

# Aflatoxina M<sub>1</sub> e Aflatoxina B<sub>1</sub>-lisina como Biomarcadores de Avaliação da Eficiência de Adsorventes para Aflatoxinas: Artigo de Revisão

## Aflatoxin M<sub>1</sub> and Aflatoxin B<sub>1</sub>-lysine as Biomarkers for Evaluation of Adsorbents Efficiency for Aflatoxins: Review Article

Roice Eliana Rosim<sup>a\*</sup>; Carlos Augusto Fernandes de Oliveira<sup>a</sup>; Carlos Humberto Corassin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos. SP, Brasil.

\*E-mail: roice@usp.br

### Resumo

A contaminação de alimentos por aflatoxinas, principalmente, a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) representa um problema mundial para a saúde humana e animal. Uma forma de avaliar a exposição a estes contaminantes é analisando a dieta para verificar a ocorrência destes compostos. Esta metodologia, no entanto, tem limitações devido à variabilidade das aflatoxinas encontradas nos alimentos e às diferenças individuais na toxicocinética dos compostos. Por outro lado, o biomonitoramento de aflatoxinas em fluidos biológicos se utilizando de biomarcadores gera informações mais confiáveis sobre a exposição a estas toxinas nos indivíduos. O uso de adsorventes químicos na ração animal possibilita a detoxificação de aflatoxinas sem produzir efeitos tóxicos nem alterar as propriedades nutricionais. Este trabalho teve por objetivo revisar os dados publicados sobre a eficiência *in vitro* e *in vivo* de adsorventes para aflatoxinas, bem como estudos referentes ao uso da aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) e da AFB<sub>1</sub>-lisina como biomarcadores para avaliar a redução da biodisponibilidade da AFB<sub>1</sub> por adsorventes em rações. Trabalhos relevantes publicados nos últimos dez anos (2009-presente) foram selecionados nas bases de dados PubMed, Science Direct e Google Scholar. A determinação de AFM<sub>1</sub> no leite e/ou na urina, bem como de AFB<sub>1</sub>-lisina no soro, indica a biodisponibilidade individual da AFB<sub>1</sub> em ensaios para avaliar a eficiência de adsorventes em animais. Deste modo, a utilização destes biomarcadores permite reduzir os custos dos ensaios *in vivo*, além de proporcionar maior padronização dos experimentos e possibilitar a avaliação da eficiência dos adsorventes em condições de campo.

**Palavras chave:** AFB<sub>1</sub> - Adsorventes Minerais. Biomarcadores de Exposição - AFB<sub>1</sub>-lisina - AFM<sub>1</sub>

### Abstract

*Food contamination by aflatoxins, mainly aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), is a worldwide concern for human and animal health. A possible way to assess the exposure to these contaminants is through the diet analyses to verify the occurrence of mycotoxins. However, this methodology has important limitations due to the variability of mycotoxins found in the food and the individual differences in the toxicokinetics of the compounds. On the other hand, biomonitoring of aflatoxins in biological fluids using biomarkers generates more reliable information on the exposure to these toxins in individuals. The use of chemical adsorbents in animal feed makes it possible to detoxify mycotoxins without producing toxic effects or altering the nutritional properties. The aim of this study was to revise the available published data on the *in vitro* and *in vivo* efficacy of adsorbents for aflatoxins, as well as studies on the use of aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) and AFB<sub>1</sub>-lysine as biomarkers to evaluate the reduction in the bioavailability of AFB<sub>1</sub> by adsorbents in feed. Relevant articles published in the last 10 years (2009-present) were selected in PubMed, Science Direct and Google Scholar. Determination of AFM<sub>1</sub> in milk and/or urine, and AFB<sub>1</sub>-lysine in serum, indicate the individual bioavailability of AFB<sub>1</sub> in trials conducted for evaluation of adsorbent's efficiency in animals. Thus, the use of these biomarkers may reduce the costs of *in vivo* trials, increase the standardization of experiments, and evaluate the adsorbents' efficiency under field conditions.*

**Keywords:** Aflatoxin B<sub>1</sub> - Clays - Exposure Biomarkers - Aflatoxin B<sub>1</sub>-lysine Aflatoxin M<sub>1</sub>

### 1 Introdução

Grande parte das perdas de alimentos no mundo se deve à presença de fungos e à contaminação por micotoxinas. Segundo estimativas da FAO (2004), 25% das culturas de grãos são afetadas por micotoxinas a cada ano, sendo que a contaminação pode ocorrer nas etapas de pré ou pós-colheita, especialmente, em regiões de clima tropical. No Brasil, a utilização de práticas agrícolas inadequadas de plantio, de colheita, de secagem, de transporte e de armazenagem de cereais e de grãos favorece a contaminação e o desenvolvimento de fungos de modo geral, particularmente os toxigênicos. Esta contaminação acarreta grandes perdas na produtividade animal, gerando impacto econômico, além de riscos à saúde humana (SABINO, 2008).

Entre os tipos de micotoxinas, as aflatoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, caracterizam-se por serem potentes agentes mutagênicos e carcinogênicos. A aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é o principal tipo produzido pelo fungo em condições naturais, e também a mais tóxica, sendo hepatotóxica, teratogênica, genotóxica e classificada como carcinógeno humano (grupo 1) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993; JACKSON e GROOPMAN, 1999; WANG *et al.*, 2001; IARC, 2002). A estrutura química das aflatoxinas apresenta um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanoide. Em relação à solubilidade, as aflatoxinas são compostos insolúveis em solventes apolares e solúveis em solventes orgânicos polares (IARC, 2002).

Boas práticas agrícolas são as melhores formas de evitar o crescimento fúngico e a possível produção de micotoxinas (FAO, 2004). Ainda assim, os grãos armazenados em condições inadequadas podem apresentar contaminação. Uma das maneiras para detoxificação de micotoxinas presentes na alimentação sem alterar o valor nutricional nem produzir efeitos tóxicos é o uso de substâncias capazes de adsorvê-las e, conseqüentemente, reduzir a biodisponibilidade das toxinas no trato gastrointestinal (OLIVEIRA *et al.*, 2014). A adição de adsorventes minerais na ração é um procedimento efetivo, pois estas substâncias se ligam às aflatoxinas formando um complexo, que é excretado pelas fezes (PHILLIPS, 1999; KOLOSOVA; STROKA, 2011; DI GREGORIO *et al.*, 2014). A contaminação do leite por aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), principal composto originado pela biotransformação da AFB<sub>1</sub> no fígado, também diminui com o uso de adsorventes (DI NATALE *et al.*, 2009; CARRARO *et al.*, 2014). O uso de biomarcadores tem sido utilizado como indicativo da eficiência de adsorventes usados para diminuir a exposição humana às aflatoxinas (WANG *et al.*, 2008).

A composição e as propriedades físico-químicas dos adsorventes podem variar amplamente, o que torna necessária a avaliação de sua eficácia em ensaios *in vitro* e *in vivo* (DI GREGORIO *et al.*, 2014). No entanto, os protocolos experimentais dos ensaios *in vivo*, geralmente, apresentam custo elevado, pois envolvem a administração de níveis da toxina com e sem o adsorvente para avaliar diversos tipos e efeitos sobre a produtividade dos animais, além de dados histopatológicos e clínicos, entre outros (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2010). Neste contexto, o emprego de biomarcadores para estimar a biodisponibilidade de AFB<sub>1</sub> em ensaios de eficiência de adsorventes *in vivo* poderia reduzir os custos destes ensaios, além de proporcionar maior praticidade e padronização na condução dos experimentos, além de possibilitar a avaliação dos adsorventes em condições de campo.

Este trabalho teve por objetivo revisar os dados publicados sobre a eficiência *in vitro* e *in vivo* de adsorventes para aflatoxinas, bem como os estudos referentes ao uso da AFM<sub>1</sub> e da AFB<sub>1</sub>-lisina como biomarcadores para avaliar a redução da biodisponibilidade da AFB<sub>1</sub> por adsorventes em rações. Uma descrição da biotransformação e dos efeitos tóxicos das aflatoxinas é também apresentada, juntamente com as características gerais dos adsorventes minerais.

## 2 Desenvolvimento

### 2.1 Metodologia

Os artigos usados nesta revisão foram selecionados das bases de dados: PubMed, Science Direct e Google Scholar no período de março a junho de 2017. Os termos pesquisados foram: “mineral adsorbents” OU “biomarkers” E “AFB<sub>1</sub>” OU “AFB<sub>1</sub>-lysine” OU “AFM<sub>1</sub>”. Os artigos potencialmente elegíveis foram baixados e avaliados quanto aos seguintes

critérios de inclusão: (1) artigos completos; (2) publicados a partir de 2009 (últimos 10 anos); (3) contendo descrição completa da metodologia analítica utilizada.

### 2.2 Biotransformação e efeitos tóxicos das Aflatoxinas

A toxicidade das aflatoxinas está relacionada com a sua biotransformação pelo organismo, o que as torna mais hidrofílicas, a fim de que sejam excretadas, embora este processo possa resultar também em compostos com maior toxicidade. Assim, a AFB<sub>1</sub> é considerada um pró-carcinógeno que requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (RAWAL, 2010).

Após a ingestão oral, a AFB<sub>1</sub> é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal e biotransformada primariamente no fígado por enzimas associadas ao citocromo P450 (JAGER *et al.*, 2011). Em todas as espécies animais, o processo de biotransformação ocorre em duas fases: a fase I consiste, principalmente, por reações de hidrólise, redução e oxidação, enquanto que a fase II envolve as reações de conjugação dos produtos da fase I. Os metabólitos resultantes incluem produtos hidroxilados, tais como: AFM<sub>1</sub> e aflatoxina Q<sub>1</sub>, demetilados (aflatoxina P<sub>1</sub>), hidratados (aflatoxina B<sub>2a</sub>) e um produto de redução por enzimas citoplasmáticas (aflatoxicol). Todos estes compostos podem ser excretados na urina (JAGER *et al.*, 2014), além da bile e fezes (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Em aves domésticas, os principais produtos de biotransformação da AFB<sub>1</sub> são AFM<sub>1</sub> e aflatoxicol, os quais podem estar presentes na forma de resíduos nos ovos (OLIVEIRA *et al.*, 2000). As enzimas do citocromo P450 também convertem a AFB<sub>1</sub> em AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido, sua forma pró-carcinógena, que se liga covalentemente aos ácidos nucléicos, principalmente DNA com o qual forma o aduto AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina, e também à albumina do soro, formando o aduto AFB<sub>1</sub>-lisina (ESSIGMANN *et al.*, 1977 e SABBIONI *et al.*, 1990). Tanto o aduto de DNA quanto o de albumina têm sido bastante estudados como biomarcadores em animais e humanos.

A susceptibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas depende da concentração da toxina nos alimentos e duração da exposição, além de variar com a idade, a raça, o sexo, o estado nutricional e a composição da dieta. As aves, especialmente perus, são extremamente sensíveis aos efeitos tóxicos e carcinogênicos da AFB<sub>1</sub>, devido à eficiente bioativação mediada pelo citocromo P-450, que a converte em exo-AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido, composto altamente reativo e eletrofílico responsável pelas mutações no DNA e capaz de se ligar com proteínas e outros compostos nucleofílicos. A detoxificação é mediada pela enzima glutatona S transferase (RAWAL *et al.*, 2010). No caso de humanos, características adicionais podem determinar diferentes susceptibilidades individuais às aflatoxinas, como a capacidade hepática de ativação/detoxificação de carcinógenos, a habilidade em reparar uma alteração no DNA, o estado nutricional e a imunidade, e status

socioeconômico (WHO, 1993).

### 2.3 Características gerais dos adsorventes para Aflatoxinas

A adição de adsorventes, que podem ser minerais, orgânicos ou polímeros sintéticos, possibilita a formação de um complexo que é excretado nas fezes. Depois de extraídas da fase líquida, as aflatoxinas interagem com a superfície do adsorvente ficando retidas. Neste processo de adsorção, vários tipos de interações intermoleculares podem estar envolvidos.

Na adsorção física, as interações que ocorrem são eletrostáticas, de atração e de repulsão, força de Van der Waals e polarização, sendo, portanto, um fenômeno reversível, enquanto que na adsorção química existe uma troca eficaz de elétrons entre o adsorvente e a substância adsorvida, formando um complexo sobre a superfície sólida de forma irreversível (TAPIA-SALAZAR *et al.*, 2010). A adsorção, sendo um fenômeno essencialmente superficial, é influenciada por várias características físicas da substância. No caso de micotoxinas, influenciam no processo a sua polaridade, forma, tamanho, área de superfície e solubilidade, desacoplamento e distribuição de cargas no caso de compostos ionizados (HUWIG *et al.*, 2001).

O critério mais importante para avaliação de adsorventes é a estabilidade da ligação adsorvente-toxina, em uma ampla faixa de pH, uma vez que é esperado que o produto funcione durante a passagem pelo trato gastrointestinal (BINDER, 2007). Assim, a European Food Safety Authority (2010) declarou que apenas testes de adsorção *in vitro* não bastam para provar a eficácia dos adsorventes para micotoxinas, sendo necessários testes *in vivo*. De acordo com a Instrução Normativa 13/2004, que aprova o Regulamento Técnico Sobre Aditivos para Produtos Destinados à Alimentação Animal, adsorventes são classificados em aditivos tecnológicos (adsorvente: substância capaz de fixar moléculas) e aditivos zootécnicos (melhoradores de desempenho: substâncias definidas quimicamente, que melhoram os parâmetros de produtividade) (BRASIL, 2004).

Os adsorventes minerais, extraídos do solo, são compostos de poucos elementos químicos. Oxigênio e silício são os mais abundantes, sendo que os silicatos constituem de 70 a 90% de toda massa mineral. Alumínio e ferro também ocorrem em grande quantidade e participam de grande variedade de complexos com oxigênio, formando estruturas cristalinas. A estrutura básica dos silicatos é composta por um átomo Si<sup>4+</sup> ao centro e quatro átomos O<sup>2-</sup> nos ápices formando um tetraedro. Esta estrutura, através do compartilhamento de O<sup>2-</sup>, pode se ligar a outras formando uma variedade de estrutura complexas como anéis (ciclosilicatos), cadeias (inosilicatos), camadas (filosilicatos), e arranjos tridimensionais (tectosilicatos) (PHILLIPS; LEMKE; GRANT, 2002). Estes arranjos determinam as características das argilas quanto à carga, à polaridade, à capacidade de expansão, à formação, à estrutura, à capacidade de troca catiônica, ao tamanho de partícula, à área de superfície, à reologia, entre outros (LUNA;

SCHUCHARDT, 1999; TAPIA-SALAZAR *et al.*, 2010). Aluminosilicatos são frequentemente utilizados na adsorção de aflatoxinas. O sistema beta-dicarbonil das aflatoxinas permite ligações com cátions metálicos presentes nas argilas. No caso de outras micotoxinas não polares, sua ação é menos efetiva, devido à superfície hidrofílica (HAUSCHILD *et al.*, 2007). A incorporação de ácidos orgânicos de cadeia longa resulta em um aumento da hidrofobicidade da superfície da argila, aumentando a afinidade por moléculas não polares e reduzindo a adsorção de moléculas hidrofílicas (DAKOVIC *et al.*, 2005).

O aluminosilicato hidratado de sódio e cálcio (HSCAS) é o composto mais estudado como agente sequestrante de aflatoxinas. Pode ser obtido naturalmente ou através de tratamento térmico de argilas de cálcio. Sua estrutura tem moléculas de água ligadas a um complexo metálico, com afinidade para adsorver compostos carregados positivamente (RAMOS e HERNANDEZ, 1997; HUWIG *et al.*, 2001; TAPIA-SALAZAR, *et al.*, 2010). O mecanismo de adsorção de aflatoxinas por HSCAS se baseia no compartilhamento de elétrons da superfície negativa da argila com o sistema beta carbonil parcialmente positivo das aflatoxinas, formando um complexo, mas também podem estar envolvidos mecanismos de quelação ou interação da aflatoxina com íons Ca ou pontes metálicas da superfície do HSCAS (PHILLIPS, 1999; PHILLIPS *et al.*, 2008).

As bentonitas (montmorilonitas), devido à capacidade de trocas iônicas também são amplamente usadas como agentes sequestrantes de micotoxinas. São classificadas em bentonitas de cálcio, magnésio, potássio ou sódio e formam géis, quando intumescidas (DIAZ; SMITH, 2005). Bentonitas de sódio tem maior capacidade de retenção de água (capacidade de dilatação) em relação às bentonitas de cálcio (DIAZ *et al.*, 2004). Zeolitas são um grupo de silicatos, cujos tetraedros de SiO<sup>4</sup> e AlO<sup>4</sup> são interligados. A estrutura dos aluminosilicatos carregada negativamente atrai cátions positivos para dentro de sua estrutura, através de amplos poros que fornecem espaço também para moléculas de água, de amônia, de nitratos e de carbonatos (DIAZ; SMITH, 2005).

Carvão ativado é uma forma de carbono obtido após aquecimento na ausência de ar e tratado com oxigênio, o que permite a formação de milhões de poros entre os átomos de carbono. Tem sido usado como antídoto no tratamento para infecções desde o século XIX (HUWIG *et al.*, 2001). As propriedades sequestrantes do carvão ativado dependem de fatores como tamanho do poro, da área de superfície, da estrutura da micotoxina e dose (GALVANO *et al.*, 2001).

A primeira etapa para verificar se um adsorvente é eficiente para se ligar à aflatoxina consiste em realizar um estudo *in vitro*, no qual soluções aquosas de AFB<sub>1</sub> em diferentes concentrações e pH são adicionadas do adsorvente nas proporções indicadas para seu uso, seguido de um tempo de incubação e posterior centrifugação para análise da concentração da toxina no sobrenadante (NEEFF *et al.*, 2013).

Trata-se de processo laboratorial relativamente simples, considerado como de triagem para indicar adsorventes potencialmente eficientes para adsorver a micotoxina no trato intestinal dos animais. O Quadro 1 apresenta os resultados de estudos *in vitro* que avaliaram a adsorção de AFB<sub>1</sub> e AFM<sub>1</sub> por HSCAS, bentonitas/montmorilonitas, zeolitas e carvão ativado nos últimos 10 anos. Pode-se observar que os

melhores resultados (adsorção acima de 90%) foram obtidos para HSCAS (LI *et al.*, 2010; NEEFF *et al.*, 2013) e carvão ativado (DI NATALE *et al.*, 2009; GALLO; MASOERO, 2010). Percentuais de adsorção acima de 90% também foram obtidos com bentonitas/montmorilonitas, porém com grande variabilidade dos resultados (GALLO; MASOERO, 2010; CARRARO *et al.*, 2014).

**Quadro 1** - Estudos que avaliaram a eficiência *in vitro* de adsorventes para aflatoxina B<sub>1</sub> e M<sub>1</sub> nos últimos 10 anos (2009-presente).

Adsorvente	Tipo de aflatoxina (Concentração, µg/mL)	Quantidade utilizada (mg)	Adsorção (%)	Referência
HSCAS	AFB <sub>1</sub> (2,0)	100	100	Neeff <i>et al.</i> (2013)
	AFB <sub>1</sub> (20,0)	75	98 a 100	Li <i>et al.</i> (2010)
Bentonitas/ Montmorilonitas	AFB <sub>1</sub> (0,821)	82	48 a 99	Gallo e Masoero (2010)
	AFM <sub>1</sub> (0,075)	25	70 a 100	Carraro <i>et al.</i> (2014)
	AFM <sub>1</sub> (0,5)	50	80	Di Natale <i>et al.</i> (2009)
Zeolitas	AFB <sub>1</sub> (0,821)	82	10 a 80	Gallo e Masoero (2010)
Carvão ativado	AFB <sub>1</sub> (0,821)	82	> 99	Gallo e Masoero (2010)
	AFM <sub>1</sub> (0,5)	50	> 99	Di Natale <i>et al.</i> (2009)

HSCAS: Aluminossilicato hidratado de sódio e cálcio; AFB<sub>1</sub>: aflatoxina B<sub>1</sub>; AFM<sub>1</sub>: aflatoxina M<sub>1</sub>.

Fonte: Dados da pesquisa.

Considerando a grande variabilidade das propriedades físico-químicas dos adsorventes existe sempre a necessidade de confirmar a eficiência dos mesmos através de estudos *in vivo*, uma vez que os resultados obtidos *in vitro* não conseguem simular

todas as variáveis que podem interferir no processo de adsorção no trato gastrointestinal dos animais. Os resultados de estudos *in vivo*, que avaliaram a eficiência de adsorventes para aflatoxinas, nos últimos 10 anos, se encontram apresentados no Quadro 2.

**Quadro 2** - Estudos que avaliaram a eficiência de adsorventes para aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) *in vivo* nos 10 anos (2009-presente).

Adsorvente	Concentração de AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Quantidade Utilizada (kg/100kg)	Efeitos Observados (espécie animal)	Referência
HSCAS	225,3	0,2	Aumento da ingestão de alimento, maior retenção de fósforo, melhor rendimento de músculo (aves)	Liu <i>et al.</i> (2011)
	1.000-2.000	0,1-0,2	Efeito protetor contra lesões no fígado e aumento no crescimento (aves)	Zhao <i>et al.</i> (2010)
	200	0,2	Aumento no crescimento e consumo de ração e diminuição do peso do fígado (aves)	Attia <i>et al.</i> (2013)
	450,6	0,2	Aumento de células sanguíneas, hemoglobina, diminuição de enzimas hepáticas (AST) e da atividade da mieloperoxidase (aves)	Che <i>et al.</i> (2011)
	2.500	0,5	Diminuição dos níveis de resíduos de aflatoxinas no fígado e rins, porém sem efeito protetor no fígado (aves)	Neeff <i>et al.</i> (2013)
	1.100	0,5	Diminuição dos efeitos tóxicos no fígado (suínos)	Di Gregorio <i>et al.</i> (2017)
Bentonitas/ Montmorilonitas	100	0,3	Diminuição nas lesões histológicas no fígado (aves)	Magnoli <i>et al.</i> (2013)
	5.000	0,5, 0,75 e 1,0	Melhorias no ganho de peso, consumo de ração, eficiência alimentar, peso de rim e fígado (aves)	Manafi (2012)
	25, 50 e 100	0,1	Melhoria dos pesos relativos do intestino delgado, baço e timo, altura das vilosidades e concentrações séricas de IgG e IgM (aves)	Wan <i>et al.</i> (2013)
	500	0,5	Prevenção de efeitos negativos sobre medidas do peso e de parâmetros bioquímicos séricos (suínos)	Harper <i>et al.</i> (2010)

HSCAS: Aluminossilicato hidratado de sódio e cálcio; AST: Aspartato aminotransferase; IgG: Imunoglobulina G; IgM: Imunoglobulina M.

Fonte: Dados da pesquisa.



O HSCAS em níveis de inclusão entre 0,2 e 0,5 kg/100 de ração apresentou resultados satisfatórios em todos os trabalhos disponíveis efetuados com aves e suínos, com exceção do estudo de Neeff *et al.* (2013), embora os autores tenham reportado que o adsorvente diminuiu a concentração de aflatoxinas residuais no fígado das aves intoxicadas. Bentonitas/montmorilonitas adicionadas em proporções de 0,1 a 1,0 kg/100 kg de ração também foram avaliadas em estudos com aves e suínos, demonstrando a capacidade de diminuir os efeitos deletérios da AFB<sub>1</sub> nos animais testados, principalmente, sobre o ganho de peso, consumo de ração, eficiência alimentar, enzimas hepáticas e peso relativo do fígado (MAGNOLI *et al.*, 2013; MANAFI *et al.*, 2012).

#### 2.4 Aplicação de AFM<sub>1</sub> e AFB<sub>1</sub>-lisina como Biomarcadores na Avaliação da Eficiência de Adsorventes para Aflatoxinas

Biomarcadores medem alterações celulares, biológicas ou moleculares em tecidos biológicos, células ou fluidos, fornecendo informação sobre a doença ou exposição à dada substância (JAGER *et al.*, 2011). Os tipos de biomarcadores mais utilizados em saúde humana e animal são os de exposição, de efeito e de susceptibilidade. Eles podem ser mensurados, dependendo do caso, no ar exalado e em materiais biológicos, como: sangue, urina, leite e tecidos. Os biomarcadores de exposição podem medir, além do composto original, seus metabólitos e adutos de DNA ou de proteínas, que refletem a dose interna ou biologicamente ativa do composto. Já os biomarcadores de susceptibilidade indicam a capacidade do indivíduo em responder à exposição. Em alguns casos, esta classificação pode ser sobreposta, por exemplo, um aduto de DNA pode indicar exposição a determinado composto e, também, surtir um efeito (SILINS; HÖGBERG, 2011).

O modelo de biomarcador ideal deve ser específico, ser detectado em baixos níveis, e obtido sendo usadas técnicas não invasivas nem caras, e que seja passível de quantificação (HENDERSON *et al.*, 1989). Neste contexto, a AFB<sub>1</sub> não metabolizada, seus adutos AFB<sub>1</sub>-lisina em soro sanguíneo e AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina em urina e seu metabólito AFM<sub>1</sub> na urina e leite podem ser considerados biomarcadores de exposição à AFB<sub>1</sub>. No Brasil, entretanto, existem poucos estudos sobre a presença de biomarcadores de exposição às aflatoxinas.

A AFB<sub>1</sub>, uma vez ingerida por mamíferos é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal aparecendo como o metabólito hidroxilado AFM<sub>1</sub> no sangue em até 15 minutos (MOSCHINI *et al.*, 2007) e no leite de fêmeas depois da ingestão de ração contaminada com AFB<sub>1</sub> (DIAZ *et al.*, 2004). A taxa de excreção de AFM<sub>1</sub> no leite de vacas leiteiras varia de 0,3 a 6,2 % da quantidade ingerida de AFB<sub>1</sub>, dependendo do estágio da lactação e volume da produção de leite (VAN EIJKEREN *et al.*, 2006). A presença de AFM<sub>1</sub> no leite leva à contaminação de outros produtos lácteos, pois a toxina não é eliminada pelo processamento convencional destes alimentos (DI NATALE *et al.*, 2009). A exposição humana representa,

portanto, um risco substancial devido ao consumo elevado de leite e produtos lácteos por adultos e, especialmente, crianças (PRANDINI *et al.*, 2009).

Relatos sobre a presença de AFM<sub>1</sub> no leite, ainda que em baixos níveis, têm sido reportados no Brasil, servindo de alerta sobre a exposição tanto humana quanto animal à AFB<sub>1</sub> (OLIVEIRA *et al.*, 1997; GONÇALEZ *et al.*, 2005; OLIVEIRA; ROSMANINHO; ROSIM, 2006; SHUNDO; SABINO, 2006; OLIVEIRA; FERRAZ, 2007). O uso de AFM<sub>1</sub> como biomarcador em urina de humanos em Taiwan, Serra Leoa e Gana foi relatado por Hatch *et al.* (1993); Jonsyn-Ellis (2000) e Jolly *et al.* (2006), respectivamente. Thieu e Pettersson (2009), avaliaram entre outros, AFM<sub>1</sub> na urina de suínos como biomarcador de exposição à AFB<sub>1</sub>.

O aduto AFB<sub>1</sub>-lisina tem sido utilizado como um importante biomarcador de exposição à AFB<sub>1</sub> em longo prazo na dieta, uma vez que este aduto se liga à albumina no soro sanguíneo após a biotransformação da AFB<sub>1</sub> (MCCOY *et al.*, 2005). Di Gregorio *et al.* (2017) avaliaram a presença de AFB<sub>1</sub>-lisina no sangue de suínos, no entanto a maior parte dos estudos foi feita com humanos (TURNER *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2009; SHUAIB *et al.*, 2010).

A exposição animal às micotoxinas, em geral, tem sido avaliada, principalmente, analisando-se os ingredientes da ração animal e medindo-se parâmetros bioquímicos e histológicos de animais expostos à contaminação através da dieta com e sem adsorventes. A limitação dessa abordagem, no entanto, é a alta variabilidade de resultados de contaminação nas rações, além da impossibilidade de se avaliar a exposição dos animais individualmente. Estudos *in vivo*, tais como os apresentados no Quadro 2, demandam alto investimento e tempo para se observar os efeitos das diferentes dietas nos animais (DI GREGORIO *et al.*, 2017).

Pode-se considerar que o primeiro biomarcador utilizado para avaliar a eficiência de adsorventes foi provavelmente a AFM<sub>1</sub> no leite de vacas leiteiras (DIAZ; SMITH, 2005). Um bom exemplo deste tipo de abordagem é o estudo de DIAZ *et al.* (2004), os quais observaram reduções de 31-65% na concentração de AFM<sub>1</sub> no leite de vacas alimentadas com ração contendo quatro tipos de adsorventes comerciais juntamente com 55 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. No entanto, Edrington *et al.* (1996) utilizaram três tipos de adsorventes (HSCAS, carvão ativado e HSCAS ácido) na ração de perus colostomizados e intoxicados com 0,75 mg/kg de AFB<sub>1</sub>, e observaram redução de 52-72% na taxa de excreção urinária de AFM<sub>1</sub> após 48 horas de ingestão de dieta contaminada.

O Quadro 3 apresenta os resultados de estudos que utilizaram biomarcadores para avaliação da eficiência de adsorventes para aflatoxinas na ração.

**Quadro 3** - Estudos que avaliaram o uso de adsorventes para aflatoxinas na ração utilizando biomarcadores nos últimos 10 anos (2009-presente).

Adsorvente (% de inclusão)	Biomarcador (material/espécie animal)	Concentração de AFB <sub>1</sub> na dieta (µg/kg)	Redução do biomarcador (%)	Referência
Calibrin A® (1,0)	AFM <sub>1</sub> (leite/vacas)	75	17	Queiroz <i>et al.</i> (2012)
Solis Mos® (0,25)	AFM <sub>1</sub> (leite/vacas)	20	16	Xiong <i>et al.</i> (2015)
HSCAS (0,5)	AFB <sub>1</sub> -lisina (soro/frangos)	500	0	Carão (2016)
HSCAS (0,5)	AFB <sub>1</sub> -lisina (soro/suínos)	1.100	53-72	Di Gregorio <i>et al.</i> (2017)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AFM <sub>1</sub> (leite/vacas)	480 <sup>1</sup>	45-89	Gonçalves <i>et al.</i> (2017)

<sup>1</sup> dose total por animal/dia.

solis mos®: novus international inc., st. charles, mo; calibrin a®: amlan international, chicago, il; hscas: aluminossilicato hidratado de sódio e cálcio; afb<sub>1</sub>: aflatoxina b<sub>1</sub>; afm<sub>1</sub>: aflatoxina m<sub>1</sub>.

Fonte: Dados da pesquisa.

A maior parte dos poucos estudos de determinação de biomarcadores associados ao uso de adsorventes na ração tem sido feito com vacas leiteiras, avaliando-se a AFM<sub>1</sub> como biomarcador de exposição à AFB<sub>1</sub> (DIAZ *et al.*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2012; XIONG *et al.*, 2015). Carão (2016) e Di Gregorio *et al.* (2017) avaliaram a eficiência de um adsorvente comercial à base de HSCAS, utilizando o aduto AFB<sub>1</sub>-lisina no soro de frangos de corte e suínos alimentados com rações contendo 500 e 1.100 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. Nos suínos, o HSCAS reduziu os níveis séricos de AFB<sub>1</sub>-lisina em 53-72% entre os dias 7 e 21 de exposição contínua à ração contaminada, sendo esta redução coerente com o efeito protetor do adsorvente contra os efeitos negativos da AFB<sub>1</sub> nos animais (DI GREGORIO *et al.*, 2017), conforme apresentado no Quadro 2. Em frangos, no entanto, este mesmo adsorvente comercial não apresentou resultados satisfatórios para diminuir os efeitos tóxicos da AFB<sub>1</sub> (CARÃO, 2016), o que foi demonstrado pela ausência de redução do biomarcador AFB<sub>1</sub>-lisina no soro das aves intoxicadas. Gonçalves *et al.* (2017) avaliaram o efeito de diferentes fontes de *Saccharomyces cerevisiae* incluídas na dieta (20 g/dia), na excreção de AFM<sub>1</sub> no leite de vacas, que receberam 480,0 µg de AFB<sub>1</sub> por dia. (Quadro 3).

### 3 Conclusão

A avaliação da eficiência de adsorventes para aflatoxinas requer a execução de estudos *in vivo*, uma vez que os resultados obtidos *in vitro* não conseguem simular todas as variáveis que podem interferir no processo de adsorção no trato gastrointestinal dos animais. O uso de biomarcadores para avaliar a exposição às aflatoxinas é uma ferramenta importante, que permite identificar, individualmente, animais que estão sob risco, mas que não exibem sintomas de intoxicação. A utilização de biomarcadores para estimar a biodisponibilidade de aflatoxinas em ensaios de eficiência de adsorventes em animais permite reduzir os custos dos ensaios *in vivo*, além de proporcionar maior praticidade e padronização dos experimentos e possibilitar a avaliação dos

adsorventes em condições de campo.

### Referências

- ATTIA Y.A. *et al.* Capability of different non-nutritive feed additives on improving productive and physiological traits of broiler chicks fed diets with or without aflatoxin during the first 3 weeks of life. *J. Anim. Physiol Anim Nutr.*, n.97, p.754-72, 2013.
- BINDER E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 133, p.149-166, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 de novembro de 2004. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-13-de-30-de-novembro-de-2004.pdf>> Acesso em 9 maio 2018.
- CARÃO, A.C.P. Determinação de biomarcadores de aflatoxina B<sub>1</sub> e aplicabilidade na avaliação de adsorventes em frangos de corte. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2016.
- CARRARO, A. *et al.* Clay minerals as adsorbents of aflatoxin M<sub>1</sub> from contaminated milk and effects on milk quality. *Applied Clay Sci.*, n.88-89, p.92-9, 2014.
- CHE Z.Q. *et al.* The protective effects of different mycotoxin adsorbents against blood and liver pathological changes induced by mold-contaminated feed in broilers. *Asian Australas J. Anim. Sci.*, n. 24, p. 250-257, 2011.
- DAKOVIC A. *et al.* Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids Surf B*, n.46, p.20-25, 2005.
- DIAZ D.E. *et al.* Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*, n.157, p.233-241, 2004.
- DIAZ, D.; SMITH, T.K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. In: DIAZ, D. *The mycotoxin blue book*. Nottingham: United Kingdom, 2005. p.323-339.
- DI GREGORIO, M.C. *et al.* Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Rev.*, n. 33, p. 125-35, 2014.
- DI GREGORIO, M.C. *et al.* Determination of serum aflatoxin B<sub>1</sub>-lysine to evaluate the efficacy of an aflatoxin-adsorbing feed additive in pigs fed na aflatoxin B<sub>1</sub>-contaminated diet. *Mycotoxin Res*, n. 33, p. 93-102, 2017.

- DI NATALE, F.; GALLO, M.; NIGRO, R. Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *J. Food. Eng.*, n. 95, p. 186-91, 2009.
- EDRINGTON, T.S. *et al.* Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS), acidic HSCAS, and activated charcoal reduce urinary excretion of aflatoxin M<sub>1</sub> in turkey poults. Lack of effect by activated charcoal on aflatoxicosis. *Toxicol. Letters*, n. 89, p. 115-22, 1996.
- ESSIGMANN, J.M. *et al.* Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B<sub>1</sub> in vitro. *Proc Natl Acad Sci.*, n.74, p.1870-74, 1977.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group “substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins”. *EFSAJ* n. 8, p. 1-8, 2010.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food Nutr Paper*, n. 81, p. 1728-3263, 2004.
- GALLO A.; MASOERO F. In vitro models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins. *Ital J. Anim. Sci.*, n. 9, p. 109-16, 2010.
- GALVANO, F. *et al.* Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J. Food Prot.*, n. 64, p. 120-31, 2001.
- GONÇALEZ, E. *et al.* Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.4, p.435-8, 2005.
- GONÇALVES, B.L. *et al.* Effects of different sources of *Saccharomyces cerevisiae* biomass on milk production, composition, and aflatoxin M<sub>1</sub> excretion in milk from dairy cows fed aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. Dairy Sci.*, n.11 p.5701-5708, 2017.
- HARPER A.F. *et al.* Assessment of a hydrated sodium calcium aluminosilicate agent and antioxidant blend for mitigation of aflatoxin-induced physiological alterations in pigs. *J. Swine Health Prod.*, n.18, p.282-9, 2010.
- HATCH, M.C. *et al.* Urinary aflatoxin levels, hepatitis-B virus infection an hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Int. J. Cancer*, n.54, p.931-944, 1993.
- HAUSCHILD L. *et al.* Digestibilidade e metabolismo de dietas de suínos contendo zearalenona com adição de organoaluminossilicato. *Pesq. Agropec. Bras.*, n.42, p.219-224, 2007.
- HENDERSON, R.F. *et al.* The use of biological markers in toxicology. *Crit Rev Toxicol*, n.20, p.65-82, 1989.
- HUWIG A. *et al.* Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett*, n.122, p.179-188, 2001.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC, 1993.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC Press, v. 82, p. 171–274, 2002.
- JACKSON P.E.; GROOPMAN J.D. Aflatoxin and liver cancer. *Baillière's Clin Gastroenterol*, n. 13, p. 545–55, 1999.
- JAGER A.V. *et al.* Biomarkers of Aflatoxin Exposure and Its Relationship with the Hepatocellular Carcinoma. In: GUEVARA-GONZALEZ. Aflatoxins - biochemistry and molecular biology. InTech, 2011. doi: 10.5772/22476. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/biomarkers-of-aflatoxin-exposure-and-its-relationship-with-the-hepatocellular-carcinoma> Acesso em: 12 abr. 2018.
- JAGER, A.V. *et al.* Determination of urinary biomarkers for assessment of short-term human exposure to aflatoxins in São Paulo, Brazil. *Toxins*, n.6, p.1996-2007, 2014.
- JOLLY, P. *et al.* Determinants of aflatoxin levels in Ghanaians: Sociodemographic factors, knowledge of aflatoxin and food handling and consumption practices. *Int. J. Hyg. Environm. Health*, n. 209, p.345-358, 2006.
- JONSYN-ELLIS, F. Seasonal variation in exposure frequency and concentration levels of aflatoxins and ochratoxins in urine samples of boys and girls. *Mycopathol.*, n.152, p.35-40, 2000.
- KOLOSOVA A.; STROKA J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin J.*, n. 4, p. 225-56, 2011.
- LI J.; SUO D.; SU X. Binding capacity for aflatoxin B<sub>1</sub> by different adsorbents. *Agric. Sci. China*, n. 9, p. 449-56, 2010.
- LIU, Y.L. *et al.* Effect of three mycotoxin adsorbents on growth performance, nutrient retention and meat quality in broilers fed on mould-contaminated feed. *Br Poult Sci*, n. 52, p. 255-63, 2011.
- LUNA F.J.; SCHUCHARDT U. Argilas pilarizadas: uma introdução. *Quim Nova*, n. 22, p. 104-9, 1999.
- MAGNOLI A.P. *et al.* Effect of monogastric and ruminant gastrointestinal conditions on in vitro aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption ability by a montmorillonite. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, n. 30, p. 743-49, 2013.
- MANAFI M. Counteracting effect of high grade sodium bentonite during aflatoxicosis in broilers. *J. Agric. Sci. Tech.*, n. 14, p. 539-47, 2012.
- MCCOY, L.F. *et al.* Analysis of aflatoxin B<sub>1</sub>-lysine adduct in serum using isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communic. Mass Spectrometry*, n.19, p.2203-2210, 2005.
- MOSCHINI M. *et al.* Mucosal absorption of aflatoxin B<sub>1</sub> in lactating dairy cows. *Ital. J. Anim. Sci.*, n. 6, p. 324-26, 2007.
- NEEFF D.V. *et al.* In vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B<sub>1</sub>. *Poult Sci.*, n.92, p.131-137, 2013.
- OLIVEIRA, C.A.F. *et al.* Immunochemical assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam*, v.14, n.1, p.7-10, 1997.
- OLIVEIRA, C.A.F. *et al.* Aflatoxin B<sub>1</sub> residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Addit. Contam.*, v.17, p.459-462, 2000.
- OLIVEIRA, C.A.F. *et al.* Animal health: mycotoxins. In: ENCYCLOPEDIA OF AGRICULTURE AND FOOD SYSTEMS. Oxford: Elsevier Limited, 2014. p.358-377.
- OLIVEIRA, C.A.F.; FERRAZ, J.C.O. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in pasteurized, UHT milk and milk powder from goat origin. *Food Control.*, n.18, p.375-378, 2007.
- OLIVEIRA, C.A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M<sub>1</sub> and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam.*, v.23, n.2, p.196-201, 2006.
- PHILLIPS, T.D. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin induced disease. *Toxicol. Sci.*, n. 52, p.118-126, 1999.
- PHILLIPS, T.D. *et al.* Reducing human exposure to aflatoxin

- through the use of clay: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.*, n.25, p.134-145, 2008.
- PHILLIPS, T.D.; LEMKE, S.L.; GRANT, P.G. Characterization of Clay-based enterosorbent for the prevention of aflatoxicosis. In: DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. *Mycotoxins and food safety*. Washington: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p.157-179.
- PRANDINI A. *et al.* On the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.*, n. 47, p. 984-91, 2009.
- QUEIROZ O.C.M. *et al.* Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M<sub>1</sub> concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B<sub>1</sub>-contaminated diet. *J. Dairy Sci.*, n.95, p.5901-5908, 2012.
- RAMOS, A.J.; HERNANDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 65, p.197-206, 1997.
- RAWAL, S.; KIM, J.E.; COULOMBE JR., R. Aflatoxin B<sub>1</sub> in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Res Veterinary Sci*, n.89, p. 325-31, 2010.
- RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.*, n.59, p.57-67, 1997.
- SABBIONI G. Chemical and physical properties of the major albumin adduct of aflatoxin B<sub>1</sub> and their implications for the quantification in biological samples. *Chem Biol. Int.*, n.75, p.1-15, 1990.
- SABINO, M. Micotoxinas em alimentos. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 2008. p.609-620.
- SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. *Braz J. Microbiol.*, n.37, p.164-167, 2006.
- SHUAIB, F.M.B. *et al.* Association between birth outcomes and aflatoxin B<sub>1</sub> biomarker blood levels in pregnant women in Kumasi, Ghana. *Trop Med. Int. Health*, n.15, p.160-167, 2010.
- SILINS, I; HÖGBERG, J. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int. J. Environ Res. Public Health*, n.8, p.629-647, 2011.
- TANG L. *et al.* Aflatoxin-albumin adducts and correlation with decreased serum levels of vitamins A and E in an adult Ghanaian population. *Food Addit Contam.*, n. 26, p.108-118, 2009.
- TAPIA-SALAZAR M. *et al.* Mycotoxins in aquaculture: occurrence in feeds components and impact on animal performance. In: CRUZ-SUAREZ, L.E. *et al. Avances en Nutrición Acuicola*. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2010. p.514-546.
- THIEU, N.Q.; PETERSSON, H. Zearalenone, deoxynivalenol and aflatoxin B<sub>1</sub> and their metabolites in pig urine as biomarkers for mycotoxin exposure. *Mycotox Res.*, v.25, p.59-66, 2009.
- TURNER P.C. *et al.* Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambia infants. *Int J. Epidemiol.*, n.36, p. 1119-125, 2007.
- VAN EIJKEREN J.C. H.; BAKKER M.I.; ZEILMAKER M.J.A. A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. *Food Addit Contam.*, n. 23, p. 833-838, 2006.
- WAN X.L. *et al.* Toxicity of increasing aflatoxin-B<sub>1</sub> concentrations from contaminated corn with or without clay adsorbent supplementation in ducklings. *Poult Sci.*, n.92, p.1244-1253, 2013.
- WANG J.S. *et al.* Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village, Fusui County, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent*, n.10, p.143-146, 2001.
- WANG P. *et al.* NovaSil clay intervention in Ghanaians at high risk for aflatoxicosis: II. Reduction in biomarkers of aflatoxin exposure in blood and urine. *Food Addit Contam Part A*, n.25, p. 622-634, 2008.
- WHO - World Health Organization. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva: WHO, 1993.
- XIONG, J.L. *et al.* Transfer of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> to milk aflatoxin M<sub>1</sub> and effect of inclusion of adsorbent in the diet of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, n. 98, p. 2545-554, 2015.
- ZHAO J. *et al.* Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult Sci*, n. 89, p. 2147-156, 2010.