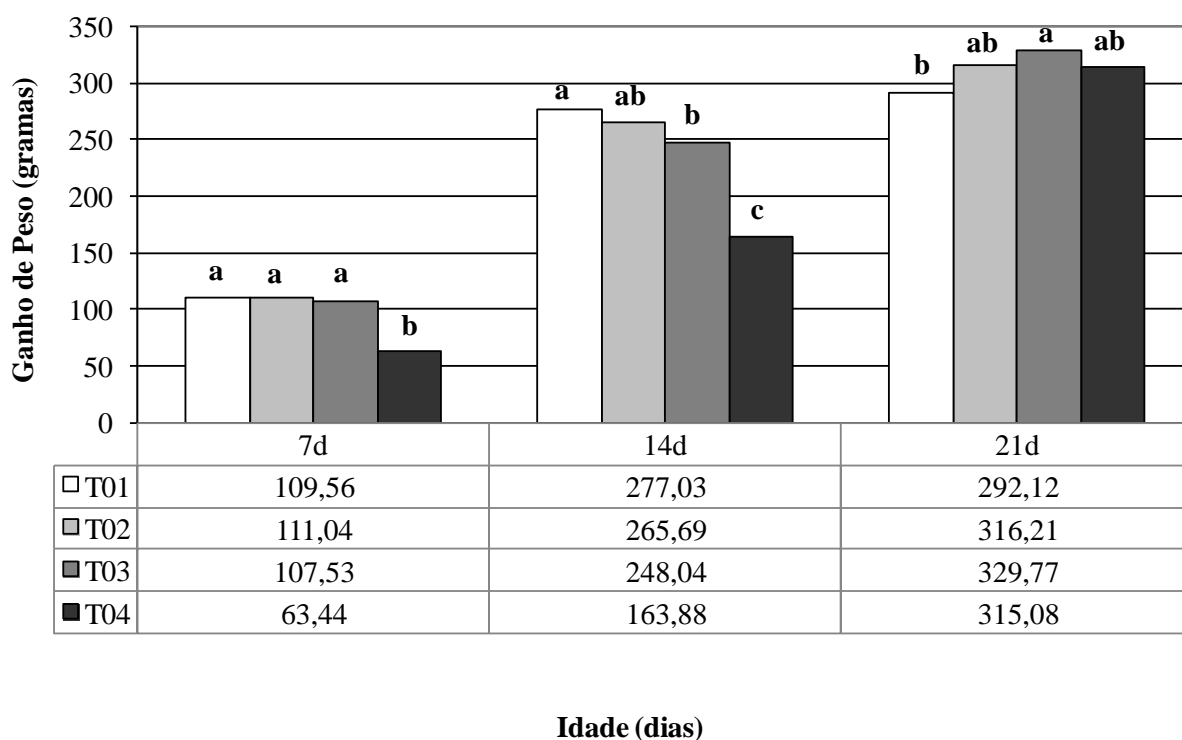


Figura 26: Gráfico da média de ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05).

Aos 7 dias já se evidenciam diferenças entre tratamentos. A inclusão do produto C piorou o parâmetro em conjunto com a aflatoxina da dieta. O grupo T04 foi a menor média apresentada, 42 % menor que o grupo controle.

Aos 14 dias de idade o resultado é muito evidente e inesperado. O grupo T04 simplesmente apresentou a menor média de ganho de peso: 40,8 % menor do que o grupo controle, e 41,1 % menor do que o próprio grupo intoxicado.

Aos 21 dias de idade as altas temperaturas também influenciaram negativamente o ganho de peso do grupo controle em relação aos demais. O produto C foi ineficiente na avaliação do peso vivo, e aqui também notamos isto. Mesmo com a influência negativa das altas temperaturas sobre o grupo controle, o grupo intoxicado não conseguiu alcançar maior média quando se observa a avaliação dos produtos A e B, mas com inclusão do produto C, o grupo intoxicado agora é o possuidor da maior média de ganho de peso vivo. O grupo

intoxicado teve uma média de ganho de peso 4,2 % maior do que o grupo T02 e o grupo 4,6 % maior que o grupo T04.

4.3 Avaliação do Consumo de Ração das Aves.

As médias de consumo de ração dos quatro tratamentos na avaliação do produto A aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 27.

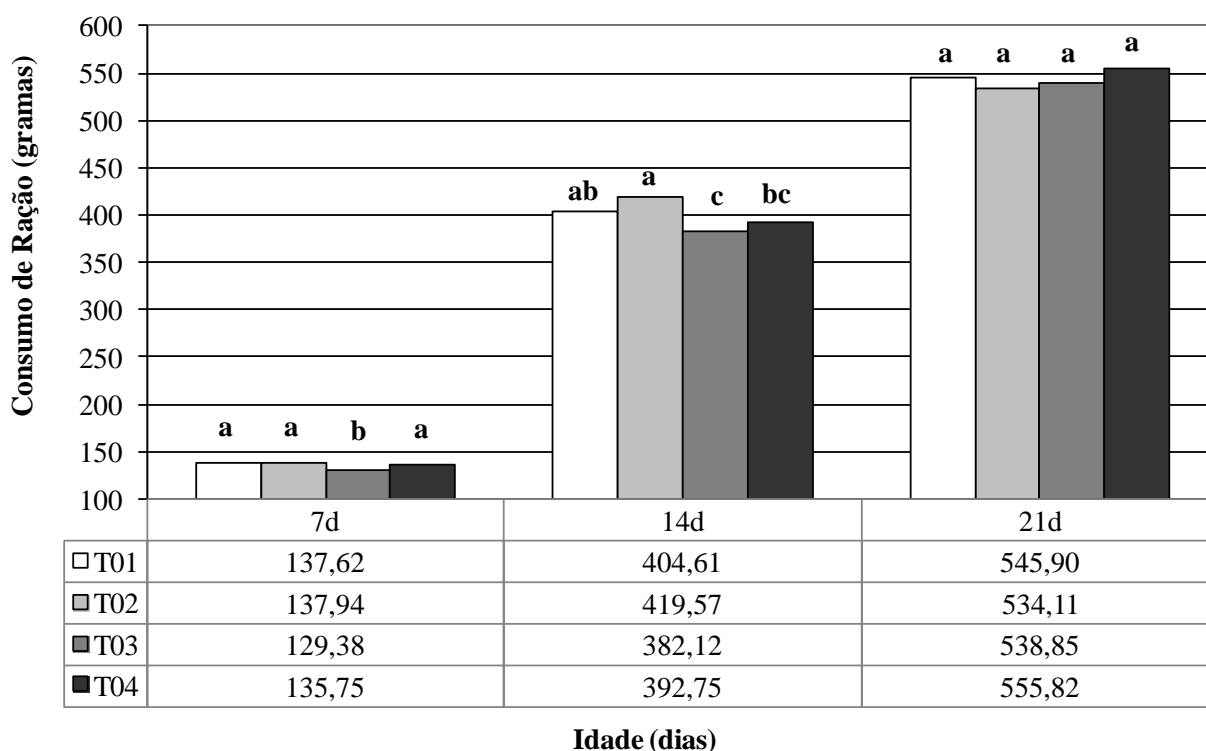


Figura 27: Gráfico do consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

A aflatoxina da dieta foi capaz de reduzir o consumo de alimento já na primeira semana (5,9 % menor em relação ao grupo controle), e esse efeito se repetiu na segunda semana (5,5 % menor que o grupo controle, e 9,0 % menor que o grupo T02). Nesta época a maior média de consumo pertenceu ao grupo T02, dos animais que apenas consumiram o produto A. Na última semana não houve diferenças estatísticas entre as médias de consumo de

ração, apesar de notarmos no gráfico que o maior consumo foi do grupo T04, com uma diferença muito discreta para os outros grupos, mas 4,0 % maior que o próprio grupo T02.

Dados de consumo de ração isolados nada mostram, mas sim em conjunto com os dados de ganho de peso. O índice que os correlaciona é a conversão alimentar, abordada mais a frente. Isso quer dizer que um baixo consumo pode não ser ruim se o peso vivo e o ganho de peso estiverem normais, da mesma forma que um alto consumo não acompanhado de ganho conseqüente de peso significa baixo rendimento e perda do ponto de vista econômico. No caso do grupo intoxicado, já vimos que as médias de peso vivo foram baixas, e confirmamos que o consumo também foi, logo a concentração de aflatoxinas utilizada no presente estudo foi capaz de alterar negativamente dois parâmetros zootécnicos importantíssimos em frangos de corte. Outros autores concordam com os resultados mostrados, onde a ingestão de aflatoxinas diminuiu consideravelmente o consumo de alimento nessas aves: Zhao et al. (2010) observaram uma redução de 12,2% e 28,1% no consumo de aves aos 21 dias de idade que consumiram 1,0 e 2,0 mg Kg⁻¹ de aflatoxina na ração. Esses resultados, porém, discordam de Santin et al. (2003), que não reportou uma redução considerável de consumo de ração com a concentração de 0,5 mg Kg⁻¹ de aflatoxinas na dieta de frangos de corte.

Os resultados quanto ao efeito da PCL sobre o consumo estão de acordo com Albino et al. (2006), aumentando o consumo de ração pelas aves que somente receberam o prebiótico.

As médias de consumo de ração dos quatro tratamentos na avaliação do produto B aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 28.

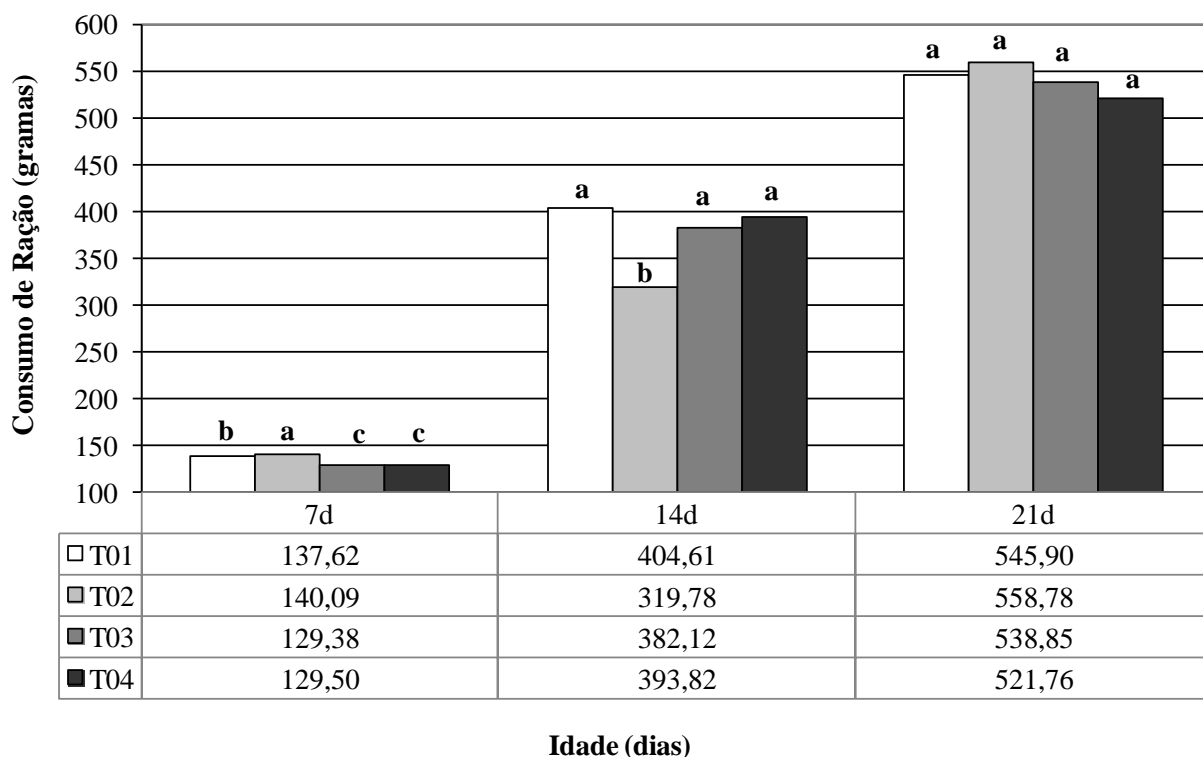


Figura 28: Gráfico do consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p<0,05).

Aos 7 dias as menores médias de consumo pertenceram aos dois tratamentos que ingeriram a toxina. E aos 14 dias, este perfil muda, com a menor média de consumo pertencente aos animais do grupo T02 (5,5 % menor do que o grupo controle). Esse valor de consumo aliado a um bom peso vivo e ganho de peso do grupo na mesma fase experimental resultou em uma conversão alimentar baixa, o que é muito desejável em uma criação de frangos de corte, pois é um indício de bom aproveitamento dos nutrientes dos alimentos pelas aves e gera lucro ao produtor. Estes resultados concordam com os de Benites et al. (2008), em que as aves aos 21 dias alimentadas com PCL reduziram o consumo mantendo o bom peso corpóreo, porém Benites et al. (2008) não reportaram neste caso uma melhora na conversão alimentar.

Depois desta fase todas as médias se igualam estatisticamente.

As médias de consumo de ração dos quatro tratamentos na avaliação do produto C aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 29.

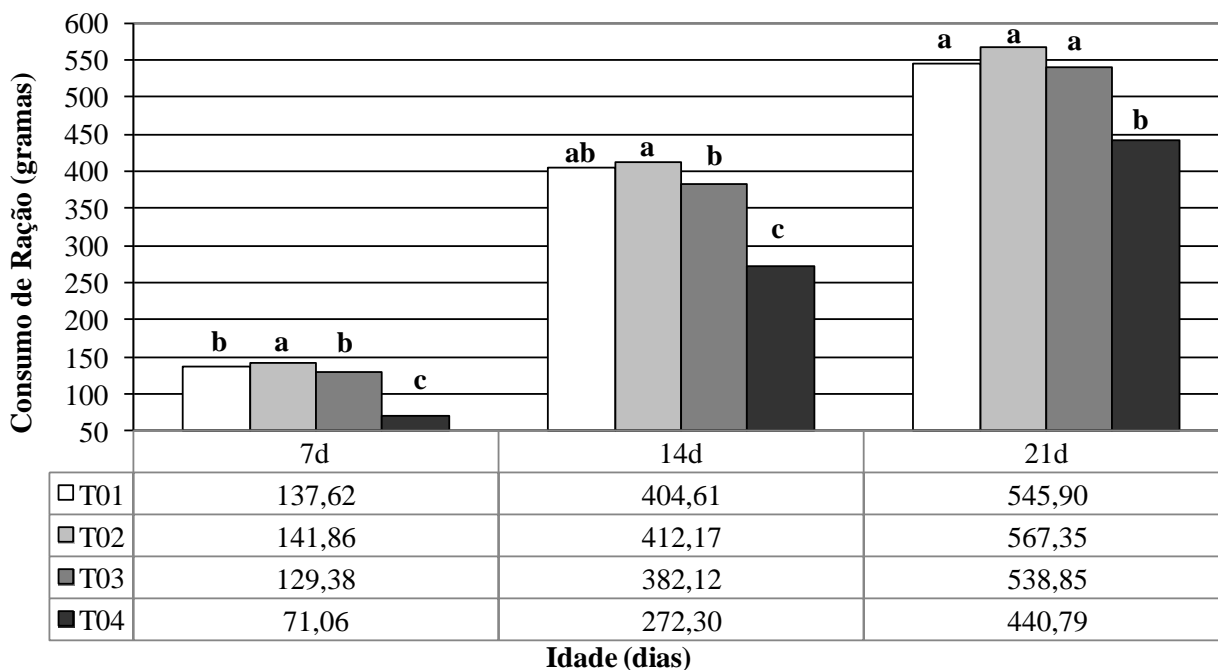


Figura 29: Gráfico do consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

O que chama muita atenção na avaliação do produto C são as baixíssimas médias de consumo de ração pertencentes ao grupo T04 nas três fases experimentais. A adição de AFB₁ mais produto C diminuiu muito o consumo de ração das aves, efeito já evidenciado na primeira semana de vida. Aos 7, 14 e 21 dias as médias de consumo do grupo T04 foram 48,3 %, 32,7 % e 19,25 % menores do que o grupo controle, respectivamente. Importante atentar que as baixas médias de consumo de ração não foram acompanhadas por boas médias de ganho de peso e peso vivo, ou seja, não significou em redução dos efeitos negativos da aflatoxicose induzida.

4.4 Avaliação da Conversão Alimentar das Aves.

As médias de conversão alimentar dos quatro tratamentos na avaliação do produto A aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 30.

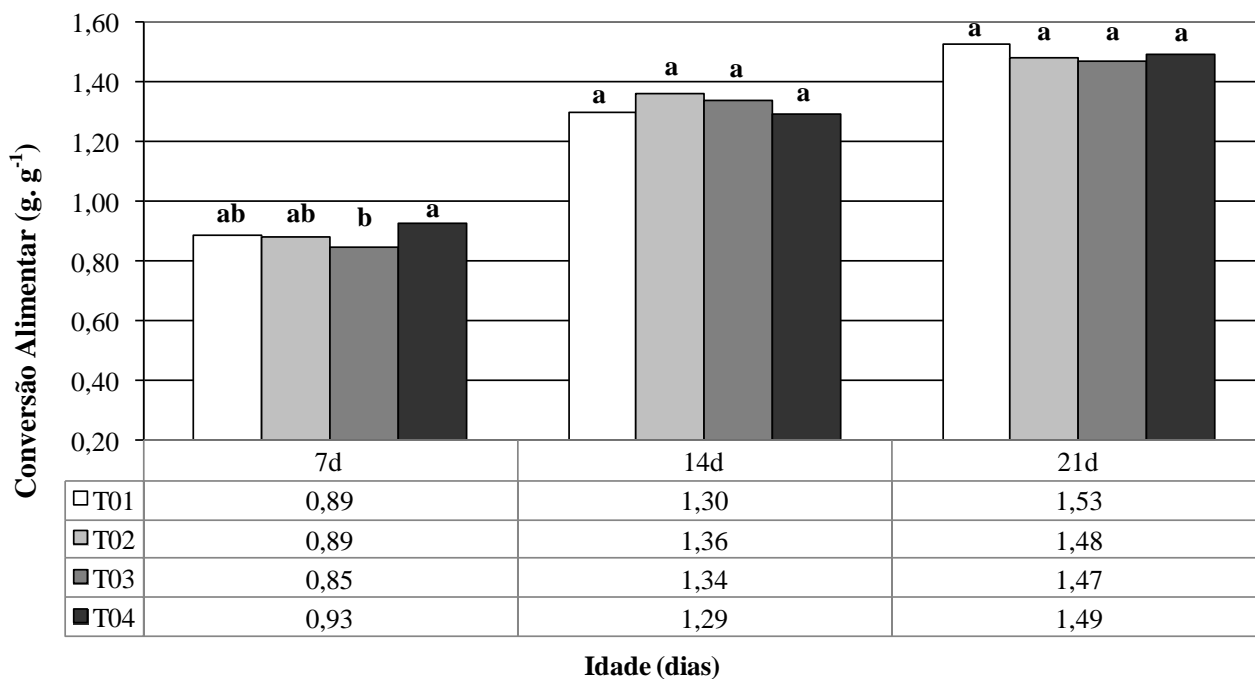


Figura 30: Gráfico da conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Da mesma forma que o consumo, a conversão alimentar não pode ser avaliada isoladamente. A conversão é um índice que avalia quanto que o animal ganhou em peso em relação ao consumo, logo quanto menor mais eficiente, mas não adianta o índice ser baixo se o peso vivo do animal também for. Na primeira semana a conversão alimentar do grupo intoxicado foi baixa, mas devido a um menor consumo provocado pela ingestão conjunta da toxina. Com o passar de mais uma semana de experimento não há mais diferenças significativas na conversão alimentar dos grupos, porém como já foi visto o peso dos animais só diminuiu e o consumo piorou com a aflatoxicose induzida, e no caso dos produtos A e B esses efeitos foram amenizados. Estes resultados discordam dos de Valdivia et al. (2001) em

que a administração da aflatoxina às aves (em uma concentração mais alta que a deste estudo: 3 mg Kg⁻¹) piorou a conversão alimentar além do peso vivo e do ganho de peso diário.

Os resultados sobre a eficácia de AAM à base de PCL dependem do manejo, composição do produto, idade e estado sanitário das aves, mas em geral, estes produtos são reportados como capazes de reverter efeitos negativos das aflatoxicoses em frangos e podem melhorar a conversão alimentar na presença ou não de micotoxinas na dieta (KELLER et al., 2012; ROLL et al., 2010). O uso do produto A não melhorou significativamente a conversão alimentar em nenhum desses casos, apenas aumentou o consumo de ração (com conseqüente aumento de peso das aves) a partir dos 14 dias de idade, discordando dos trabalhos de Çelyk, Denly e Savas (2003) e de Santin et al. (2003).

Nos resultados encontrados por Zhao et al. (2010) a conversão alimentar e também o peso vivo foram piorados nas aves aos 21 dias de idade pela administração da aflatoxina na dieta, e a PCL não foi capaz de reverter tal efeito. Diferentemente neste estudo, o peso vivo e o ganho de peso foram recuperados com a inclusão da PCL na dieta, apesar da não melhora significativa da conversão alimentar.

As médias de conversão alimentar dos quatro tratamentos na avaliação do produto B aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 31.

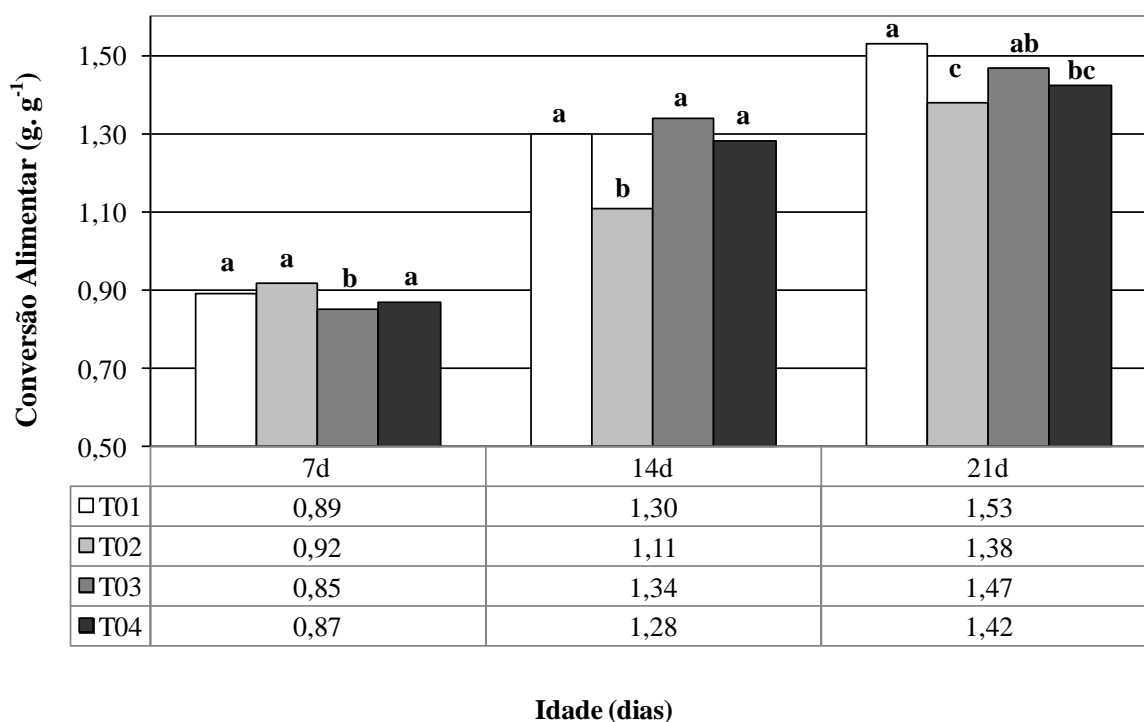


Figura 31: Gráfico da conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Na primeira semana aqui ocorre como já foi dito, o índice para o grupo intoxicado foi baixo, porém não acompanhado de um peso vivo adequado.

Aos 14 e aos 21 dias ocorre o efeito mais que desejável em um prebiótico e em um AAM ao mesmo tempo. Na ausência de micotoxinas na dieta o produto B conseguiu melhorar o índice de conversão (15,4 % menor que o controle), e na presença de micotoxinas mesmo não havendo diferença significativa notamos que a conversão alimentar do grupo melhorou se comparada ao grupo apenas intoxicado (4,5 %). E aos 21 dias ocorreu o mesmo, na ausência de micotoxinas a conversão alimentar foi excelente em relação ao controle (9,8 %), e também melhorou em muito na presença de micotoxinas (3,4 % em comparação com o grupo intoxicado).

Em se tratando do produto B, ele foi o único a melhorar este índice. Logo estes resultados concordam com os estudos de Çelyk, Denly e Savas (2003), Keller et al. (2012) e de Santin et al. (2003) em que os produtos melhoraram a conversão alimentar das aves até na presença de aflatoxinas na dieta.

As médias de conversão alimentar dos quatro tratamentos na avaliação do produto C aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 32.

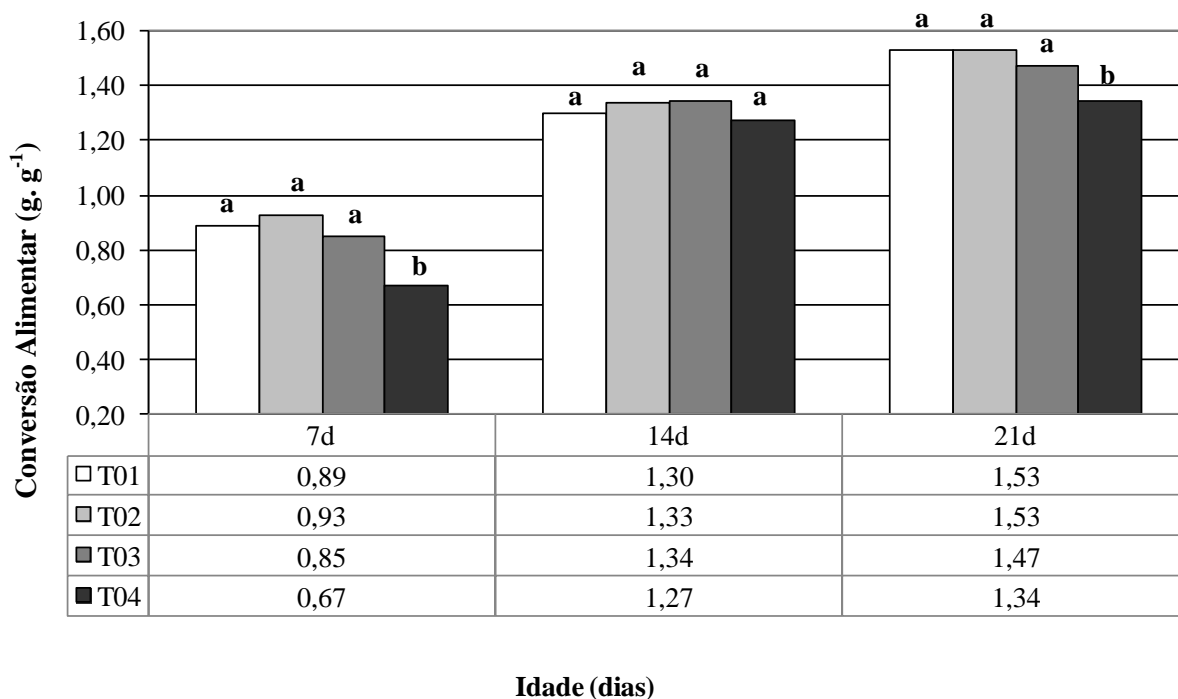


Figura 32: Gráfico da conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Este gráfico é um bom exemplo do porquê que não se pode analisar apenas a conversão alimentar por si só em um experimento deste porte. Segundo a figura, a conversão alimentar para o grupo T04 está boa em todas as fases do experimento, porém já foi visto os efeitos negativos das aflatoxinas na dieta, e do efeito pior ainda que ela causa em conjunto com o produto C administrado na ração: o peso piora ainda mais, e o consumo é muito baixo. O produto C sozinho também em nada ajudou no desempenho das aves. Logo não podemos dizer que a melhora da conversão alimentar para o produto C foi um bom resultado.

4.5 Análises Bioquímicas Realizadas a partir de Amostras de Sangue Colhidas das Aves

A patologia clínica é usada na medicina veterinária de animais de companhia há anos, para avaliar as alterações metabólicas que possam indicar algum sinal de doença nos animais. Porém para aves (de produção ou não) este recurso não é comumente utilizado. Há então uma ausência de informações sobre valores sanguíneos de referência na medicina de aves (SCHIMIDT et al., 2007). Esta etapa do trabalho objetivou reconhecer as alterações provocadas pela aflatoxicose e/ou pela administração do AAM nas aves utilizando como ferramenta as análises bioquímicas séricas.

As médias obtidas dos exames bioquímicos (AST, ALT, ácido úrico e proteínas totais) dos quatro tratamentos na avaliação do produto A aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 33.

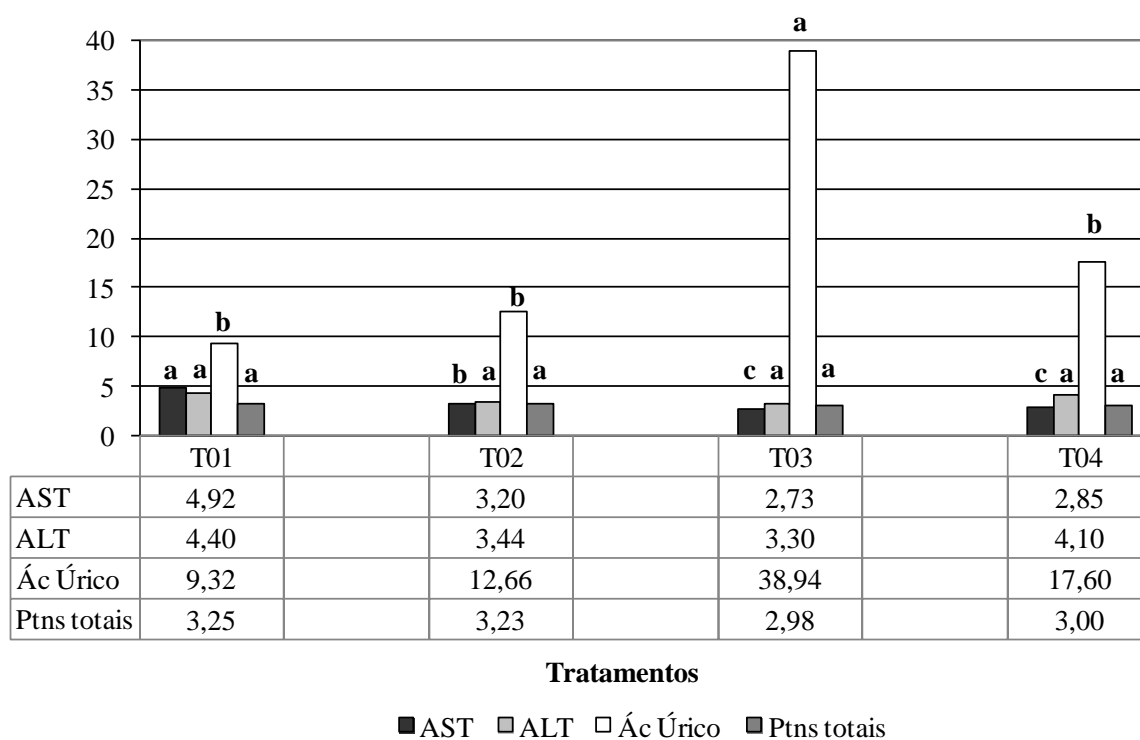


Figura 33: Gráfico das análises bioquímicas dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto A: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Os valores de AST estão expressos em UI L⁻¹ 10⁻³, os de ALT em UI L⁻¹ 10⁻¹, os de ácido úrico em mg dL⁻¹, e o de proteínas totais em g dL⁻¹; Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05).

Para a enzima AST, o grupo controle apresentou valor significativamente mais alto, seguido do grupo T02, e de T03 e T04. Para ALT e proteínas totais não houve diferenças significativas entre tratamentos.

ALT é uma enzima encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma do fígado, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática aguda. Sendo um indicador de disfunção ou inflamação hepática, obstrução dos ductos biliares. Já AST é uma enzima citoplasmática e mitocondrial, presente em vários tecidos, como músculo cardíaco, rins, pâncreas e fígado e seu nível sérico se encontra elevado em caso de lesão hepática mais grave (mas não exclusivamente hepática, pois não é hepato-específica), seja aguda ou crônica (CAMPBELL, 2007; GONÇALVES et al., 2012; SCHMIDT et al., 2007). A elevação dos níveis séricos da AST é sinal de lesão dos hepatócitos, resultante de necrose por exemplo. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas, pois, em dano hepatocelular leve, a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação de enzima mitocondrial elevando a relação AST/ALT. Outro fato é que, em lesões graves, os valores de ALT podem declinar mais rapidamente por terem sido primeiramente lançadas na corrente sanguínea, e os valores de AST ficam por mais tempo elevados, o que acaba elevando esta relação (GONÇALVES et al., 2012).

Não houve diferenças estatísticas significativas entre tratamentos em relação a proteínas totais.

O ácido úrico e a ureia são as provas bioquímicas utilizadas para avaliar a função renal das aves. O ácido úrico é o principal produto do metabolismo de nitrogênio nas aves, é sintetizado no fígado e nos rins, sendo 90% do ácido úrico sanguíneo excretado primariamente por secreção tubular, nos túbulos proximais dos néfrons corticais. Este processo de secreção é independente da reabsorção tubular de água (SCHMIDT et al., 2007). No presente trabalho buscou-se explicações para os níveis de ácido úrico também baseando-se na atividade hepática, pois é o órgão alvo das aflatoxinas.

As análises de ácido úrico surpreenderam em todos os tratamentos de todos os produtos. Os níveis de ácido úrico no grupo intoxicado foram altíssimos em comparação com os demais tratamentos. O produto A foi capaz de abaixar os níveis de ácido úrico nas aves intoxicadas. A seguir se apresenta a discussão para tal efeito, que pode ser explicada pela alteração da síntese protéica e/ou pelas alterações nos rins que a aflatoxicose também causou.

Os resultados apresentados concordam com os de Chowdhury e Smith (2004), e com os de Swamy et al. (2002), que observaram maior ácido úrico plasmático pela presença de

micotoxinas de *Fusarium* na dieta das aves, e a inclusão de glucomananos esterificados restaurou a produção e o ácido úrico a níveis normais. Segundo estes autores, as micotoxinas afetam a síntese protéica, tornando maior a disponibilidade de aminoácidos livres na circulação e sua degradação, e na inclusão de glucomananos a síntese protéica restabelecida e a melhora na filtração glomerular renal retornam esses níveis a valores normais, e que talvez até fatores desconhecidos ajam nesse metabolismo. As teorias e opiniões são muito diferentes. Segundo Batina et al. (2005), Oguz, et al. (2002), Franciscato et al. (2006), os níveis de ácido úrico em frangos intoxicados com aflatoxinas tendem a diminuir, pois o ácido úrico é o produto final do metabolismo protéico, que em aves com aflatoxicose está diminuído. Oguz et al. (2002), entretanto, apesar de concordar com a explanação, não reportou diferenças significativas neste parâmetro bioquímico nas aves em suas pesquisas.

As médias obtidas dos exames bioquímicos (AST, ALT, ácido úrico e proteínas totais) dos quatro tratamentos na avaliação do produto B aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 34.

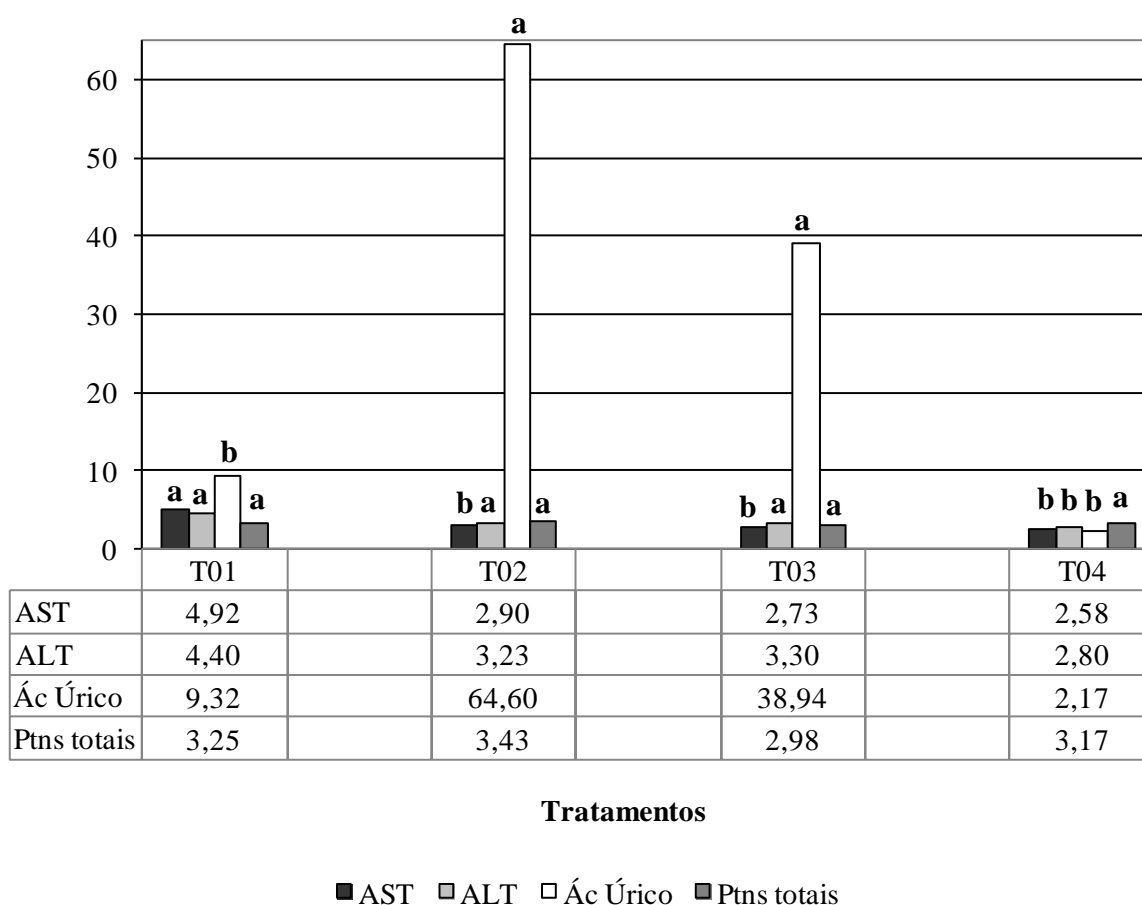


Figura 34: Gráfico das análises bioquímicas dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto B: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Os valores de AST estão expressos em UI L⁻¹ 10⁻³, os de ALT em UI L⁻¹ 10⁻¹, os de ácido úrico em mg dL⁻¹, e o de proteínas totais em g dL⁻¹; Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05).

No caso da avaliação sérica em relação ao produto B, a AST estava alta dentro do grupo controle. A ALT estava baixa apenas para os animais do grupo T04. Este resultado discorda do encontrado por Valdivia et al. (2001), em que o grupo de aves intoxicadas por aflatoxinas é que apresentaram a atividade de ALT baixa em relação aos demais.

Não houve diferenças estatísticas significativas entre tratamentos em relação a proteínas totais.

Os níveis de ácido úrico estavam altos para os animais do grupo T02 e T03, sendo que estavam mais altos para o grupo que consumiu apenas o produto B (T02). Presume-se que, o aditivo, por ser um prebiótico, e fonte de aminoácidos essenciais, eleve os níveis de ácido

úrico também pelo fato de aumentar na circulação a quantidade de aminoácidos livres e elevar o metabolismo protéico, aumentando assim os níveis de ácido úrico circulante.

As médias obtidas dos exames bioquímicos (AST, ALT, ácido úrico e proteínas totais) dos quatro tratamentos na avaliação do produto C aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Figura 35.

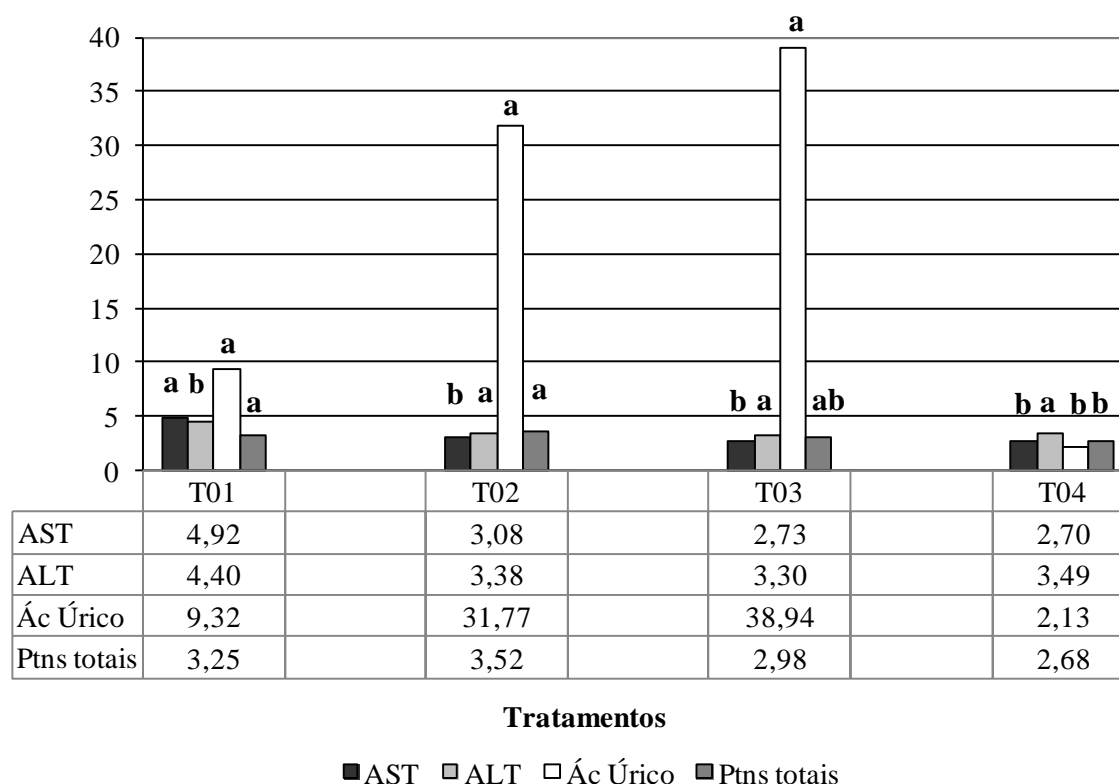


Figura 35: Gráfico das análises bioquímicas dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto C: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁. Os valores de AST estão expressos em UI L⁻¹ 10⁻³, os de ALT em UI L⁻¹ 10⁻¹, os de ácido úrico em mg dL⁻¹, e o de proteínas totais em g dL⁻¹; Médias com letras distintas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05).

Como na avaliação do produto B, a AST estava alta dentro do grupo controle. Os níveis de ácido úrico estavam altos para os animais do grupo T02 e T03, só que com os maiores níveis para o grupo intoxicado. Para ALT, não houve diferenças estatísticas

significativas entre os tratamentos. Para as atividades de AST e ALT, o presente trabalho não encontrou uma homogeneidade de resultados, não podendo então estabelecer uma conclusão acerca desta análise.

Esses resultados discordam com os resultados de Valdivia et al. (2001), que demonstrou em sua pesquisa que a administração 3 mg Kg^{-1} de aflatoxinas na dieta elevou a atividade de AST e decresceu a atividade de ALT.

Os níveis de proteínas totais no grupo intoxicado estavam mais baixos em relação ao grupo controle e T02, e esses níveis diminuíram ainda mais no grupo T04. Dados que concordam com os resultados obtidos por Basmacioglu et al. (2005), Batina et al. (2005) e Franciscato et al. (2006), que também observaram diminuição de proteínas totais por aflatoxicose. Estes resultados também concordam com os de Valdivia et al. (2001) que demonstraram que a aflatoxina é capaz de baixar os níveis de proteínas totais plasmáticas, e com os de Zhao et al. (2010) que em seus estudos demonstraram o mesmo, e que a PCL em suas pesquisas também não foi capaz de reverter esta alteração. A diminuição das concentrações séricas de proteínas totais são indicadores de danos em fígado quando se trata de frangos em consequência da aflatoxicose, pois com o fígado afetado há prejuízos na síntese protéica. Na avaliação dos dois produtos anteriores não observamos alteração em se tratando de proteínas totais.

4.6 Avaliação do peso absoluto dos órgãos (fígado, moela, baço, coração, bursa) e mensuração do intestino

As médias do peso absoluto de órgãos das aves dos quatro tratamentos na avaliação do produto A estão apresentados na Tabela 5.

O peso absoluto da moela das aves não diferiu entre tratamentos pra nenhum dos três produtos testados.

O peso absoluto do baço e da bursa foram menores no grupo intoxicado, e os produtos não foram capazes de reverter este efeito. Estes órgãos fazem parte do sistema imune da ave, como as aflatoxinas causam depreciação do sistema imune em geral, é normal na aflatoxicose que o peso desses órgãos diminuíssem como ocorreu no presente experimento.

Tabela 5: Média do peso absoluto dos órgãos dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto A: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso Absoluto de Órgãos</i>					
	Fígado (g)	Moela (g)	Baço (g)	Coração (g)	Bursa (g)	Intestino (cm)
T01	18,92 ±	18,38 ±	0,57 ±	3,52 ±	1,82 ±	137,91 ±
	1,51 ^a	2,21 ^a	0,13 ^{ab}	0,41 ^a	0,38 ^a	7,20 ^b
T02	18,28 ±	18,61 ±	0,60 ±	3,54 ±	1,75 ±	137,75 ±
	1,49 ^a	2,87 ^a	0,14 ^a	0,35 ^a	0,41 ^{ab}	10,81 ^b
T03	18,49 ±	18,57 ±	0,49 ±	3,44 ±	1,52 ±	145,04 ±
	1,76 ^a	3,83 ^a	0,11 ^b	0,47 ^a	0,35 ^{bc}	11,69 ^a
T04	18,38 ±	17,67 ±	0,54 ±	3,48 ±	1,46 ±	131,21 ±
	1,62 ^a	2,42 ^a	0,11 ^{ab}	0,28 ^a	0,29 ^c	8,45 ^c

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Não houve diferenças estatísticas significativas na avaliação do peso absoluto do fígado e do coração.

O peso absoluto da bursa foi baixo no grupo intoxicado, porém menor ainda no grupo T04, efeito não esperado.

Na mensuração do comprimento total do intestino (em centímetros), o grupo intoxicado apresentou maior comprimento, e o grupo T04 o menor. Os demais apresentaram valores intermediários.

As médias do peso absoluto de órgãos das aves dos quatro tratamentos na avaliação do produto B estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Média do peso absoluto dos órgãos dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto B: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso Absoluto de Órgãos</i>					
	Fígado (g)	Moela (g)	Baço (g)	Coração (g)	Bursa (g)	Intestino (cm)
T01	18,92 ±	18,38 ±	0,57 ±	3,52 ±	1,82 ±	137,91 ±
	1,51 ^a	2,21 ^a	0,13 ^{ab}	0,41 ^a	0,38 ^a	7,20 ^b
T02	18,96 ±	19,01 ±	0,63 ±	3,50 ±	1,82 ±	137,52 ±
	1,92 ^a	2,42 ^a	0,15 ^a	0,36 ^a	0,41 ^a	7,53 ^b
T03	18,49 ±	18,57 ±	0,49 ±	3,44 ±	1,52 ±	145,04 ±
	1,76 ^a	3,83 ^a	0,11 ^b	0,47 ^a	0,35 ^b	11,69 ^a
T04	18,14 ±	18,43 ±	0,52 ±	3,62 ±	1,73 ±	132,60 ±
	1,65 ^a	2,71 ^a	0,13 ^b	0,35 ^a	0,42 ^{ab}	9,14 ^b

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Não houve diferenças estatísticas significativas na avaliação do peso absoluto do fígado e do coração.

Novamente o maior comprimento total de intestinos foi atribuído ao grupo intoxicado.

O peso absoluto da bursa foi mais baixo no grupo intoxicado.

As médias do peso absoluto de órgãos das aves dos quatro tratamentos na avaliação do produto C estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Média do peso absoluto dos órgãos dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto C: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso Absoluto de Órgãos</i>					
	Fígado (g)	Moela (g)	Baço (g)	Coração (g)	Bursa (g)	Intestino (cm)
T01	18,92 ±	18,38 ±	0,57 ±	3,52 ±	1,82 ±	137,91 ±
	1,51 ^a	2,21 ^a	0,13 ^a	0,41 ^a	0,38 ^a	7,20 ^b
T02	18,16 ±	18,82 ±	0,57 ±	3,59 ±	1,81 ±	142,82 ±
	1,99 ^a	2,42 ^a	0,12 ^a	0,31 ^a	0,40 ^a	8,06 ^{ab}
T03	18,49 ±	18,57 ±	0,49 ±	3,44 ±	1,52 ±	145,04 ±
	1,76 ^a	3,83 ^a	0,11 ^b	0,47 ^{ab}	0,35 ^b	11,69 ^a
T04	16,31 ±	17,07 ±	0,48 ±	3,23 ±	1,37 ±	123,46 ±
	1,93 ^b	2,21 ^a	0,11 ^b	0,40 ^b	0,29 ^b	9,10 ^c

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Quanto às mensurações realizadas nas amostras de órgãos para o produto C: o peso absoluto de fígado e coração (que não se alteraram na avaliação dos demais produtos) foram menores dentro do grupo T04.

A menor mensuração do intestino foi atribuída ao grupo T04 e novamente o maior comprimento total de intestinos foi atribuído ao grupo intoxicado. Este efeito foi significativo e foi observado na comparação entre tratamentos da avaliação dos três produtos. Nos primeiros dias de vida (até a primeira quinzena principalmente), o trato gastrointestinal dos pintinhos cresce cerca de quatro vezes mais que o corpo, e sofre mudanças à medida que o animal cresce. O presente experimento foi realizado nesta época de vida dos animais: do primeiro até o vigésimo primeiro dia de vida. Logo, qualquer influência nutricional tem grandes repercussões.

No intestino delgado, o desenvolvimento das vilosidades é fundamental para que a absorção nutritiva funcione plenamente e, para que elas se desenvolvam, é necessária a presença de alimento. O estímulo ao desenvolvimento do intestino delgado (quantitativo e qualitativo) depende muito de novos enterócitos formados na cripta de Lieberkühn, migrando para o topo das vilosidades e já com orientação seletiva para a digestão dos grupos

nutricionais presentes nos alimentos. E paralelamente a isso, há um ajuste da taxa de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal (VIEIRA; POHAL, 2000). A maturação do intestino delgado envolve o aumento do número de vilos no duodeno (4 - 7 dias pós-eclosão), jejuno e íleo (10 – 14 dias pós-eclosão), aumento na profundidade de cripta (até 12 dias de idade), aumento do número de enterócitos por vilos, aumento das microvilosidades do enterócito (primeira semana de vida) e desenvolvimento máximo da síntese de enzimas pancreáticas (10 dias de idade) (BUENO, 2006). O que ocorreu no presente trabalho foi a administração de aflatoxinas na alimentação dos frangos desde o primeiro dia de vida, e essas micotoxinas influenciam negativamente na absorção de nutrientes. Essa velocidade de passagem do alimento teve que ser diminuída, e os enterócitos se desenvolveram mais (maior comprimento do intestino) para a compensação dessa má absorção.

4.7 Avaliação do Aspecto Macroscópico do Fígado e Peso Relativo de Fígado e Rins

O fígado é o órgão alvo das aflatoxinas, logo é este órgão que mais sofre alterações e estas podem ser facilmente visualizadas durante dissecação.

O aspecto macroscópico de amostras de fígado de aves dos quatro tratamentos na avaliação do produto A estão apresentados na Figura 36.

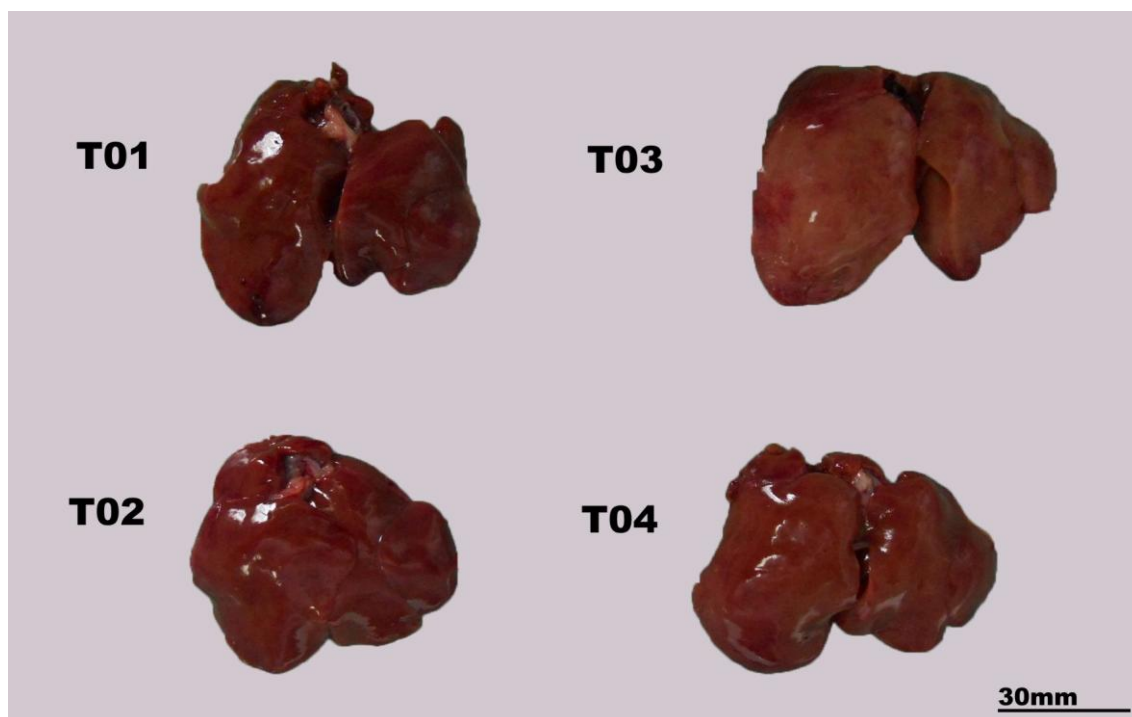


Figura 36: Aspecto macroscópico típico de fígados das aves dos quatro tratamentos pertencentes à avaliação do produto A: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

O fígado das aves do grupo controle apresentou aspecto e cor considerados normais para o órgão: vermelho escuro, superfície lisa arredondada sem depressões ou alterações. E a partir dessa avaliação foi possível a comparação com os demais grupos experimentais.

A aparência das amostras de fígado das aves do grupo T02 foi muito semelhante à do grupo controle.

O fígado de aves do grupo intoxicado apresentou coloração alterada para amarelo-pálido, a textura friável e os bordos arredondados, tudo consequência da degeneração gordurosa sofrida pelo órgão. Visivelmente o tamanho do órgão era maior, apesar de não ter sido constatado aumento do peso absoluto do órgão dentro do grupo. Essas observações estão de acordo com diversos estudos, apesar das diferentes concentrações utilizadas de aflatoxinas: Miazzo et al. (2000), Valdivia et al. (2001) e Zhao et al. (2010).

A aparência do órgão das aves do grupo T04 se aproximou à aparência das amostras do grupo controle. Pode-se dizer que houve uma leve reversão do efeito deletério das aflatoxinas sobre o órgão. Apesar de nítidas as alterações e da utilidade dessa informação, a

avaliação macroscópica de fígado deve ser aliada à outras avaliações, como a de peso relativo do órgão e as análises bioquímicas séricas, dado o caráter subjetivo desta análise.

O aspecto macroscópico de amostras de fígado de aves dos quatro tratamentos na avaliação do produto B estão apresentados na Figura 37.

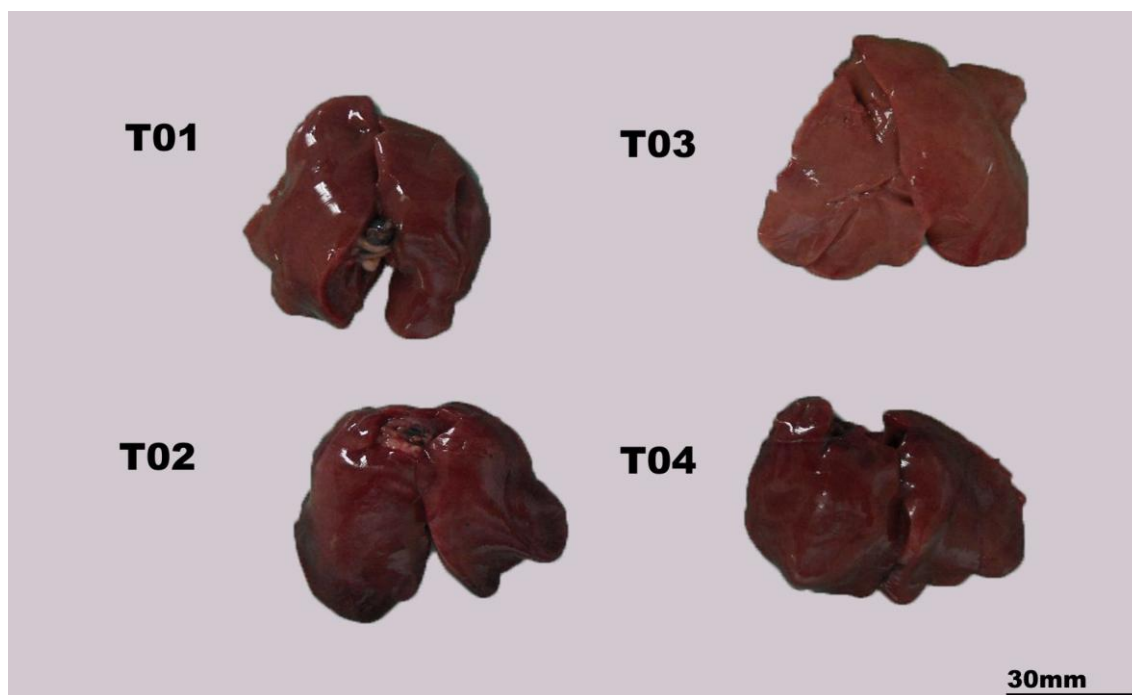


Figura 37: Aspecto macroscópico típico de fígados das aves dos quatro tratamentos pertencentes à avaliação do produto B: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

Os resultados do produto B foram os mesmos apresentados na avaliação do produto A. Houve uma reversão dos efeitos negativos das aflatoxinas sobre órgão pela adição do produto B, visualizado na aparência nítida das amostras de fígado dissecadas.

O aspecto macroscópico de amostras de fígado de aves dos quatro tratamentos na avaliação do produto C estão apresentados na Figura 38.

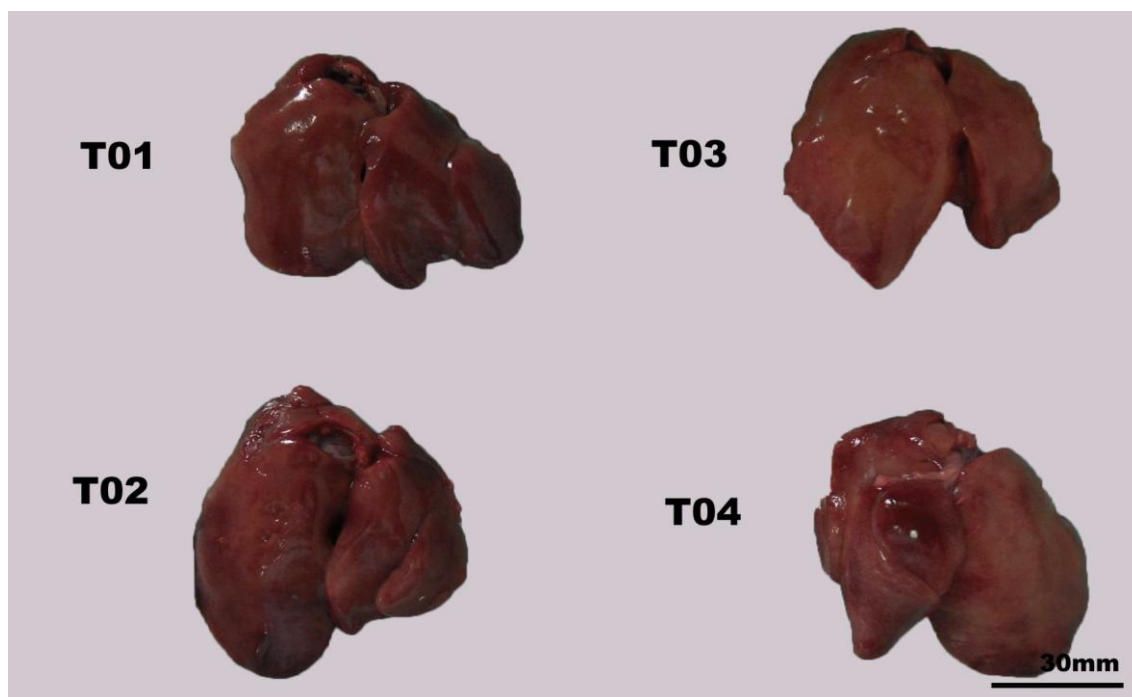


Figura 38: Aspecto macroscópico típico de fígados das aves dos quatro tratamentos pertencentes à avaliação do produto C: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

As amostras de fígado do grupo T02 apresentaram características de cor e tamanho semelhantes às do grupo controle.

Apesar de não ter sido utilizado qualquer instrumento para tornar as diversas nuances de cores possíveis de serem mensuradas, foi notável que as amostras de fígado das aves do T04 apresentaram uma cor pálida, não tão intensa, porém próxima às amostras de fígado no grupo intoxicado.

As médias do peso relativo de fígado e rins das aves dos quatro tratamentos na avaliação do produto A estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Média do peso relativo de fígado e rins dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto A: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso Relativo de Órgãos (%)</i>	
	Fígado	Rins
T01	2,48 ± 0,21 ^a	0,64 ± 0,08 ^a
T02	2,56 ± 0,23 ^a	0,63 ± 0,10 ^a
T03	2,47 ± 0,18 ^a	0,71 ± 0,10 ^a
T04	2,57 ± 0,15 ^a	0,72 ± 0,08 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Apesar do aumento de tamanho notado visivelmente nas amostras de fígado no grupo intoxicado, não houve diferenças estatísticas significativas para o peso relativo do órgão. Também não houve diferenças estatísticas significativas para peso relativo dos rins. Estes resultados estão de acordo com os de Santin et al. (2003) e de Ortatatli et al. (2005), que também não encontraram diferenças significativa no peso desses órgãos durante a exposição de frangos de corte utilizando respectivamente 0,5 e 0,1 mg Kg⁻¹. Apesar da estatística não considerar, nos resultados de Ortatatli et al. (2005) houve cerca de 8,0% de diferença entre peso relativo de fígados de animais intoxicados em relação ao grupo controle. Porém estes resultados não estão de acordo com os de Cardoso (2007) que observou aumento realmente significativo do peso médio relativo do fígado (aumento de 14%) em animais intoxicados com aflatoxinas (2,0 mg Kg⁻¹) até os 21 dias de idade.

As médias do peso relativo de fígado e rins das aves dos quatro tratamentos na avaliação do produto B estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Média do peso relativo de fígado e rins dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto B: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso Relativo de Órgãos (%)</i>	
	Fígado	Rins
T01	2,48 ± 0,21 ^{ab}	0,63 ± 0,08 ^b
T02	2,66 ± 0,25 ^a	0,62 ± 0,07 ^b
T03	2,47 ± 0,18 ^{ab}	0,71 ± 0,10 ^a
T04	2,32 ± 0,14 ^b	0,54 ± 0,10 ^c

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

O grupo T02 apresentou maior peso relativo de fígado, seguidos do grupo controle e T04 (não diferem estatisticamente entre si) e o menor peso relativo do órgão foi atribuído ao grupo T04.

A tendência após uma aflatoxicose é que o peso relativo do fígado aumente, pois o órgão passa por um processo de degeneração gordurosa e há o acúmulo anormal de gordura no órgão comprometendo seu funcionamento. Este efeito não foi observado neste estudo, em nenhum dos produtos avaliados. Zhao et al. (2010) reportaram o aumento de 26 % e 65% no peso relativo do fígado com a administração de 1 e 2 mg Kg⁻¹ de aflatoxina respectivamente, e a PCL testada não foi capaz de reverter este efeito.

O grupo intoxicado apresentou a maior média de peso relativo de rins, seguida do grupo controle e T02, que não diferiram estatisticamente. E a menor média foi atribuída ao grupo T04. Com a aflatoxicose, o peso relativo dos rins também tende a aumentar, pois há congestão glomerular, degeneração tubular com conseqüente filtração glomerular prejudicada e áreas de nefrose. Estes resultados concordam com os de Ortatatli et al. (2005), que, apesar de em seus estudos não terem sido encontradas diferenças estatísticas significativas, a diferença do peso médio relativo de rins do grupo controle para o intoxicado foi de 11,3%, e sua dose de aflatoxinas foi de 0,1 mg Kg⁻¹ apenas.

As médias do peso relativo de fígado e rins das aves dos quatro tratamentos na avaliação do produto C estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Média do peso relativo de fígado e rins dos animais nos diferentes tratamentos relativos ao produto C: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso Relativo de Órgãos (%)</i>	
	Fígado	Rins
T01	2,48 ± 0,21 ^a	0,63 ± 0,08 ^a
T02	2,38 ± 0,44 ^a	0,75 ± 0,12 ^a
T03	2,47 ± 0,18 ^a	0,71 ± 0,10 ^a
T04	2,48 ± 0,11 ^a	0,68 ± 0,16 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Como na avaliação do parâmetro no produto A, também não houve diferenças estatísticas significativas para o peso relativo do fígado e rins para os grupos experimentais de avaliação do produto C, apesar das diferenças macroscópicas notáveis.

4.8 Alterações / Lesões Histopatológicas Observadas em Fígado e Rins

As alterações histopatológicas (e seus graus) ocorrida no fígado das aves dos oito tratamentos estão apresentados na Tabela 11. Como para esta variável (avaliação histopatológica de rins e fígado) não foi aplicada a avaliação estatística, todos os resultados foram apresentados em tabela única. Os grupos T02, T05 e T07 foram os tratamentos que receberam os produtos A, B e C respectivamente sem adição de toxina, e os grupos T04, T06 e T08 foram os tratamentos que receberam os produtos A, B e C respectivamente adicionados de aflatoxinas na dieta.

Tabela 11: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM A; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM A + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T05 - 0,2% AAM B; T06 - 0,2% AAM B + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T07 - 0,2% AAM C; T08 - 0,2% AAM C + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08
<i>Alterações histopatológicas</i>								
Desorganização de hepatócitos	-	-	+++	+	-	+	-	+++
Vacuolização de hepatócitos	-	-	+++	-	-	-	-	+++
Infiltrado de células basofílicas no espaço porta	+	+	+++	+	+	+	+	+++
Hiperplasia de ductos biliares	-	-	+++	+	-	-	-	++
Hemorragia periportal e congestão de veia centro-lobular	-	-	+++	-	-	-	-	++
Ectasia de capilares sinusóides	-	-	+++	+	-	-	-	+++
Necrose periportal	-	-	+++	+	-	-	-	+++

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

A única alteração observada para as amostras do grupo controle foi um infiltrado discreto de células basofílicas no espaço porta. Esta alteração foi observada em todas as amostras, porém com intensidade nos grupos T03 e T08 e também foi a única alteração observada nos tratamentos em que os animais receberam na dieta apenas os aditivos A, B e C.

No grupo intoxicado, todas alterações listadas ocorreram juntas (Figura 39) com intenso grau: desorganização e vacuolização de hepatócitos, infiltrado de células basofílicas, necrose e hemorragia no espaço porta, ectasia de capilares sinusóides e hiperplasia de ductos biliares. Todas essas alterações em conjunto caracterizam a degeneração gordurosa, hidrópica e necrose do tecido, próprios de uma intoxicação por aflatoxinas em aves. Esses achados se assemelham com os da pesquisa de: Valdivia et al. (2001), Miazzo et al. (2000), Ortatlatli et al. (2005) e Zhao et al. (2010).

O objetivo do aditivo na dieta é a diminuição da intensidade desses efeitos sobre o tecido hepático, já que eles atuam na diminuição da disponibilidade de aflatoxinas na dieta. O produto A atuou bem, as alterações no grupo T04 foram notadas com grau discreto, exceto

pela vacuolização de células e hemorragia que não ocorreram. O produto B também atuou muito bem, apenas uma desorganização discreta de hepatócitos no grupo T06 foi notada. Estes resultados discordam com os de Zhao et al. (2010), pois a PCL testada não foi capaz de reverter estes efeitos.

Porém o produto C também se mostrou ineficaz na avaliação histopatológica. Todas as alterações ocorreram em grau intenso ou moderado, como no grupo T03. Ou seja, o produto C não foi capaz de proporcionar um efeito hepatoprotetor aos animais que consumiram aflatoxinas na dieta.

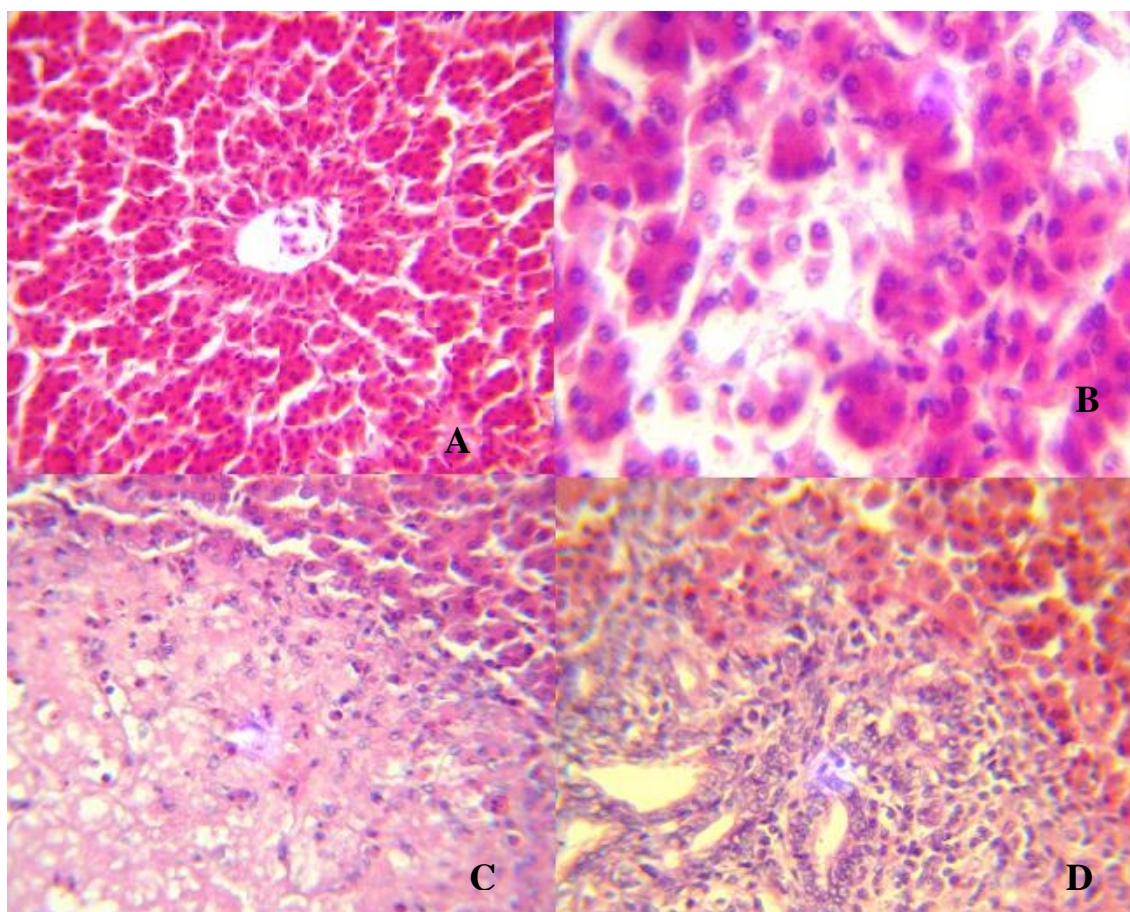


Figura 39: Micrografia de amostras de fígado das aves: A – Fígado controle, disposição normal de hepatócitos e espaço porta normal; B – Desorganização celular e necrose individual de hepatócitos; C – Área de necrose focalmente extensa; D – Necrose, proliferação e acúmulo de células basofílicas ao redor de canálculos biliares.

As alterações histopatológicas (e seus graus) ocorrida nos rins das aves dos oito tratamentos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Alterações histopatológicas observadas nos rins dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias: T01 – dieta base; T02 – 0,2% AAM A; T03 - 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T04 – 0,2% AAM A + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T05 - 0,2% AAM B; T06 - 0,2% AAM B + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁; T07 - 0,2% AAM C; T08 - 0,2% AAM C + 1 mg Kg⁻¹ AFB₁.

Alterações histopatológicas	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08
Congestão glomerular	-	-	+++	+	-	-	-	+++
Nefrose tubular focal	-	-	+++	-	-	-	-	-
Infiltrado inflamatório mononuclear intersticial	-	-	+++	+	-	+	-	+++
Congestão difusa de vasos intersticiais	-	+	-	-	+	-	+	-

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

O mesmo ocorreu com as alterações histopatológicas nos rins. Nenhuma alteração foi constatada no tecido renal dos animais no grupo controle, e nos grupos que receberam os produtos, apenas uma discreta congestão de vasos intersticiais foi notada. No grupo de animais intoxicados houve congestão glomerular, nefrose tubular e infiltrado inflamatório mononuclear intersticial em grau intenso. E no grupo T08 (produto C mais aflatoxina) observaram-se as mesmas alterações do grupo intoxicado, com exceção da nefrose tubular.

Esses resultados concordam parcialmente com os de Valdivia et al. (2001), que observou em frangos da mesma idade as mesmas respostas do tecido renal às aflatoxinas, porém em menor intensidade, com espessamento da membrana basal do glomérulo, e ausência de nefrose. Ortatli et al. (2005) somente reportou degeneração tubular em alguns animais (30%) intoxicados.

Os resultados obtidos do grupo T08, com relação a fígado e rins, demonstram a ausência de um efeito protetor contra aflatoxinas da dieta pelo produto C.

5 CONCLUSÕES

- ❖ Sob as mesmas condições de temperatura, umidade e criação, as aves do mesmo lote neste estudo responderam de maneira diferente (na avaliação de parâmetros zootécnicos) aos três produtos à base de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* testados, mostrando a importância da influência da cepa fúngica e da constituição de cada produto;
- ❖ Dois dos produtos utilizados, o AAM A e o AAM B - exatamente os que continham 100% de PCL, melhoraram o peso vivo, o ganho de peso e o consumo de ração durante os 21 dias, incluindo as aves intoxicadas experimentalmente. Esses produtos também puderam atenuar o aumento do comprimento total de intestinos, e alterações hepáticas e renais, e consequentemente séricas e enzimáticas devido à intoxicação;
- ❖ A única alteração não revertida por nenhum dos três AAMs foi a redução dos pesos absolutos dos órgãos linfóides: baço e bursa.
- ❖ Um dos produtos (AAM C – 70% PCL + 30% bentonita sódica) não foi capaz de atenuar os efeitos negativos da aflatoxicose induzida, ao contrário, o produto até piorou muitos dos índices, como o peso vivo e as alterações hepáticas e renais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, as paredes celulares de leveduras isoladas se mostraram efetivos aditivos anti-micotoxinas incorporadas em rações de aves experimentalmente intoxicadas com aflatoxinas. Mais estudos devem ser realizados acerca de AAM à base de PCL incorporados na alimentação animal, tais como:

- ❖ Experimentos *in vivo* reduzindo a quantidade de micotoxinas ingeridas pelos animais em concentrações de ocorrência natural;
- ❖ Experimentos *in vivo* quantificando os níveis de aflatoxinas em produtos de origem animal: carne e ovos;
- ❖ Estudar a influência da co-ocorrência de diferentes micotoxinas na capacidade de adsorção *in vivo*;
- ❖ Realizar estudos de quantificação de micotoxinas fornecidas aos animais também na matéria fecal, desta forma confirma-se se houve um processo de adsorção e/ou degradação da molécula de micotoxina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Current importance of ochratoxin A – producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 903-906, 2001.

ABREU, A. P. N.; SPERS, A.; SPERS, R. C.; GARCIA, E. A.; BERTO, D. A.; MOLINO, A. B.; PELÍCIA, K.; SILVA, A. P. Níveis de adsorvente em rações contaminadas por micotoxinas e desempenho em codornas japonesas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 551 – 560, 2008.

ALBINO, L. F. T.; FERES, F. A.; DIONIZIO, M. A.; ROSTAGNO, H. S.; VARGAS JUNIOR, J. G.; CARVALHO, D. C. O.; GOMES, P. C.; COSTA, C. H. R. Uso de prebiótico à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 742-749, 2006.

ALMEIDA, A. V. A. F.; BOTURA, M. B.; ABREU, R. D.; BITTENCOURT, T. C. C.; BATATINHA, M. J. M. Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no Estado da Bahia. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 76, n. 3, p. 353 - 358, 2009.

ARAÚJO, J. A.; SILVA, J. H.V; AMÂNCIO, A. L. L; LIMA, M. R; LIMA, C. B; Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasília**, v.1, n.3, p.69-77, 2007.

ARAVIND, K. L.; PATIL, V. S.; DEVEGOWDA, G.; UMAKANTHA, B. GANPULE, S. P. 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.

ASTORECA, A.; BARBERIS, C.; MAGNOLI, C.; COMBINA, M.; DALCERO, A. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by

Aspergillus niger aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 131-135, 2009.

AVISITE. **Oferta aumenta e preço do frango vivo permanece inalterado**. 21 mar 2014. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/noticias/index.php?codnoticia=14901>>. Acesso em: 21 mar 2014.

AWAAD, M. H. H.; ATTA, A. M.; EL-GHANY, W. A. A.; ELMENAWAY, M.; AHMED, K.; HASSAN, A. A.; NADA, A. A.; ABDELALALEEM, G. A. Effect of a Specific Combination of Mannan-Oligosaccharides and β -Glucans Extracted from Yeast Cell Wall on the Health Status and Growth Performance of Ochratoxicated Broiler Chickens. **Journal of American Science**, v. 7, n. 3, p. 82-96, 2011.

BASMACIOGLU, H; OGUZ, H.; ERGUL, M.; COL, R.; BIRDANE, Y. O. Effect of dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. **Czech Journal of Animal Science**, v.50, n. 1, p. 31 – 39, 2005.

BATINA, P. N.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M.; SOUZA, C.; MARTINS, D. B. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 826-831, 2005.

BEHLING, M.; ZONTA, E.; LIMA, E.; SOBRINHO, N. M. B. A. Produtividade e desempenho vegetativo de dez cultivares de soja na Baixada Fluminense, Seropédica-RJ. **Revista Ceres**, v. 56, n. 1, p. 69-73, 2009.

BENITES, V.; GILHARRY, R.; GERNAT, A. G.; MURILO, J. G. Effect of dietary mannan oligosaccharide from Bio-Mos or SAF-Mannan on live performance of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 17, n. 4, p. 471-475, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portaria MAARA No.183 de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, de 25 de março de 1996, seção 1, p 4929.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portaria nº 13 de 24 de maio de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de maio de 2006, Seção 2, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Aditivos, **antimicrobianos e anticoccidianos autorizados no Brasil**. 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados>> Acesso em 18 out. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 02 de fevereiro de 2011, seção 1, p. 72..

BRAZILIAN CHICKEN, O site da indústria avícola no Brasil. **O Frango pelo Mundo**. 2009. Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/industria-avicola/o-frango-pelo-mundo.php>http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson_r/A_flavus3.html> Acesso em: 22 mai. 2012

BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 22, p. 525-564, 1991.

BRUNS, T. D.; VILGALYS, R.; BARNS, S. M.; GONZALEZ, D.; HIBBETT, D. S.; LANE, D. J.; SIMON, L.; STICKEL, S.; SZARO, T. M.; WEISBURG, W. G.; SOGIN, M. L. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 1, p. 231- 241, 1993.

BUENO, F. L. **Efeito da Forma Física, Granulometria (DGM) e Adição de Óleo em Dietas Iniciais de Frangos**. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2006. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado (Ciências Veterinárias). 47 p.

CAMPBELL, T. W. Bioquímica clínica de aves. In: THRALL, M.A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 415-435.

CAMPOS, S. G. Micotoxicose. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 28 – 29, 1999.

CARDOSO, V. S. **Efeitos da piperina em frangos de corte (*Gallus gallus*) com intoxicação experimental por aflatoxinas**. Seropédica, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007. Originalmente apresentado como dissertação de Mestrado. 47p.

ÇELYK, K.; DENLY, M.; SAVAS, T. Reduction of toxic effects of aflatoxin by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicken diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 615–619, 2003.

CHOWDHURY, R. S.; SMITH, T. K. Effects of Feeding Blends of Grains Naturally Contaminated with *Fusarium* Mycotoxins on Performance and Metabolism of Laying Hens. **Poultry Science**, v. 83, n. 11, p. 1849 – 1856, 2004.

CORNELL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF PLANT PATHOLOGY AND PLANT-MICROBE BIOLOGY. **Nelson Lab: Genetic Dissection of Maize Disease Resistance – A young maize kernel infected with *Aspergillus flavus***. 2005. Disponível em: <http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson_r/A_flavus3.html> Acesso em: 31 jul. 2011.

DAGHIR, N. J. Mycotoxins in Poultry Feed. In: DAGHIR, N. J. **Poultry Production in Hot Climates**. 2 ed. Cambridge: CABI, 2008. p. 197-218.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIO, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 179-184, 1997.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M. M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO R.; PALACIO, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.

DIONIZIO, M. A.; BERTECHINI, A. G.; KATO, R. K.; TEIXEIRA, A. S. Prebióticos como promotores de crescimento para frangos de corte – Desempenho e Rendimento de Carcaça. **Ciência Agrotécnica**, edição especial, p. 1580-1587, 2002.

EMBRAPA: FIORENTIM, L. **Entendendo a questão dos probióticos como promotores do crescimento em frangos**. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=Artigos&cod_artigo=203>. Acesso em: 31 maio 2010.

FARIA, D. E.; HENRIQUE, A. P. E. F.; NETO, R. F.; MEDEIROS, A. A.; JUNQUEIRA, O. M.; FARIA FILHO, D. E. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 1. probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 1 – 8, 2009.

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 617-621, 2000.

FERREIRA, F. A. B.; KUSSAKAWA, K. C. K. Probióticos: Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 8, n. 1, p. 40 – 43, 1999.

FLEMMING, J. S.; FREITAS, R. J. S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformes* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 41-47, 2005.

FRANCISCATO, C.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M.; WOLKMER, P.; MACIEL, R. M.; PAULA, M. T.; GARMATZ, B. C.; COSTA, M. M. Concentrações séricas de minerais e funções hepática e renal de frangos intoxicados com aflatoxina e tratados com montmorilonita sódica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1573-1577, 2006.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MANDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e animal. **Documentos 110: Embrapa**, 2007.

GIACOMINI, L. Z.; FICK, F. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; RAUBER, R. H.; ALMEIDA, C. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 234-239, 2006.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, B. M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GONCALVES, F. G. ; ZANINI, S. F. ; FEITOSA, M. L. ; GONÇALVES, E. P. M.; COLNAGO, G. L. Efeito da pimenta rosa associada a diversas dosagens de antibióticos em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1503 - 1509, 2012.

GOPALKRISHNAN, G.; BANUMATHI, B.; SURESH, G. Evaluation of the antifungal activity of natural xantones from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivative. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 5, p. 519-524, 1997.

GRAHAM, H.; MCCRACKEN, K. J. Yeasts in Animal Feeds. In: GARNSWORTHY P. C.; WISEMAN, J. **Recent Advances in Animal Nutrition**. Nottingham: University Press, 2005. p 169-211.

HOMERO, V. Avicultura fluminense: um setor com grande possibilidade de expansão. **Boletim da Faperj**, Ano VI, n. 293, 2010.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, 1993. 571p.

KAMALZADEH, A.; HOSSEINI, A.; MORADI, S. Effects of Yeast Glucomannan on Performance of Broiler Chickens. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, n. 1, p. 49-53, 2009.

KELLER, K. M. **Leveduras com potencial ação descontaminante de micotoxinas e como probiótico para aplicação na produção animal**. Seropedica, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012. Originalmente apresentada como tese de Doutorado (Ciências Veterinárias). 146p.

KELLER, K. M.; OLIVEIRA, A. A.; ALMEIDA, T. X.; KELLER, L. A. M.; QUEIROZ, B. D.; NUNES, L. M. T.; CAVAGLIERI, L. R.; ROSA, C. A. R. Efeito de parede celular de

levedura sobre o desempenho produtivo de frangos de corte intoxicados com Aflatoxina B₁. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 2, p. 101-105, 2012.

KHAN, S. H.; HASAN, S.; SARDAR, R.; ANJUN, M. A. Occurrence of Aflatoxin B₁ in Poultry Feed and Feed Ingredients in Pakistan. **International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 30-42, 2011.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

KRÜGER, C. D. **Ocratoxina A em suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro sob Inspeção Sanitária. I. Determinação de níveis séricos por cromatografia líquida. II. Correlação com as lesões renais e hepáticas**. Niterói, Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense, 2006. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária). 81p.

LEDOUX, D. R., WEIBKING, T. S., ROTTINGHAUS, G. E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ in the young turkey poults. **Poultry Science**, v.75, n. 12, p.1472-1478, 1997.

LEGARDA, T. M.; BURDASPAL, P. A. Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países de la Unión Europea. **Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos**, n. 291, p. 115-122, 1998.

LI, Y. C.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; FRITSCHKE, K. L.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 78, n. 9, p. 1275-1282, 1999.

LILLEHOJ, E. B. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Ratón: CRC Press, 1991. p. 1-35.

LIMA H. J. D. Prebióticos na dieta de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 4, p. 599-606, 2008.

LODDI, M. M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. **Revista CFMV**, v. 23, p. 51-56, 2001.

LOPES, J. M.; RUTZ, F.; MALMANN, C. A.; TOLEDO, G. S. T.; Adição de bentonita sódica como adsorvente de aflatoxinas em rações de frangos de corte. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1594-1599, 2006.

LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 53-75, 2009.

MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. Toxical aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 267-359.

MAGNOLI, A. P.; TALLONE, L.; ROSA, A. C. R.; DALCERO, A. M.; CHIACCHIERA S. M.; SANCHEZ, R. M. T. Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin. **Applied Clay Science**, v. 40, n. 1, p. 63 – 71, 2008.

MAGNOLI, C.; DALCERO, A.; CHIACCHIERA S.; MIAZZO, R.; SAENZ, M. A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, n. 1, p. 27-32, 1998.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria: Sociedade Vicente Pallotti, 2007, 238p.

MARIN, D. E.; TARANU, I.; BUNACIU, R. P.; PASCALE, F.; TUDOR, D. S.; AVRAM, N.; SARCA, M.; CUREU, I.; CRISTE, R. D.; SUTA, V.; OSWALD, I. P. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 1250-1257, 2002.

MIAZZO, R. D.; ROSA, C. A. R.; CARVALHO, E.C.Q.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIO, G.; SAENZ, M.; KIKOT, A.; BASALDELLA, E.; DALCERO, A. M.

Efficacy of synthetic zeolites to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, n. 1, p. 1–6, 2000.

MIAZZO, R.; PERALTA, M. F.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; FERRERO, S.; CHIACCHIERA, S. M.; CARVALHO, E. C.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p.1-8, 2005.

NOGUEIRA S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e conseqüentes problemas de segurança alimentar. **Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Determinação da concentração de b-glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 312-316, 2003.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2009.

PRESCOTT. L. M.; HARLEY, J.; KLEIN, A. C. D. **Microbiology**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2002. 1147 p.

OGUZ, H.; KURTOGLU, F.; KURTOGLU, V.; BIRDANE, Y. O. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Research in Veterinary Science**, v.73, n. 1, p.101 -103, 2002.

ORTATATLI M., OGUZ, H.; HATIPOGLU, F.; KARAMAN, M. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Research in Veterinary Science**, v. 78, n. 1, p. 61-68, 2005.

RAWAL, S.; KIM, J. E.; COULOMBE JR, R. Aflatoxin B₁ in poultry: toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 3, p. 325-331, 2010.

ROLL, V. F. B.; LOPES, L. L.; ROSSI, P.; ANCIUTI, M. A.; RUTZ, F.; XAVIER, E. G.; SILVA, S. S. Hematologia de frangos alimentados com dietas contendo aflatoxinas e adsorvente de toxinas. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 225, p. 93 – 101, 2010.

ROSA, C. A. R.; MIAZZO, R.; MAGNOLI, Z.; SALVANO, M.; CHIACCHIERA, S. M.; FERRERO, S.; SALUZ, M.; CARVALHO, E. C. Q.; DALCERO, A. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **Poultry Science**, v. 80, n. 2, p. 139-144, 2001.

ROSA, C. A. R.; RIBEIRO, J. M. M.; FRAGA, M. E.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L. R.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M.; LOPES, C. W. G. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 89 – 96, 2006.

ROSA, C. A. R., KELLER, K. M., OLIVEIRA, A. A., ALMEIDA, T. X., KELLER, L. A. M., MARASSI, A. C., KRUGER, C. D., DEVEZA, M. V., MONTEIRO, B. S., NUNES, L. M. T., ASTORECA, A., CAVAGLIERI, L. R., DIREITO, G. M., EIFERT, E. C., LIMA, T. A. S., MODERNELL, K. G., NUNES, F. I. B., GARCIA, A. M., LUZ, M. S., OLIVEIRA, D. C. N. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhao State, Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 27, n. 2, p.241 - 248, 2010.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos da micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 68, n. 2, p. 107 - 114, 2001.

ROSSI, P.; NUNES, J. K.; RUTZ, F.; REIS, J. S.; BOURSHEIDT, D.; ROCHA, A. A.; MORAES, P. V. D.; ANCIUTI, M. A. Glucomanano e selênio em frangos alimentados com dietas com aflatoxinas. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 237, p.33-43, 2013.

RUSSO, R.; FREITAS, T. Brasil abre disputa com África do Sul por exportação de frango. **BOL Notícias**. 2012. Disponível em: <http://noticias.bol.uol.com.br/internacional/2012/06/22/brasil-abre-disputa-contr-africa-do-sul-por-exportacao-de-frango.jhtm>. Acesso em: 16 mar 2014.

RUTZ, F.; LIMA, G. J. M. M. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre, RS. **Anais do Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**. Concórdia, SC: CNPSA, 2001. 10p. CD-ROM.

SALLE, C. T. P.; LORENZINI, G.; SFOGGIA, M.; CÉ, M. C.; GUAHYBA, A. S.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P.; SALLE, F. O. Presença de Aflatoxinas em fígados de frangos de corte criados a campo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Rio Grande do Sul**, v. 29, n. 2, p. 101-106, 2001

SAMSON, R. A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6 ed., Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 2000. 388 p.

SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; KRABBE, E. L.; ALESSI, A. C.; POLVEIRO, W. J. C.; MAIORKA, A. Low level of aflatoxina in broiler at experimental conditions. Use of cellwall yeasts as adsorbent of aflatoxin. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 51-55, 2003.

SANTOS, J. F; GRANGEIRO, J. I. V. Desempenho de aves caipira alimentadas com mandioca e palma forrageira enriquecidas com levedura. **Tecnologia & Ciência Agropecuaria**, v. 6, n. 2, p.49-54, 2012.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, p. 1 – 12, 2000.

SARGEANT, K.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R. B. A.; ALLCROFT, R. The assay of a toxic principle in certain groundnuts meals. **Veterinary Records**, v. 73, n. 46, p. 1219 – 1223, 1961.

SAS Institute, 1985. **SAS User's Guide: Statistics**. Version 6 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; NETTO, D. P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 63-72, 2003.

SCHMIDT, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A.C. Patologia clínica em aves de produção - uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola - revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 9 - 20, 2007.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.

SERRA, R. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. Largo do Paço, Braga: Universidade do Minho, 2005 Originalmente apresentada como tese de Doutorado (Engenharia Biológica). 330p.

SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; STUBBLEFIELD, R. D.; SORENSON, W. G. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 425 - 428, 1966.

SILVA, P. L. Desafios Atuais na Produção e na Sanidade Avícola. **Engormix Artigos**. 2009. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/desafios-atuais-producao-sanidade-t216/165-p0.htm>> Acesso em: 26 jul 2011.

SORENSON, W. G. Fungal Spores: Hazardous to Health? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, s. 3, p. 469-472, 1999.

SOUZA, G. M. **Os promotores de crescimento na produção de aves de corte**. Campo Grande, Mato Grosso do Sul: Universidade Católica Dom Bosco, 2009. Originalmente apresentada como Monografia, trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária, 52 p.

SWAMY, H. V. L. N., SMITH, T. K., COTTER, P. F., BOERMANST, H. J.; SEFTONS, A. E. Effects of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on production and metabolism in broiler. **Poultry Science**, v. 81, n. 7, p. 966-975, 2002.

SWAMY, H. V. L. N., SMITH, T. K., KARROW, N. A., BOERMANST, H. J. Effects of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological parameters of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 4, p. 533-543, 2004.

TECSA. **Micotoxinas em Aves - Adaptação do 14º Curso de Sanidade Avícola Fort Dodge**. 2010. Disponível em: < <http://www.tecsa.com.br/media/file/pdfs/DICAS%20DA%20SEMANA/AVICULTURA%202010/Micotoxinas%20em%20aves.pdf>> Acesso: em 23 jul. 2011.

TEDESCO, D.; STEIDLER, S.; GALLETI, S.; TAMENI, M.; SONZOGNI, O.; RAVAROTTO, L. Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B₁ in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 83, n. 11, p. 1839–1843, 2004.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B₁ e fumonisina B₁. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 924 - 929, 2006.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento UE No 466/2001 de la Comisión de 8 de marzo de 2001. **Diário Oficial da União Européia**. Bruxelas, UE, de 8 de março de 2001.

VALDIVIA A. C.; MARTÍNEZ, A.; DAMIÁN, F. J.; QUEZADA, T.; ORTÍZ, R.; MARTÍNEZ, C.; LLAMAS, J.; RODRÍGUEZ, M. L.; YAMAMOTO, L.; JARAMILLO, F.; LOARCA-PINA, M. G.; REYES, J. L. Efficacy of N-acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B₁ intoxication in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p. 727–734, 2001.

VIEIRA, S. L.; POPHAL, S. Nutrição Pós-Eclosão de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 3, p. 189 – 199, 2000 .

YIANNIKOURIS, A.; ANDRE, G.; BULEON, A. ; JEMINET, G. ; CANET, I ; FRANCOIS, J.; BERTIN, G; JOUANY. J. P. Comprehensive conformational study of key interactions involved in zearalenone complexation with β -d-glucan. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, p. 2176–2185, 2004.

YIANNIKOURIS, A., POUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C. G.; FRANCOIS, J.; BERTING, G.; JOUANY, J. P. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: Application to zearalenone. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 10, p. 783–789, 2003.

ZHAO, J.; SHIRLEY, R. B.; DIBNER, J. D.; URAIZEE, F.; OFFICER, M.; KITCHELL, M.; VAZQUEZ-ANON, M.; KNIGHT, C. D. Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 89, n. 10, p. 2147–2156, 2010.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A: Peso vivo dos animais no 1º dia e aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A.

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso Vivo (g)</i>			
	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia
T01	42,26 ± 0,27 ^a	151,82 ± 7,14 ^a	428,85 ± 23,74 ^a	720,97 ± 26,38 ^a
T02	42,36 ± 0,18 ^a	155,81 ± 6,00 ^a	409,72 ± 14,47 ^{ab}	735,78 ± 21,26 ^a
T03	42,35 ± 0,13 ^a	149,88 ± 8,39 ^a	397,92 ± 14,53 ^b	727,68 ± 15,68 ^a
T04	42,24 ± 0,21 ^a	151,15 ± 9,35 ^a	409,63 ± 24,63 ^{ab}	726,52 ± 14,74 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE B: Peso vivo dos animais no 1º dia e aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B.

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso Vivo (g)</i>			
	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia
T01	42,26 ± 0,27 ^a	151,82 ± 7,14 ^a	428,85 ± 23,74 ^a	720,97 ± 26,38 ^a
T02	42,35 ± 0,22 ^a	152,96 ± 8,31 ^a	414,59 ± 16,36 ^{ab}	737,99 ± 21,16 ^a
T03	42,35 ± 0,13 ^a	149,88 ± 8,39 ^a	397,92 ± 14,53 ^b	727,68 ± 15,68 ^a
T04	42,40 ± 0,18 ^a	149,10 ± 8,37 ^a	408,76 ± 35,46 ^{ab}	735,04 ± 26,98 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE C: Peso vivo dos animais no 1º dia e aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C.

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso Vivo (g)</i>			
	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia
T01	42,26 ± 0,27 ^a	151,82 ± 7,14 ^a	428,85 ± 23,74 ^a	720,97 ± 26,38 ^a
T02	42,35 ± 0,19 ^a	153,39 ± 5,63 ^a	419,08 ± 48,87 ^{ab}	735,29 ± 23,16 ^a
T03	42,35 ± 0,13 ^a	149,88 ± 8,39 ^a	397,92 ± 14,53 ^b	727,68 ± 15,68 ^a
T04	42,31 ± 0,17 ^a	105,74 ± 7,50 ^b	269,62 ± 18,14 ^c	584,70 ± 19,96 ^b

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE D: Ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A.

<i>Tratamentos</i>	<i>Ganho de Peso (g)</i>		
	7º dia	14º dia	21º dia
T01	109,56 ± 7,25 ^a	277,03 ± 26,04 ^a	292,12 ± 37,14 ^b
T02	113,44 ± 5,96 ^a	253,92 ± 10,08 ^b	326,06 ± 9,63 ^a
T03	107,53 ± 8,45 ^a	248,04 ± 7,85 ^b	329,77 ± 5,75 ^a
T04	108,91 ± 9,26 ^a	258,48 ± 17,90 ^b	316,88 ± 34,26 ^{ab}

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE E: Ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B.

<i>Tratamentos</i>	<i>Ganho de Peso (g)</i>		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01	109,56 ± 7,25 ^a	277,03 ± 26,04 ^a	292,12 ± 37,14 ^b
T02	110,61 ± 8,15 ^a	261,64 ± 16,00 ^{ab}	323,39 ± 25,06 ^a
T03	107,53 ± 8,45 ^a	248,04 ± 7,85 ^b	329,77 ± 5,75 ^a
T04	106,69 ± 8,29 ^a	259,67 ± 28,26 ^{ab}	326,28 ± 15,09 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE F: Ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C.

<i>Tratamentos</i>	<i>Ganho de Peso (g)</i>		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01	109,56 ± 7,25 ^a	277,03 ± 26,04 ^a	292,12 ± 37,14 ^b
T02	111,04 ± 5,69 ^a	265,69 ± 48,19 ^{ab}	316,21 ± 53,16 ^{ab}
T03	107,53 ± 8,45 ^a	248,04 ± 7,85 ^b	329,77 ± 5,75 ^a
T04	63,44 ± 7,42 ^b	163,88 ± 13,54 ^c	315,08 ± 11,68 ^{ab}

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE G: Consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A.

<i>Tratamentos</i>	<i>Consumo de Ração (g)</i>		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01	137,62 ± 7,25 ^a	404,61 ± 11,03 ^{ab}	545,90 ± 50,52 ^a
T02	137,94 ± 5,84 ^a	419,57 ± 19,99 ^a	534,11 ± 21,65 ^a
T03	129,38 ± 8,02 ^b	382,12 ± 33,85 ^c	538,85 ± 39,52 ^a
T04	135,75 ± 5,57 ^a	392,75 ± 11,48 ^{bc}	555,82 ± 37,61 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE H: Consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B.

<i>Tratamentos</i>	<i>Consumo de Ração (g)</i>		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01	137,62 ± 7,25 ^b	404,61 ± 11,03 ^a	545,90 ± 50,52 ^a
T02	140,09 ± 9,36 ^a	319,78 ± 53,03 ^b	558,78 ± 49,59 ^a
T03	129,38 ± 8,02 ^c	382,12 ± 33,85 ^a	538,85 ± 39,52 ^a
T04	129,50 ± 10,25 ^c	393,82 ± 23,56 ^a	521,76 ± 22,72 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE I: Consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C.

<i>Tratamentos</i>	<i>Consumo de Ração (g)</i>		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01	137,62 ± 7,25 ^b	404,61 ± 11,03 ^{ab}	545,90 ± 50,52 ^a
T02	141,86 ± 5,94 ^a	412,17 ± 29,31 ^a	567,35 ± 67,03 ^a
T03	129,38 ± 8,02 ^b	382,12 ± 33,85 ^b	538,85 ± 39,52 ^a
T04	71,06 ± 12,61 ^c	272,30 ± 19,00 ^c	440,79 ± 61,48 ^b

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE J: Conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto A.

<i>Tratamentos</i>	<i>Conversão Alimentar (g g⁻¹)</i>		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01	0,89 ± 0,04 ^{ab}	1,30 ± 0,08 ^a	1,53 ± 0,09 ^a
T02	0,89 ± 0,02 ^{ab}	1,36 ± 0,04 ^a	1,48 ± 0,03 ^a
T03	0,85 ± 0,08 ^b	1,34 ± 0,09 ^a	1,47 ± 0,07 ^a
T04	0,93 ± 0,01 ^a	1,29 ± 0,08 ^a	1,49 ± 0,07 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)

APÊNDICE K: Conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto B.

<i>Tratamentos</i>	<i>Conversão Alimentar (g g⁻¹)</i>		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01	0,89 ± 0,04 ^a	1,30 ± 0,08 ^a	1,53 ± 0,09 ^a
T02	0,92 ± 0,05 ^a	1,11 ± 0,12 ^b	1,38 ± 0,08 ^c
T03	0,85 ± 0,08 ^b	1,34 ± 0,09 ^a	1,47 ± 0,07 ^{ab}
T04	0,87 ± 0,03 ^a	1,28 ± 0,06 ^a	1,42 ± 0,03 ^{bc}

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05)

APÊNDICE L: Conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos relativos ao produto C.

<i>Tratamentos</i>	<i>Conversão Alimentar (g g⁻¹)</i>		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01	0,89 ± 0,04 ^a	1,30 ± 0,08 ^a	1,53 ± 0,09 ^a
T02	0,93 ± 0,04 ^a	1,33 ± 0,14 ^a	1,53 ± 0,11 ^a
T03	0,85 ± 0,08 ^a	1,34 ± 0,09 ^a	1,47 ± 0,07 ^a
T04	0,67 ± 0,11 ^b	1,27 ± 0,07 ^a	1,34 ± 0,11 ^b

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05)

APÊNDICE M: Análises bioquímicas dos animais pós abate nos diferentes tratamentos relativos ao produto A.

<i>Tratamentos</i>	<i>Bioquímica</i>			
	AST (UI L ⁻¹)	ALT (UI L ⁻¹)	Ácido Úrico (mg dL ⁻¹)	Proteínas totais (g dL ⁻¹)
T01	492,40 ± 73,08 ^a	44,00 ± 7,97 ^a	9,32 ± 6,24 ^b	3,25 ± 0,44 ^a
T02	319,63 ± 143,94 ^b	34,38 ± 22,39 ^a	12,66 ± 11,64 ^b	3,23 ± 0,51 ^a
T03	273,00 ± 69,50 ^c	33,00 ± 12,71 ^a	38,94 ± 37,56 ^a	2,98 ± 0,24 ^a
T04	284,67 ± 17,04 ^c	41,00 ± 17,99 ^a	17,60 ± 7,43 ^b	3,00 ± 0,42 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05)

APÊNDICE N: Análises bioquímicas dos animais pós abate nos diferentes tratamentos relativos ao produto B.

<i>Tratamentos</i>	<i>Bioquímica</i>			
	AST (UI L ⁻¹)	ALT (UI L ⁻¹)	Ácido Úrico (mg dL ⁻¹)	Proteínas totais (g dL ⁻¹)
T01	492,40 ± 73,08 ^a	44,00 ± 7,97 ^a	9,32 ± 6,24 ^b	3,25 ± 0,44 ^a
T02	289,75 ± 63,93 ^b	32,25 ± 10,79 ^a	64,60 ± 20,63 ^a	3,43 ± 0,56 ^a
T03	273,00 ± 69,50 ^b	33,00 ± 12,71 ^a	38,94 ± 37,56 ^a	2,98 ± 0,24 ^a
T04	257,50 ± 52,82 ^b	28,00 ± 8,67 ^b	2,17 ± 1,46 ^b	3,17 ± 0,29 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan (p≤0,05)

APÊNDICE O: Análises bioquímicas dos animais pós abate nos diferentes tratamentos relativos ao produto C.

<i>Tratamentos</i>	<i>Bioquímica</i>			
	AST (UI L ⁻¹)	ALT (UI L ⁻¹)	Ácido Úrico (mg dL ⁻¹)	Proteínas totais (g dL ⁻¹)
T01	492,40 ± 73,08 ^a	44,00 ± 7,97 ^a	9,32 ± 6,24 ^b	3,25 ± 0,44 ^a
T02	308,00 ± 88,55 ^b	33,75 ± 11,31 ^a	31,77 ± 23,78 ^a	3,52 ± 0,41 ^a
T03	273,00 ± 69,50 ^b	33,00 ± 12,71 ^a	38,94 ± 37,56 ^a	2,98 ± 0,24 ^a
T04	270,13 ± 52,76 ^b	34,88 ± 15,85 ^a	2,13 ± 1,25 ^b	2,53 ± 0,37 ^b

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

^a Médias com letras distintas nas colunas diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)