

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA CÂNDIDA TEIXEIRA

**EFEITOS DA ZEARALENONA EM LEITOAS PRÉ-PÚBERES E EFICÁCIA DE  
ADITIVO ANTI-MICOTOXINA NA PREVENÇÃO DA MICOTOXICOSE**

CURITIBA  
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA CÂNDIDA TEIXEIRA

**EFEITOS DA ZEARALENONA EM LEITOAS PRÉ-PÚBERES E EFICÁCIA DE  
ADITIVO ANTI-MICOTOXINA NA PREVENÇÃO DA MICOTOXICOSE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, pelo programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Orientador: Geraldo Camilo Alberton

CURITIBA  
2010

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



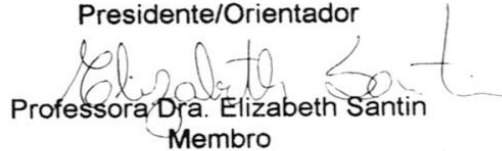
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “EFEITOS DA ZEARALENONA EM LEITÕES PRÉ-PÚBERES E EFICÁCIA DE ADITIVO ANTIMICOTOXINA NA PREVENÇÃO DA MICOTOXICOSE” apresentada pela Mestranda LETICIA CÂNDIDA TEIXEIRA declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APROVADA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

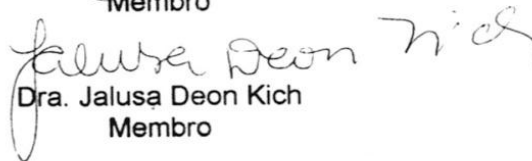
Curitiba, 8 de fevereiro de 2010



Professor Dr. Gerardo Camilo Alberton  
Presidente/Orientador



Professora Dra. Elizabeth Santin  
Membro



Dra. Jalusa Deon Kich  
Membro

## AGRADECIMENTOS

À orientação do Prof. Geraldo Camilo Alberton, meus agradecimentos em especial, por compartilhar comigo seus conhecimentos e sua amizade.

À UFPR, Universidade Federal do Paraná. E a UFU, Universidade Federal de Uberlândia por minha formação como Médica Veterinária.

À equipe da empresa Impextraco<sup>®</sup> que possibilitou a concretização do projeto disponibilizando-nos todas as condições para a realização do experimento e também pelo investimento com a construção do Laboratório Experimental de Suínos da Universidade Federal do Paraná.

À participação dos alunos da graduação como estagiários voluntários durante a experimentação animal: Thiago Noletto Aguiar, Amábilis Ivana Aparecida Fiori Mauricio Vieira da Silva, Adriana Lemgruber, Letícia Olbertz, Rogério Moreto de Jesus, Carolina Fernandes e Isabella Lunardon pelo compromisso, responsabilidade, dedicação e paciência na realização das atividades, tornado-as um trabalho em equipe harmonioso.

Às residentes Nina da Cunha Medeiros, Kemi Tokuno, Lia Lenatti e Aline Fujita pela paciência, pelos ensinamentos durante a execução do experimento.

Aos professores que com competência e com dedicação fizeram jus a profissão de docência, são eles:

À professora Rosângela Locatelli Dittrich, pela paciência, pelo aprendizado e pelas inúmeras correções do trabalho.

À professora Elizabeth Santin por me fornecer toda liberdade de trabalho no Laboratório de Ornitopatologia, pela acessibilidade, pela grande sabedoria, pela disposição em ensinar, pela amizade, pelos churrascos e por me “emprestar” seus estagiários me auxiliando em momentos na experimentação animal. Meus sinceros agradecimentos também aos estagiários e funcionários do laboratório de Ornitopatologia.

Ao professor Fabiano Montiani-Ferreira, pela gentileza, pelo carinho, por dividir seus conhecimentos estatísticos nas intermináveis análises e pela paciência

em me ensinar e ensinar de novo quando preciso na realização e interpretação da estatística, pela correção dos trabalhos, mesmo se tratando de estudo diferente de sua linha de pesquisa, por acreditar na ciência acima de tudo, por se dedicar na realização da mesma e na melhoria da Universidade Federal, sendo um importante exemplo e referência tanto como pesquisador como pessoa.

Ao Prof. Edson Moleta Colodel da Universidade Federal do Mato Grosso pela disposição e importante ajuda nas análises histopatológicas.

Á Kelly Mazzuti primeiramente pela amizade e lealdade e por toda colaboração nas atividades do mestrado.

Á Annez Andraus, minha querida amiga, pela cumplicidade, pela confiança e pelo auxílio nas correções dos textos em inglês apesar da distância.

Ao meu querido amigo Sandres Almeida pelas conversas e pelos vários gestos de motivação sempre me incentivando e acreditando na realização desta dissertação.

Ao Kleber e a família Hoffmann por todo carinho

Aos meus pais, Rivalino Antônio Teixeira e Adelize Cândida Teixeira, pelo amor sincero, pela confiança, pelo investimento nos estudos e na educação, pelo apoio e incentivo em minhas idéias, mesmo com isso resultando na minha mudança de cidade e na nossa separação física de mais de 1000 km, no entanto, demonstrando de diversas formas suas presenças durante todas as fases e os momentos, acreditando e contribuindo, seja com palavras, com carinho, seja com apoio financeiro para conclusão deste trabalho.

Aos animais, as porquinhas, a Amandita que me ensinaram pelo convívio, a aprender muito sobre suas necessidades, sua inteligência, suas interações e por me despertar o interesse nos estudos com bem-estar animal.

A todos os brasileiros que, mesmo sem saber, contribuíram para que eu recebesse através da CAPES, uma bolsa de mestrado nestes dois anos.

E a DEUS, que eu sei que me cuida, me protege, me guia.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	12

## **CAPÍTULO 1.** Zearalenona: Características, efeitos tóxicos em suínos e prevenção -

Revisão de Literatura.....	14
1.1. Introdução.....	15
1.2. Micotoxinas e zearalenona.....	17
1.2.1. Características das micotoxinas.....	17
1.2.2. Características da zearalenona.....	19
1.2.3. Ocorrência da zearalenona no milho.....	20
1.3. Características da intoxicação pela zearalenona em suínos.....	21
1.3.1. Biotransformação em suínos.....	21
1.3.2. Modo de ação e sinais clínicos.....	23
1.3.3. Lesões macro e microscópicas.....	26
1.3.4. Interações com sistema imunológico.....	27
1.3.5. Alterações hematológicas e bioquímicas sangüíneas.....	28
1.4. Interações com as <i>Fusarium</i> micotoxinas.....	29
1.5. Controle das micotoxinas.....	31
1.5.1. Medidas preventivas.....	31
1.5.2. Medidas corretivas.....	32
1.6. Considerações finais.....	35
1.7. Referências.....	36

## **CAPÍTULO 2:** Efeitos da ZEA em leitoas pré-púberes.....

2.1. Introdução.....	43
2.2. Material e métodos.....	45
2.2.1. Local e animais.....	45
2.2.2. Dieta, alimentação e manejo semanal.....	45
2.2.3. Adição de zearalenona e análise de micotoxina.....	46

2.2.4.	Análises hematológicas e bioquímicas.....	47
2.2.5.	Análise morfológica dos órgãos e histopatológica.....	48
2.2.6.	Avaliação da resposta imune humoral contra hemácias de carneiro.....	49
2.2.7.	Análise estatística.....	50
2.3.	Resultados.....	51
2.3.1.	Análise micotoxicológica.....	51
2.3.2.	Vulvometria e peso do trato reprodutivo.....	51
2.3.3.	Altura das células epiteliais das glândulas endometriais e superficiais da mucosa uterina.....	53
2.3.4.	Análises morfológicas dos órgãos e histopatológica.....	54
2.3.5.	Ganho de peso.....	56
2.3.6.	Análises hematológicas e bioquímicas.....	56
2.3.7.	Avaliação da resposta imune humoral contra hemácias de carneiro.....	58
2.4.	Discussão.....	58
2.5.	Conclusão.....	66
2.6.	Referências.....	67

**CAPITULO 3:** Eficácia de aditivo anti-micotoxina em leitoas pré-púberes expostas a zearalenona.....72

3.1.	Introdução.....	74
3.2.	Material e métodos.....	76
3.2.1.	Local e animais.....	76
3.2.2.	Dieta, alimentação e manejo semanal.....	76
3.2.3.	Adição de zearalenona e pesquisa micotoxicológica.....	78
3.2.4.	Análises hematológicas e bioquímicas.....	79
3.2.5.	Análises morfológicas dos órgãos e histopatológica.....	79
3.2.6.	Avaliação da resposta imune humoral contra hemácias de carneiro.....	80
3.2.7.	Análises estatísticas.....	81
3.3.	Resultados.....	82
3.3.1.	Análises micotoxicológicas.....	82
3.3.2.	Vulvometria e peso do trato reprodutivo.....	83

3.3.3. Altura do endométrio e das células epiteliais das glândulas endometriais.....	83
3.3.4. Análises morfológicas dos órgãos e histopatológica.....	84
3.3.5. Parâmetros de desempenho zootécnico.....	84
3.3.6. Análises hematológicas e bioquímicas.....	85
3.3.7. Avaliação da resposta imune humoral contra hemácias de carneiro.....	86
3.4. Discussão.....	86
3.5. Conclusão.....	95
3.6. Referências.....	95
3.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura química da zearalenona (a) e de seus metabólitos (b)  $\alpha$ -zearalenol ( $R^1=OH$  e  $R^2=H$ ) e  $\beta$ -zearalenol ( $R^1=H$  e  $R^2=OH$ ).....20

### CAPÍTULO 2

Figura 1- Evolução da área de vulva (média  $\pm$  desvio padrão) dos T1 (controle) e T2 (0,75mg /kg de zearalenona) durante o período do experimento.....52

Figura 2 - Área da vulva no T1 (controle) de 197,12 mm<sup>2</sup> e no T2 (0,75mg/kg de zearalenona) de 621,64 mm<sup>2</sup>.....52

Figura 3 – Média ( $\pm$  desvio padrão) do peso relativo total do trato reprodutivo e peso do útero-ovário-vagina dos T1 (controle) e T2 (0,75mg /kg de zearalenona).....53

Figura 4 – Média ( $\pm$  desvio padrão) da altura das células epiteliais da glândula endometrial e da mucosa uterina dos T1 (controle) e T2 (0,75mg /kg de zearalenona).....54

Figura 5 – Fotomicrografia de útero de leitoas, HE, 40x do T1 (A e C, controle) e do T2 (B e D, 0,75mg/kg de zearalenona). (A) Camada epitelial da mucosa uterina regular (C) Células epiteliais das glândulas endometriais uniformes e regulares (B) Irregularidade, proliferação e espessamento das células epiteliais uterinas (seta), metaplasia escamosa do útero (D) Hiperplasia das glândulas endometriais (aumento irregular e proliferação das células epiteliais) (seta).....55

Figura 6 – Fotomicrografia de canal vaginal de leitoas, HE. T1 (A e B, controle) e T2 (C e D, 0,75mg/kg de zearalenona). Epitélio próximo a cérvix (A e C). Epitélio próximo a vulva (B e D). (A) Epitélio com células dispostas uniformes e regulares, (x20). (B) Epitélio próximo a vulva com estratificação regular (x10). (C) Epitélio com proliferação celular e irregular (seta) (x10). (D) Epitélio estratificado irregular (seta) (x10).....56

### CAPÍTULO 3

Figura 1- Média ( $\pm$  desvio padrão) da altura de endométrio.....84

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1- Composição bromatológica da dieta-base das leitoas.....	46
Tabela 2 - Resultado da análise micotoxicológica da ração com e sem adição de ZEA e do farelo de soja e milho antes do preparo da ração.....	51
Tabela 3. Média ( $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros hematológicos de leitoas com idade média de 53 dias com e sem exposição à ZEA.....	57
Tabela 4. Média ( $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros bioquímicos séricos de leitoas com idade média de 53 dias com e sem exposição à ZEA.....	58

### CAPITULO 3

Tabela 1. Distribuição das 36 leitoas nos tratamentos.....	77
Tabela 2- Composição bromatológica e análise micotoxicológica dos milhos.....	77
Tabela 3 - Resultado da análise micotoxicológica das rações.....	82
Tabela 4 – Média ( $\pm$ desvio padrão) da área de vulva (mm <sup>2</sup> ) e dos pesos relativos e totais do trato reprodutivo e do útero-ovário-vagina no 21° dia.....	83
Tabela 5- Média ( $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros hematológicos de leitoas com idade média de 53 dias.....	85
Tabela 6- Média ( $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros bioquímicos séricos de leitoas no 1° e no 21°dia de experimento.....	86

## RESUMO

### EFEITOS DA ZEARALENONA EM LEITOAS PRÉ-PÚBERES E EFICÁCIA DE ADITIVO ANTI-MICOTOXINA NA PREVENÇÃO DA MICOTOXICOSE

A zearalenona (ZEA) é produzida por fungos *Fusarium*, sua ocorrência é freqüente em grãos e por isso suínos estão diretamente expostos à esta micotoxicose. Apesar da ZEA possuir uma estrutura não esteroide, possui capacidade de ativar os receptores de estrogênio e resultar em alterações morfológicas e funcionais dos órgãos do trato reprodutivo. Após a contaminação do grão é difícil a eliminação desta micotoxina, no entanto, o uso de aditivos anti-micotoxinas (AAM) com comprovada eficiência pode ser uma medida corretiva. O presente trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão de literatura com as características e os efeitos tóxicos da ZEA em suínos e as medidas preventivas para evitar esta micotoxicose; os efeitos da exposição de leitoas pré-púberes à concentração de 0,75mg/kg desta micotoxina; e a avaliação da eficácia do uso de um AAM na prevenção dos sinais da intoxicação na concentração de 0,5mg/kg de ZEA.

**Palavras-chave:** zearalenona, aditivo anti-micotoxina, suínos, intoxicação

## ABSTRACT

### ZEARALENONE EFFECTS IN PRE-PUBERTAL GILTS AND THE EFFECTIVENESS OF DETOXIFYING AGENT IN THE PREVENTION OF MYCOTOXICOSIS

Zearalenone (ZEA) is produced by *Fusarium* fungi, its occurrence is common in grains, that's why pigs are directly exposed to this mycotoxicosis. Although ZEA have a non-steroidal structure, it has the capability to activate the estrogen receptors that will result in morphological and functional alteration of the reproductive tract organs. After the contamination of the grain, it is difficult to eliminate this mycotoxin, however, the use of anti detoxifying agent with proven efficiency may be a way to correct it. This paper aims to present a literature review with the features and toxic effects of ZEA in swine and preventive actions to avoid this mycotoxicosis; the effects of pre-pubertal gilts exposure to 0.75 mg/kg of this mycotoxin and the evaluation of the efficacy of a detoxifying agent use to prevent the signs of intoxication at a concentration of 0.5 mg/kg of ZEA.

**Keyword:** zearalenone, detoxifying agent, swine, intoxication.

## INTRODUÇÃO

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina não esteroide, mas com atividade estrogênica, sendo sintetizada por fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium*. Sua freqüente ocorrência nos grãos, especialmente no milho, expõe os suínos diretamente aos seus efeitos tóxicos, sendo que, comparados as demais espécies animais, estes apresentam maior susceptibilidade, principalmente por características de sua metabolização hepática que produz metabólito mais tóxico que a própria ZEA, o  $\alpha$ -zearalenol (MALEKINEJAD et al., 2006). Apesar de conhecidos os efeitos de hiperestrogenismo em suínos, a maioria dos estudos com ZEA são em experimentação *in vivo* com concentrações muito altas, o que normalmente não reflete a situação real, sendo assim, pouco se sabe dos limites máximos toleráveis para os suínos não manifestarem os efeitos tóxicos. Este conhecimento é importante principalmente para o estabelecimento de limites toleráveis para ZEA em alimentos destinados a alimentação animal, já determinado por alguns países (ZINEDINE et al., 2007). No Brasil estes limites ainda não foram determinados.

As medidas preventivas para evitar a presença do fungo são as mais eficazes no controle da ZEA; estas medidas devem incluir boas práticas no armazenamento, transporte e produção de grãos (SANTIN et al., 2005). No entanto, ainda com a prática de medidas preventivas é difícil a eliminação total das micotoxinas na ração e em situações de elevada contaminação, vale-se a adoção de medidas corretivas como o uso de aditivos anti-micotoxinas na ração (AAM), com objetivo de detoxificação ou de adsorção, neste caso, impedindo suas absorções no trato gastrointestinal.

Os resultados da eficácia dos AAM são extremamente variáveis, principalmente pela característica apolar da ZEA que dificulta sua ligação em

adsorventes, destacando os pertencentes à classe dos aluminossilicatos (DAKOVIC, et al.,2005). Além disso, outros fatores como a formulação dos AAM, características das estruturas químicas dos aluminossilicatos e também de sua origem, modificações nas estruturas químicas, as condições dos estudos (*in vitro* e *in vivo*), a formulação do produto, o uso de enzimas detoxificantes, ou sua associação com adsorventes; também influenciam para esta grande variação nos resultados encontrados na literatura (DAKOVIC, et al.,2005; DIAZ e SMITH et al, 2005).

Neste sentido, a presente dissertação está dividida em três capítulos, sendo o capítulo 1 uma revisão de literatura das características da ZEA, seus efeitos tóxicos em suínos e as medidas de controle desta micotoxina. O capítulo 2, um artigo científico apresentando o estudo com a avaliação dos efeitos tóxicos da ZEA em leitoas pré-púberes em concentração mais baixa (0,75mg/kg) que as normalmente encontradas na literatura, com objetivo de estudar estes efeitos numa concentração relativamente mais próxima a encontrada no campo. O Capítulo 3, também em formato de artigo científico, está apresentado o estudo com a avaliação do uso de um aditivo anti-micotoxina (AAM) na prevenção dos efeitos tóxicos da ZEA em leitoas pré-púberes expostas à concentração de 0,5mg/kg.

## **CAPÍTULO 1**

---

### **ZEARALENONA: CARACTERÍSTICAS, EFEITOS TÓXICOS EM SUÍNOS E PREVENÇÃO – REVISÃO DE LITERATURA**

## ZEARALENONA: CARACTERÍSTICAS, EFEITOS TÓXICOS EM SUÍNOS E PREVENÇÃO – REVISÃO DE LITERATURA

*(Zearalenone: Characteristics, toxic effects in swines and prevention – Review)*

TEIXEIRA, L. C.; SANTIN, E.; ALBERTON, G.C.

**RESUMO-** A Zearalenona (ZEA) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium* que contaminam grãos, especialmente o milho, geralmente ainda no campo, e se encontra disseminada por todos os países. Frequentemente está associada a ações tóxicas para humanos e animais, sendo que, particularidades da metabolização hepática de suínos os tornam a espécie mais susceptível. Esta micotoxina provoca desordens reprodutivas, já que juntamente com seus metabólitos,  $\alpha$ - zearalenol e  $\beta$ - zearalenol, mimetizam a ação do estrogênio causando o hiperestrogenismo. Esta revisão aborda a ocorrência da ZEA, características e particularidades de sua biotransformação, seus efeitos tóxicos em suínos e as medidas preventivas e corretivas para combate à micotoxicose.

**Palavras chave:** Zearalenona; suínos; intoxicação; aditivo anti-micotoxina.

**ABSTRACT-** The Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by fungus of *Fusarium* gender that contaminate grains, especially corn, usually when they are still in the fields, and it is disseminated by all countries. It is frequently associated with toxic actions to humans and animals, but, particularities of pigs hepatic metabolism make them the most susceptible species. This mycotoxin causes reproductive disorders, once that together with its metabolites,  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol, mimic the action of estrogen causing hyperestrogenism. This review covers the occurrence of ZEA, characteristics and particularities of its biotransformation and its toxic effects in swine and the preventive and corrective measures to combat mycotoxicosis.

**Keywords:** zearalenone; swine; intoxication; detoxifying agent.

### 1.1 INTRODUÇÃO

O crescimento fúngico em grãos é de ocorrência normal tanto na lavoura como no processo de estocagem. Os fungos podem espoliar nutrientes dos grãos e, também, resultar na produção de micotoxinas, tóxicas aos animais, humanos e plantas. Tendo em vista que na suinocultura moderna os suínos são alimentados com rações compostas principalmente por grãos, destacando-se o milho, estes são susceptíveis às intoxicações por micotoxinas.

Dentre as micotoxinas que afetam os suínos, merece destaque a

zearalenona (ZEA), que é produzida por fungos do gênero *Fusarium* e possui efeito estrogênico (hiperestrogenismo) resultando em transtornos reprodutivos (CHANG et al., 1979; ETTIENNE E JEMMALI, 1982). Particularidades da metabolização hepática de suínos os tornam a espécie mais susceptível aos efeitos tóxicos desta micotoxina.

O quadro clínico das intoxicações pela ZEA varia de acordo com a quantidade de toxina ingerida, o tempo de ingestão, sexo do animal e estágio reprodutivo (CONKOVÁ et al., 2003). Os sinais podem ser confundidos com uma série de outras doenças ou problemas de manejo da granja, porém edema e hiperemia de vulva são sinais clássicos deste tipo de intoxicação.

Após a contaminação do grão pelas micotoxinas, as ações para evitar a intoxicação pelos animais são limitadas. Os aditivos anti-micotoxinas são ferramentas disponíveis no mercado para remover, destruir ou inativar micotoxinas da ração. Os resultados de estudos *in vivo* para avaliação das ações efetivas destes produtos são variáveis, especialmente os com ação adsorvente, pois as características da estrutura química e propriedades físicas da ZEA dificultam sua ligação nestes produtos (DOLL, et al., 2005; DAKOVIC, et al., 2005). As enzimas detoxificantes inativam a capacidade tóxica da ZEA e possuem resultados promissores, porém os estudos realizados são *in vitro* (TAKAHASHI-ANDO et al., 2002). A limitação destas medidas corretivas reforça a importância da prevenção da contaminação do grão pelo *Fusarium* com a adoção de boas práticas de cultivo e também de transporte e armazenamento dos grãos, sendo estas as medidas mais eficazes e seguras no combate as micotoxinas (SANTIN, et al., 2005).

O desenvolvimento desta revisão tem por objetivo expor algumas

considerações relevantes de artigos científicos para melhor esclarecer aspectos relacionados com a manifestação do quadro clínico produzido pela ingestão de ZEA, apresentar características da metabolização e as manifestações sistêmicas que ocorrem na intoxicação em suínos, além do impacto de seus efeitos tóxicos na saúde e no bem-estar dos animais e discutir as ações preventivas e corretivas para evitar a micotoxicose.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.2. MICOTOXINAS E ZEARALENONA**

#### **1.2.1 Características das micotoxinas**

As micotoxinas são substâncias tóxicas resultados do metabolismo secundário de fungos, sendo conceituadas como compostos não essenciais ao desenvolvimento fúngico e formadas no estágio final da fase exponencial de crescimento (SANTIN et al., 2005). São produzidas por diversos gêneros fúngicos que contaminam produtos agrícolas por toda cadeia de produção alimentar desde o campo, colheita e do transporte ao armazenamento. As condições de pré e pós-colheita e os cultivos determinam o crescimento de gêneros específicos de fungos. Por estas razões é difícil a adoção de medidas universais para controle de todos estes microrganismos simultaneamente, e também das micotoxinas (CAST, 2003).

Os mais importantes gêneros fúngicos produtores de micotoxinas são os *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os gêneros *Claviceps*, *Penicillium* e *Aspergillus* crescem preferencialmente durante o armazenamento dos grãos, e normalmente não causam problemas no campo. Os do gênero *Fusarium*, infectam os grãos na lavoura, são fitopatógenos, necessitam de altas condições de umidade, 20 a 21% e temperatura amena (SANTIN et al., 2005).

Apesar de menos freqüente, é possível o aparecimento de micotoxinas de *Fusarium* na fase pós-colheita (HOLLINGER e EKPERIGIN, 1999; SANTIN et al., 2005).

A produção de micotoxinas ocorre quando os fungos são submetidos a condições de estresse. Nos grãos armazenados, a contaminação com fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas são resultados da interação complexa entre umidade, temperatura, substrato, concentração de oxigênio e dióxido de carbono, presença de insetos e fungos. Nas condições de campo o estresse ocorre por condições climáticas, intempéries, pragas, entre outros, que também resultam em perda de vigor pela planta predispondo-a a colonização por fungos toxigênicos (SANTIN et al., 2005).

Os principais grupos de micotoxinas que acometem suínos são as produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, as aflatoxinas e ocratoxinas, e as *Fusarium* micotoxinas que compreendem as fumonisinas, tricotecenos e a ZEA. Estas micotoxinas estão entre as principais encontradas nos grãos e que possuem grande importância para a saúde animal (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

A grande variação térmica é essencial para produção de micotoxinas por fungos *Fusarium*, como comprovado por MARTINS e MARTINS (2002) em estudo *in vitro*. Os autores verificaram que a maior produção de ZEA ocorreu no milho incubado a 28°C por 15 dias e seguidos de queda na temperatura para 12°C. Esta condição é encontrada em regiões de clima temperado da América, Europa e Ásia (CREPPY, 2002). No Brasil, estas condições são observadas principalmente nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Os impactos econômicos associados às micotoxinas incluem redução na produtividade, lesões nos órgãos vitais, aumento da incidência de doenças infecciosas em consequência da imunossupressão, interferência na capacidade reprodutiva, e em casos graves, morte de animais (CAST, 2003). As micotoxinas possuem capacidade mutagênica, carcinogênica, teratogênica (IARC, 1999), sendo que seus efeitos negativos na saúde estão diretamente ligados à dose, ao tempo de exposição e a idade do animal. Além disso, o crescimento fúngico ocasiona baixo rendimento das culturas e perda nutricional dos grãos reduzindo o desempenho animal (PESTKA et al., 1995; MORENO et al., 2005; SANTIN et al., 2005).

### 1.2.2 Características da ZEA

A ZEA é uma micotoxina não esteróide com características estrogênicas. É produzida por uma variedade de fungos do gênero *Fusarium*, dentre eles os *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* e *F. semitectum* (ZINEDINE, 2007).

A denominação zearalenona provém do fungo "*Gibberella zae*" (forma assexuada do *Fusarium graminearum*), grande produtor desta micotoxina, e também por características da sua estrutura química. Sua molécula é constituída por uma lactona ácida resorcílica, sendo o radical "- eno" pela dupla ligação entre os carbonos C1 e C2 e o "- ona" pela cetona no C6 (URRY et al., 1966), como mostra a Figura 1.

Durante a metabolização em mamíferos ocorre a formação de dois metabólitos isômeros da ZEA,  $\alpha$ - e  $\beta$ - zearalenol (Figura 1) que possuem também ação estrogênica. Estes metabólitos também são produzidos pelos

fungos, porém em uma concentração inferior a produzida durante a metabolização da ZEA no organismo animal (ZINEDINE, 2007).

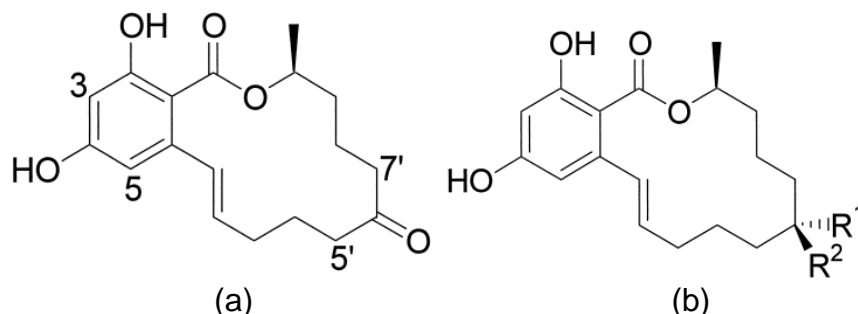


Figura 1- Estrutura química da zearalenona (a) e de seus metabólitos (b)  $\alpha$ -zearalenol ( $R^1=OH$  e  $R^2=H$ ) e  $\beta$ - zearalenol ( $R^1= H$  e  $R^2=OH$ ).

O risco para saúde pública pela ingestão de produtos de origem animal contaminados com ZEA apesar de existir, não tem sido descrito como de grande importância, pois a sua biotransformação e excreção nas espécies animais são rápidas (CAVRET et al., 2006; ZINEDINE et al., 2007). A detecção de ZEA em carne e leite reduz quando a exposição cessa e está ligada a dose ingerida pelo animal (CAVRET et al., 2006). Não foi encontrada ZEA nem seus metabólitos em músculos, rins, fígado e gordura de bovinos machos alimentados com 0,1 mg ZEA/dia/kg (DANICKE et al., 2002; ZINEDINE et al., 2007), nem em leite de vacas alimentadas com 0,1 ou 0,33 mg/kg de ZEA por 21 dias (PRELUSKY et al., 1990). Não tem sido reportada também a presença desta micotoxina em ovos (ZINEDINE et al., 2007).

### 1.2.3 Ocorrência da ZEA no milho

A ZEA possui distribuição mundial e ocorre em diversos cereais, principalmente no milho (SILVA e VARGAS, 2001) decorrente principalmente do fungo *F. graminearum*, um importante produtor de ZEA e freqüentemente

isolado neste grão (MARTINS e MARTINS, 2002). Acredita-se que com a expansão mundial do comércio de grãos o fungo tenha se espalhado de um país a outro (PLACINTA et al. 1999).

A prevalência de ZEA no milho do Brasil dos anos de 1990 a 2000 foi avaliada por SALAY e MERCADANTE (2002). Neste estudo, mais de 50% das amostras dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul estavam contaminadas. Em outro levantamento realizado também no Brasil, MALLMANN e DILKEN (2007) analisaram 65361 amostras colhidas aleatoriamente nas indústrias de ração do país. Em 14,8% das amostras de ração encontrou-se contaminação por ZEA, sendo que em alguns momentos do ano ultrapassou os 45%.

A prevalência de micotoxinas na indústria de alimentos da Europa, Ásia e Oceania foi mensurada no período de 2003 a 2005. Na Ásia e Oceania a ZEA foi o contaminante mais comum das amostras de glúten de milho com taxa de contaminação de 92%, com concentração média de 272 µg/kg e máxima de 3158 µg/kg, esteve presente também em 37% das amostras de produtos destinados a alimentação animal e ração em concentração média de 114 µg/kg e máxima de 4132 µg/kg. Nas amostras de milho da Europa e região do Mediterrâneo a ZEA foi detectada em 63% das amostras com níveis máximos de 1958 µg/kg e média de 71 µg/kg (BINDER et al., 2007).

### **1.3 CARACTERÍSTICAS DA INTOXICAÇÃO PELA ZEA EM SUÍNOS**

#### **1.3.1 Biotransformação em suínos**

O conhecimento dos mecanismos de biotransformação tem fundamental importância para o entendimento da susceptibilidade das espécies às micotoxicoses. As espécies animais apresentam diferentes sistemas

enzimáticos que convertem as substâncias tóxicas em hidrofílicas para serem excretadas do organismo. Em alguns casos os produtos da metabolização têm toxicidade mais acentuada que o próprio substrato, como é o caso da ZEA (D'MELLO et al., 1999).

A ZEA é absorvida rapidamente após administração oral (AVANTAGGIATO, et al., 2003; CAVRET et al., 2006), sendo que em suínos, a absorção após uma dose de 10 mg/kg de peso vivo é de aproximadamente de 80 a 85 % (BIEHL et al., 1993). Seu metabolismo pode ocorrer por duas vias, a via 1, por hidroxilação; e a via 2, por conjugação ao ácido glucurônico (OLSEN et al., 1981) que inativa a ZEA e seus metabólitos. A via 1 consiste na formação de  $\alpha$ - e  $\beta$ - zearalenol catalisada pelas enzimas 3 $\alpha$ - e 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (HDS). Na via 2 a conjugação da ZEA e de seus metabólitos com ácido glucurônico é catalisada pela glucuronil-difosfato-uridina-transferase1 (OLSEN et al., 1981). As enzimas 3 $\alpha$ - e 3 $\beta$ -HDS estão presentes em vários órgãos e são responsáveis pelo metabolismo dos hormônios esteróides (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007).

A redução da ZEA em  $\alpha$ -zearalenol e  $\beta$ -zearalenol é mais ativa no fígado e foi bastante demonstrada em muitas espécies como nos ratos, suínos, perus e galinhas. No entanto, os eritrócitos também possuem esta capacidade (CHANG e LIN, 1984), assim como a mucosa e a microbiota intestinal (BIEHL et al., 1993; KOLLARCZIK et al., 1994).

O metabólito  $\alpha$ -zearalenol possui mais potencial estrogênico que a ZEA e o  $\beta$ -zearalenol (MIROCHA et al., 1978; CELIUS et al., 1999; MINERVINI et al., 2001; MALEKINEJAD et al., 2006), uma vez que possui maior afinidade pela ligação com os receptores de estrogênio (CELIUS et al., 1999). Em suínos

há predominância da conversão da ZEA em  $\alpha$ -zearalenol devido à eficiência da enzima 3- $\alpha$ -HDS.

Outra particularidade dos suínos é que, comparados às outras espécies animais, possuem menor capacidade de glucuronidação e, portanto, menor capacidade de inativação da ZEA e de seus metabólitos (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007). Somadas estas características e particularidades da metabolização da ZEA explica-se o fato desta espécie ser a mais sensível aos efeitos de ordem reprodutiva desta micotoxina.

### **1.3.2 Modo de ação e sinais clínicos**

A ação da ZEA ocorre por estímulo aos receptores estrogênicos citoplasmáticos, incrementando a síntese protéica no aparelho reprodutor. Conseqüentemente, estimula a secreção das células endometriais, síntese de proteínas uterinas e resulta em aumento do peso do trato reprodutivo (GAUMY et al., 2001). Entretanto, a intensidade de seus efeitos tóxicos depende do status reprodutivo do animal, ou seja, se está em fase pré-púbere, em cio ou gestante (EDWARDS et al., 1987).

Em porcas observa-se principalmente aumento e/ou tumefação da vulva. A intoxicação por ZEA causa transtornos reprodutivos, como o aumento da infertilidade associada a estro permanente, atraso no retorno ao estro, persistência de corpo lúteo, falhas na implantação, pseudogestação, anomalias ovarianas, nascimento de leitões fracos (EDWARDS et al., 1987; KUIPER-GOODMAN et al., 1987; ETIENNE e DOURMAD, 1994; FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007).

A ocorrência de abortos não é relatada em intoxicações experimentais

com doses de até 30mg/kg. LONG e DIEKMAN (1986) não observaram redução da sobrevivência fetal nesta concentração. Já em doses muito altas, próximas a 60mg/kg, houve redução da sobrevivência fetal e do tamanho da ninhada (ETIENNE e DOURMAD, 1994). De acordo com LONG e DIEKMAN (1986) a ocorrência de morte embrionária, além da relação com a dose, parece estar ligada com momento de ingestão de ZEA durante a gestação. Estes autores observaram que de quatro porcas prenhes alimentadas com ZEA no período curto e limitado de 7 a 10 dias de gestação, apenas uma permaneceu prenhe e nada ocorreu com as que alimentaram entre 2-6 dias e 11-15 dias de gestação.

As leitoas recém-nascidas representam a categoria animal mais sensível aos efeitos da ZEA devido à excreção via leite pela porca (ETIENNE e DOURMAD, 1994; ZINDEDINE et al., 2007) e ainda pela transferência via placenta, como já demonstrado em ratos por BERNHOFT et al. (2001) e em suínos por DANICKE et al. (2007). Como sinais clínicos notam-se intensa hiperemia e edema da vulva, mamas e infiltração edematosa da região perineal, abdominal e umbilical (YANG et al., 1995). A ocorrência de prolapsos retais ou vaginais foi descrita por McNUTT et al. (1928).

Em leitoas sexualmente maduras a ingestão de rações com ZEA produz efeitos importantes no aumento do intervalo entre estros. Esta característica foi descrita por EDWARDS et al. (1987) em estudo com leitoas não prenhas alimentadas com ração contendo a micotoxina nas concentrações de 5 e 10mg/kg. Observou-se aumento do ciclo estral para  $29.2 \pm 2.9$  e  $32.7 \pm 3.3$  dias, respectivamente.

Como qualquer estrogênio, a ZEA é luteotrófica e em dietas de 3 a

10mg/kg, há probabilidade de indução de anestro e aborto em porcas, se essas dietas forem consumidas no meio do ciclo estral. O anestro e o elevado nível de progesterona podem persistir por vários meses mesmo depois da exposição à micotoxina ter cessado (EDWARDS et al., 1987). No entanto, em baixos níveis de 0,4mg/kg de ZEA, GUTZWILLER et al. (2009) não observaram efeitos negativos em porcas na puberdade nos parâmetros reprodutivos: idade do primeiro estro, na prenhez e no número de fetos por porca.

Como outros sinais, podem-se observar redução do tamanho da ninhada, agalaxia, aborto (WEAVER et al., 1978) aumento de natimortos, leitões mumificados e da incidência de síndrome dos membros abertos nos leitões (splay-leg), principalmente quando há alta ingestão de alimento contaminado pela porca no final da gestação (EDWARDS et al., 1987). Redução no peso dos fetos e aumento da heterogeneidade da ninhada foi observado em porcas gestantes de 80 dias alimentadas com 4mg/kg de ZEA (ETTIENNE e JEMMALI, 1982). Ainda neste estudo observaram redução do peso da placenta sugerindo redução das trocas nutricionais.

Em machos expostos a ZEA pode ocorrer depressão sérica de testosterona, da espermatogênese e do peso dos testículos, além da indução de feminização e redução de libido (D'MELO et al., 1999). Em camundongos inoculados por via intraperitoneal houve aumento da vesícula seminal, do peso da glândula prepucial do testículo e de espermatozoides anormais, redução de espermatozoides vivos, de sua integridade acrossômica, na produção espermática, das células espermatogênicas e da concentração sérica de testosterona. Fêmeas que copularam com estes camundongos tiveram menor taxa de concepção (YANG et al., 2007).

### **1.3.3 Lesões macro e microscópicas**

As alterações causadas por intoxicação com ZEA são referentes a alterações fisiológicas no trato genital e se caracterizam na microscopia, sobretudo, pelo edema intersticial, proliferação celular, metaplasia escamosa do útero, ducto uterino, cérvix, vagina e glândula mamária (CHANG et al., 1979). No útero, as alterações ocorrem pelo decréscimo de secreção de LH e progesterona com modificação da morfologia do tecido, caracterizada também por proliferação glandular do endométrio com acúmulo de líquido endometrial aumentando significativamente o peso deste órgão (ETIENNE e DOURMAD, 1994). A vulva, vagina, cérvix e útero apresentam-se aumentados com proliferação epitelial da vagina associado a edema e hiperemia. Os ovários se encontram aumentados com sinais de maturação dos folículos ovarianos (VÁNYI et al., 1994).

A intoxicação por ZEA interfere no desenvolvimento dos oócitos reduzindo a qualidade destes em fêmeas suínas como demonstrado por ALM et al. (2006). Neste estudo houve comprometimento dos oócitos das fêmeas que receberam diferentes dosagens de ZEA, sendo que as que receberam maiores doses (9,57 mg/kg) sofreram degeneração na cromatina meiótica e a proporção dos oócitos que alcançaram a metáfase II foi menor.

### **1.3.4 Interações com o sistema imunológico**

As micotoxinas provocam sérios efeitos danosos no sistema imune de seres humanos e de animais, sendo ainda bastante limitado o número de estudos com o objetivo de avaliar a toxicidade das micotoxinas produzidas por *Fusarium* na imunidade dos suínos (OSWALD et al., 2005). Apesar dos poucos

estudos correlacionando os impactos da ZEA no sistema imunológico, este sistema é potencial alvo em casos de perturbação hormonal já que os linfócitos expressam receptores de estrogênio (IGARASHI et al., 2001, KINCADE et al., 2002).

Alguns estudos já demonstram os efeitos imunotóxicos da ZEA. Redução significativa do número de linfócitos foi observada em camundongos tratados com 40mg/kg da micotoxina, e também das células T CD3+, CD4+, CD8+ e CD56+ (ABBÉS et al., 2006). Altas concentrações de ZEA reduziram a mitose e a sobrevivência de linfócitos de bovinos sendo observada formação de adutos no DNA destes linfócitos, resultando em aberrações em seus cromossomos (LIOI et al., 2004). Em linfócitos de suínos foi houve marcante efeito inibitório na proliferação celular quando expostos a pequenas doses (2,5  $\mu$ M) de  $\alpha$ -zearalenol (LUONGO et al., 2008). Em outro estudo, TAJIMA et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes constatando a inibição dose-dependente da síntese de DNA de linfócitos L929 expostos a ZEA.

Os efeitos imunomodulatórios também foram avaliados em linfócitos T humanos expostos ao  $\alpha$ - zearalenol. Os linfócitos incubados na presença de concentração crescente de  $\alpha$ - zearalenol tiveram marcante efeito inibitório da proliferação celular mesmo em pequenas doses (10 $\mu$ M). Observou-se ainda, aumento da atividade da caspase 3, dose-dependente, sugerindo indução de apoptose. Porém, concomitantemente a apoptose, acredita-se que ocorra necrose celular devido aos efeitos citotóxicos da ZEA em altas concentrações. Constatou-se também redução na transcrição de IL-2 e INF- $\gamma$  sendo que, os tratamentos com  $\alpha$ - zearalenol resultaram em inibição dose-dependente da expressão de RNAm para INF- $\gamma$  (LUONGO et al., 2006).

### **1.3.5 Alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas**

As micotoxinas em geral provocam alterações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos, sendo que são reconhecidas as ações hepatotóxicas, imunotóxicas e nefrotóxicas que a ZEA provoca nas espécies animais e em humanos. Neste sentido, existem estudos com objetivo de verificar estas alterações provocadas pela ZEA, porém, para suínos estes parâmetros ainda estão pouco estabelecidos e os resultados existentes sobre os efeitos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos, em sua maioria, são com intoxicações com altas concentrações de ZEA (>1mg/kg).

A ação hematotóxica da ZEA foi demonstrada nos estudos de ABBÉS et al. (2006) e MAAROUFI et al. (1996) camundongos e ratos, respectivamente, intoxicados com concentrações superiores a 1,5mg/kg, observando disfunção da coagulação, alterações de alguns parâmetros hematológicos (aumento das hemácias, hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio- MCV e redução do número de plaquetas e contagem de células brancas). Houve ainda redução do número de linfócitos (ABBÉS et al., 2006) reforçando a capacidade imunossupressora desta micotoxina e confirma os resultados encontrados por BEREK et al. (2001) que também relataram redução de linfócitos T e B em humanos expostos a ZEA.

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (IARC, 1999), a ZEA e seus metabólitos são classificados como pertencentes ao grupo 3 (sendo os a toxicidade aumentada em ordem decrescente de classificação) e possuem potencial carcinogênico. Em concentrações altas ou na associação com outras micotoxinas é observada alterações na função hepática normal

(DANICKE et al., 2007; FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; ZINEDINE et al. 2007). Estudo em coelhos submetidos a baixo (10 µg/kg p.v.) e alta (100 µg/kg p.v.) níveis ZEA demonstrou que os altos níveis provocaram alterações nas atividades das enzimas AST, ALT, fosfatase alcalina, GGT e lactato desidrogenase (LD) enquanto nos baixos níveis (10 µg/kg p.v.) houve aumento somente da atividade da fosfatase alcalina (CONKOVA et al., 2001). Em ratos e camundongos também foram observados aumento da atividade das enzimas hepáticas (ABBÈS et al., 2006; MAAROUFI et al., 1996; STADNIK e BORZECKI 2009) AST e ALT e da fosfatase alcalina e bilirrubina.

Em intoxicação experimental com 3 mg/kg de ZEA em suínos, SPERANDA MARCELA et al. (2006) observaram aumento das enzimas AST, GGT e da lactato desidrogenase. Nos parâmetros hematológicos encontraram principalmente aumento de MCV (volume corpuscular médio), também relatado por ABBÈS et al. (2006).

#### **1.4 INTERAÇÕES COM AS *FUSARIUM* MICOTOXINAS**

As principais micotoxinas produzidas pelos fungos do gênero *Fusarium* são: a fumonisina, a ZEA e os tricotecenos: deoxinivalenol (DON), toxina T2, nivalenol, diacetoxiscirpenol (DAS), entre outras. Produtos a base de grãos são usualmente contaminados por mais de uma destas, sendo necessário, portanto, o conhecimento a respeito da interação e sinergismo entre elas, para determinar suas conseqüências e toxicidade para os animais.

Alguns estudos compararam os efeitos associados entre ZEA e DON. FENG CHEN et al. (2008) em avaliação dos efeitos desta combinação no sistema imune observaram a diminuição sérica das proteínas totais, albumina e globulina, além da redução da resposta imune humoral contra vacinas da Peste

Suína Clássica. Decréscimo da subpopulação de leucócitos e de hemoglobina foi relatado em leitões nascidos de porcas gestantes alimentadas com estas micotoxinas (DÄNICKE et al., 2007). No desafio com hemácias de carneiro, os leitões que receberam ração contendo concentrações baixas de ZEA (0,08 mg/kg) e DON (1,78 mg/kg) tiveram atraso no desenvolvimento de títulos de anticorpos (ROTTER et al., 1994).

A associação de ZEA e DON resulta também em alterações histopatológicas no fígado, sendo reportados sinais de necrose dos hepatócitos, aumento na esteatose (quando a concentração de micotoxina é maior), maior deposição de hemossiderina (devido a hemossiderose, cuja causa não é bem explicada), aumento das fibras colágenas (pelo excesso de ferro) o que também aumenta a espessura do tecido conectivo das junções lobulares, e diminuição do glicogênio. Na bioquímica sangüínea houve aumento das enzimas AST e ALT e não da GGT (TIEMANN et al., 2006), que já foi observado por FENG CHEN et al. (2008).

Na avaliação da influência das micotoxinas sobre a indução mitogênica de proliferação das células brancas *in vitro*, a fumonisina B1 não inibiu a proliferação celular. Já na associação de fumonisina B1 e  $\alpha$ - zearalenol observou-se inibição mais potente da proliferação celular do que quando as células foram expostas apenas ao  $\alpha$ - zearalenol (LUONGO et al., 2006; LUONGO et al., 2008). Além disso, na administração concomitante destas micotoxinas observou-se maior inibição dose dependente sobre a expressão de citocinas INF- $\gamma$  e IL-2 pelos RNAm do que quando avaliado somente na presença de  $\alpha$ - zearalenol (LUONGO et al., 2006).

## 1.5 CONTROLE DAS MICOTOXICOSES

### 1.5.1 Medidas preventivas

Dentre as estratégias de controle das micotoxicozes a mais simples e mais eficaz se baseia na prevenção da contaminação dos grãos e alimentos evitando o crescimento fúngico (DIAZ e SMITH, 2005). Os fungos *Fusarium*, como já explicado, contaminam os grãos principalmente no campo, sendo que esporos advindos da fase pré-colheita podem entrar para a fase de armazenamento e em condições impróprias de estocagem dos grãos os esporos podem proliferar e resultar em micotoxinas (SANTIN et al., 2005). Desta forma as medidas preventivas devem ser aplicadas em dois momentos: na fase pré-colheita (no campo) e na fase pós-colheita (no armazenamento).

Na fase pré colheita, em geral a manutenção de práticas agronômicas que promovam a saúde dos grãos e evitem estresse pela planta podem reduzir o crescimento fúngico (SANTIN et al., 2005). Dentre estas práticas, inclui-se o uso de grãos mais resistentes a infestação por insetos e por fungos e a disseminação nas plantas de linhagens de fungos atóxicas que excluem competitivamente os fungos toxigênicos (CLEVELAND et al., 2003). É importante também ressaltar a influência das condições climáticas, principalmente de umidade e temperatura, tanto necessária para o crescimento fúngico e produção de micotoxinas, como determinante para estresse da planta tornando-a mais susceptível a colonização pelo *Fusarium*. Sendo que as mudanças climáticas ocorridas nos últimos anos são favoráveis a infecção por este gênero fúngico (DOLL et al., 2005).

Na fase pós-colheita as medidas preventivas são baseadas no monitoramento do crescimento fúngico que devem abranger desde o

transporte, silo, triturador até o comedouro dos animais. É importante manter as condições de umidade e temperatura corretas durante o armazenamento do grão, a umidade do grão deve ser reduzida pelo menos até 15% dentro de 48h após a colheita, o silo deve ser projetado para ter uma boa circulação de ar e evitar danos mecânicos nos grãos. Os silos, comedouros e equipamentos devem ser limpos removendo resíduos que possam abrigar os fungos (SANTIN et al., 2005). Além disso, é importante evitar insetos, já que estes podem agir como vetores. O uso de fungistáticos e ácidos orgânicos inibidores de crescimento fúngico são comuns e eficientes, porém, se já existem micotoxinas nos grãos, estas práticas são pouco eficazes.

A adoção destas medidas, apesar de não excluir totalmente a contaminação dos grãos por micotoxinas, quando aplicadas corretamente limitam sua produção a baixos níveis. Sendo assim, é essencial o controle de fungos, pois além de evitar perdas nutricionais dos grãos evitam significativamente sua contaminação por micotoxinas.

### **1.5.2 Medidas corretivas**

A adoção de boas práticas de cultivo de grãos é estratégia necessária para controle das micotoxinas, no entanto, ainda assim é difícil evitar a presença destas em sua totalidade, especialmente para as que são produzidas por *Fusarium*, devido à dependência das condições climáticas, principal fator estimulador de sua produção. Sendo assim, ainda com a aplicação de medidas preventivas para evitar a contaminação dos grãos, as micotoxinas podem estar presentes na ração e neste caso, vale-se a adoção de medidas corretivas que minimizem seus efeitos tóxicos nos animais de produção, como o uso de

aditivos anti-micotoxinas com eficiência comprovada (DOLL et al.,2005).

Os aditivos anti-micotoxinas incluem os agentes detoxificantes que se referem aqueles que possuem capacidade de remoção das propriedades tóxicas, como as enzimas que alteraram a estrutura química das micotoxinas inibindo suas propriedades tóxicas. Existem também os agentes de descontaminação ou seqüestradores de micotoxinas, que são os que as removem ou as neutralizam possuindo como exemplos os adsorventes. Estes englobam desde carvão ativado, parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) aos minerais silicatos que constituem um grupo imenso e complexo com vários representantes, alguns grupos estudados para adsorção da ZEA como os aluminossilicatos (HSCAS: hydrated sodium calcium aluminosilicate), zeólitos naturais, bentonitas e clinoptilolita naturais, montmorilonita e filossilicatos (DIAZ e SMITH, 2005). Estes adsorventes se ligam as micotoxinas no trato gastrointestinal e evitam sua absorção (DAKOVIKC et al., 2005). Os minerais silicatos constituem-se de argilas que possuem estruturas químicas complexas que variam dentro de um mesmo grupo, por isso sua eficácia pode variar também de acordo com sua origem (DIAZ e SMITH, 2005). É importante salientar que estes agentes corretivos devem possuir outras características além da capacidade de remoção, destruição ou inativação da micotoxina, não devem produzir resíduos tóxicos, nem afetar as propriedades nutricionais da ração bem como a disponibilidade dos nutrientes, e devem ser economicamente viáveis (DIAZ e SMITH, 2005).

A ligação dos adsorventes às micotoxinas é dependente de diversos fatores, dentre eles as estruturas químicas e propriedades físicas das micotoxinas e da estrutura dos cristais dos minerais de adsorção e das

propriedades físicas destes. As propriedades físicas das micotoxinas como polaridade, solubilidade, tamanho, forma, e, no caso de compostos iônicos, a distribuição das cargas e a constante de dissociação possuem importante função no processo de adsorção (HUWIGA et al., 2001), como também o pH da solução (DAKOVICK et al., 2005). A diversidade de micotoxinas existentes, variando em suas estruturas químicas e propriedades físicas, impede a atuação dos adsorventes com a mesma eficácia para todas elas.

Os aluminossilicatos naturais possuem superfícies hidrofílicas e por isso são menos efetivos na adsorção de micotoxinas apolares como a ZEA (DAKOVICK et al., 2005). Entretanto, modificações químicas em zeólitos e argilas de filossilicatos com longas cadeias de ácidos orgânicos possibilitaram o aumento de sua superfície hidrofóbica e a afinidade de se ligarem as moléculas apolares, havendo em contrapartida, redução na adsorção de moléculas hidrofílicas como as aflatoxinas (DAKOVICK et al., 2005).

Além dos adsorventes, outro método que tem sido empregado como agente corretivo para ZEA é o uso de enzimas detoxificantes, sendo um método prático e eficiente para descontaminação de ZEA, como foi demonstrado *in vitro* por TAKAHASHI-ANDO et al. (2002) utilizando uma lactonahidrolase e *in vivo* com o uso de uma epoxidase (CHENG et al., 2006).

Os estudos para investigação de agente corretivos, são realizados primeiramente *in vitro*, simulando o pH, tempo de trânsito do trato gastrointestinal de suínos e possui grande importância para seleção de possíveis agentes detoxificantes ou adsorventes. Todavia, por ser uma suposição do modo de ação da adsorção em um modelo extremamente abstrato, a eficiência real destes aditivos deve ser provada *in vivo* (DOLL et al.,

2005; DIAZ e SMITH, 2005). DOLL et al. (2005) não observaram redução dos efeitos provocados pela ZEA e DON em experimentação *in vivo* com uso de um aluminossilicato modificado que apresentou resultados positivos na adsorção da ZEA *in vitro*.

Os aditivos anti-micotoxinas são ferramentas práticas e podem ser soluções corretivas em casos de contaminação intensa dos grãos por micotoxinas. A seleção destes agentes deve ser criteriosa e com eficiência científica comprovada *in vivo*.

## **1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A ZEA é freqüentemente encontrada em grãos e causa graves efeitos deletérios na saúde animal e, conseqüentemente, resulta em perdas zootécnicas. Seus efeitos tóxicos abrangem principalmente desordens reprodutivas, porém já são conhecidos seus efeitos citotóxicos, genotóxicos, hepatotóxicos e imunotóxicos. Sendo assim, seus prejuízos com saúde animal podem ser ainda maiores do que somente aqueles mensurados com perdas na reprodução e, a ocorrência simultânea de micotoxinas, geralmente com interações entre elas, causa ações tóxicas ainda mais graves.

A contaminação dos grãos pela micotoxinas é inevitável, porém a utilização de medidas preventivas pode reduzir esta contaminação a níveis toleráveis. Os agentes corretivos disponíveis no mercado possuem resultados variáveis, especialmente pela complexidade da estrutura química da ZEA, sendo que em casos de contaminação intensa vale-se a adoção de aditivos anti-micotoxina de eficiência comprovada.

## 1.7 REFERÊNCIAS

ABBÈS,S.; SALAH-ABBÈS, J.B.; OUANES,Z.; HOUAS,Z.; OTHMAN,O.; BACHA,H.; ABDEL-WAHHAB,M.A.; OUESLATI, R. Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v.6, p.1251–1258, 2006.

ALM, H.; BRÜSSOW, K. P.; TORNER, H.; VANSELOW, J.; TORNEK, W., DÄNICKE, S.; TIEMANN, U. Influence of *Fusarium*-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. **Reproductive toxicology**. v. 22, p. 44–50, 2006.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessing the zearalenone binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p.1283–1290, 2003.

BEREK, L.; PETRI, I.B.; MESTERHAZY, A.; TEREN, J.; MOLANR, J. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. **Toxicol. In Vitro**, v.15, p.25–30, 2001.

BERNHOF, A.; BEHRENS, G. H.G.; INGEBRIGTSEN, K.; LANGSETHA, W.; BERNDT, S.; HAUGEN, T. B.; GROTMOL, T. Placental transfer of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rats. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.545–550, 2001.

BIEHL, M.L.; PRELUSKY, D.B.; KORITZ, G.D.; HARTIN, K.E.; BUCK,W.B.; TRENHOLM, H.L. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 121, p.152–159, 1993.

BINDER, E.M.; TAN, L.M.; CHIN, L.J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.265–282, 2007.

CAST. Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: risk in plant and animal systems**. In Task Force Report 139; **CAST**: Ames, IA, 2003, 199p .

CAVRET, S.; LECOEUR, S. Fusariotoxin transfer in animal. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.444–453, 2006.

CELIUS, T.; HAUGEN, T.B.; GROTMOL, T.; WALTHER, B.T. Asensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. **Environ. Health Perspect.**, v.107, p.63–68, 1999.

CHANG, K.; KURTZ, H.J.; MIROCHA, C.J. Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. **Am. J. Vet Res.**, v. 40, p.1260–1267. 1979.

CHANG, W.M; LIN, J.K. Transformation of zearalenone and zearalenol by rat erythrocytes. **Food Chem. Toxicol.** v. 22, n.11, p. 887–891, 1984.

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

CLEVELAND, T.E.; DOWD, A.E.; DESJARDINS, BHATNAGAR, D.; COTTY, P.J. United States Department of agriculture- Agriculture research on pre-harvest prevention of mycotoxin and mycotoxigenic fungi in US crops. **Pest management science**, v. 59, n.6-7, p.629-42, 2003.

CONKOVÁ, E.; LACIAKOVA, A.; G. KOVÁČ, G.; SEIDEL, H. Review: Fusarial toxins and their role in animal diseases. **The Veterinary Journal**, v.165, p.214–220, 2003.

CONKOVÁ, E.; LACIAKOVA, A.; PASTOROVA, B.; SEIDEL, H.; KOVÁČ, G. The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. **Toxicol. Lett.**, v.121, p.145–149, 2001.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicol. Lett.** v.127, p.19–28, 2002.

DAKOVIC, A.; TOMASEVIC-CANOVIC, M.; DONDUR, V.; ROTTINGHAUS, G. E.; MEDAKOVIC, V.; ZARIC, S. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 46, p.20–25, 2005.

DÄNICKE, S.; UEBERSCHÄR, K-H.; HALLE, I.; MATTHES, S.; VALENTA, H.; FLACHOWSKY, G. Effect of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or Fusarium toxin-contaminated maize on performance of hens and carryover of zearalenone. **Poultry Sci.**, v.81, p.1671–1680, 2002.

DÄNICKE, S.; BRÜSSOW, K-P.; GOYARTS, T.; VALENTA, H.; UEBERSCHÄR, K-H.; TIEMANN, U. On the transfer of the Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.1565–1574 , 2007.

DIAZ, D.E.; SMITH, T.K. Mycotoxin sequestering agents: Practical tools for the neutralization of mycotoxins. . In. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2005, p.323-335.

D’MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, wealfare and productivity. **Animal feed science technology**, v.80, p.183-205. 1999.

DOLL, S.; GERICKE, S.; DANICKE, S.; RAILA, J.; UEBERSCHAR, K.-H.; VALENTA, H.; SCHNURRBUSCH, U.; SCHWEIGERT, F. J.; FLACHOWSKY, G. The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in Fusarium toxin contaminated maize containing diets for piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.89, p.342–358, 2005.

EDWARDS, S.; CANTLEY, T.C.; ROTTINGHAUS, G.E.; OSWEILER, G.D.; DAY, B.N. The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. **Theriogenology**, v. 28, n. 1, p. 43-49, 1987.

ETIENNE, M.; JEMMALI, M. Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts. **J. Anim. Sci.**, v.55 p.1-10, 1982.

ETIENNE, M.; DOURMAD, J.Y. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. **Livest. Prod. Sci.**, v.44, p.99–113, 1994.

FENG CHEN; MA, Y.; XUE C.; MA,J.; XIE,Q.; WANG,G.; BI,Y.; CAO, Y. The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs. **J.Vet Sci.**, v.9, n.1, p.39-44, 2008.

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

GAUMY, J.L.; BAILLY, J.D; BURGAT, V.; GUERRE, P. Zéaralénone: propriétés et toxicité expérimentale. **Revue Méd. Vét.**, v.152, n.3, p.219-234, 2001.

GUTZWILLER, A.; GAFNER, J.L.; STOLL, P. Effects of a diet containing fusarium toxins on the fertility of gilts and on bulbourethral gland weight in barrows. **Arch Anim Nutr.** v. 63, n.1, p.16-25, 2009.

HOLLINGER, K.; EKPERIGIN, H. E. Mycotoxicosis in food producing animals. **Veterinary Clinics of North America**, v.15, p.133–165, 1999.

HUWIGA, A.; FREIMUND, S.; APPELIB, O. K.; DUTLERB, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicol. Lett.** 122, 179, 2001.

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

IARC. Overall evaluations of carcinogenicity to humans. International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs**, v. 1–73 p. 1–36.1999.

IGARASHI, H.; KOURO, T.; YOKOTA, T.; COMP, P.C.; KINCADE, P.W. Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors. **Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)**, v.98,n.26,p.15131–15136, 2001.

KINCADE, P. W.; IGARASHI, H.; MEDINA, K. L.; KOURO, T.; YOKOTA, T.; ROSSI, M.I.D.; OWENA, J. J.T.; GARRETT, K. P.; SUNA, X.; SAKAGUCHI. N. Lymphoid lineage cells in adult murine bone marrow diverge from those of other blood cells at an early,hormone-sensitive stage. **Seminars in immunology**, v. 14, p. 385–394, 2002.

KOLLARCZIK, B.; GAREIS, M.; HANELT, M. In vitro transformation of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. **Nat. Toxins.**, v. 2, n.3, p.105–110, 1994.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regul.Toxicol. Pharmacol.**, v.7, p. 253–306, 1987.

LIOI, M.B.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; SALZANO, URSINI, M.V. Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. **Mutat. Res.**, v.557, p.19–24. 2004.

LONG, G.G. e DIEKMAN, M.A. Characterization of effects of zearalenone in swine during early pregnancy. **Am. J. Vet. Res.**, v.47,p.184-187, 1986.

LUONGO, D.; SEVERINO, L.; BERGAMO, P.; DE LUNA, R.; LUCISANO, A.; ROSSI, M. Interactive effects of fumonisin B1 and  $\alpha$ -zearalenol on proliferation and cytokine expression in Jurkat T cells. **Toxicol. in vitro**, v. 20,p.1403–1410. 2006.

LUONGO, D.; DE LUNA, R.; RUSSO. R.; SEVERINO, L. Effects of four *Fusarium* toxins (fumonisin B1,  $\alpha$ -zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. **Toxicol.**, v. 52, p.156–162, 2008.

MALLMANN, C. A.; DILKEN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. Santa Maria: Do Autor, 2007, 240p.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v.172, p.96–102, 2006.

MIROCHA, C. J., S. V. PATHRE, J. BEHRENS, AND B. SCHAUERHAMER. Uterotropic activity of cis and trans isomers of zearalenone and zearalenol. **Appl. Environ. Microbiol.** v.35, p.986-987, 1978

MAAROUFI, K.; CHEKIR, L.; CREPPY, E.E.; ELLOUZ, F.; BACHA, H., Zearalenone induces modifications in haematological and biochemical parameters in rats. **Toxicol.**, v. 34, p.534–540,1996.

MARTINS, M. L. H.; MARTINS, M. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 79, p.315–318, 2002.

MCNUTT, S. H.; PURWIN, P.; MURRAY, C. Vulvovaginitis in swine. Preliminary Report. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, v.73, p.484, 1928.

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M.E.; MARITATO, F.; MINOIA, P.; VISCONTI, A. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro

maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. **Toxicol. in Vitro**, v. 15, n.4–5, p.489–495, 2001.

MORENO, E. C.; GARCIA, G.T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v.116, p.220–226, 2009.

OLSEN, M.; PETTERSSON, H.; KIESSLING, K. H. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. **Acta Pharmacol. Toxicol.** (Copenh).,v. 48, p. 157–161, 1981.

OSWALD, I.P.; MARIN, D.E.; BOUHET, S.; PINTON, P.; TARANU, I.; ACCENSI, F. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. **Food Addit. Contam.**, v.22, n.4, p.354–360, 2005.

PESTKA, J. J.; ABOUZIED, M. N.; SUTIKNO, T. Immunological assays for mycotoxin detection. **Food Technology**, v.2, p. 120–128, 1995.

PLACINTA, C.M.; D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 78, p.21–37. 1999.

PRELUSKY, D.B.; SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.; LAWRENCE, G.A. Minimal transmission of earalenone to milk of dairy cows. **J. Environ. Sci. Health.**, v.25, p.87–103. 1990.

ROTTER, B.A.; THOMPSON,B.K.; LESSARD, M.; TRENHOLM, H.L.; TRYPHONAS, H. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. **Fundamental and applied toxicology**, v. 23, p.117-124, 1994.

SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v. 13, p.87–92, 2002.

SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. In. **The Mycotoxin Blue Book**. 1 ed. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2005, p.225-234.

SILVA, C. M.; VARGAS, E. A. A survey of zearalenone in corn using Romer Mycosep 224 column and high performance liquid chromatography. **Food addit. contam.**, v.18, p. 39–45, 2001.

SPERANDA MARCELA; LIKER, B.; SPERANDA, T.; SERIC, V.; ANTUNOVIC, Z.; GRABAREVIC, Z.; SENSIC, D.; GRGURIC, D.; STEINER, Z. Haematological and biochemical parameters of weaned piglets fed on fodder mixture contaminated by zearalenone with addition of clinoptilolite. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v.56, n. 2-3, p.121-136, 2006.

STADNIK, A.; BORZECKI, A. Influence of the zearalenone on the activity of chosen liver enzymes in a rat. **Ann Agric Environ Med**, v.16, p.31–35, 2009.

TAJIMA, O.; SCHOEN, E.D.; FERON, V.J.; GROTEN, J.P. Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of Fusarium mycotoxins for possible interactions. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, n.5, p.685–695, 2002.

TAKAHASHI-ANDO, N.; KIMURA, M.; KAKEYA, H.; OSADA, H.; YAMAGUCHI, I. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. **Biochem. J.**, v.365, p.1-6, 2002.

TIEMANN, U.; BRUSSOW, K.-P.; KUCHENMEISTER, U.; JONAS, L.; KOHLSCHEIN, P.; POHLAND, R.; DANICKE, S. Influence of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two Fusarium toxins on selected enzymatic and histological parameters of liver in gilts. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1228–1235, 2006.

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

VÁNYI, A.; BATA, A.; GLÁVITS, R.; KOVÁCS, F., Perinatal oestrogen syndrome in swine. **Acta Vet Hung**, v.42, n.4, p.433-46, 1994.

WEAVER, G.A.; KURTZ, H.J.; MIROCHA, C.J.; BATES, F.Y.; BEHREN, S, J.C.; ROBISON, T.S; GIPP, W.F.. Mycotoxin-induced abortions in swine. **Can. Vet. J.**, v.19, p. 72-74, 1978.

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

YANG, H.H.; AULERICH, R.J.; HELFERICH, W.; YAMINI, B.; CHOU, K.C.; MILLER, E.R.; BURSIA, S.J. Effects of zearalenone and/or tamoxifen on swine and mink reproduction. **J. Appl. Toxicol.**, v. 15, p.223–232, 1995.

YANG, J.Y.; WANG, G.X.; LIU, J.L.; FAN, J.J.; CUI, S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives  $\alpha$ -zearalenol on male reproductive system in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p.381–387, 2007.

## **CAPÍTULO 2**

---

### **EFEITOS DA ZEARALENONA EM LEITOAS PRÉ- PÚBERES**

## EFEITOS DA ZEARALENONA EM LEITOAS PRÉ- PÚBERES

*(Zearalenone effects in pre-pubertal gilts)*

TEIXEIRA, L. C.; SANTIN, E. ; LOCATELLI- DITTRICH, R.; MONTIANI-FERREIRA, F.; ALBERTON, G.C.;

**RESUMO-** O experimento consistiu na exposição oral de leitoas pré-púberes a concentração de 0,75 mg/kg de zearalenona (ZEA) durante 21 dias com objetivo de avaliar os efeitos desta micotoxina sobre trato reprodutivo, hematologia e bioquímica séricas e resposta imune humoral contra hemácias de carneiro. Foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) no peso de trato reprodutivo, na área vulvar, na altura das células epiteliais das glândulas endometriais e superficiais da mucosa uterina. Estes resultados demonstraram a capacidade desta micotoxina não esteróide em mimetizar as ações do  $17\beta$  estradiol nesta concentração. Entretanto, apesar das evidentes alterações nos parâmetros estudados no trato reprodutivo, não foram observadas alterações no ganho de peso, bem como nas avaliações hematológicas e bioquímicas sanguíneas e na resposta imune humoral contra hemácias de carneiro.

**Palavras-chave:** zearalenona, útero, hematologia, bioquímica sanguínea, resposta imune humoral.

**ABSTRACT-** The experiment consisted in submitting pre-pubertal gilts to a diet with a concentration of 0.75 mg/kg of zearalenone (ZEA) for 3 weeks in order to evaluate the effects of this mycotoxin on reproductive tract, hematological and biochemical blood and humoral immune response against sheep red blood cells.. The following effects were observed: an increase in weight of the reproductive tract, vulvar area, height of endometrial gland epithelial cells and epithelial cells of uterine mucosa ( $P < 0.05$ ). These results show the capacity of this non-steroidal mycotoxin to mimic the actions of  $17\beta$  estradiol in this concentration. However, despite it no alterations in the weight gain were observed, neither was in hematologic, biochemical parameters and in humoral response against sheep red blood cells (SRBC).

**Keywords:** zearalenone, uterus hematology, biochemical blood parameters, humoral immune response.

### 2.1 INTRODUÇÃO

O milho é altamente susceptível à contaminação pelos fungos fitopatógenos do gênero *Fusarium* (KUMAR et al., 2008) que produzem uma série de micotoxinas, sendo a zearalenona (ZEA) freqüentemente encontrada neste grão (SALAY e MERCADANTE, 2002). Os suínos estão diretamente expostos à ZEA por terem sua base alimentar constituída de milho, sendo

especialmente mais sensíveis aos seus efeitos tóxicos comparando-os as outras espécies animais (MALEKINEJAD et al., 2006).

A ZEA é uma micotoxina não esteróide com efeitos estrogênicos, que pode causar transtornos reprodutivos. A maior susceptibilidade dos suínos ocorre principalmente em virtude de sua biotransformação hepática que, nesta espécie, resulta em maior produção do metabólito mais tóxico que a própria ZEA, o  $\alpha$ -zearalenol (KUIPER-GOODMAN et al., 1987; FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD 2007). O  $\alpha$ -zearalenol tem maior afinidade para se ligar aos receptores estrogênicos quando comparado à ZEA e ao  $\beta$ - zearalenol (OLSEN et al., 1981; MALEKINEJAD et al., 2006).

O quadro clínico das intoxicações pela ZEA varia muito de acordo com quantidade de toxina ingerida, tempo de ingestão, sexo do animal e estágio reprodutivo. Os sinais podem ser confundidos com uma série de outras doenças ou problemas de manejo da granja. Porém, o edema e hiperemia de vulva são sinais clássicos deste tipo de intoxicação e a constatação dos mesmos é indicativa da intoxicação por ZEA (WYATT, 2005).

A maioria dos trabalhos que tratam de intoxicação experimental com ZEA utiliza dosagens superiores a 1mg/kg (ETIENNE e JEMMALI 1982; YOUNG et al., 1982 SPERANDA MARCELA et al., 2006; ANDRETTA et al. 2008). Sabe-se que a ocorrência de sinais clínicos são dependentes de fatores individuais, da dose e que sua manifestação clínica está condicionada ao estresse dos animais expostos. Em condições experimentais, devido ao maior controle dos fatores estressantes, manejo adequado e baixo desafio, podem-se não evidenciar os sinais clínicos, particularmente quando se emprega concentrações muito baixas de ZEA. Este estudo teve como objetivos avaliar

os efeitos da exposição de fêmeas pré-púberes a uma concentração de ZEA capaz de reproduzir sinais clínicos de intoxicação, e relativamente próxima às concentrações rotineiramente encontradas no campo. Adicionalmente, os efeitos tóxicos produzidos foram avaliados utilizando-se uma comparação dos parâmetros reprodutivos, hematológicos e bioquímicos sangüíneos, o desempenho zootécnico dos animais e a resposta imune humoral contra hemácias de carneiro.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Local e animais**

Foram utilizadas 12 leitoas com idade média de 32 dias no início do experimento, com bom estado geral de saúde constatado por exames clínicos, hematológicos e bioquímicos sangüíneos. As leitoas eram da linhagem Danbred<sup>®</sup>, com peso médio de 8,55 ( $\pm 0,60$ ) kg no primeiro dia de experimento.

O experimento teve duração de 21 dias. Os animais permaneceram uma semana em adaptação antes do início da fase experimental, sendo divididos em dois tratamentos T1 (ração controle) e T2 (ração experimental com 0,75 mg/kg de ZEA), compostos por seis animais cada e alojados em baias individuais (2m comprimento x 1m largura) sobre piso plástico. A temperatura no local experimental foi mantida proporcionando conforto térmico aos animais.

### **2.2.2 Dieta, alimentação e manejo semanal**

A dieta das leitoas era composta por milho, soja e núcleo vitamínico-mineral formulada de acordo com o NRC (NRC,1998), compatível com a fase do ciclo de vida (Tabela 1). O milho utilizado para preparação da ração foi obtido de fornecedor que não realizava seleção criteriosa do milho.

Tabela 1- Composição bromatológica da dieta-base das leitoas.

Nutrientes	Quantidade
Umidade (%)	10, 212
Matéria seca*	89, 788
Proteína bruta (%)*	18, 112
Gordura bruta (%)*	4, 052
Matéria mineral (%)*	6, 025
Fibra bruta (%)*	2, 944
Cálcio (%)*	0, 622
Fósforo disponível (%)*	0, 403
Lisina(%)*	1, 155
EM kcal/kg	3.284,39

EM:Energia metabolizável calculada

\* Cálculo obtido da matéria seca

As leitoas foram observadas duas vezes ao dia. Semanalmente os animais foram pesados, obtendo-se o cálculo do ganho de peso (diferença entre as pesagens semanais e ao término e início do experimento). O consumo de ração e a conversão alimentar real não foram analisados devido as estruturas das baias que permitiam muito desperdício dificultando o recolhimento das sobras. A vulvometria foi feita com auxílio de paquímetro digital que forneceu as medidas em milímetros e foi realizada também semanalmente. A área de vulva foi obtida pela multiplicação da largura (eixo latero-lateral) e altura (eixo dorso-ventral) da vulva.

### 2.2.3 Adição de zearalenona e análise de micotoxinas

A ZEA (*Sigma Aldrich Corporation*) possuiu quantidade mínima de pureza de 99% e foi misturada inicialmente em milho degerminado em processo de diluições seriadas. Após confirmação da análise micotoxicológica, a mistura milho degerminado+ZEA foi incorporada à ração com auxílio de um misturador tipo “Y”.

As amostras de milho moído e de farelo de soja utilizadas para produção da ração foram enviadas para análise micotoxicológica no Laboratório de Micotoxinas (LABMIC) do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição ESALQ/USP, utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada. Foram determinadas as concentrações de ZEA e ocratoxina pelo método modificado de SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA (1989) com purificação em coluna de imunoafinidade, além das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 pelo método modificado do MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária) BRASIL (2000). Foi realizado o cálculo de correção para obtenção final na ração da concentração de ZEA determinada de 0,75 mg/kg. Após a mistura e preparo das rações, as amostras de cada tratamento também foram analisadas para as mesmas toxinas pelos mesmos métodos. O alimento e a água foram fornecidos aos animais *ad libitum*.

#### **2.2.4 Análises hematológicas e bioquímicas**

Amostras de sangue foram obtidas por punção da veia cava com agulha calibre 40X12 adaptada à seringa. O sangue foi imediatamente transferido para tubos sem EDTA para obtenção do soro e com EDTA (10%) para análise hematológica. As coletas foram realizadas no primeiro e último dia do experimento. As amostras de sangue sem EDTA foram centrifugadas a (500 x g) por 5 minutos para obtenção do soro. No soro foram determinadas, por métodos colorimétricos, as concentrações séricas das seguintes enzimas: aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamil tranferase (GGT), estas por método cinético, além de urease e proteína total (PT) por método de biureto e

albumina por reação verde de bromocresol. As análises foram realizadas em analisador bioquímico semi-automático CELM-SBA-200.

As amostras de sangue com EDTA foram processadas para obtenção dos parâmetros hematológicos. As extensões sangüíneas foram feitas imediatamente após a coleta de sangue. No contador de células automático CELM-CC-530 foram obtidos o número total de leucócitos, de eritrócitos e a concentração de hemoglobina. O hematócrito (Ht) foi determinado pela técnica do micro-hematócrito, o volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foram obtidas pela fórmula de Wintrobe ( $VGM = Ht \times 10 / \text{hemácia}$ ;  $CHGM = Hb \times 100 / Ht$ ). Os valores de proteína plasmática total (PPT) foram obtidos por refratometria. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensão sangüínea corada com Wright.

### **2.2.5 Análise morfológica dos órgãos e histopatológica**

Após 21 dias do fornecimento das rações experimentais, os animais foram abatidos em frigorífico com inspeção estadual e suas carcaças submetidas ao exame macroscópico de fígado, linfonodos mesentéricos e trato reprodutivo (ovários, útero, vagina e vulva), quanto ao peso e aspecto geral. Os órgãos do trato reprodutivo foram dissecados e pesados. Em seguida obteve-se o peso somente do útero-ovário-vagina. Para evitar influência do peso dos animais no peso do trato reprodutivo, calculou-se o peso relativo do trato reprodutivo e relativo do útero-ovário-vagina, dividindo-se os valores dos pesos encontrados pelo peso corporal e multiplicando-os por 100.

Os fragmentos do útero, linfonodos e fígado foram coletados e fixados em formalina 10% tamponada com fosfato, logo após o abate dos animais. A

seguir o material foi processado segundo as técnicas histológicas convencionais, incluído em parafina e cortado para obtenção de secções de 5µm de espessura. Os cortes foram fixados em lâmina e corados pelo método de hematoxilina e eosina (LUNA, 1968).

Os fragmentos de fígado, linfonodos, útero e vagina foram avaliados quanto à presença de alterações em sua morfologia. No útero foram obtidos três cortes no corno uterino e adotaram-se como critério de avaliação as seguintes mensurações: altura média da célula epitelial das glândulas endometriais e altura média da célula epitelial superficial da mucosa uterina, ambas indicadoras de hipertrofia celular conforme HENEWEER et al. (2007). Para isto, fotografaram-se três campos com magnificação 40x com glândulas endometriais e três com a camada superficial da mucosa uterina sendo realizadas quatro medições em campos diferentes, com auxílio do programa “Motic images plus 2.0<sup>®</sup>”. Na análise histopatológica do canal vaginal, devido às diferenças de estratificação do epitélio em sua extensão, ocorrendo redução da estratificação conforme se aproxima da cérvix, foram coletados fragmentos de duas localizações, uma no terço proximal do útero e outra no terço distal, mais próximo da vulva.

#### **2.2.6 Avaliação da resposta imune humoral contra hemácias de carneiro**

A resposta imune humoral foi mensurada determinando-se anticorpos anti-hemácia de carneiro pelo teste de hemaglutinação em placas seguindo o protocolo com duas inoculações intramusculares de  $10^8$  hemácias de carneiro diluídas em solução salina e com adjuvante completo de Freund (Modificado de BONNETTE et al., 1990). A primeira inoculação foi feita no 10º dia após o início

do experimento e a segunda inoculação sete dias após a primeira inoculação (17º dia do experimento) sendo coletados sangue dos animais 5 dias após a 1º inoculação e 4 dias após a 2º inoculação. O soro foi mantido congelado a -20°C em tubos de polietileno para realização do teste de hemaglutinação (HA) em placas. Os títulos de hemaglutinação foram determinados após inativação dos soros pelo método de diluições seriadas de acordo com SCHURIG et al. (1978).

### **2.2.7 Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e seis repetições cada. Cada animal foi considerado como unidade experimental.

Para as análises estatísticas dos parâmetros hematológicos e bioquímicos sangüíneos as variáveis foram submetidas à detecção e exclusão dos “outliers” (valores extremos) como descrito por FAUSTINI et al. (2000). Os resultados da análise sorológica para resposta humoral contra hemácias de carneiro foram convertidos em Log 10 antes da análise estatística.

As médias das variáveis estudadas entre os grupos foram submetidas à avaliação estatística pela análise de variância (ANOVA). Quando detectado efeito dos tratamentos seguiu-se com o pós-teste de comparação de Tukey/Kramer para verificar diferenças entre as médias, com segurança de 95%.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Análise micotoxicológica

Os resultados referentes às análises micotoxicológicas estão apresentados na Tabela 2. Foi detectada a presença de ZEA no milho moído, sendo a concentração corrigida no T2 para obtenção final de 0,75 mg/kg de ZEA na ração. No grupo controle obteve-se ainda a concentração de 0,335 mg/kg de ZEA. Foi encontrada também aflatoxina B1 no milho moído, porém, devido à baixa concentração não foi detectada após o preparo da ração.

Tabela 2 - Resultado da análise micotoxicológica da ração com e sem adição de ZEA e do farelo de soja e milho antes do preparo da ração.

PRODUTO	ZEA (µg/kg)	OCRA (µg/kg)	AFB1 (µg/kg)	AFB2 (µg/kg)	AFG1 (µg/kg)	AFG2 (µg/kg)
T1	335	NR	NR	NR	NR	NR
T2	753	NR	NR	NR	NR	NR
Farelo de soja	< 80	ND	ND	ND	ND	ND
Milho moído	263	ND	1,4	ND	ND	ND

ND- não detectada, NR- não realizado, ZEA: zearalenona, OCRA: ocratoxina, AFL: aflatoxina B1, B2, G1, G2

\*Limite para detecção/quantificação de zearalenona (ZEA) 60,0 / 80,0 µg/kg, de ocratoxina 4 µg/kg, de aflatoxinas 0,5 / 1,0 µg/kg.

### 2.3.2 Vulvometria e peso do trato reprodutivo

Na vulvometria, diferenças significativas foram observadas somente no 21º dia de experimentação (Figura 1 e 2).

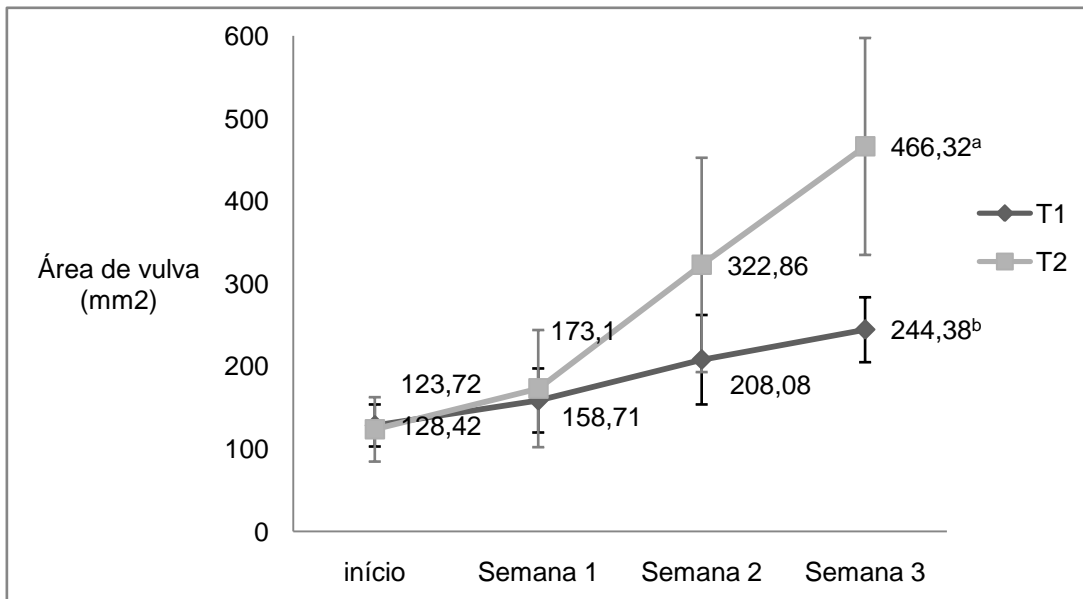


Figura 1- Evolução da área de vulva (média  $\pm$  desvio padrão) dos T1 (controle) e T2 (0,75mg /kg de zearalenona) durante o período do experimento.

Letras diferentes diferem estatisticamente ( $P= 0, 018$ ), T1 (controle) T2 (0,75mg /kg de ZEA)

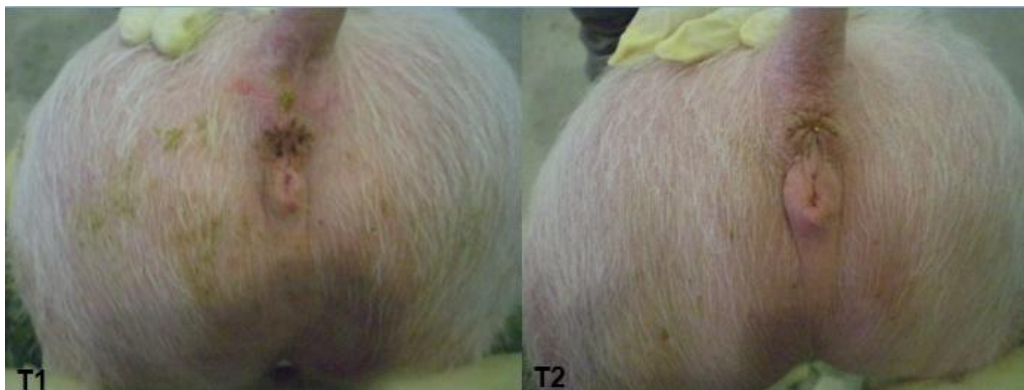


Figura 2 - Área da vulva no T1 (controle) de 197,12 mm<sup>2</sup> e no T2 (0,75mg/kg de zearalenona) de 621,64 mm<sup>2</sup>.

Nas avaliações de peso do trato reprodutivo e relativo de útero-ovário-vagina houve diferenças entre os grupos (Figura 3). O peso do trato reprodutivo referente ao grupo com ZEA (T2) foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle (T1).

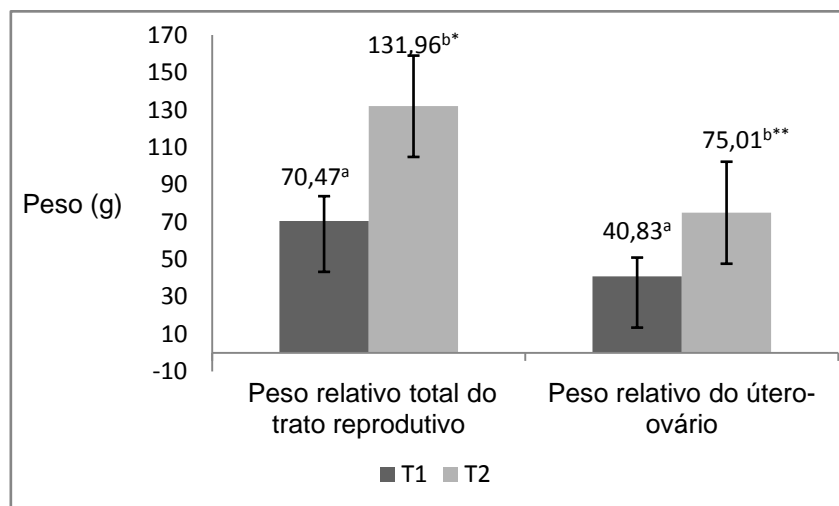
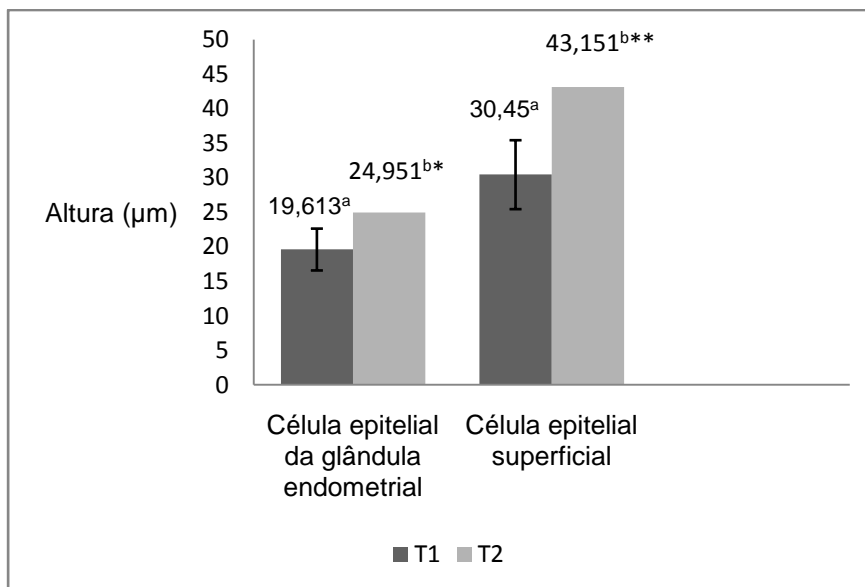


Figura 3 – Média ( $\pm$  desvio padrão) do peso relativo total do trato reprodutivo e peso do útero-ovário-vagina dos T1 (controle) e T2 (0,75mg /kg de zearalenona). Letras diferentes diferem estatisticamente  $P^* = 0,006$ ,  $P^{**} = 0,016$ .

### 2.3.3 Altura das células epiteliais das glândulas endometriais e superficiais da mucosa uterina

Os resultados das medições da altura das células epiteliais das glândulas endometriais e superficiais da mucosa uterina estão apresentados na Figura 4. O grupo T2 apresentou maior altura das células epiteliais uterinas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4.** Média ( $\pm$  desvio padrão) da altura das células epiteliais da glândula endometrial e da mucosa uterina dos T1 (controle) e T2 (0,75mg /kg de zearalenona). Letras diferentes diferem estatisticamente \* P= 0, 0074 e \*\*P=0, 001.

#### 2.3.4 Análises morfológicas dos órgãos e histopatológica

Nenhuma alteração macroscópica foi observada nos órgãos estudados, exceto de dois animais do T2 que apresentaram ovários císticos. Na avaliação histológica não se constatou qualquer alteração nos linfonodos e no fígado foi observada discreta hiperplasia de ductos biliares nas amostras de ambos os tratamentos.

Na avaliação histológica de útero e do canal vaginal foram observadas no T2 irregularidade, espessamento e proliferação da camada das células epiteliais da mucosa uterina (Figura 5) e vaginal (Figura 6). Observou-se ainda metaplasia escamosa do útero e hiperplasia das glândulas endometriais (Figura 5). Na mucosa do canal vaginal do grupo T2, em fragmentos de ambas as localizações, houve proliferação, irregularidade e aumento da camada epitelial (Figura 6).

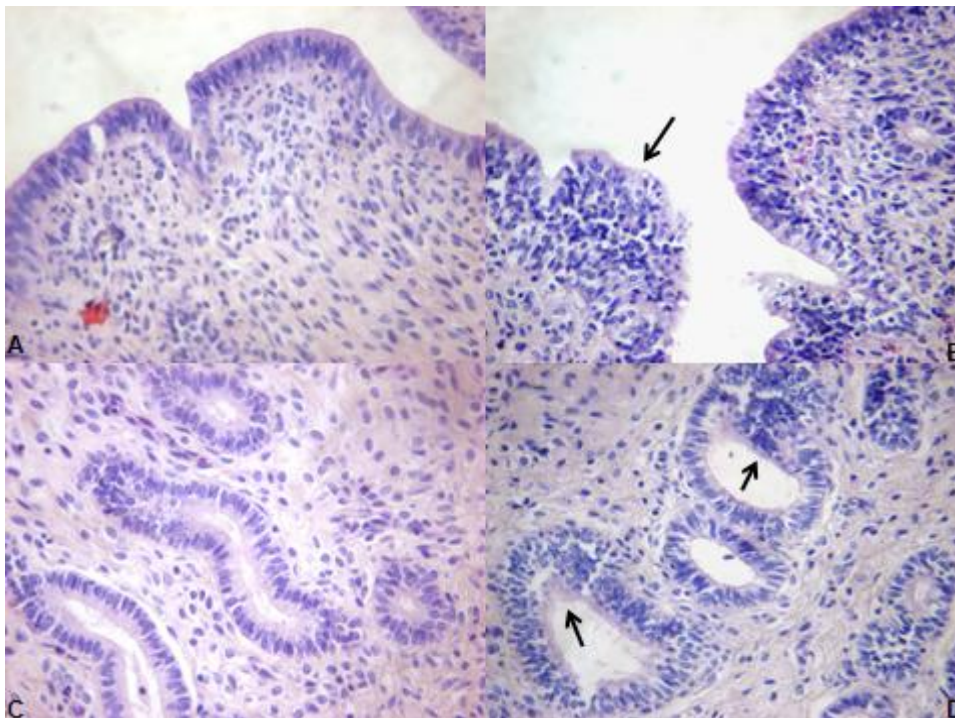


Figura 5 – Fotomicrografia de útero de leitoas, HE, 40x do T1 (A e C, controle) e do T2 (B e D, 0,75mg/kg de zearalenona). (A) Camada epitelial da mucosa uterina regular (C) Células epiteliais das glândulas endometriais uniformes e regulares (B) Irregularidade, proliferação e espessamento das células epiteliais uterinas (seta), metaplasia escamosa do útero (D) Hiperplasia das glândulas endometriais (aumento irregular e proliferação das células epiteliais) (seta).

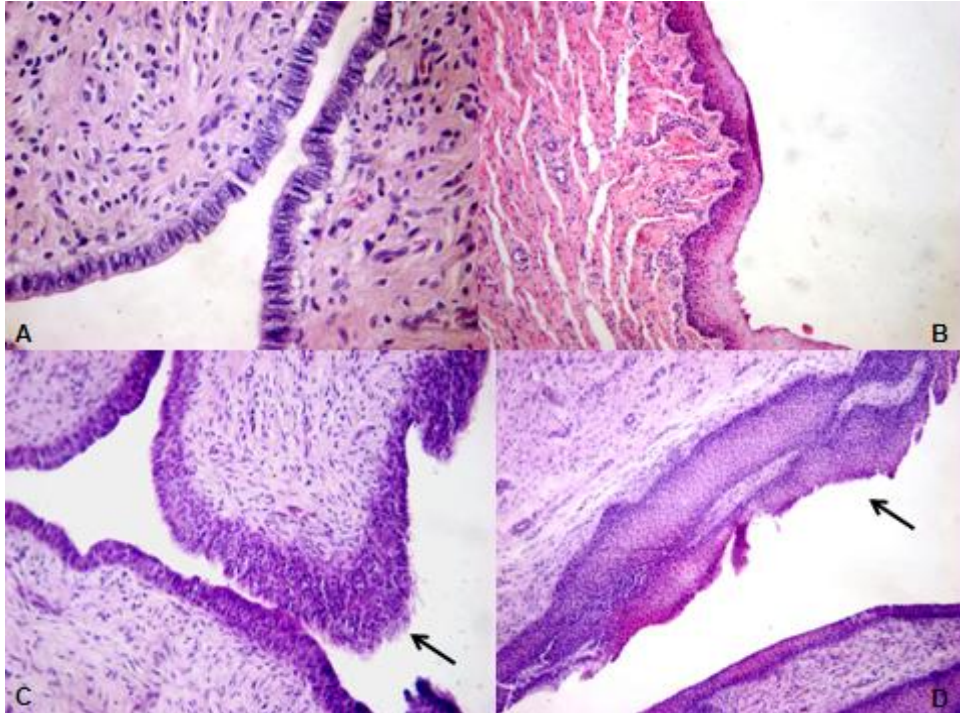


Figura 6 – Fotomicrografia de canal vaginal de leitoas, HE. T1 (A e B, controle) e T2 (C e D, 0,75mg/kg de zearalenona). Epitélio próximo a cérvix (A e C). Epitélio próximo a vulva (B e D). (A) Epitélio com células dispostas uniformes e regulares, (x20). (B) Epitélio próximo a vulva com estratificação regular (x10). (C) Epitélio com proliferação celular e irregular (seta) (x10). (D) Epitélio estratificado irregular (seta) (x10).

### 2.3.5 Ganho de peso

Não foi observada diferença entre a média dos grupos T1 e T2 ( $P=0,47$ ) no ganho de peso total (11,96 e 12,59kg).

### 2.3.6. Análises hematológicas e bioquímicas

Nas análises hematológicas não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e nem entre o 1° e 21° dia de experimento. Todos estes parâmetros no 1° dia (início do experimento), encontravam-se dentro dos limites estabelecidos por FELDMAN et al. (2000). Os valores hematológicos do 21° dia (fim do experimento) estão apresentados na Tabela

3. No grupo T1 foram verificadas baixo CHGM, leucocitose, linfocitose e eosinopenia e no T2 linfocitose e eosinopenia.

Tabela 3. Média ( $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros bioquímicos séricos de leitões com idade média de 53 dias com e sem exposição à ZEA.

Variável (unidade)	T1 (controle)	T2 (0,75mg /kg ZEA)	P (2° coleta)	Referência*
Hemácia ( $\times 10^6 / \mu\text{L}$ )	6,97 $\pm$ 0,67	6,67 $\pm$ 0,24	0,3698	5,9-6,8
Hematócrito (%)	42 $\pm$ 2	43,2 $\pm$ 2,95	0,4426	37-44
Hemoglobina (g/dl)	10,75 $\pm$ 2,54	11,74 $\pm$ 1,24	0,4502	11,3-13,3
VGM ( $\mu\text{m}^3$ )	62 $\pm$ 1,58	63 $\pm$ 1,41	0,357	62-68
CHGM (%)	25,8 $\pm$ 6,79	29 $\pm$ 1,63	0,3936	28-32
Leucócitos ( $\times 10^3 / \text{mm}^3$ )	23,81 $\pm$ 11,71	18,26 $\pm$ 3,55	0,3963	12,7-20,9
Neutrófilos ( $/\text{mm}^3$ )	4233,2 $\pm$ 1604,32	4597,5 $\pm$ 692,78	0,6877	3556-8987
Bastonetes ( $/\text{mm}^3$ )	249	193	***	0-1045
Eosinófilos ( $/\text{mm}^3$ )	250,5 $\pm$ 24,74	181,5 $\pm$ 60,10	0,2721	444,5-2926
Linfócitos ( $/\text{mm}^3$ )	16189,5 $\pm$ 4772,26	12852 $\pm$ 7167,23	0,30	5080-14212
Monócitos ( $/\text{mm}^3$ )	868 $\pm$ 90,51	956 $\pm$ 214,05	0,6140	381-2194,5
PPT	6,12 $\pm$ 0,22	6,35 $\pm$ 0,25	0,1936	4,9-8**

VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; PPT: proteína plasmática total, ZEA: zearalenona. Obs. Os valores absolutos médios de basófilos foram iguais a 0.

\* Referência para leitões de 36 dias por FELDMAN *et al.* (2000)

\*\* Referência para leitões de 33 -94 dias de idade, FAUSTINI *et al.* (2000).

\*\*\* Valor de P não calculado, apenas uma amostra em cada tratamento apresentou valores absolutos de bastonetes. T1 (controle) T2 (0,75mg /kg de ZEA).

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados das análises bioquímicas sanguíneas. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Nos valores das enzimas hepáticas GGT e AST, uréia e albumina também não foram verificadas diferenças significativas entre os momentos das coletas, 1° dia (início) e 21° dia (término) do experimento. Os resultados bioquímicos no 1° dia de experimento se comportaram de maneira semelhante

com os resultados obtidos no 21º dia de experimento quanto aos limites de referência estabelecidos na tabela 4. Houve diferença entre o momento da coleta somente para as PT que foram significativamente superiores no T2 no 1º dia de experimento quando comparado ao 21º dia, com média de  $6,81 \pm 0,47$  e no 21º dia de  $5,36 \pm 0,35$  ( $P= 0,0001$ ).

Tabela 4. Média ( $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros bioquímicos séricos de leitões com idade média de 53 dias com e sem exposição à ZEA.

Variável (unidade)	T1 (controle)	T2 (0,75mg/kg ZEA)	P (2º coleta)	Referência*
AST (UI/L)	122,05 $\pm$ 34,61	110,65 $\pm$ 24, 41	0,7925	28.5-87.4*
GGT (UI/L)	48, 91 $\pm$ 9, 11	56,0 $\pm$ 9, 04	0,3889	10-60**
PT (g/ dL)	5,6 $\pm$ 0, 58	5,36 $\pm$ 0, 35	0,7586	7 -8,9***
ALBUMINA (g/ dL)	4,3 $\pm$ 0, 36	4,3 $\pm$ 0, 31	0,7226	1,9-3,3**
URÉIA (mg/ dL)	18,39 $\pm$ 4, 19	19,27 $\pm$ 3,27	0,6089	9,7-37*

AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gamaglutamil tranferase; PT: Proteína total, ZEA:zearalenona

\*Referência para leitões pré-púberes de 33 -94 dias de idade, FAUSTINI et al. (2000).

\*\* Referência para KANEKO et al. (1997), não especificou idade dos animais.

\*\*\* Referência para JAIN et al. (1993), não especificou idade dos animais.

### 2.3.7 Avaliação da resposta imune humoral contra hemácias de carneiro

Nas imunizações com hemácias de carneiro não houve diferença nos títulos entre os tratamentos.

## 2.4 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados na análise micotoxicológica sugerem a freqüente ocorrência de ZEA nos grãos do Brasil, já que a micotoxina foi encontrada no milho e no farelo de soja utilizados no experimento. Este resultado reflete os obtidos por SALAY e MERCADANTE (2002) que em levantamento da incidência de micotoxinas no milho, amostras dos estados do

Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás apresentaram mais de 50% de contaminação por ZEA.

Na vulvometria houve diferença significativa somente na 3ª semana de exposição à ZEA. Este resultado difere do obtido por ANDRETTA et al. (2008) que, utilizando 2mg/kg, observaram aumento da vulva (volume vulvar) na primeira semana de exposição de fêmeas pré-púberes à ZEA. As diferenças na dose e no tempo de exposição à micotoxina entre os estudos reforçam a importância destas variáveis na manifestação dos sinais clínicos de edema e hiperemia de vulva.

O parâmetro área de vulva apresentou grande variação, apesar de observado diferença significativa entre os tratamentos. Sendo assim, para testes experimentais com baixas concentrações de ZEA este parâmetro pode não ser confiável. É importante ressaltar também que a presença de ZEA no grupo controle pode ter influenciado na grande variação observada neste parâmetro e até mesmo ter subestimado os efeitos produzidos pela ZEA especialmente no trato reprodutivo.

As medições das células epiteliais demonstram a capacidade da ZEA em provocar hipertrofia das células uterinas. O aumento da altura das células epiteliais foi relatado por HENEWEER et al. (2007) em ratos tratados com 10mg/kg de ZEA no período de 3 dias. A exposição prolongada à micotoxina justifica este achado na concentração usada no presente estudo. DOLL et al. (2004) não encontraram aumento da altura das células epiteliais do útero e das glândulas endometriais apesar de ter constatado aumento de peso do útero no grupo com 0,42 mg/kg, este resultado pode ter ocorrido, pois neste estudo, houve associação de ZEA e deoxinivalenol (DON). A DON reduz a síntese

protéica na célula pela ligação na subunidade ribossomal 60S. Neste caso, a DON pode ter suprimido os efeitos da ZEA (DOLL et al., 2004; FEINBERG e MCLAUGHLIN, 1989).

As alterações histopatológicas encontradas foram descritas por outros autores na mucosa uterina e vaginal (BRISTOL e DJURICKOVIC, 1971; CHANG et al., 1979; ETIENNE e DOURMAD, 1994; FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007). SPERANDA MARCELA et al. (2006) e VÁNYI et al. (1994) relataram também em seus estudos com ZEA hiperplasia das glândulas endometriais. A presença de cistos em ovários do grupo T2 indica sinais de maturação dos folículos ovarianos, provocados pela micotoxina, e observados em leitoas pré-púberes expostas a ZEA por VÁNYI et al. (1994).

Os efeitos de hiperestrogenismo nas leitoas ocorreram com doses inferiores de ZEA quando comparadas as utilizadas nos estudos de ETIENNE e JEMMALI et al. (1982), que evidenciaram efeitos de hiperestrogenismo em doses superiores a 3 mg/kg; e por ANDRETTA et al. (2008) com doses de 2 mg/kg, observando aumento na vulvometria e peso do trato reprodutivo. Em investigação dose-resposta com concentrações gradativas de ZEA, DOLL et al. (2003) observaram aumento de peso de útero em concentrações baixas (0.42 mg/kg). O conhecimento do limite de concentração de ZEA para o início de seus efeitos tóxicos é importante para o futuro estabelecimento de legislações com limites aceitáveis desta micotoxina em rações de suínos, especialmente no Brasil onde estes limites não estão determinados. Desde 2003 as concentrações de ZEA são controladas na alimentação animal e humana por 16 países (FAO, 2004). O regulamento da União Européia permite

concentrações de ZEA de 0,1 e 0,3 mg/kg em ração para leitoas pré-púberes e para porcas sexualmente maduras, respectivamente (EC 2006).

A ZEA atua estimulando a síntese protéica uterina induzindo a proliferação celular e aumentando a massa dos órgãos reprodutivos (GAUMY et al., 2001), sendo assim, os resultados observados nos peso do trato reprodutivo, da área de vulva, bem como da altura das células epiteliais evidenciam seu potencial estrogênico na concentração de 0,75mg/kg. Nos mamíferos dois receptores nucleares mediam as ações por estímulo a ligação do estrógeno, os  $\alpha$ - e  $\beta$ - receptores de estrógeno, havendo predominância dos  $\alpha$ - no útero (KLINGE, 2001; NILSSON et al., 2001; WANG et al.,1999). Isto reflete também na maior afinidade do metabólito  $\alpha$ -zearalenol em se ligar aos receptores estrogênicos (TAKEMURA et al., 2007) e a maior susceptibilidade de suínos aos efeitos da ZEA pela predominância na produção deste metabólito (MALEKINEJAD et al., 2006).

Não houve diferenças no ganho de peso entre os grupos. Em outros estudos mesmo com ingestões de ração com quantidades iguais e superiores a 2 mg/kg de ZEA não observaram alterações no desempenho dos animais (ANDRETTA et al., 2008; SPERANDA MARCELA et al., 2006). Isto reforça a ação da ZEA, sobretudo no trato reprodutivo, sem alterar significativamente os parâmetros de desempenho zootécnicos.

A presença de micotoxina produzida por *Fusarium*, em situações de campo, normalmente está associada a outras micotoxinas produzidas por fungos deste gênero, como a fumonisina e os tricotecenos, sendo a DON um importante membro deste grupo. Neste caso, na presença de ZEA e DON relata-se redução significativa na ingestão e no ganho de peso (CHENG et al.,

2006; DOLL et al., 2004; TIEMANN et al., 2006). A DON está relacionada com recusa de alimentos e inibição de síntese de proteínas hepáticas (MELOCHE e SMITH, 1995; TIEMANN et al., 2006), sendo que doses de 2mg/kg são capazes de reduzir o ganho de peso e aumentar a conversão alimentar (CONKOVÁ et al., 2003).

A presença de discreta hiperplasia dos ductos biliares em ambos os tratamentos pode estar relacionada com o fato de no T1, existir uma concentração de ZEA de 0,335 mg/kg e sendo a sua metabolização no fígado pode ser indicativo de resposta a toxicidade leve. Além disso, pode haver outras micotoxinas presentes no milho que não foram pesquisadas ou ainda outros agentes tóxicos na dieta que resultem numa maior atividade metabólica neste órgão, inclusive no T1.

No presente estudo os parâmetros eritrocitários se mantiveram dentro dos valores de referência citados por FELDMAN et al. (2000). No entanto, os valores de CHGM no T1 foram inferiores aos citados por este autor em leitões de 36 dias de idade e também por FAUSTINI et al. (2000) que estabeleceram valores de 28-37% em leitões de 33- 94 dias de idade, observando-se, portanto, leve hipocromia. Os valores de hemoglobina no T1 foram próximos aos limites inferiores dos valores de referência. FAUSTINI et al. (2000) obtiveram limites de referência para hemoglobina entre 8,6-13,3 (g/dl) não considerando ocorrência de anemia no seu estudo porque o limite para hemoglobina foi abaixo de 8g/dl (AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL, 1967). ODINK et al. (1990) também verificaram valores inferiores de hemoglobina para suínos sadios com desvio para esquerda no intervalo de referência.

Foram observados leucocitose, linfocitose e eosinopenia no T1 e linfocitose e eosinopenia no T2. A ausência de neutrofilia e de monocitose associadas à linfocitose exclui a ocorrência de inflamação crônica, além disso, não foram observados linfócitos reativos. Os fatores como idade e estado fisiológico dos suínos influenciam nos valores hematológicos e bioquímicos séricos de referência (FELDMAN et al., 2000; FAUSTINI et al., 2000; TUMBLESON et al., 1986; JAIN et al. 1993), sendo a possível causa de linfocitose o estresse agudo por adrenalina (FELDMAN et al., 2000) durante a manipulação dos animais para coleta de sangue. A eosinopenia não tem importância clínica demonstrada.

Os valores da AST, em ambos os tratamentos, foram superiores aos citados por FAUSTINI et al. (2000) de 28,5-87,4 e KANEKO et al. (1997) de 32-84 UI/l sem especificação da idade dos animais. Na coleta do 1º dia de experimento os valores encontrados também foram elevados de  $101,2 \pm 36,63$  e  $137,48 \pm 45,85$  no T1 e T2, respectivamente. A enzima AST é importante indicador de lesão tecidual de suínos, entretanto, não é uma enzima órgão-específica, estando presente no fígado, nos eritrócitos e nos músculos cardíaco e esquelético (MEYER et al., 1995). A atividade da AST está relacionada com a idade, sendo valores menores observados em porcos adultos (DUBREUIL e LAPIERRE, 1997). Os valores superiores neste estudo podem ser atribuídos as variações que ocorrem nos parâmetros bioquímicos devido à idade e ambiente (TUMBLESON et al., 1986; FAUSTINI, et al., 2000). Além disso, divergências entre os parâmetros já estabelecidos e os resultados encontrados podem estar relacionadas com a escassez de informações quanto aos valores de referência

para suínos discriminando-os por categoria animal, sexo, idade, raça, manejo, ambiente. (FAUSTINI, et al., 2000).

A GGT é uma enzima associada às membranas e presente no citosol, especialmente nos epitélios dos ductos biliares e renais (MEYER et al., 1995). Houve discreto aumento da GGT no T2, mas não foi constatada significância estatística e os valores estão dentro dos limites estabelecidos por KANEKO et al. (1997). SPERANDA MARCELA et al. (2006) em leitões alimentadas com 3mg/kg de ZEA também obtiveram valores de GGT ( $51,25 \pm 6,18$ ) dentro dos limites normais.

Os valores obtidos para uréia estiveram dentro dos parâmetros estabelecidos por FAUSTINI et al. (2000) e KANEKO et al. (1997) de 10-30mg/dL sem especificação de idade. SPERANDA MARCELA et al. (2006) encontraram valores de uréia para leitões no grupo controle de: 14,56 mg/ dL e no grupo com ZEA de: 12,18 mg/ dL. As discretas diferenças nestes valores comparados aos encontrados no presente trabalho podem ter ocorrido por variações na alimentação dos animais. A alimentação com dietas ricas em proteínas causa aumento pouco significativo e sendo o aumento discreto de uréia indicativo de aumento de catabolismo protéico (GONZÁLEZ et al., 2006).

As proteínas totais (PT), exceto as  $\gamma$  globulinas, são sintetizadas no fígado e são a albumina,  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas. Já quando comparados os tratamentos não houve diferenças significativas. Os valores encontrados para PT foram inferiores aos citados por JAIN et al. (1993), que não especificam idade dos animais, em ambos os tratamentos e no 1° e no 21° dia de experimento. Entretanto, valores similares ao do presente trabalho foram encontrados por EGELI et al. (1998) para PT com valores de 3,3 a 6,3 g/dL

para leitões com 35 dias de idade. Existe um aumento linear das proteínas séricas de porcos durante o período de crescimento de 8-20 semanas (DUBREUIL e LAPIERRE, 1997). Os leitões do experimento possuíam média de 32 dias no 1º dia do experimento e de 7,5 semanas no 21º dia, podendo explicar valores inferiores de PT encontrados.

Altos valores de albumina para leitões foram observados também por ROTTER et al. (1994) em estudo com leitões de 5-6 semanas de idade alimentados com dieta contendo baixas concentrações de ZEA e DON, que além do aumento de albumina observaram também decréscimo de  $\alpha$ -globulinas. A hiperalbuminemia foi atribuída à ingestão inadequada de água. No presente estudo, não foram observados sinais de desidratação dos animais. Baixos valores de globulinas também foram observados no presente estudo, de 1,3 g/dL no T1 e de 1,06 g/dL no T2 de acordo com os valores de referência de KANECO et al., 1997. É possível que as micotoxinas produzidas por *Fusarium* afetem diretamente a síntese de  $\alpha$ -globulina no fígado (ROTTER et al., 1994) no entanto, há a necessidade de mais estudos investigativos para este achado.

Apesar da metodologia de avaliação de títulos de anticorpos anti-hemácias de carneiro ser extensivamente usada na literatura (PEPLOWSKI et al. 1980; BONNETTE et al., 1990; ROTTER et al., 1994) para estudar a resposta imunológica dos animais, sabe-se que a resposta imune de animais frente a diferentes desafios é extremamente complexa. Em estudo com desafio de hemácias de carneiro ROTTER et al. (1994) também não encontraram diferença significativa, mas observaram numericamente um atraso na resposta de títulos de anticorpos de leitões de 5 a 6 semanas de idade alimentados com

concentrações baixas de DON (0; 0,75; 1,5; 3 mg/kg) e ZEA (0; 0,05; 0,08; 0,15 mg/kg).

As micotoxinas podem afetar de diferentes formas a resposta imune dos animais, desde a produção de enzimas e citocinas até aumentar a produção de radicais livres que afetam indiretamente estes parâmetros (SURAI e DVORSKA et al., 2005). Outros estudos relatam efeitos inibitórios da ZEA na proliferação de linfócitos, demonstrando sua capacidade imunotóxica em altas concentrações. ABBÉS et al. (2006) com 40 mg/kg de ZEA observaram redução significativa no número de linfócitos e também das células T CD3+, CD4+, CD8+ e CD56+ em camundongos. Já um estudo *in vitro*, LUONGO et al. (2008) com baixas concentrações (2,5  $\mu$ M) de  $\alpha$ -zearalenol observou efeito inibitório na proliferação celular de linfócitos de suínos. Desta forma, acredita-se que esta metodologia pode não ter sido capaz de determinar o real efeito da ZEA na resposta imunológica.

## 2.5 CONCLUSÃO

A concentração de 0,75mg/kg de ZEA foi suficiente para produzir efeito de aumento do peso de trato reprodutivo, da área vulvar, da altura das células epiteliais das glândulas endometriais e das células superficiais na mucosa uterina. No entanto, nestas condições, não houve alteração no desempenho dos animais nem tampouco nos parâmetros hematológicos, bioquímicos sanguíneos e, por fim, na resposta imune humoral contra hemácias de carneiro.

## 2.6 REFERÊNCIAS

ABBÈS,S.; SALAH-ABBÈS, J.B.; OUANES,Z.; HOUAS,Z.; OTHMAN,O.; BACHA,H.; ABDEL-WAHHAB,M.A.; OUESLATI, R. Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v.6, p.1251–1258, 2006.

AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. The Nutrient Requirement of Farm Livestock. 3, Pigs. **Agricultural Research Council**, London, 1967.

ANDRETTA, I.; LOVATTO, P.A.; HAUSCHILD, L.; DILKIN, P.; GARCIA, G.G.; LANFERDINI, E.; CAVAZINI, N.C.; C.A. MALLMANN. Alimentação de leitões pré-púberes com dietas contendo ZEA. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.5, p.1227-1233, 2008.

BONNETTE, E. D.; KORNEGAY, E. T.; LINDEMANN, M. D.; HAMMERBERG, C. Humoral and cell-mediated immune response and performance of weaned pigs fed four supplemental vitamin E levels and housed at two nursery temperatures. **J Anim Sci.**, v.68, p.1337-1345,1990.

BRISTOL, F.M.; DJURICKOVIC,S. Hyperestrogenism in female swine as the result of feeding mouldy corn. **Can. Vet. Jour.**, v. 12, n. 6, 1971.

CHANG, K.; KURTZ, H.J.; MIROCHA, C.J. Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, p.1260-1267, 1979.

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

CONKOVÁ, E.; LACIAKOVA, A.; G. KOVÁČ, G.; SEIDEL, H. Review: Fusarial toxins and their role in animal diseases. **The Veterinary Journal**, v.165, p.214-220, 2003.

EUROPEAN COMMISSION. Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin, T-2 and HT-2 and fumonisin in products intended for animal feeding. **Off J Eur Union L**. 229:7-9, 2006.

DOLL, S.; DANICKE, S.; UEBERSCHA R, K.-H.; VALENTA, H.; CHNURRBUSCH, U.; GANTER, M.; KLOBASA, F.; FLACHOWSKY, G., Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. **Archives of Animal Nutrition**, v.57, p.311-334, 2003.

DOLL, S.; DANICKE, S.; SCHNURRBUSCH, U. The effect of increasing concentrations of Fusarium toxins in piglet diets on histological parameters of the uterus and vagina. **Arch. Anim. Nutr.**, v.58, p.413-417, 2004.

DUBREUIL, P.; LAPIERRE, H. Biochemistry reference values for Quebec lactating dairy cows, nursing sows, growing pigs and calves. **Can. J. Vet. Res.**,

v.61, p.235-239, 1997.

EGELI, A. K.; FRAMSTAD, T.; MORBERG, H. Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. **Acta Vet. Scand.**, v.39, p.381-393, 1998.

ETIENNE, M.; JEMMALI, M.. Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts. **J. Anim. Sci.**, v.55, p.1-10, 1982.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper N. 81. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, Italy, 2004.

FAUSTINI, M.; MUNARI, E.; COLOMBANI, C.; RUSSO, V.; MAFFEO, G.; VIGO, D. Haematology and Plasma Biochemistry of Stamboek Pre-pubertal Gilts in Italy: Reference Values. **J. Vet. Med.**, v.47, p.525-532, 2000.

FEINBERG, B. AND MCLAUGHLIN, C.S. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: Beasley, V.R. (Ed.) **Trichothecene mycotoxicosis: Pathophysiological effects**. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton, 1989, cap.1, p.27-35.

FELDMANN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Schalm's Veterinary hematology (THORN, E.C.). In: THORN, C. E. **Normal hematology of the pig**. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000, cap.168, p.1089-1095.

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

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Schalm's Veterinary hematology In: THORN, C.E. **Normal hematology of the pig**. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000, Cap.168, p.1089-1095.

GAUMY, J.L.; BAILLY, J.D.; BURGAT, V.; GUERRE, P. Zéaralénone: propriétés et toxicité expérimentale. **Revue Méd. Vét.**, v.152, n.3, p.219-234, 2001.

GONZÁLEZ, H.D.F.; SILVA, S.C.; CÉRON, J.J. Perfil bioquímico sanguíneo. In: **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2006, cap.8, p.313-357.

HENEWEER, M.; HOUTMAN, H.; POORTMAN, J.; GROOT, M.; MALIEPAARD, C.; PEIJNENBURG, A. Estrogenic effects in the immature rat uterus after dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using a systems biology approach. **Toxicological sciences**, v.99, n.1, p.303-314, 2007.

JAIN, N. C. Evaluation of anemias and polycythemias. In: Jain, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Malvern: Lea & Febiger, 1993, cap.8, p.159-168.

KANEKO, J. J. Blood Analyte reference values in large animals. In: Kaneko, J. J., J. W., **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Harvey and M. L. Bruss Academic Press, 1997, Appendix VIII, p.890-894.

KLINGE, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. **Nucleic Acids Res.**, v.29, p.2905-2919, 2001.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.7, p.253-306, 1987.

KUMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v.27, p.891-905, 2008.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology**. New York: McGraw-Hill, 1968, p.253.

LUONGO, D.; DE LUNA, R.; RUSSO, R.; SEVERINO, L. Effects of four Fusarium toxins (fumonisin B1, a-zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. **Toxicol.**, v. 52, p.156–162, 2008.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v.172, p.96-102, 2006.

MELOCHE, J.L.; SMITH, T.K. Altered tissue amino acid metabolism in acute T-2 toxicosis. **Proc. Exp. Biol. Med.**, v.210, p.260-266, 1995.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Rocca, 1995. p.280.

NILSSON, S.; MAKELA, S.; TREUTER, E.; TUJAGUE, M.; THOMSEN, J.; ANDERSSON, G.; ENMARK, E.; PETTERSSON, K.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Mechanisms of estrogen action. **Physiol. Rev.**, v.81, p.1535-1565, 2001.

NRC. Nutrient requirements of swine. Washington: National Academy of Science, 1998.

ODINK, J.; SMEETS, J. F. M.; VISSER, I. J. R.; SANDMAN, H.; SNIJDERS, J. M. A. Hematological and clinicochemical profiles of healthy swine and swine with inflammatory processes. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.163-170, 1990.

OLSEN, M.; PETTERSSON, H.; KIESSLING, K. H. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.48, p.157-161, 1981.

PEPLOWSKI, M. A.; MAHAN, D. C.; MURRAY, F. A.; MOXON, A. L.; CANTOR, A. H.; EKSTROM, K. E. Effect of dietary and injectable vitamin e and

selenium in weanling swine antigenically challenged with sheep red blood cells. **J Anim Sci.**, 51:344-351, 1980.

ROTTER, B. A.; THOMPSON, B. K.; LESSARD, M.; TRENHOLM, H. L.; TRYPHONAS, H. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. **Fundamental and applied toxicology**, v.23, p.117-124, 1994.

SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v.13, p.87-92, 2002.

SCHURIG, G.G.; DUNCAN, J. R.; WINTER, A.J. Elimination of genital vibriosis in female cattle by systemic immunization with killed cells or cell-free extracts of *Campylobacter fetus*. **The J. Infect. Dis.** v.138, n. 4, p.463-472, 1978.

SURAI, P.F.; DVORSKA, J.E. In. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2005, p.225-234.

SPERANDA MARCELA; LIKER, B.; SPERANDA, T.; SERIC, V.; ANTUNOVIC, Z.; GRABAREVIC, Z.; SENSIC, D.; GRGURIC, D.; STEINER, Z. Haematological and biochemical parameters of weaned piglets fed on fodder mixture contaminated by zearalenone with addition of clinoptilolite. **Acta Veterinaria (Beograd)**, V.56, N.2-3, p.121-136, 2006.

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

TIEMANN, U.; BRUSSOW, K. P.; KUCHENMEISTER, U.; JONAS, L.; KOHLSCHHEIN, P.; POHLAND,R.; DANICKE,S. Influence of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two *Fusarium* toxins on selected enzymatic and histological parameters of liver in gilts. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1228-1235, 2006.

TUMBLESON, M. E., D. A. SCHMIDT, AND E. SCHOLL. Hematology and clinical chemistry. In: LEMAN A. D.; STRAW, B.; GLOCK, R. D.; MENGELING, W. L.; PENNY, R. C. H.; SCHOLL, E. **Diseases of Swine**. 6.ed. Ames: Iowa State University Press, 1986, p.27-43.

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

WYATT, R.D. Mycotoxin interactions. In. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2005, p.269-278.

WANG, H., MASIRONI, B., ERIKSSON, H., AND SAHLIN, L. A comparative study of estrogen receptors {alpha} and {beta} in the rat uterus. **Biol. Reprod.**, v.61, p.955-964, 1999.

YOUNG, L.G.; KING, G.J.; McGIRR, L.; SUTTON, J.C. Moldy corn in diets of gestating and lactating swine. **J Anim Sci.** v.54,p.976-982, 1982.

## **CAPÍTULO 3**

---

### **EFICÁCIA DE ADITIVO ANTI-MICOTOXINA EM LEITOAS PRÉ-PÚBERES EXPOSTAS À ZEARALENONA**

## EFICÁCIA DE ADITIVO ANTI-MICOTOXINA EM LEITOAS PRÉ-PÚBERES EXPOSTAS À ZEARALENONA

*(Effectiveness of a detoxifying agent in pre-pubertal gilts exposed to zearalenone)*

TEIXEIRA, L. C.; SANTIN, E.; LOCATELLI- DITTRICH, R.; MONTIANI-FERREIRA, F.; ALBERTON, G.C.

**RESUMO** – O trabalho consistiu na exposição oral de leitoas pré-púberes a ração contendo 0,5mg/kg de zearalenona (ZEA) e avaliou-se a ação de um aditivo anti-micotoxina (AAM); composto de filossilicatos, epoxidases e hidrolases à 0,15%, 0,25% e 0,4%; na prevenção da intoxicação. Uma formulação experimental deste mesmo produto acrescida de bentonita e adicionada na ração a 0,1%, também foi verificada. Os tratamentos com ZEA e AAM receberam ração originada de milho com qualidade bromatológica inferior ao grupo controle negativo (sem ZEA), o que possibilitou observar a ação do AAM numa condição mais próxima a real. Foram avaliadas as variáveis vulvometria, peso do trato reprodutivo, análise histopatológica de fígado, linfonodo e útero, medindo-se a altura do endométrio e das células epiteliais das glândulas endometriais. Além disso, pesquisaram-se alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos, resposta imune humoral contra hemácias de carneiro e o desempenho dos animais para ganho de peso, não sendo verificadas diferenças entre os tratamentos para estas variáveis. O grupo controle positivo (com ZEA) apresentou aumento significativo no peso do trato reprodutivo e na altura de endométrio ( $P < 0,05$ ) comparando-se ao grupo controle negativo (sem ZEA), evidenciando o potencial estrogênico da micotoxina na concentração de 0,5mg/kg. Para estas mesmas variáveis os grupos com AAM não diferiram dos controles ( $P > 0,05$ ), sendo observados numericamente resultados inferiores aos obtidos no controle positivo, sugerindo uma redução dos efeitos tóxicos. O tratamento com a formulação experimental do AAM atuou melhor na prevenção dos efeitos tóxicos, reduzindo significativamente a altura de endométrio ( $P < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** zearalenona, filossilicatos, bentonitas, suínos.

**ABSTRACT-** This work consisted of an oral exposure of pre-pubertal gilts to 0.5 mg/kg of zearalenone (ZEA) in the feed and evaluation of the action of a detoxifying agent (DA) composed by phyllosilicates, epoxidase and hydrolase, at 0.15%, 0.25 % and 0.4% inclusion rates, in the prevention of hyperestrogenism. An experimental formulation (bentonite added) of this product at a 0.1% inclusion was also verified. The treatments with ZEA, and DA received feed originated from corn with bromatological quality lower than the control group (without ZEA). This allowed to assess the action of the DA in a condition closer to that faced in the field. Variables evaluated were vulvometria, reproductive tract weight, histopathologic analysis of liver, lymph nodes and uterus (measuring the height of the endometrium and epithelial cells of endometrial glands). In addition, changes in the hematological and chemical blood parameters were investigated. Humoral immune response against sheep red blood cells (SRBC) and weight gain did not differ between treatments. There was an increase in the reproductive tract weight and endometrium height ( $P < 0.05$ ) between the control groups (with and without ZEA), showing the potential estrogenicity of ZEA. For these same

variables groups with DA did not differ from the controls ( $P > 0.05$ ), but showed numerically intermediate results, indicating a reduction of toxic effects. In the treatment with the experimental formulation of DA a decrease in the endometrium height was observed ( $P < 0.05$ ). There was a drop in feed conversion ( $P < 0.05$ ) in the DA (0.15%), however it was restricted to this treatment.

**Keywords:** zearalenone, phyllosilicate, bentonites, swines.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os suínos são freqüentemente expostos às intoxicações por micotoxinas pelo fato de sua alimentação ser composta principalmente por grãos. Dentre as micotoxinas que afetam os suínos, a zearalenona (ZEA) merece destaque pela ampla ocorrência no milho (KUMMAR et al., 2008; SALAY e MERCADANTE, 2002) e pela maior susceptibilidade dos suínos à esta toxina comparados às outras espécies animais.

A ZEA possui capacidade em se ligar aos receptores estrogênicos e por isso causa alterações funcionais e morfológicas nos órgãos reprodutivos (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007). Os suínos apresentam grande susceptibilidade a esta micotoxina devido às características de metabolização hepática que, nesta espécie, produz metabólito mais tóxico que a própria ZEA, o  $\alpha$ -zearalenol (MALEKINEJAD et al., 2006). A categoria mais sensível aos seus efeitos são as leitoas pré-púberes cujos sinais clínicos clássicos são edema e hiperemia de vulva (ZINEDINE et al., 2007).

Em alguns momentos do ano, mesmo com a adoção das medidas preventivas, a contaminação de grãos com micotoxinas pode superar os níveis toleráveis; neste caso, vale-se a adoção de medidas corretivas como o uso de aditivos anti-micotoxinas (AAM) na ração, que atuam como agentes de detoxificação ou de adsorção ou com ambas as funções no mesmo produto (HUWIG et al., 2001).

Estudos com enzima detoxificante apontam-na como uma opção eficiente para descontaminação de ZEA em rações (TAKAHASHI-ANDO et al., 2002). Já as ligações dos adsorventes a base de aluminossilicatos à ZEA são difíceis principalmente devido a apolaridade desta micotoxina (DOLL et al., 2005; HUWIG et al. 2001). A efetividade dos AAM é analisada inicialmente em condições *in vitro*, entretanto, a confirmação *in vivo* é imprescindível para verificação da verdadeira eficácia do produto (DOLL et al., 2005; DIAZ e SMITH at al., 2005).

Os estudos disponíveis na literatura com intoxicação experimental por ZEA, em sua maioria, tratam de concentrações superiores a 1mg/kg (ETIENNE e JEMMALI 1982; SPERANDA MARCELA et al., 2006; ANDRETTA et al., 2008) o que difere das condições encontradas normalmente à campo em que estas concentrações são inferiores (MALLMANN e DILKEN, 2007). Sendo assim, estudos com baixas concentrações de ZEA, são importantes para melhor entendimento de seus efeitos na suinocultura.

Os objetivos do estudo foram avaliar a ação de 0,5mg/kg de ZEA sobre as características clínicas, reprodutivas, zootécnicas, hematológicas e bioquímicas sanguíneas e resposta imune humoral contra hemácias de carneiro de leitoas pré-púberes; e avaliar também a eficácia do aditivo anti-micotoxina Elitox<sup>®</sup>, composto de filossilicatos, biopolímeros (quitosanas) e as enzimas epoxidases e hidrolases, e de uma formulação experimental deste produto adicionada de bentonita orgânica ativada em evitar os efeitos tóxicos nestes parâmetros.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Local e animais**

Foram utilizadas 36 leitoas com idade média inicial de 32 dias, em bom estado de saúde, constatado por meio de exames clínicos, hematológicos e bioquímicos sanguíneos. Todas as leitoas eram da linhagem Danbred<sup>®</sup>, e possuíam peso médio de 9,5 ( $\pm 1,3$ ) kg no primeiro dia de experimento.

As leitoas foram alojadas individualmente em baias com dimensões de 2m comprimento x 1m largura, revestidas com piso plástico vazado, sendo que os animais foram distribuídos de forma aleatória nos seis tratamentos com seis animais cada (tabela 1). Após a semana de adaptação os animais receberam as dietas experimentais durante 3 semanas. A temperatura na unidade experimental foi mantida proporcionando conforto térmico aos animais. No 21º dia de experimento os animais foram abatidos.

### **3.2.2 Dieta, alimentação e manejo semanal**

A dieta das leitoas compôs-se de milho, soja e núcleo vitamínico-mineral formulada de acordo com o NRC (NRC,1998), compatível com o ciclo de vida. As inclusões do aditivo anti-micotoxina Elitox<sup>®</sup> (Impextraco, Bélgica) na ração foram feitas em concentrações seriadas (tabela 1). No tratamento 3 foi avaliada uma formulação experimental do Elitox<sup>®</sup> adicionada de bentonita orgânica ativada.

Foram obtidos milhos de duas procedências, sendo uma de uma empresa que não possui critério de seleção e outra de uma empresa que realiza seleção por meio de mesa densimétrica. Em ambos os casos foram feitas análises bromatológicas e micotoxicológicas para verificação da qualidade. Os resultados

destas análises estão apresentados na tabela 2. O milho de melhor qualidade, obtido pela separação por mesa densimétrica foi destinado a produção da ração do tratamento 1 (controle negativo).

Tabela 1- Distribuição das 36 leitoadas nos tratamentos.

Tratamento	Zearalenona (MG/kg)	AAM (%)
T1	0	0
T2	0,5	0
T3	0,5	0,10
T4	0,5	0,15
T5	0,5	0,25
T6	0,5	0,4

\*AAM: Aditivo anti-micotoxina Elitox<sup>®</sup>,  
T3: Formulação experimental Elitox<sup>®</sup>

Tabela 2- Composição bromatológica e análise micotoxicológica dos milhos.

Nutrientes	Milho (T1)	Milho (T2,T3,T4,T5,T6)	Diferença
Umidade (%)	9,94	12,43	-2,49
Matéria seca (%)	90,06	87,57	2,49
Proteína bruta (%)*	7,79	7,02	0,77
Gordura bruta (%)*	4,25	3,18	1,07
Matéria mineral (%)*	1,17	1,25	-0,08
Fibra bruta (%)*	1,34	1,86	-0,52
Cálcio (%)*	0,04	0,08	-0,04
Fósforo disponível*	0,22	0,23	-0,01
Micotoxinas**	Milho (T1)	Milho (T2,T3,T4,T5,T6)	Diferença
Zearalenona (mg/kg)	0, 210	0, 349	-139
Ocratoxina A	ND	ND	ND
Aflatoxina B1(µg/kg)	ND	3,3	-0,33

ND- Não detectado. Não foram detectadas em ambos os milhos as aflatoxinas B2, G1 e G2.

\*Cálculo obtido da matéria seca.

\*\* \* Limite para detecção/quantificação de zearalenona (ZEA) 60,0 / 80,0 µg/kg, de ocratoxina 4 µg/kg e de aflatoxinas 0,5 / 1,0 µg/kg.

(T1:controle, T2: 0,5 mg/kg ZEA, T3: 0,5 mg/kg ZEA + 0,1% AAM, T4: 0,5 mg/kg ZEA + 0,15%AAM, T5: 0,5 mg/kg ZEA + 0,25%AAM, T6: 0,5 mg/kg ZEA + 0,4%AAM)

As leitoadas foram observadas duas vezes ao dia. Semanalmente os animais foram pesados e calculados o ganho de peso (diferença entre as

pesagens semanais e ao término e início do experimento). O consumo de ração e a conversão alimentar real não foram analisados pois as estruturas das baias permitiam muito desperdício dificultando o recolhimento das sobras. A vulvometria foi realizada com paquímetro digital e medida em milímetros, também semanalmente. A área de vulva foi obtida pela multiplicação de sua largura (eixo latero- lateral) e altura (eixo dorso-ventral).

### **3.2.3 Adição de zearalenona e pesquisa micotoxicológica**

A ZEA (*Fermentek biotechnology*<sup>®</sup>) com quantidade mínima de pureza de 98% foi incorporada, a princípio, em processo de diluições seriadas em milho degerminado. Após a confirmação da concentração de ZEA pela análise micotoxicológica, no Laboratório de Micotoxinas (LABMIC) no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição ESALQ/USP, a mistura milho degerminado+ZEA foi incorporada á ração com auxílio de misturador tipo “Y”.

Amostras de milho moído e farelo de soja utilizados para produção da ração foram enviadas para análise micotoxicológica, todas as análises foram realizadas no mesmo laboratório pela técnica de cromatografia em camada delgada. Foi determinada a concentração de ZEA e ocratoxina pelo método SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA (1989) modificado com purificação em coluna de imunoafinidade e das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 pelo método do MAPA (BRASIL 2000) modificado. Foi feito o cálculo de correção para obtenção final na ração da concentração de ZEA determinada de 0,5 mg/kg. Após a mistura e preparo das rações, amostras de cada tratamento também foram analisadas para as mesmas toxinas no mesmo laboratório.

### **3.2.4 Análises hematológicas e bioquímicas**

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia cava com agulha de calibre 40x12 adaptada à seringa. O sangue foi imediatamente transferido para tubos sem EDTA para obtenção do soro e com EDTA (10%) para análise hematológica. As coletas foram realizadas no primeiro e último dia do experimento. As amostras de sangue sem EDTA foram centrifugadas (500 x g) por 5 minutos para obtenção do soro. No soro foram determinadas, por métodos colorimétricos, as concentrações da Aspartato aminotransferase (AST), Gamaglutamil tranferase (GGT), análises de uréia, proteína total (PT) pela reação de biureto e albumina pela reação verde de bromocresol. As análises foram realizadas em analisador bioquímico semi-automático CELM-SBA-200.

As amostras de sangue com EDTA foram processadas para hematologia. No contador de células automático CELM-CC-530 foram obtidos o número total de leucócitos, de eritrócitos e a concentração de hemoglobina. O hematócrito (Ht) foi determinado pela técnica do micro-hematócrito, o volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foram obtidas pela fórmula de Wintrobe ( $VGM = Ht \times 10 / \text{hemácia}$ ;  $CHGM = Hb \times 100 / Ht$ ). Os valores de proteína plasmática total (PPT) foram obtidos por refratometria. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensão sangüínea corada com Wright imediatamente após a coleta do sangue.

### **3.2.5 Análises morfológicas dos órgãos e histopatológica**

Após 21 dias do fornecimento das rações experimentais, os animais foram abatidos em frigorífico com inspeção estadual e submetidos a exame macroscópico de fígado, linfonodo mesentérico e trato reprodutivo (ovários,

útero, vagina e vulva), quanto ao peso e aspecto geral. Os órgãos do trato reprodutivo (útero, ovário, vagina e vulva) foram dessecados e pesados. Em seguida obteve-se o peso somente do útero-ovário-vagina. Para evitar influência do peso dos animais no peso do trato reprodutivo, calculou-se o peso relativo do trato reprodutivo e relativo do útero-ovário-vagina, dividindo-se os valores dos pesos encontrados pelo peso corporal e multiplicando-os por 100.

Após o abate dos animais, os fragmentos do útero, linfonodos e fígado foram coletados e fixados em formalina 10% tamponada com fosfato. O material foi processado segundo as técnicas histológicas convencionais, incluído em parafina e cortado. Os cortes foram fixados em lâmina e corados pelo método de hematoxilina e eosina (LUNA, 1968).

Os fragmentos de fígado e linfonodo foram avaliados quanto à presença de alterações em sua morfologia. No útero foram obtidos três cortes do terço-médio do corno uterino e adotaram-se como critério de avaliação as medições da altura da célula epitelial das glândulas endometriais na magnificação (20x), como indicadores de hipertrofia celular, conforme descrito por HENEWEER et al. (2007), e a altura do endométrio avaliada na magnificação (4x). Para isto, fotografaram-se as glândulas endometriais e endométrio, sendo realizadas quatro medições em três glândulas diferentes e quatro medições da altura de endométrio. Para estas medições utilizou-se o software "Motic images plus 2.0<sup>®</sup>".

### **3.2.6 Avaliação da resposta imune humoral contra hemácias de carneiro**

A resposta imune humoral foi mensurada determinando-se anticorpos anti-hemácia de carneiro pelo teste de hemaglutinação em placas (HA) seguindo o protocolo com duas inoculações intramusculares de  $10^8$  hemácias de carneiro

diluídas em solução salina e com adjuvante completo de Freund (Modificado de BONNETTE et al., 1990). A primeira inoculação foi feita no 10º dia após o início do experimento e a segunda inoculação sete dias após a primeira inoculação (17º dia do experimento) sendo coletados sangue dos animais 5 dias após a 1ª inoculação e 4 dias após a 2ª inoculação. O soro foi mantido congelado a -20°C em tubos de polietileno para realização do teste de HA em placas. Os títulos de hemaglutinação foram determinados após inativação dos soros por método de diluições seriadas de acordo com SCHURIG et al. (1978).

### **3.2.7 Análises estatísticas**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e seis repetições cada. Adotou-se cada animal como unidade experimental.

Para as análises estatísticas dos parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos as variáveis foram submetidas à detecção e exclusão dos “outliers” (valores extremos) como descrito por FAUSTINI et al. (2000). Os resultados da análise sorológica para resposta humoral contra hemácias de carneiro foram convertidos em  $\text{Log}_{10}$  antes da análise estatística.

As médias das variáveis estudadas entre os grupos foram submetidas à avaliação estatística pela análise de variância (ANOVA). Quando detectado efeito dos tratamentos seguiu-se com o teste de comparação post hoc de Tukey/Kramer para verificar diferenças entre as médias à um nível de 95% de segurança.

### 3. RESULTADOS

#### 3.3.1 Análises micotoxicológicas

Nas análises micotoxicológicas realizadas nos milhos das duas procedências, foi encontrada no milho de melhor qualidade, utilizado para ração do T1, apenas ZEA na concentração de 0,21 mg/kg. No milho utilizado para produção das rações dos tratamentos T2, T3, T4, T5 e T6 foram encontradas as concentrações de 3,3 µg/kg de aflatoxina B1 e de 0,349 mg/kg de ZEA. No farelo de soja utilizado para produção de todas as rações encontrou-se concentração de ZEA inferior a 0,08 mg/kg e nenhuma das outras micotoxinas pesquisadas.

No preparo das rações foram feitas as correções para obtenção final da concentração de ZEA determinada, sendo que a concentração obtida esteve próxima aos 0,5 mg/kg, como apresentado na tabela 3. Foram detectadas concentrações baixas de aflatoxina B1 em todos os tratamentos e de aflatoxina B2 somente no T3. No T1 (controle negativo), ainda com o cuidado na seleção do milho e da soja foi encontrada a concentração de 0,132 mg/kg de ZEA.

Tabela 3 - Resultado da análise micotoxicológica das rações.

Tratamento	ZEA (mg/kg)	AFB1 (µg/kg)	AFB2 (µg/kg)	AFG1 (µg/kg)	AFG2 (µg/kg)
T1	0,132	<1	ND	ND	ND
T2	0,449	<1	ND	ND	ND
T3	0,601	2,1	<1	ND	ND
T4	0,601	<1	ND	ND	ND
T5	0,598	<1	ND	ND	ND
T6	0,586	<1	ND	ND	ND

ND- não detectada, NR- não realizado, ZEA: zearalenona, OCRA: ocratoxina, AFL: aflatoxina B1, B2, G1, G2

\* Limite para detecção/quantificação de zearalenona (ZEA) 60,0 / 80,0 µg/kg, de ocratoxina 4 µg/kg e de aflatoxinas 0,5 / 1,0 µg/kg.

(T1: controle negativo, T2: 0,5 mg/kg ZEA, T3: 0,5 mg/kg ZEA + 0,1% AAM, T4: 0,5 mg/kg ZEA + 0,15%AAM, T5: 0,5 mg/kg ZEA + 0,25%AAM, T6: 0,5 mg/kg ZEA + 0,4%AAM)

### 3.3.2 Vulvometria e peso do trato reprodutivo

Na avaliação da área de vulva não foi encontrada diferença significativa entre os grupos após 21 dias de exposição à ZEA ( $P= 0,626$ ) nem durante as avaliações semanais (Tabela 4). No entanto, na avaliação de peso relativo total do trato reprodutivo e peso relativo de útero-ovário-vagina (Tabela 5) houve diferenças significativas entre os tratamentos T1 (controle negativo) e T2 (controle positivo). Nos grupos com AAM não foram constatadas diferenças significativas entre si e entre T1 e T2.

Tabela 4 – Média ( $\pm$  desvio padrão) da área de vulva ( $\text{mm}^2$ ) e dos pesos relativos e totais do trato reprodutivo e do útero-ovário-vagina no 21º dia.

Tratamento	Área de vulva ( $\text{mm}^2$ )	Peso relativo total (g)	Peso relativo útero-ovário-vagina (g)
T1	235,00 $\pm$ 61,10	71,71 $\pm$ 9,57 <sup>a</sup>	51,76 $\pm$ 4,26 <sup>a</sup>
T2	334,48 $\pm$ 152,83	115,48 $\pm$ 32,26 <sup>b</sup>	86,51 $\pm$ 25,30 <sup>b</sup>
T3	290,50 $\pm$ 82,39	91,82 $\pm$ 22,85 <sup>ab</sup>	68,23 $\pm$ 16,98 <sup>ab</sup>
T4	274,14 $\pm$ 26,20	91,39 $\pm$ 12,60 <sup>ab</sup>	64,14 $\pm$ 8,710 <sup>ab</sup>
T5	307,76 $\pm$ 125,93	96,81 $\pm$ 22,32 <sup>ab</sup>	76,71 $\pm$ 24,72 <sup>ab</sup>
T6	320,50 $\pm$ 91,53	96,20 $\pm$ 21,66 <sup>ab</sup>	71,18 $\pm$ 16,35 <sup>ab</sup>
P	0,49	0,02	0,02

(T1: controle negativo, T2: 0,5 mg/kg zearalenona (ZEA), T3: 0,5 mg/kg ZEA + 0,1% AAM, T4: 0,5 mg/kg ZEA + 0,15%AAM, T5: 0,5 mg/kg ZEA + 0,25%AAM, T6: 0,5 mg/kg ZEA + 0,4%AAM)

### 3.3.3 Altura do endométrio e das células epiteliais das glândulas endometriais

Nas medições da altura do endométrio, os grupos T1 (controle negativo) e T3 (formulação experimental do Elitox<sup>®</sup> em inclusão de 0,1%) tiveram valores médios inferiores ( $P<0,05$ ) aos apresentados pelo grupo T2 (somente ZEA) (figura 1). Os tratamentos com as outras inclusões de AAM, apesar de apresentarem altura de endométrio intermediária ao T1 e T2 não foram

estatisticamente diferentes. Já nas medições das células epiteliais das glândulas endometriais não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P=0,199$ ).

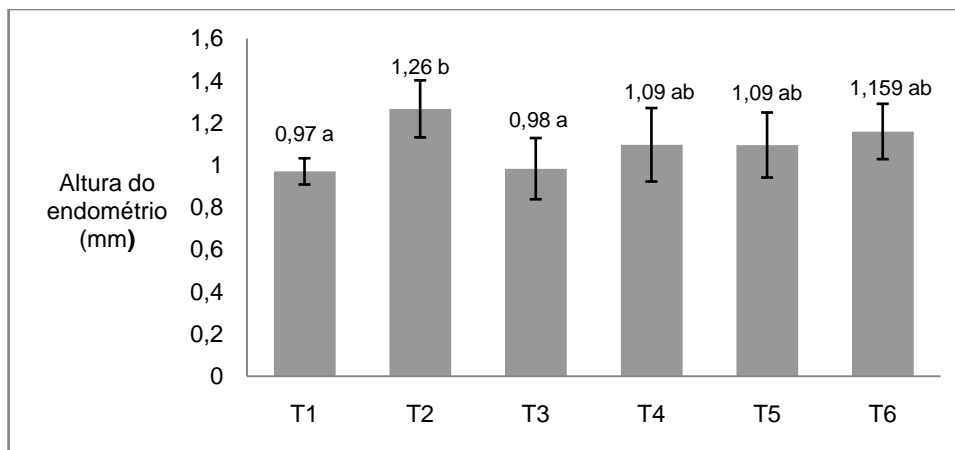


Figura 1- Média ( $\pm$  desvio padrão) da altura de endométrio.

\*Letras diferentes diferem estatisticamente ( $P=0,018$ ).

(T1: controle negativo, T2: 0,5 mg/kg zearalenona (ZEA), T3: 0,5 mg/kg ZEA + 0,1% AAM, T4: 0,5 mg/kg ZEA + 0,15%AAM, T5: 0,5 mg/kg ZEA + 0,25%AAM, T6: 0,5 mg/kg ZEA + 0,4%AAM)

### 3.3.4 Análises morfológicas dos órgãos e histopatológica

Na avaliação macroscópica e histológica não houve nenhuma alteração no fígado e no linfonodo mesentérico. No ovário de um animal de cada um dos tratamentos T2, T3 e T4 foram observados cistos.

Na análise histopatológica do útero foram observadas alterações discretas, nos grupos T2, T3, T4, T5 e T6; como proliferação e irregularidade das células da camada epitelial da mucosa uterina, sendo mais notáveis e mais distribuídas pela extensão da mucosa dos animais do grupo T2.

### 3.3.5 Ganho de peso

Não houve diferença entre as médias dos grupos ( $P=0,0502$ ) no ganho de peso nas avaliações semanais e no ganho de peso total.

### 3.3.6 Análises hematológicas e bioquímicas

Nas análises hematológicas não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nem entre os diferentes períodos de coletas (Tabela 7). Em ambas as coletas todos estes parâmetros encontravam-se dentro dos limites estabelecidos por FELDMAN et al. (2000) e FAUSTINI et al. (2000).

Os valores encontrados na bioquímica sanguínea também não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e entre as coletas (tabela 8), exceto para proteínas totais (PT) em que houve diferença significativa entre as coletas ( $P < 0,0001$ ). Em todos os tratamentos os valores encontrados para AST, GGT e albumina foram superiores e para PT inferiores aos valores de referência consultados (JAIN et al., 1993; KANEKO et al., 1997; FAUSTINI et al., 2000).

Tabela 5- Média ( $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros hematológicos de leitões com idade média de 53 dias.

PARÂMETRO (unidade)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	P	REF.*
Hemácia ( $\times 10^6 / \mu\text{L}$ )	7,04 $\pm$ 0,07	6,82 $\pm$ 0,37	6,52 $\pm$ 0,26	6,58 $\pm$ 0,68	6,82 $\pm$ 0,32	6,85 $\pm$ 0,58	0,55	6,4-8**
Hematócrito (1)	0,45 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,01	0,38	37-44
Hemoglobina (g/dl)	13,15 $\pm$ 0,45	12,85 $\pm$ 0,64	12,24 $\pm$ 0,75	12,53 $\pm$ 1,59	12,9 $\pm$ 0,5	12,4 $\pm$ 0,59	0,64	11,3- 13,3
VGM ( $\mu\text{m}^3$ )	59,93 $\pm$ 10,0 8	58,92 $\pm$ 6,48	61,60 $\pm$ 3,07	61,11 $\pm$ 3,55	60,56 $\pm$ 3,89	60,03 $\pm$ 3,97	0,98	53-61**
CHGM (%)	30,08 $\pm$ 2,36	31,63 $\pm$ 3,40	30,46 $\pm$ 0,94	31,08 $\pm$ 0,57	31,04 $\pm$ 1,25	30,24 $\pm$ 0,58	0,71	28-32
Leucócitos ( $\times 10^3 / \text{mm}^3$ )	16880 $\pm$ 3646,50	16075 $\pm$ 4379,78	17120 $\pm$ 3393,67	15560 $\pm$ 2415,16	16633,33 $\pm$ 4701,34	17133,33 $\pm$ 4669,33	0,98	12,7- 20,9
Neutrófilos (/ $\text{mm}^3$ )	6466,5 $\pm$ 3211,97	4880,16 $\pm$ 1020,45	6001,4 $\pm$ 1838,94	6710,5 $\pm$ 2525,30	7306,2 $\pm$ 4159,36	4746,66 $\pm$ 1840,83	0,50	3213- 14196* *
Bastonetes (/ $\text{mm}^3$ )	273,33 $\pm$ 104,21	122	266	141	189	212,5 $\pm$ 20,50	0,63	0-1045
Eosinófilos (/ $\text{mm}^3$ )	275 $\pm$ 135,54	326,75 $\pm$ 232,67	318,75 $\pm$ 321,15	377,5 $\pm$ 288,53	197,66 $\pm$ 36,77	435	0,92	94,5- 2873**
Linfócitos (/ $\text{mm}^3$ )	7867,5 $\pm$ 4848,38	9532 $\pm$ 2988,18	8197,5 $\pm$ 2382,35	8026,66 $\pm$ 1950,61	10022,8 $\pm$ 1407,01	11895,67 $\pm$ 4218,72	0,26	5080- 14212
Monócitos (/ $\text{mm}^3$ )	427,2 $\pm$ 243,85	299,5 $\pm$ 96,06	251 $\pm$ 77,59	347 $\pm$ 3 32,75	348,33 $\pm$ 166,49	257,8 $\pm$ 149,17	0,79	189- 2704**
PPT	6,01 $\pm$ 0,56	5,6 $\pm$ 0,4	5,66 $\pm$ 0,54	5,5 $\pm$ 0,51	5,93 $\pm$ 0,79	5,66 $\pm$ 0,57	0,61	4,9-8***

VGM: volume globular médio, CHGM: concentração de hemoglobina globular média PPT: proteína plasmática total. Obs. Os valores absolutos médios de basófilos foram iguais a 0.

\* Referência para leitões de ambos os sexos de 36 dias de idade por FELDMAN et al. (2000)

\*\* Referência para leitões de ambos os sexos de 3-4 meses de idade por FELDMAN et al. (2000)

\*\*\* Referência para leitões pré-púberes FAUSTINI et al. (2000).

Tabela 6- Média ( $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros bioquímicos séricos de leitões no 1° e no 21° dia de experimento.

1° DIA								
PARAMETRO (unidade)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	P	REF.
AST (UI/L)	156,5 $\pm$ 40,48	215,83 $\pm$ 84,49	135,4 $\pm$ 25,02	169,8 $\pm$ 55,97	156,16 $\pm$ 72,81	205,83 $\pm$ 103,05	0,36	28,5-87,4*
GGT (UI/L)	54,16 $\pm$ 40,24	30,16 $\pm$ 39,66	99,4 $\pm$ 35,96	47 $\pm$ 34,09	77,83 $\pm$ 42,95	62,33 $\pm$ 32,30	0,07	10-60**
PT (g/ dL)	7,11 $\pm$ 1,45	7,8 $\pm$ 0,87	8,4 $\pm$ 0,21	7,95 $\pm$ 1,7	8,86 $\pm$ 0,378	7,72 $\pm$ 1,20	0,27	4,9-8*
ALBUMINA (g/dL)	4,5 $\pm$ 0,54	4,78 $\pm$ 0,64	5,2 $\pm$ 0,23	5,11 $\pm$ 0,79	5,58 $\pm$ 0,38	4,98 $\pm$ 0,63	0,12	1,9-3,3**
URÉIA (mg/ dL)	25,16 $\pm$ 1,16	30,66 $\pm$ 10,85	27 $\pm$ 3,74	23,8 $\pm$ 1,30	31,33 $\pm$ 9,02	27 $\pm$ 5,44	0,35	9,7-37*
21° DIA								
PARAMETRO (unidade)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	P	REF.
AST (UI/L)	142,5 $\pm$ 41,93	119 $\pm$ 29,02	109,16 $\pm$ 9,17	104,16 $\pm$ 17,72	117 $\pm$ 10,95	132 $\pm$ 20,18	0,12	28,5-87,4*
GGT (UI/L)	60,25 $\pm$ 12,97	64 $\pm$ 6,40	73,16 $\pm$ 20,32	77,5 $\pm$ 19,27	84,2 $\pm$ 11,07	59,2 $\pm$ 13,98	0,09	10-60**
PT (g/ dL)	5,55 $\pm$ 0,39	5,81 $\pm$ 0,48	5,68 $\pm$ 0,14	5,86 $\pm$ 0,22	5,61 $\pm$ 0,11	5,85 $\pm$ 0,20	0,32	7-8,9***
ALBUMINA (g/dL)	4,26 $\pm$ 0,12	4,2 $\pm$ 0,23	4,25 $\pm$ 0,10	4,25 $\pm$ 0,15	4,23 $\pm$ 0,13	4,3 $\pm$ 0,12	0,91	1,9-3,3**
URÉIA (mg/ dL)	27 $\pm$ 6,32	33,2 $\pm$ 3,27	30,83 $\pm$ 4,79	29,66 $\pm$ 3,55	31 $\pm$ 8,15	30,6 $\pm$ 2,60	0,61	9,7-37*

AST: Aspartato aminotransferase, GGT: Gamaglutamil transferase, PT: Proteína total.

\*Referência para leitões pré-púberes de 33 -94 dias de idade, FAUSTINI et al. (2000).

\*\* Referência para KANEKO et al. (1997), não especificou idade dos animais.

\*\*\* Referência para JAIN et al. (1993), não especificou idade dos animais.

(T1: controle negativo, T2: 0,5 mg/kg zearalenona (ZEA), T3: 0,5 mg/kg ZEA + 0,1% AAM, T4: 0,5 mg/kg ZEA + 0,15%AAM, T5: 0,5 mg/kg ZEA + 0,25%AAM, T6: 0,5 mg/kg ZEA + 0,4%AAM)

### 3.3.7 Avaliação da resposta imune humoral contra hemácias de carneiro

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto à resposta imune humoral contra hemácias de carneiro.

## 3.4. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados na análise micotoxicológica do milho refletem a freqüente contaminação dos grãos pela ZEA. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por SALAY e MERCADANTE (2002) que encontraram contaminação superior a 50% em amostras e subprodutos de milho dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás.

Na comparação dos milhos das duas procedências, com e sem critério de seleção, foi verificada ainda, diferença bromatológica principalmente no que se refere à gordura, proteína e concentrações de ZEA e aflatoxinas. O milho do

grupo T1 (controle negativo), separado por mesa densimétrica, apresentou melhor qualidade bromatológica e menor contaminação por micotoxinas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por SILVA et al. (2008) em que os grãos de milhos com baixa densidade separados pela mesa densimétrica, apresentaram maiores contaminações por micotoxinas.

Os resultados da qualidade bromatológica e da presença de micotoxinas são muito semelhantes com o que ocorre em situações reais em que os animais são alimentados com milhos adquiridos sem nenhuma seleção ou, com seleção inadequada. Além de produzir as micotoxinas, a atividade metabólica do fungo associada com a respiração aeróbica utiliza gordura e carboidrato dos grãos. Como resultado a gordura é marcadamente reduzida (SANTIN et al., 2005), assim como a energia metabolizável que pode reduzir de 5% a 25% (COELHO, 1994; SANTIN et al., 2005).

Na avaliação da vulvometria, apesar de se observar diferença numérica entre as médias de T1 e T2 de aproximadamente 42%, esta não foi significativa, provavelmente devido à grande variação apresentada para esta variável. A alta variação pode ser justificada por diferenças inerentes ao animal, bem como, pela resposta individual a exposição à ZEA. No estudo de ANDRETTA et al. (2008) utilizando 2mg/kg observaram aumento da vulva (volume vulvar) na primeira semana de exposição de leitoas pré-púberes à ZEA. Além da importância da dose, a condição de ambiência, nutrição e tratamento dos animais exercem grande influência sobre o aparecimento de sinais de intoxicação. Em condições de campo, animais submetidos a estresse provocado por superlotação em baias, alta pressão infecciosa, presença de outras micotoxinas e variações climáticas bruscas podem manifestar sinais de intoxicação mesmo ao ingerir

concentrações baixas de micotoxinas (WYATT, 2005). Na condição experimental, os animais foram alojados em baias individuais limpas e desinfetadas, com controle de temperatura e acesso irrestrito a água e alimentos. O controle destes fatores pode ter contribuído para redução do estresse dos animais diminuindo a manifestação clínica da ZEA, especialmente no T2 (somente ZEA) na concentração de micotoxina utilizada.

Foi observado aumento significativo no peso do trato reprodutivo do T2 comparado ao T1 (controle negativo). Resultados semelhantes foram encontrados por DOLL et al. (2003) com aumento de peso de útero em leitoas tratadas com baixas concentrações de ZEA de 0.42 mg/kg. Outros autores que relatam aumento de peso de trato reprodutivo em leitoas se referem a concentrações bastante superiores, como no estudo realizado por ETIENNE e JEMMALI (1982) que utilizaram de 3,6 e 4,3 mg/kg de ZEA.

Os efeitos da ZEA no grupo T2 também foram comprovados para variável altura de endométrio, em contrapartida não alterou a altura das células epiteliais das glândulas endometriais. HENEWEER et al. (2007) observaram aumento das células epiteliais somente em ratos tratados com altas concentrações de ZEA (10 mg/kg). Os suínos, por serem mais susceptíveis a esta micotoxina se comportam de modo diferente dos ratos que produzem predominantemente o metabólito menos tóxico, o  $\beta$ -zearalenol (MIROCHA et al., 1978; MALEKINEJAD et al., 2006). Por estas características, é possível que suínos apresentem limiares mais baixos para manifestarem aumento de células epiteliais comparados aos ratos. Além disso, a exposição prolongada do presente estudo pode ter influenciado neste achado. Em outro estudo com concentração de 0,75

mg/kg foi observado aumento estatisticamente significativo das células epiteliais (TEIXEIRA et al., DADOS NÃO PUBLICADOS).

Estes resultados no aumento de peso no trato reprodutivo e na altura do endométrio, observado no grupo T2 (controle positivo) em relação ao grupo T1 (controle negativo), evidenciam o potencial estrogênico da ZEA. Esta micotoxina atua como o estrógeno, estimulando a síntese protéica uterina induzindo a proliferação celular e aumentando a massa dos órgãos reprodutivos (GAUMY et al., 2001), e conseqüentemente da altura do endométrio.

O grupo T3 composto por uma formulação contendo bentonita orgânica ativada obteve resultado significativo na redução da altura de endométrio. Estudos *in vitro* demonstraram a ação de bentonitas como adsorventes para ZEA (BUENO et al., 2005; RAMOS et al., 1996a). No entanto, RAMOS et al. (1996b), em experimentação *in vivo* não observaram eficácia no uso de bentonitas. As discrepâncias entre os resultados obtidos nos estudos de avaliação da ação de AAM pode ser justificado pela grande diversidade de aluminossilicatos existentes, sendo que dentro de uma mesma classificação de aluminossilicatos ocorrem pequenas variações em suas estruturas químicas de acordo com suas origens (DIAZ e SMITH, 2005). É possível que na formulação experimental do Elitox<sup>®</sup>, modificações na estrutura de bentonita ou até mesmo na origem da mesma possibilitaram este resultado. Além disso, as diferenças entre estes resultados nas diversas pesquisas também podem estar ligadas às modificações nas formulações destes produtos que não são fornecidas.

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com o AAM e os controles (T1 e T2), alguns estudos já verificaram a ação dos componentes do Elitox<sup>®</sup>. A avaliação *in vivo* dos

filossilicatos, uma subclasse de aluminossilicatos, foi realizada em estudo por ABBÈS et al. (2006) e apresentou redução dos efeitos tóxicos da ZEA em dose de 40 mg/kg de peso corporal sobre os parâmetros hematológicos, bioquímico sanguíneos, imunológicos e histológicos em camundongos. Entretanto, deve ser cautelosa a extrapolação de resultados inter-espécies pelas diferenças na biotransformação hepática. DAKOVIC et al. (2005) afirma que modificações químicas de argilas de filossilicatos e zeólitos conseguem expandir sua superfície hidrofóbica fornecendo afinidade para moléculas apolares, como é o caso da ZEA. Além de adsorventes, o produto testado possui também em sua composição duas enzimas com capacidade detoxificante, as hidrolases e epoxidases. Estudos *in vitro* constataram efeitos de uma lactonahidrolase para detoxificação da ZEA (TAKAHASHI-ANDO et al., 2002), e *in vivo* da epoxidase, com resultados considerados como detoxificação parcial ou total, reduzindo os efeitos tóxicos em leitoas (CHENG et al., 2006).

As adições do AAM reduziram numericamente os efeitos tóxicos da ZEA nas variáveis peso de trato reprodutivo, peso de útero-ovário-vagina e na redução da altura do endométrio. Este resultado pode estar ligado à capacidade limitada dos adsorventes e enzimas se ligarem às micotoxinas, principalmente *in vivo*. É importante ainda salientar a diferença na qualidade nutricional observada no milho utilizado no T1 em relação aos demais tratamentos. Apesar de parecer pequena, esta diferença, de alguma forma pode interferir na resposta dos animais às micotoxinas e nos demonstra que a diferença entre os tratamentos não referia-se somente ao nível de micotoxina, pois a qualidade nutricional dos grãos exerce importante influência na resposta dos animais às micotoxinas.

Alterações no desempenho dos animais, quanto a ganho de peso e conversão alimentar, provocadas exclusivamente pela ZEA não têm sido descritas na literatura. Outros estudos também não observaram redução no ganho de peso, no consumo de alimento e no aumento da conversão alimentar de leitoas expostas à ZEA em concentrações superiores a 1mg/kg (ANDRETTA et al., 2008; SPERANDA MARCELA et al., 2006). Em estudo realizado por DOLL et al. (2005) em teste de eficácia de um aluminossilicato, foi observada redução no consumo de alimento e o no ganho de peso nos animais. Entretanto, neste estudo havia a associação de ZEA e deoxinivalenol (DON) na ração e os autores acreditam que, como já demonstrado *in vitro*, aluminossilicatos não são capazes de adsorver a DON, sendo estes efeitos resultado da atividade desta micotoxina.

As alterações nos parâmetros hematológicos foram relatadas em ratos alimentados com altas concentrações de ZEA (40 e 500 mg/kg) por ABBÉS et al. (2006), que observaram aumento de leucócitos, hematócrito, hemácias, hemoglobina, volume corpuscular médio e redução de plaquetas. Na concentração de 0,5 mg/kg utilizada no presente estudo os resultados hematológicos permaneceram dentro dos valores de referência e não foram alterados pela ZEA, bem como pela adição dos AAM.

A ação hepatotóxica da ZEA foi comprovada por alguns estudos (STADNIK e BORZECKI, 2009) em ratos. STADNIK e BORZECKI, (2009) verificaram aumentos das enzimas AST e ALT em concentrações de 0,5 mg/kg. SPERANDA MARCELA et al.(2006) observaram aumento da AST ( $83.25 \pm 7.34$  UI/L) em leitoas alimentadas com 3 mg/kg de ZEA. No presente estudo foram encontrados no 1° e 21° dia do experimento valores altos para GGT e AST em todos os tratamentos, quando comparado com a literatura, o que exclui a

possibilidade de o aumento ter sido causado exclusivamente pela ZEA. DUBREUIL e LAPIERRE (1997) afirmam que a atividade da AST está relacionada com a idade, sendo valores menores observados em porcos adultos. Os valores de referência hematológicos e bioquímicos sanguíneos sofrem influência da idade, raça, ambiente (IMLAH e McTAGGART, 1977) e método de coleta de amostra (DUBREUIL et al., 1990). Os parâmetros de referência já estabelecidos para suínos, em sua maioria, encontram-se ultrapassados para os atuais métodos de diagnóstico, além da escassez de valores de referência por categoria animal, sexo, idade, raça, manejo, ambiente (FAUSTINI, et al., 2000). Diferenças principalmente na linhagem genética, ambiente e idade dos animais entre os trabalhos pesquisados para os valores de referência podem justificar esta discrepância, já que associado a não existência de diferenças entre os tratamentos, não foram observadas alterações na histopatologia de fígado.

Os baixos valores para PT (proteína total) em todos os animais também foram encontrados por EGELI et al. (1998) com valores de 3,3 a 6,3 g/dL para leitões com 35 dias de idade. Existe um aumento linear das proteínas séricas de porcos durante o período de crescimento de 8-20 semanas (DUBREUIL e LAPIERRE, 1997), sendo que os leitões do experimento possuíam média de 32 dias no 1º dia do experimento e de 7,5 semanas no 21º dia, podendo explicar valores baixos de PT encontrados.

A albumina, também em todos os animais, esteve aumentada segundo os valores de referência KANEKO et al. (1997), sem especificar a idade. ROTTER et al. (1994) em estudo com leitões de 5-6 semanas de idade alimentados com dieta contendo baixas concentrações de ZEA e DON, observaram aumento de albumina. O autor correlacionou com a possível baixa de ingestão de água, no

entanto, não foi observado sinais de desidratação dos animais. No presente estudo, foram observados também baixos valores de globulinas em todos os tratamentos (T1=1,29; T2=1,61; T3=1,43; T4=1,61; T5=1,38; T6=1,55) de acordo com KANECO, et al. (1997). ROTTER et al. (1994) acreditam que possam ocorrer efeitos da DON na redução da produção de  $\alpha$ -globulinas no fígado, já que em seu estudo encontraram também este achado. Esta é uma hipótese possível já que no presente estudo não houve pesquisa micotoxicológica para DON. Ainda assim, são necessários mais estudos para comprovação desta hipótese.

Apesar da metodologia de avaliação de títulos de anticorpos anti-hemácias de carneiro ser extensivamente usada na literatura (PEPLOWSKI et al. 1980; BONNETTE et al., 1990; ROTTER et al., 1994) para estudar a resposta imunológica dos animais, sabe-se que a resposta imune de animais frente a diferentes desafios é extremamente complexa. Além disso, micotoxinas podem afetar de diferentes formas a resposta imune dos animais, desde afetando a produção de enzimas e citocinas até aumentar a produção de radicais livres que afetam indiretamente estes parâmetros (SURAI E DVORSKA et al., 2005). Estudos também relatam efeitos inibitórios da ZEA na proliferação de linfócitos, demonstrando sua capacidade imunotóxica em altas concentrações. ABBÉS et al. (2006) com 40 mg/kg de ZEA observaram redução significativa no número de linfócitos e também das células T CD3+, CD4+, CD8+ e CD56+ em camundongos. Em estudo *in vitro*, LUONGO et al. (2008) com baixas concentrações (2,5  $\mu$ M) de  $\alpha$ -zearalenol observaram efeito inibitório na proliferação celular de linfócitos de suínos. Desta forma, acredita-se que esta metodologia não foi capaz de determinar o real efeito da ZEA na resposta imune.

### 3.5 CONCLUSÃO

A concentração de 0,5 mg/kg de ZEA não reproduziu os sinais clínicos de aumento de vulva e não alterou os parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos, a resposta imune humoral contra hemácias de carneiro e o ganho de peso das leitoas. Entretanto, a capacidade estrogênica da ZEA foi observada nas variáveis peso do trato reprodutivo e altura do endométrio.

Os tratamentos com AAM não diferiram estatisticamente dos grupos controles, com e sem ZEA, nas variáveis peso de trato reprodutivo e altura de endométrio, com exceção para o grupo com a formulação experimental do AAM, adicionada de bentonita, que foi capaz de reduzir significativamente a altura do endométrio.

### 3.6 REFERÊNCIAS

ABBÈS,S.; SALAH-ABBÈS, J.B.; OUANES,Z.; HOUAS,Z.; OTHMAN,O.; BACHA,H.; ABDEL-WAHHAB,M.A.; OUESLATI, R. Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v.6, p.1251–1258, 2006.

ANDRETTA, I.; LOVATTO, P.A.; HAUSCHILD, L.; DILKIN, P.; GARCIA, G.G.; LANFERDINI, E.; CAVAZINI, N.C.; C.A. MALLMANN. Alimentação de leitoas pré-púberes com dietas contendo ZEA. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.5, p.1227-1233, 2008.

BONNETTE, E. D.; KORNEGAY, E. T.; LINDEMANN, M. D.; HAMMERBERG, C. Humoral and cell-mediated immune response and performance of weaned pigs fed four supplemental vitamin E levels and housed at two nursery temperatures. **J Anim Sci.**, v.68, p.1337-1345,1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 9, de 24 de março de 2000. Aprova os métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30mar. 2000. Seção 1, p. 35-41.

BUENO, D.J.; DI MARCO,L.; OLIVER, G.; BARDO, A. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p.613–615, 2005.

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

COELHO M. B. Microbial deterioration of foodstuffs. In: **Moulds, mycotoxins and food preservatives in the food industry**. Parsippany, New Jersey, BASF Corporation, p.9-13,1994.

DAKOVIC, A.; TOMASEVIC-CANOVIC, M.; DONDUR, V.; ROTTINGHAUS, G. E.; MEDAKOVIC, V.; ZARIC,S. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 46, 20–25, 2005.

DIAZ, D.E.; SMITH,T.K. Mycotoxin sequestering agents: Practical tools for the neutralization of mycotoxins. . In. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2005, p.323-335.

DOLL, S.; DANICKE, S.; UEBERSCHA R, K.-H.; VALENTA, H.; CHNURRBUSCH, U.; GANTER, M.; KLOBASA, F.; FLACHOWSKY, G., Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. **Archives of Animal Nutrition** 57, 311–334, 2003.

DOLL, S.; GERICKE, S.; DANICKE, S.; RAILA, J.; UEBERSCHAR, K.-H.; VALENTA, H.; SCHNURRBUSCH, U.; SCHWEIGERT, F. J.; FLACHOWSKY, G. The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in Fusarium toxin contaminated maize containing diets for piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 89, 342–358, 2005.

DUBREUIL, P.; COUTURE, Y.; TREMBLAY, A.; MARTINEAU, G.-P. Effects of experimenters and different blood sampling procedures on blood metabolite values in growing pigs. *Can. J. Vet. Res.* 54, 379±382, 1990.

DUBREUIL, P.; LAPIERRE, H. Biochemistry reference values for Quebec lactating dairy cows, nursing sows, growing pigs and calves. **Can. J. Vet. Res.**, v.61, p.235-239, 1997.

EGELI, A. K.; FRAMSTAD, T.; MORBERG, H.. Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. **Acta Vet. Scand.** 39, 381±393,1998.

ETIENNE, M.; JEMMALI, M.. Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts. **J. Anim. Sci.**, 55:1-10, 1982.

FAUSTINI, M.; MUNARI, E.; COLOMBANI, C.; RUSSO, V.; MAFFEO, G.; VIGO, D. Haematology and Plasma Biochemistry of Stamboek Pre-pubertal Gilts in Italy: Reference Values. **J. Vet. Med.**, A 47, 525 – 532, 2000.

FELDMANN,B.F.; ZINKL,J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary hematology** (THORN,E.C.). In: THORN, C. E. Normal hematology of the pig. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000, cap.168, p.1089-1095.

FINK-GREMMELS, J., MALEKINEJAD, H. Review: Clinical effects and

biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, 137, 326–341, 2007.

GAUMY, J.L.; BAILLY, J.D. BURGAT, V.; GUERRE, P. Zéaralénone: propriétés et toxicité expérimentale. **Revue Méd. Vét.**, v.152, n.3, p.219-234, 2001.

HENEWEER, M.; HOUTMAN, H.; POORTMAN, J.; GROOT, M.; MALIEPAARD, C.; PEIJNENBURG, A. Estrogenic effects in the immature rat uterus after dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using a systems biology approach. **Toxicological sciences**, 99(1), 303–314, 2007.

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

IMLAH, P.; H. S. MCTAGGART. Haematology of the pig. In: Archer, L. K, and L. B. Jeffcott (eds), **Comparative Clinical Haematology**. pp. 271±303. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1977.

JAIN, N. C. Evaluation of anemias and polycythemias. In: Jain, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Malvern: Lea & Febiger, 1993, cap.8, p.159-168.

KANEKO, J. J. Blood Analyte reference values in large animals. In: Kaneko, J. J., J. W., **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Harvey and M. L. Bruss Academic Press, 1997, Appendix VIII, p.890-894

KUMMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, 27, 891–905, 2008.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology**. New York: McGraw-Hill, 1968, p.253.

LUONGO, D.; DE LUNA, R.; RUSSO, R.; SEVERINO, L. Effects of four Fusarium toxins (fumonisin B1, a-zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. **Toxicon** 52, 156–162, 2008.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, 172, 96–102, 2006.

MALLMANN, C.A.; DILKEN, P. Micotoxinas e micotoxicoses em suínos. Santa Maria: Do Autor, 2007, p.240.

MIROCHA, C. J., S. V. PATHRE, J. BEHRENS, AND B. SCHAUERHAMER. Uterotropic activity of cis and trans isomers of zearalenone and zearalenol. **Appl. Environ. Microbiol.** v.35, p.986-987, 1978.

NRC. Nutrient requirements of swine. Washington: National Academy of Science, 1998.

PEPLOWSKI, M. A.; MAHAN, D. C.; MURRAY, F. A.; MOXON, A. L.; CANTOR, A. H.; EKSTROM, K. E. Effect of dietary and injectable vitamin e and selenium in weanling swine antigenically challenged with sheep red blood cells. **J Anim Sci.**, 51:344-351, 1980.

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

RAMOS, A.J.; FINK GREMMELS, J.; HERNANDEZ, E. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. **J. Food Prot.** 59: 631–641, 1996b.

ROTTER, B.A.; THOMPSON,B.K.; LESSARD, M.; TRENHOLM, H.L.; TRYPHONAS, H. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. **Fundamental and applied toxicology**, n. 23, p.117-124, 1994.

SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, 13, 87–92; 2002.

SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. In. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2005, p.225-234.

SCHURIG, G.G.; DUNCAN, J. R.; WINTER, A.J. Elimination of genital vibriosis in female cattle by systemic immunization with killed cells or cell- free extracts of *Campylobacter fetus*. **The J. Infect. Dis.** v.138, n. 4, p.463-472, 1978.

SILVA, C.S.; COUTO, H.P.; FERREIRA, R.A.; FONSECA, J.B.;GOMES, A.V.C.; SOARES, R.T.R.N. Valores nutricionais de milhos de diferentes qualidades para frangos de corte. **R. Bras. Zootec.**, v.37, n.5, p.883-889, 2008.

SOARES L.M.V; RODRIGUEZ-AMAYA D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc Off Anal Chem**, v. 72, p. 22-26, 1989.

SPERANDA MARCELA; LIKER, B.; SPERANDA, T.; SERIC, V.; ANTUNOVIC, Z.; GRABAREVIC, Z.; SENSIC, D.; GRGURIC, D.; STEINER, Z. Haematological and biochemical parameters of weaned piglets fed on fodder mixture contaminated by zearalenone with addition of clinoptilolite. **Acta Veterinaria (Beograd)**, Vol. 56, No. 2-3, 121-136, 2006.

STADNIK, A.; BORZĘCKI, A. Influence of the zearalenone on the activity of chosen liver enzymes in a rat. **Ann Agric Environ Med**, 16, 31–35, 2009.

SURAI, P.F.; DVORSKA, J.E. In. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2005, p.225-234.

TAKAHASHI-ANDO, N.; KIMURA, M.; KAKEYA, H.; OSADA, H.; YAMAGUCHI, I. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. **Biochem. J.**, 365, 1±6, 2002.

WYATT, R.D. Mycotoxin interactions. In. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2005, p.269-278.

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No levantamento bibliográfico realizado foram observados diversos estudos sobre os efeitos tóxicos da ZEA, e em sua maioria, apresentavam concentrações superiores a 1mg/kg da micotoxina. Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram a capacidade da ZEA em produzir o hiperestrogenismo nas concentrações de 0,5mg/kg e de 0,75mg/kg. O conhecimento dos limites de intoxicação são importantes para os futuros estabelecimentos de limites toleráveis desta micotoxina na alimentação animal no Brasil.

Os AAM podem ser uma ferramenta eficaz no combate às micotoxicoses, no entanto, como demonstrado em diversos artigos seus efeitos *in vivo* e *in vitro* são variáveis e a comprovação destes *in vivo* é imprescindível. A avaliação de AAM *in vivo* é um desafio, já que a manifestação da micotoxicose é dependente de diversos fatores como o status imunológico do animal, a presença de outras micotoxinas, a qualidade nutricional da ração, entre outros, sendo que alguns são de difícil controle. Além disso, como a ação dos aditivos anti-micotoxinas (AAM) é diferente para as diversas micotoxinas, e em situações reais, talvez possam apresentar melhores resultados por evitarem a ação de algumas micotoxinas e a ocorrência de interações entre elas. Sendo assim, testes de eficácia para AAM realizados com grãos naturalmente contaminados associadas às análises micotoxicológicas e bromatológicas completas podem fornecer resultados mais esclarecedores sobre a eficácia destes produtos.

São necessários mais estudos para verificação dos limites máximos toleráveis para intoxicação com ZEA e também para avaliar seus efeitos, além dos já conhecidos no trato reprodutivo, pois é possível que seus efeitos tóxicos estejam sendo subestimados. Os conhecimentos dos sinais clínicos e das alterações produzidas em intoxicações têm importância para adoção de melhores parâmetros, especialmente para avaliação das ações dos AAM.