



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS**

**JANAÍNA NONES**

**MICOTOXINAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA: AVALIAÇÃO DA  
QUALIDADE DE DIETAS DE SUÍNOS PRODUZIDAS EM UMA  
PEQUENA PROPRIEDADE RURAL**

Florianópolis  
2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS**

Janaína Nones

**MICOTOXINAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA: AVALIAÇÃO DA  
QUALIDADE DE DIETAS DE SUÍNOS PRODUZIDAS EM UMA  
PEQUENA PROPRIEDADE RURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vildes Maria Scussel

Florianópolis  
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Nones, Janaína

MICOTOXINAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA: AVALIAÇÃO DA  
QUALIDADE DE DIETAS DE SUÍNOS PRODUZIDAS EM UMA PEQUENA  
PROPRIEDADE RURAL [dissertação] / Janaína Nones ;  
orientador, Vildes Maria Scussel - Florianópolis, SC, 2012.  
150 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Avaliação de ingredientes e  
rações para suínos . 3. Composição química . 4. Micotoxinas .  
I. Scussel, Vildes Maria . II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos. III. Título.

**Janaína Nones**

**MICOTOXINAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA: AVALIAÇÃO DA  
QUALIDADE DE DIETAS DE SUÍNOS PRODUZIDAS EM UMA  
PEQUENA PROPRIEDADE RURAL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 20 de Julho de 2011.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseane Fett  
(Coordenadora do Curso)

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vildes Maria Scussel  
(Orientadora - PGCAL/UFSC)

---

Prof. Dr. César Damian  
(PGCAL/UFSC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Helena Siegel Moeke  
(UNISUL)

---

Dr<sup>a</sup>. Léa Luzia Freitas Costa  
(LACEN)



## AGRADECIMENTOS

À Professora Vildes Maria Scussel, por ser um exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa;

Aos meus pais, Venâncio e Marlene, pelo carinho, paciência, incentivo e por se empenharem para concretização das minhas realizações;

Aos meus irmãos, Jader e Juliane, por todo apoio, dedicação e pelo incentivo que sempre me ofereceram.

Ao meu esposo Alex, pelo amor, força e companheirismo;

À minha segunda família, Iracema, Ari e Max, por estarem presentes nos momentos importantes da minha vida;

Ao Daniel, pela paciência e pelos ensinamentos referentes as metodologias analíticas utilizadas neste trabalho;

À Karina Koerich, pela cooperação nas extrações analíticas;

À Marcelina e Rafael, pelo grandioso apoio na realização das análises bromatológicas;

À Geovana, pelos ensinamentos e auxílio para realização dos experimentos relacionados ao isolamento e identificação de espécies fúngicas;

Aos demais colegas do LABMICO (Barbara, Denise, Karina Tonon; Kim, Laura, Maria Cristina, Maristela, Menithen), pela amizade e por todos os momentos agradáveis que passamos juntos.

À Sônia, pelo seu bom humor, capaz de diariamente nos contagiar;

À Associação Brasileira de Micotoxinas e Armazenagem de Grãos (ABMAG), pelo auxílio financeiro;

À CAPES, por ter oportunizado, através da concessão de uma bolsa de estudos, a realização deste trabalho;

À todos os professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos;

À todos aqueles que tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!



"A mais bela recompensa para quem persistiu a vida toda, tentando entender um pouco da verdade, é que os outros realmente compreendam seu trabalho e fiquem satisfeitos com ele" (**Albert Einstein**)



## RESUMO

**NONES, JANAÍNA. Micotoxinas e Composição Química: Avaliação da Qualidade de Dietas de Suínos Produzidas em uma Pequena Propriedade Rural.** 2012. 150p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - SC

A produção brasileira de carne suína é de 3,24 milhões de toneladas e o Estado de Santa Catarina participa com 26% do valor total desta produção. Medidas para diminuição dos custos desta atividade agropecuária, com o intuito de aumentar a rentabilidade decorrente do processo de criação de suínos, são de extrema relevância para manutenção, expansão e crescimento deste setor. O objetivo deste trabalho foi de averiguar a qualidade e segurança da alimentação fornecida aos suínos de diferentes fases de vida, com o intuito de otimizar a produção, diminuir o desencadeamento de doenças e, conseqüentemente, propiciar maiores ganhos econômicos, através do aumento da qualidade da carne. Para tal, foram coletadas 72 amostras de *ingredientes* (milho, farelo de soja e de arroz), *rações* (gestação e inicial) e *resíduo da pré-limpeza do milho*, no período de agosto de 2010 a fevereiro de 2011. A averiguação da qualidade dessas amostras foi realizada através (a) de *análises de composição* de carboidratos, proteínas, fibras, lipídeos, urease e cálcio (Ca) e fósforo (P), (b) *contaminação por micotoxinas* (zearalenona (ZON), aflatoxina (AFLs), ocratoxina (OTA), esterigmatocistina (EST) e fumonisinas (FBs) e (c) *possíveis alterações no conteúdo de água* [umidade (mc) e atividade em água ( $a_w$ )]. Os valores de composição centesimal encontrados para as amostras foram similares aos descritos na literatura com variações no conteúdo de fibra, lipídeos e mc, os quais podem influenciar a digestão, metabolismo e proliferação de fungos, respectivamente. As taxas de fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) encontradas variaram de 40 a 6050 µg/kg para a soja e resíduo da pré-limpeza do milho, respectivamente. A fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) não foi encontrada em nenhuma amostra de soja, sendo encontrada em maior quantidade no resíduo da pré-limpeza do milho. Apenas 8,33% das amostras apresentaram contaminações por AFLs e ZON e nenhuma amostra apresentou contaminação para OTA e EST. Do total de amostras avaliadas, foram encontradas 11 gêneros fúngicos distintos, sendo *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* os predominantes. Apesar de encontrarmos contaminações por micotoxinas nas rações, as características morfológicas (motilidade, vigor e densidade) de 75

amostras de sêmen suíno avaliado, permaneceram inalteradas, não sendo possível correlacionar a presença de micotoxinas com relação à qualidade do sêmen analisado. Em síntese, nossos resultados demonstraram alterações na qualidade dos alimentos fornecidos à suínos da pequena propriedade do Estado de Santa Catarina, onde foi realizado o estudo, os quais poderão contribuir para o aprimoramento e/ou aplicação de estratégias mais eficazes, com o intuito de assegurar o correto preparo e armazenamento de rações e ingredientes que fazem parte da dieta de suínos.

**Palavras-chave:** suíno, micotoxinas, segurança alimentar, composição centesimal, qualidade alimentar, rações

## ABSTRACT

NONES, JANAÍNA. **Mycotoxins and Chemical Composition: Evaluation of Quality of Swine Diets Produced in a Small Rural Propriety.** 2012. 150p. Dissertation (Master in Food Science). Federal University of Santa Catarina. Florianopolis – SC

The Brazilian production of pork is 3.24 million tons and the state of Santa Catarina participates with 26% of the total value of production. Procedures to reduce the costs of agricultural activities, in order to increase profitability, due to the process of creating swine, are very important for the maintenance, expansion and growth of this sector. The aims of this study were to evaluate the quality and the safety of food supplied to these animals in distinct phases of life, in order to provide production optimize, reduce the onset of diseases and thus which will lead to economic gains by the enhance of meat quality. For that, 72 samples of *ingredients* (corn, soybean and rice), *feed* (off-spring and pregnancy) and *pre-cleaning* residue from corn were collected, from August 2010 to February 2011. The investigation of the quality of these samples was performed by testing the (a) *composition of* carbohydrates, protein, fibre, lipids, urease and ash [(calcium (Ca) and phosphorus (P)],(b) *mycotoxicological*: zearalenone (ZON), aflatoxin (AFLs), ochratoxin A (OTA), esterigmatocistina (EST) and fumonisins (FBs) and (c) *water content* [moisture content (mc) and water activity (aw)]. Composition values found for samples were similar to those described in the legislation with variations in fibre, lipids, and mc. Content, rates of fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) found ranged from 40 to 6050 µg/kg for soybeans meal and residue from the pre-cleaning of corn, respectively. Fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) was not found in any sample of soybeans meal, it was found higher quantity in the residue of pre-cleaning of the corn. Only 8.33% of the samples showed contamination with ZON and AFLs and no samples showed OTA and EST contamination. Of the total samples analyzed, it was found 11 different genera of fungi, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* were the predominate. Although we found contamination by mycotoxins in the feed, the morphological characteristics (motility, vigor and density) of 75 samples of swine semen evaluated, remained unchanged. Impossibility listing the presence of mycotoxins in the semen quality analyzed. In summary, our results demonstrate the variation of quality of swine feed, in a small propriety located in the State of Santa Catarina where that was made a research that may

contribute for the improvement and application of more effective strategies, looking for the correct prepare and storage of feed and ingredients, that are part of the swine diet.

**Keywords:** swine, mycotoxins, food safety, composition, quality food, feed

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1.</b> Sistema intensivo de produção de carne suína	29
<b>Figura 2.</b> Etapas onde podem ocorrer contaminações por micotoxinas	37
<b>Figura 3.</b> Estrutura das fumonisinas	39
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da esfinganina e esfingosina	40
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da zearalenona	41
<b>Figura 6.</b> Efeito da zearalenona no nascimento de leitões (a) mumificados (b) natimortos	42
<b>Figura 7.</b> Estruturas químicas das aflatoxinas	43
<b>Figura 8.</b> Mecanismo de ação da aflatoxina B <sub>1</sub>	44
<b>Figura 9.</b> Estrutura química da ocratoxina A	46
<b>Figura 10.</b> Estrutura química da esterigmatocistina	47
<b>Figura 11.</b> Legislação para micotoxinas encontradas em ingredientes e rações para suínos de diferentes países	48
<b>Figura 12.</b> Principais fungos produtores micotoxinas (a) <i>Fusarium</i> (b) <i>Penicillium</i> (c) <i>Aspergillus</i>	50

### CAPÍTULO 2

<b>Figure 1.</b> Flowchart of swine ingredients and feed sample collection and analysis	78
<b>Figure 2.</b> Average of (a) <i>phosphorus</i> and (b) <i>calcium</i> levels detected in feed for <i>piglets</i> and pregnant swine	81
<b>Figure 3.</b> Urease activity of soybean samples	86

### CAPÍTULO 4

<b>Figure 1.</b> (A) Photomicrograph of boar semen (B) Sperm nucleus staining by DAPI (C) Overlap of A and B	113
<b>Figure 2.</b> Breeders A and B semen analysis: a.1 and b.1 - sperm density; a.2 and b.2 - semen volume; a.3 and b.3 - sperm motility	115





## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Distribuição da utilização dos sistemas de produção de suínos	28
<b>Tabela 2.</b> Formulações de rações para suínos de diferentes fases do ciclo produtivo de um plantel	32
<b>Tabela 3.</b> Níveis de micotoxinas detectados em rações para suínos de diferentes países	38
<b>Tabela 4.</b> Exposição de diferentes animais aos efeitos tóxicos das aflatoxinas	45
<b>Tabela 5.</b> Principais características relacionadas com a produção de fungos e micotoxinas	51

### CAPÍTULO 2

<b>Table 1.</b> Swine daily feeding routine	76
<b>Table 2.</b> Ingredients proximate composition used for swine feed formulation	82
<b>Table 3.</b> Proximate composition of feed for pregnant swine and piglets	84

### CAPÍTULO 3

<b>Table 1.</b> Total count for molds and yeasts in ingredients and feed samples	97
<b>Table 2.</b> Identification of fungal genera in ingredient and feed samples	98
<b>Table 3.</b> Presence of FBs in <i>ingredients</i> and <i>feeds</i> herds	100

### CAPÍTULO 4

<b>Table 1.</b> Breeders used in the study	110
<b>Table 2.</b> Composition of the feed intended for swine breeding	110
<b>Table 3.</b> Assessment of swine breeder feed samples for mycotoxins	112



## LISTA DE ABREVIATURAS

AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
AFLs	Aflatoxinas
AI	Artificial Insemination
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Aw	Atividade em água
BTS	Beltsville Thawing Solution
Ca	Cálcio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DON	Desoxinivalenol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assays
EST	Esterigmatocistina
FAO	Food and Agriculture Organization
FB <sub>1</sub>	Fumonisina B <sub>1</sub>
FB <sub>2</sub>	Fumonisina B <sub>2</sub>
FBs	Fumonisinas
FD	Detector de Fluorescência
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	High Performance Liquid Chromathography
LC	Cromatografia Líquida
LD	Dose Letal
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e
Abastecimento	
Máx	Máximo
Mc	Moisture Content
Mín	Mínimo
NRC	National Research Council
OPA	O-oftaldialdeído

OTA	Ocratoxina A
P	Fósforo
PTL	Patulina
RNA	Ácido Ribonucleico
TOF	Time of The Flight
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta
ZAN	Zearalanone
ZON	Zearalenona
$\alpha$ -ZAL	$\alpha$ -Zearalanol
$\alpha$ -ZOL	$\alpha$ -Zearalenol
$\beta$ -ZAL	$\beta$ -Zearalanol
$\beta$ -ZOL	$\beta$ -Zearalenol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	23
<b>2 CAPÍTULO 1</b>	
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	25
<b>2.1 Produção de carne suína</b>	27
2.1.1 Sistema de produção suinícola	27
2.1.2 Sistema intensivo de produção suína	29
<b>2.2 Importância da qualidade da alimentação do suíno</b>	30
2.2.1 Exigências nutricionais dos suínos	31
2.2.1.1 Proteínas	32
2.2.1.2 Carboidratos	33
2.2.1.3 Lipídeos	33
2.2.1.4 Fibras	34
2.2.1.5 Minerais	34
2.2.1.6 Vitaminas	36
<b>2.3 Micotoxinas <i>versus</i> Suinocultura</b>	36
2.3.1 Micotoxinas	36
2.3.2 Fumonisinias	39
2.3.3 Zearalenona	40
2.3.4 Aflatoxina	43
2.3.5 Ocratoxina A	45
2.3.6 Esterigmatocistina	46
2.3.7 Legislação para micotoxinas em rações para suínos	47
<b>2.4 Fungos <i>versus</i> Rações para Suínos</b>	49
2.4.1 Identificação de fungos toxigênicos	52
<b>2.5 Medidas de controle na proliferação de fungos e produção de micotoxinas</b>	53
2.6 Referências Bibliográficas	55
<b>3 CAPÍTULO 2</b>	
<b>NUTRITIONAL QUALITY AND SAFETY ASSESSMENT OF INGREDIENTS AND FEED GIVEN TO PREGNANT SWINE AND PIGLETS</b>	72
3.1 Abstract	73
3.2 Resumo	74
3.3 Introduction	75

3.4 Materials and Methods	76
3.5 Results and Discussion	80
3.6 Conclusion	87
3.7 References	88

## **4 CAPÍTULO 3**

### **EVALUATION OF FUNGI AND FUMONISINS IN SWINE FEED AND ITS INGREDIENTS ON A FARM IN SANTA CATARINA, BRAZIL**

	92
4.1 Abstract	93
4.2 Introduction	94
4.3 Material and Methods	95
4.4 Results and Discussion	96
4.5 Conclusion	101
4.6 References	101

## **5 CAPÍTULO 4**

### **ANALYSIS OF THE PRESENCE OF MYCOTOXINS IN SWINE FEED AND ITS POSSIBLE EFFECTS ON SEMEN QUALITY**

	105
5.1 Abstract	107
5.2 Resumo	108
5.3 Introduction	108
5.4 Materials and Methods	109
5.5 Results and Discussion	111
5.6 Conclusion	114
5.7 References	116

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

119

## **8 APÊNDICE**

8.1 Zearalenone, Metabolites and Their Effect on Swine Reproductive Performance: a Review	123
---	-----

## 1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de suínos gera anualmente 12 bilhões de reais, sendo o Estado de Santa Catarina, seguido do Rio Grande do Sul e Paraná, os maiores produtores e exportadores desta carne. Somente o Estado de Santa Catarina representa 26% do total da produção de carne suína nacional.

A necessidade de aprimorar a produção, reduzir custos e, conseqüentemente, aumentar a produtividade, aliada ao anseio de mercados consumidores, cada vez mais exigentes, demandam o desenvolvimento de tecnologias que aprimorem o sistema de produção e o processamento da carne suína e de seus derivados.

A alimentação de suínos representa mais de 60% do custo total da produção. Portanto, técnicas que visem fornecer uma dieta balanceada (rica em nutrientes) e segura (isenta de contaminantes) são indispensáveis para a manutenção e/ou ampliação da lucratividade deste setor. Diferentes cuidados, considerando as diferentes fases de vida dos animais são necessários, para que seja assegurada melhor digestibilidade e, conseqüentemente, garantia do crescimento e desempenho produtivo. O adequado balanceamento de proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais propicia ao animal um adequado e saudável crescimento e, ao produtor, um maior ganho econômico. Matrizes na fase de lactação, por exemplo, diminuem a quantidade de ração ingerida nos períodos de estresse calórico, sendo que a adição de lipídeos na dieta aumenta a densidade energética, podendo ser eficiente para atender as necessidades do organismo desses animais em períodos críticos (quentes) do ano.

A garantia de uma alimentação adequada somente pode ser conquistada através do correto balanceamento nutricional dos ingredientes utilizados no preparo da dieta, bem como através de um controle adequado do processo de produção das rações que são fornecidas a estes animais. Por este motivo, averiguações constantes, como a avaliação de sua composição, devem ser realizadas para propiciar a segurança das rações, além de ser uma alternativa importante e fundamental para auxiliar no controle desta atividade.

Outro fator com relação à alimentação que deve ser considerado é a presença de contaminantes, principalmente as micotoxinas, que podem desencadear enormes problemas na suinocultura. Dentre as micotoxinas, a zearalenona (ZON), fumonisina (FBs), aflatoxina (AFLs) e ocratoxina (OTA) podem ser encontradas nas rações destinadas aos suínos. Problemas reprodutivos, tais como a repetição de cio de fêmeas,

a diminuição da libido dos machos e o nascimento de leitões natimortos e mumificados são frequentemente relacionados com a ZON. Edema pulmonar, baixa na imunidade, redução do ganho de peso e problemas hepáticos e renais são relacionados às demais micotoxinas acima citadas (FBs, AFLs e OTA).

A formação das micotoxinas se deve a fungos toxigênicos que se desenvolvem em condições propícias de temperatura e umidade. *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são os gêneros mais encontrados, podendo se desenvolver no campo ou no período de armazenagem. Por este motivo, alguns cuidados devem ser tomados com relação ao armazenamento dos ingredientes e rações destinados a animais, especialmente suínos que são mais sensíveis a ZON e OTA.

Os ingredientes que chegam à propriedade devem ser de qualidade garantida, bem como isentos de contaminação ou com percentuais abaixo dos permitidos pela legislação. Além disso, o local de armazenamento deve ser seco, bem ventilado e distante de insetos e roedores, os quais podem facilitar à deterioração do grão e consequentemente a suscetibilidade de desenvolvimento fúngico.

Considerando a enorme importância que a suinocultura desempenha na economia catarinense e brasileira, os problemas patológicos que podem ocorrer com os animais e possíveis resíduos remanescentes na carne, decorrentes de uma má qualidade alimentar, a proposta deste trabalho foi de avaliar a qualidade e segurança das rações destinadas a diferentes fases do ciclo de produção de suínos produzidos em uma pequena propriedade da Região do Vale do Itajaí, durante um período de 7 meses. Como objetivos específicos este estudo propôs: (1) Verificar a qualidade dos ingredientes e rações, quanto a composição e presença de micotoxinas (AFLs, ZON, EST e OTA) fornecidos a suínos da fase de inicial (leitões de 18 a 25 kg) e gestação. (2) Avaliar *ingredientes* (milho, farelo de soja e de arroz), *rações* (gestação e inicial) e *resíduo da pré-limpeza* do milho quanto a presença de fungos e fumonisinas. (3) Averiguar a contaminação por micotoxinas (FBs, ZON, OTA, AFLs e EST) nas dietas fornecidas a suínos (machos reprodutores), buscando correlacionar a possível presença destes contaminantes com a qualidade do sêmen produzido.



**2 CAPÍTULO 1**

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 2.1 Produção de carne suína

A produção de carne suína passou por várias transformações até atingir os parâmetros de qualidade atuais. Os suínos (*Sus scrofa domestica*) foram introduzidos no Brasil por Martim Afonso de Sousa em 1532, sendo os primeiros animais provenientes do cruzamento entre as raças originárias de Portugal. Tais animais eram usados por pequenos proprietários, e destacavam-se por suas características como: rusticidade, adaptabilidade para condições pobres de administração e alimentação (FERREIRA; LIMA, 2001; MARIANTE et al., 2003). Nessa época não havia preocupação quanto a alimentação, seleção de matrizes e melhoramento genético, para aprimoramento dos teores nutricionais da carne (SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007).

O melhoramento genético de suínos teve o seu início a partir da década de 60, onde tanto a carne quanto a gordura, tinham valor comercial. Entretanto, a partir da década de 70, com o crescimento da indústria do óleo vegetal e a consequente campanha contra o colesterol, bem como as mudanças de hábitos alimentares das pessoas, ocorreu a diminuição do valor comercial da gordura animal (BELLAYER, 2000).

Atualmente a suinocultura visa a produção de maior número de animais, com melhor conversão alimentar e maior rendimento de carne magra, aliados ao menor custo de produção (BARBOSA, 2005; SILVA, 2007). Neste contexto, vem se procurado cada vez mais com a qualidade e segurança da alimentação fornecida a estes animais, além do aprimoramento da genética, instalações e tecnologias empregadas nos plantéis. Este fato permitiu a ampliação na produção de carne suína brasileira, a qual passou de 2.620 mil toneladas em 2004 para 3.398 em 2011. Segundo estimativas, mais de 730 mil pessoas no mundo dependem diretamente da suinocultura, sendo essa atividade responsável pela renda de mais de 2.7 milhões de pessoas (ROPPA, 2005).

Aproximadamente 15% do total da produção brasileira é destinada à exportação, sendo Hong Kong, Rússia, Ucrânia e Argentina os principais países compradores. O Estado de Santa Catarina participa com 26% do total da produção nacional (ABIPECS, 2012), o qual movimenta mensalmente cerca de 770.690 (36,72%) suínos para abate, 1.307.669 (62,3%) para recria/engorda e 20.623 (0,98%) com a finalidade reprodução (TAVARES et al., 2012).

### 2.1.1 Sistema de produção suinícola

O sistema de produção para suínos é dividido em criação extensiva e intensiva, sendo este último subdividido em sistema de produção confinado, semi-confinado e ao ar livre.

A utilização do sistema extensivo de produção consiste na criação de animais soltos, submetidos ao contato direto com o campo. Este sistema, por não ser considerado economicamente rentável, vem diminuindo ao longo dos anos (Tabela 1). Além do mais, forma de produção possui condições higiênico-sanitárias precárias, sendo os animais constantemente fonte de disseminação de vários agentes patogênicos (RODRIGUEZ; HOMEM; HEINEMANN,2003).

O sistema intensivo de produção confinado é o mais utilizado, pelo fato de possuir alta tecnologia, animais de alto potencial genético, intensa reposição de reprodutores e programas de alimentação específicos para cada fase da vida do animal (ASSIS, 2006). É caracterizado pelo fornecimento de dieta balanceada com ração padrão, à base de milho e farelo de soja, suplementada com minerais e vitaminas, formulada de forma a atender às exigências dos animais (GONÇALVES; COSTA, 2010).

No sistema semi-confinado os animais tem acesso a pequenas áreas ao ar livre (com ou sem piquetes), com exceção dos animais em fase de engorda (ASSIS, 2006; BRASIL, 2002; VIEIRA, 2006). Uma das desvantagens deste sistema é a dificuldade do manejo dos animais.

Já o sistema de criação ao ar-livre é caracterizado por manter os animais nas fases de reprodução, maternidade e creche em piquetes e os suínos em fase de engorda confinados, com rotação das áreas ocupadas pelos animais. Este método é pouco frequente, apesar de apresentar algumas vantagens, como: baixo custo de implantação, manutenção e produção; número reduzido de edificações; bom desempenho técnico; mobilidade das instalações; e facilidade na implantação e ampliação da produção (ASSIS, 2006; VIEIRA, 2006).

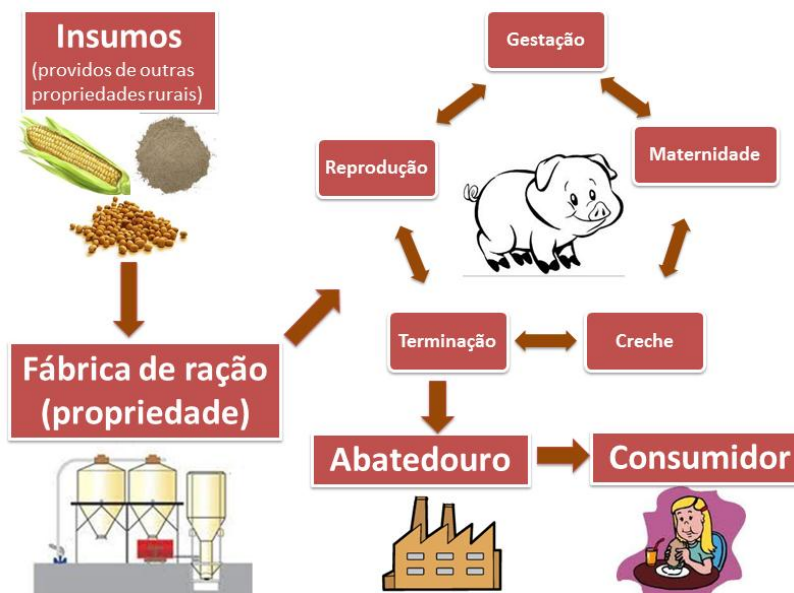
**Tabela 1.** Distribuição da utilização dos sistemas de produção de suínos no Brasil

<b>Sistema/ano (%)</b>	<b>1990</b>	<b>1995</b>	<b>2000</b>
Extensivo	32,8	25,5	17,0
Intensivo			
Confinado	40,0	48,0	61,0
Semi-confinado	27,0	26,0	21,0
Ar-livre	0,2	0,5	1,0

Perdomo, Lima e Nones (2001)

## 2.1.2 Sistema intensivo de produção suína

O sistema intensivo de produção suína é empregado em grande escala no Brasil, sendo constituído de diferentes etapas (Figura 1), as quais vem propiciado o aumento da produção dos plantéis. As principais etapas que constituem um sistema integrado de produção de suínos são:



**Figura 1.** Sistema intensivo de produção de carne suína.

(a) *Creche ou unidade de crescimento inicial*: projetada para abrigar os leitões após o desmame até atingirem 25 kg de peso corporal, o que ocorre por volta de 65 dias de idade (SOBESTIANSKY et al., 2001). A instalação normalmente possuem gaiolas para 10 leitões ou baias para grupos de 20 leitões.

(b) *Unidade de crescimento e terminação*: utilizadas para animais com 25 a 60 kg de peso corporal (65 a 110 dias de idade, aproximadamente), criados em baias coletivas do setor de crescimento; e de 60 a aproximadamente 100 kg (peso de abate), também em baias coletivas de terminação (SOBESTIANSKY et al., 2001).

(c) *Setor de reprodução*: as fêmeas já podem ser selecionadas para reprodução logo ao nascimento, caso apresentem peso corporal

maior ou igual a 1,4 kg. Depois, podem ser separadas pelas suas tetas em quantidade (número > 14 tetas) e em qualidade (ausência de tetas invertidas). Além destas, outras características podem ser usadas para o agrupamento do plantel de fêmeas reprodutoras, as quais já apresentam o primeiro cio no 5º mês de vida e estão aptas para reprodução com aproximadamente 7 meses de idade, quando apresentam peso corporal de 100 a 110 kg. Então, são encaminhadas ao setor de reprodução, onde são cobertas e permanecem até a confirmação da prenhez. Podem ser também adquiridas de empresas especializadas.

(d) *Unidade de gestação*: confirmada a prenhez, são encaminhadas para a unidade de gestação (bairns coletivas ou gaiolas individuais) onde permanecem até uma semana antes do parto. Em suínos tem sido relatado que 85% das gestações duram entre 114-116 dias, com uma amplitude de 110-119 dias (MELLAGI et al., 2006)

(e) *Maternidade*: a maternidade é uma fase muito importante na criação de suínos na qual se devem conciliar, simultaneamente, as necessidades opostas dos leitões com as da fêmea em um mesmo ambiente (CAMPOS et al., 2008). Uma semana antes do parto as fêmeas são levadas para a maternidade (gaiolas individuais com abrigo para proteção dos leitões) onde permanecem até terminar a fase de aleitamento. O desmame ocorre, normalmente, quando os leitões atingem entre 21 e 28 dias de idade, sendo os leitões encaminhados para a creche e as porcas retornam para o setor de reprodução.

## **2.2 Importância da qualidade da alimentação do suíno**

A alimentação é o componente de maior participação no custo de produção suína, representando de 65 a 76% do valor total (DUARTE; PENA; LINO, 2010; POROLNIK et al., 2012). Sob o ponto de vista da viabilidade econômica na produção, a suinocultura depende essencialmente da disponibilidade de ingredientes que tenham preços compatíveis com os preços pagos por quilograma de suíno (MOTA et al., 2012). Da mesma forma, a precisão dos valores de composição química são primordiais na busca da redução dos custos e de uma melhor produtividade (SANTOS et al., 2005). Esses valores, quando em desacordo com os padrões pré-estabelecidos, podem comprometer a eficiência de utilização do alimento pelo suíno e refletir negativamente no sucesso do empreendimento (ROCHA et al., 2012).

A garantia de uma alimentação adequada somente pode ser conquistada através do correto balanceamento nutricional dos ingredientes utilizados no preparo da dieta, bem como através de um

controle adequado do processo de produção das rações que são fornecidas a estes animais. (ZARDO; LIMA, 1999; VILANÇA, 2010; BÜNZEN et al., 2008). Logo, para a formulação de rações, é preciso levar em consideração as características nutricionais de cada ingrediente, com o intuito de melhorar o aproveitamento, minimizar os prejuízos e aumentar os lucros da produção (BELLAYER, 2001).

Dietas balanceadas são de fundamental importância para a suinocultura, uma vez que irão repercutir no correto desenvolvimento do animal, gerando maior qualidade e quantidade de carne magra, que será consumida pelo homem (GOFF; NOBLET; CHERBUT, 2003; GOMES et al., 2006). O correto funcionamento do organismo, tanto das funções bioquímicas, fisiológicas e estruturais dependem de quantidade exatas de proteínas, carboidratos, lipídeos, fibras e matéria mineral.

O não balanceamento das dietas pode ocasionar carência ou excesso de vários nutrientes ao animal, o que pode alterar o bom funcionamento do organismo, podendo diminuir a imunidade e até mesmo causar patologias (REGINA, 2010). Outra preocupação, que vem sendo evidenciada, são os danos ecológicos que os dejetos suínos causam para o meio ambiente, devido ao excesso de nutrientes (ANGONESE et al., 2006). Desta forma, vem se preocupado em minimizar o excesso de nutrientes, como o nitrogênio e fósforo (P) nas dietas.

Além disso, o cuidado com a alimentação do suíno merece uma atenção especial, pois a qualidade alimentar fornecida a estes animais irá representar maior segurança na carne e seus subprodutos originados. Uma das preocupações atuais é com relação a presença de contaminantes nas rações as quais, quando presentes em quaisquer das etapas produtivas dos suínos, podem ficar retidos na carne, como o caso da ractopamina, pesticidas e micotoxinas (BRYDEN, 2012). Diferentes micotoxinas, por exemplo, já foram encontradas na carne como: a AFLs (MALLMANN; SANTURIO; WENTZ, 1994; FERRIS et al., 2001; ALMEIDA et al., 2009), ZON (SANTURIO et al., 2000; REMUS et al., 2011), OTA (JORGENSEN et al., 1998).

### **2.2.1 Exigências nutricionais dos suínos**

As exigências nutricionais dos suínos variam de acordo com o potencial genético, idade, sexo, peso e a fase produtiva em que os animais se encontram (AARNINK; VERSTEGEN, 2007; DANTAS et al., 2010). Baseado neste critério, as formulações das rações dispõem de

quantidades distintas de milho, farelo de soja, farelo de arroz e minerais para cada etapa produtiva do plantel (Tabela 2). Essas quantidades fornecem proteínas, carboidratos, vitaminas, fibras e minerais que, em quantidades suficientes, auxiliam no desenvolvimento do organismo animal.

**Tabela 2.** Formulações de rações para suínos de diferentes fases do ciclo produtivo de um plantel

Rações	Características do suíno		Ingredientes (%)			
	Idade (dias)	Peso (kg)	Milho	Soja	Arroz	Outros*
Gestação	210-800	140-240	65	16	15	4
Lactação	210-800	140-240	63	28	5	4
Pré -1	21-28	6 -15	30	20	0	50
Pré-2	28-42	15- 18	55	15	0	30
Inicial	42-65	18-25	60	29	5	6
Crescimento	65-110	25-80	57	25	15	3
Engorda	110-160	80-110	54	23	20	3

\*vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, D<sub>3</sub>, K<sub>3</sub>) e minerais (Ca, P, sódio, cromo, cobre, ferro, cobalto, selênio) Adaptada: NUTRIFARMA (2012)

### 2.2.1.1 Proteínas

As proteínas constituem um dos principais componentes dos órgãos e das estruturas do organismo animal, sendo necessário o seu contínuo suprimento alimentar para a obtenção de um adequado crescimento e de uma adequada produção. Possuem função estrutural, de manutenção e reparo de tecidos, formação de enzimas e hormônios, proteção imunológica, transporte e armazenamento, geração e transmissão de impulsos nervosos e coagulação sanguínea.

Dentre os alimentos proteicos, o farelo de soja tem significativa importância na nutrição de suínos devido ao conteúdo e qualidade de sua proteína. Porém a soja crua possui vários fatores antinutricionais que são prejudiciais principalmente para animais monogástricos, como os suínos. Os principais fatores antinutricionais da soja de acordo com Regina (2010) são:

- Inibidores da quimiotripsina e tripsina ou inibidores da protease, que são compostos proteicos que inibem as enzimas pancreáticas, importantíssimas na digestão proteica, prejudicando assim o desenvolvimento dos animais;



- Fatores alergênicos (Glicina e B conglucina), que reduzem também a absorção de nutrientes, como proteína e aminoácido, causando efeitos graves nas micro vilosidade intestinais, além de ocasionar problemas alérgicos;
- Polissacarídeos não amidicos solúveis, reduzem o teor energético da soja.
- Ácido fítico, reduz a absorção de zinco, cálcio (Ca), ferro e outros minerais.

Para verificação dos fatores antinutricionais da soja é utilizado o método de medição de atividade ureática ou índice de urease. Essa análise permite verificar a inativação da enzima urease, presente na soja crua ou mal processada, que é desativada pelo calor. A atividade ureática ideal deve estar entre 0.05 a 0.30 (DREW; BORGESON.; THIESSEN, 2007).

### **2.2.1.2 Carboidratos**

Os carboidratos são as principais fontes de energia das dietas dos animais, contribuindo com aproximadamente 80% do total de calorias ingeridas (SILVA, 2002). Os alimentos ricos em carboidratos constituem normalmente a maior proporção das rações para suínos e geralmente a maior parcela do custo total da alimentação animal.

Alguns carboidratos presentes em ingredientes de origem vegetal possuem algumas propriedades físico-químicas que podem interferir no processo de digestão e absorção dos alimentos pelos suínos (BRASIL et al., 2009). Carboidratos complexos são pouco aproveitados por estes animais (LIMA et al., 2006; ALBUQUERQUE, 2009). Segundo Seifert e Watzl (2007) dietas contendo carboidratos não digeríveis podem influenciar nas funções do sistema imune de diferentes formas, principalmente aumentando a resistência a infecções causadas por microrganismos patogênicos.

### **2.2.1.3 Lipídeos**

A maior parte dos lipídeos presentes em dietas de suínos está na forma de triacilgliceróis, que consistem de três moléculas de ácidos graxos ligadas por ésteres a uma molécula de glicerol (SBARDELLA, 2011)

Desempenham funções bioquímicas e fisiológicas importantes no organismo animal, sendo fonte de energia, proteção e de composição

estruturais de membranas e tecidos. Além disso, os lipídeos são utilizados em rações por aumentarem a capacidade de absorção de vitaminas lipossolúveis, fornecerem ácidos graxos essenciais e atuarem como precursores de diferentes metabólitos (BASSI et al., 2012). Os óleos e gorduras fornecem 2,25 vezes mais energia que os carboidratos e as proteínas, constituindo um grande atrativo para seu uso nas rações, pois aumentam a eficiência alimentar de maneira notável, tanto para aves quanto para suínos (SBARDELLA, 2011)

Em condições ambientais específicas (estresse por calor) e/ou em determinadas fases de produção, principalmente se o consumo de ração é reduzido e/ou insuficiente, a inclusão de lipídeos aumenta a densidade energética da dieta, podendo ser eficiente para atender a exigência elevada de energia dos suínos (KLASING, 1992).

#### **2.2.1.4 Fibras**

A fibra dietética vem sendo considerada uma fonte alternativa de energia na alimentação desta espécie animal, principalmente para animais destinados ao abate nas fases de crescimento-terminação e de pós terminação, bem como para animais destinados para a reprodução (GOMES et al., 2006). Alimentos fibrosos fornecidos a vontade para suínos reduzem a espessura de toucinho e proporciona um melhor estado de saúde e de bem estar animal (GOFF; NOBLET; CHERBUT, 2003).

A utilização de alimentos fibrosos auxilia no controle do excessivo ganho de peso advindo de maior deposição de tecido adiposo e minimiza o estresse decorrente do confinamento (GOMES et al., 2006). Porém, o elevado teor de fibras nas dietas reduz a disponibilidade de energia e nutrientes, que por sua vez, pode influenciar no desempenho e produtividade dos suínos (JHA et al., 2011). A fibra pode afetar negativamente a utilização de alguns nutrientes, por levar a uma redução da digestibilidade da proteína bruta e aumentar a velocidade de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal do suíno (SANTOS et al., 2005).

#### **2.2.1.5 Minerais**

Os minerais, em geral, constituem de 4 a 6 % do peso total do organismo animal (AROUCA, 2008). São divididos em dois grupos, com base nas quantidades exigidas por espécie animal. Os presentes em maior quantidade são denominados macronutrientes e incluem o cálcio

(Ca), fósforo (P), sódio, potássio, cloro, cloreto de sódio, magnésio e enxofre. Em menor quantidade, são denominados micronutrientes e incluem ferro, manganês, iodo, cobalto, cobre, zinco e selênio etc. (REGINA, 2010). Os minerais são essenciais à constituição do sistema imune, diminuindo o impacto negativo que os fatores imunossupressores podem causar no desempenho e no estado de saúde desses animais. Participam da constituição dos ossos e de outros tecidos, formando compostos orgânicos necessários para o desempenho de funções orgânicas (SANTOS et al., 2008; BARROS, 2010). Dentre os minerais o Ca e o P são um dos mais importantes no organismo de suínos.

O Ca é um dos minerais mais abundantes no corpo, sendo 99% encontrado no esqueleto, formando parte da matriz óssea. A exigência de Ca para suínos é aproximadamente 1,2 vezes a necessidade de P (KOPINSKI, 2002). A pequena fração de Ca que não se encontra no esqueleto (1%) tem muitas funções vitais. Esta fração encontram-se distribuída amplamente pelos vários tecidos e fluídos corporais, na forma de íons livres, ligados a proteínas do soro e complexadas a ácidos orgânicos ou inorgânicos (GONZÁLES; SILVA, 2006). Outras funções que também são atribuídas a este mineral é a coagulação sanguínea, transmissão de estímulos nervoso, ativador de enzimas e participação de contração dos músculos esqueléticos cardíacos. Alguns sintomas observados em suíno pela deficiência de Ca estão atribuídos ao crescimento retardado, deformações ósseas, raquitismo e redução da produção de leite (REGINA, 2010).

O conteúdo médio de P na musculatura de suínos é de 0,206 %; nos ossos é de 3,16 %; nas vísceras 0,175 %; 0,071 % na pele e 0,036 % no tecido adiposo (STAHLY, 2007). Segundo Underwood et al. (1999), além da formação e manutenção do sistema ósseo, onde serve como reserva mobilizável para as funções que ele cumpre em quase todos os processos metabólicos, o P ainda atua como componente dos ácidos nucléicos (DNA e RNA), os quais são fundamentais para o crescimento e diferenciação celular. Segundo Carter e Cromwell (1998), a quantidade de P exigida para crescimento está intimamente relacionada com a capacidade de deposição de carne magra dos suínos. Sua troca nos tecidos decresce com a idade e aumenta nos períodos de atividade reprodutiva. A medida que os animais se desenvolvem, menor quantidade de P disponível é exigida por quilo de ganho de peso (OLIVEIRA et al., 2010). O sinal mais comum de deficiência de P nos animais em crescimento é o raquitismo, perda de apetite, fragilidade óssea e, posteriormente, problemas reprodutivos (REGINA, 2010).

### **2.2.1.6 Vitaminas**

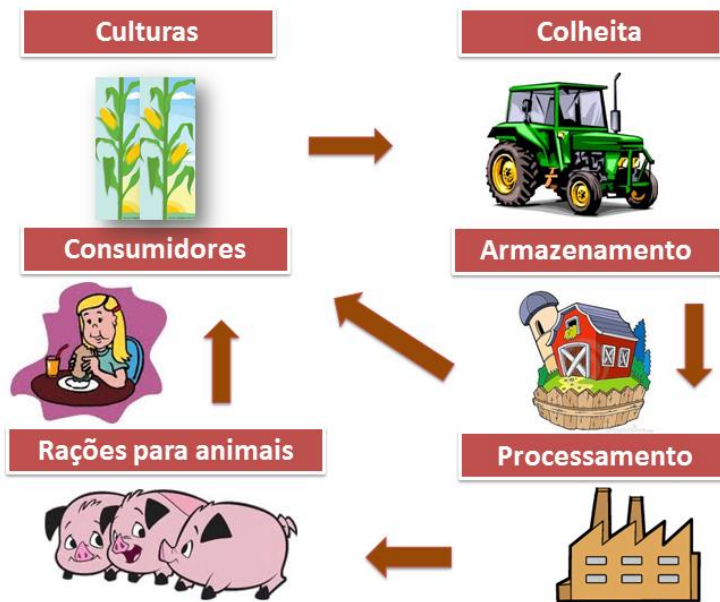
As vitaminas são compostos orgânicos indispensáveis ao metabolismo animal, estando relacionadas ao desenvolvimento dos tecidos, crescimento, funções imunes e reprodutivas (SANTOS et al., 2008; RIBEIRO; PINHEIRO; GIANFELICE, 2008). Treze vitaminas são consideradas essenciais para suínos: vitaminas A, D, E, K, B<sub>12</sub>, tiamina, niacina, riboflavina, ácido pantotênico, colina, biotina, ácido fólico e piridoxina (REGINA, 2010). Sua ausência sistemática na dieta resulta em crescimento e desenvolvimento deficientes (BARROS, 2010). São observadas desordens reprodutivas em animais de produção, como atraso da puberdade, baixa taxa de concepção, alta mortalidade embrionária e libido reduzida nos machos (SMITH; AKINBAMIJ, 2000)

## **2.3 Micotoxinas versus Suinocultura**

### **2.3.1 Micotoxinas**

As micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por várias espécies de fungos (QING-HUA et al., 2012). A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes e após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto (Figura 2).

Animais, assim como os seres humanos, são expostos as micotoxinas através da alimentação. Cerca de 25% dos alimentos mundiais são afetados por fungos produtores de micotoxinas (KÖPPEN et al., 2010). Os principais alimentos passíveis de contaminação são os cereais (milho, arroz, trigo) e leguminosas (feijão, ervilha, soja), além de rações e produtos processados (SCUSSEL, 1998, 2002; MANFIO et al., 2011). Atualmente já foram identificadas cerca de 300 micotoxinas, produzidas por aproximadamente 200 fungos (BINDER, 2007). A detecção de fungos não implica necessariamente a presença de micotoxinas, pois a produção destas toxinas depende de vários fatores, tais como a presença de fungos toxigênicos, composição química do substrato, teor de umidade, umidade relativa, temperatura e tempo de crescimento fúngico (ROIGÉ et al., 2009). As micotoxinas possuem alta estabilidade química, o que as habilita a permanecerem nos alimentos mesmo após a remoção dos fungos pelos processos de industrialização (BITTENCOURT; OLIVEIRA; CORRÊA, 2005).



**Figura 2.** Etapas onde podem ocorrer contaminações por micotoxinas.

A exposição às micotoxinas podem desencadear uma série de problemas a saúde e bem estar animal, sendo que a espécie, idade e tempo de exposição são fatores que determinam sua toxicidade. Em suínos, as micotoxinas desencadeiam problemas relacionados com: baixa na imunidade, surgimento de doenças, redução do ganho de peso, prejuízos reprodutivos e de produção (BINDER, 2007; MALLMANN; DIKIN, 2011). As micotoxinas mais comuns e que afetam a saúde do suíno são as aflatoxinas (AFLs), fumonisinas (FBs), zerealenona (ZON), ocratoxina (OTA) e esterigmatocistina (EST). Na Tabela 3 pode ser verificado níveis de micotoxinas detectados em rações para suínos.

**Tabela 3.** Níveis de micotoxinas detectados em rações para suínos de diferentes países

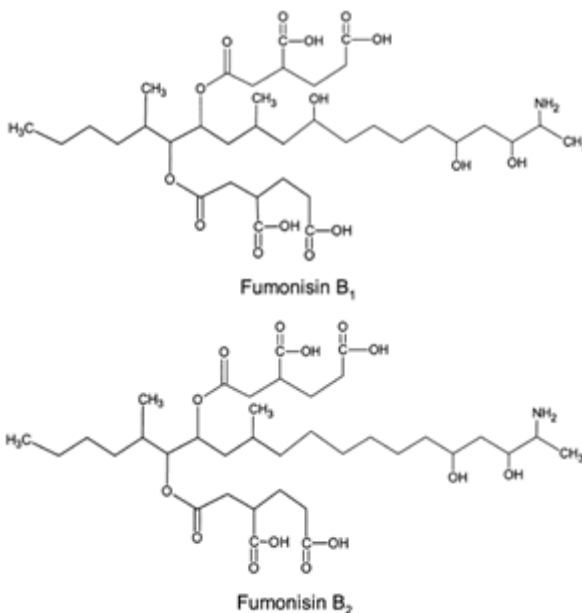
País	Amostras			Contaminação (µg/kg)				Método	Referências
	Ano	Número	Média	Variação	LOD	LOQ (%)			
<b>Fumonissina</b>									
Brasil	2004	1	37.6	NA	NI	NI	100	LC	Zlotowski et al.,(2004)
Portugal	2010	82	630.7	66.6-3815.5	50	NI	32.9	LC	Martins et al.( 2011)
Brasil	2011	753	1849.1	NI	NI	NI	97.5	LC	Horn et al.(2011)
Brasil	2006	6	0.291	0.164-0.348	0,5	1,0	66.7	LC	Nones e Scussel (2010)
<b>Zearalenona</b>									
Portugal	NI	30	NI	104-356	50	NI	13	TLC	Martins et al.(2008)
Lituânia	1999	25	32	NI- 77	10	NI	32	LC	Garaleviciene,et al. (2002)
Argentina	2005	240	ND	ND	100	NI	ND	TLC	Pereyra et al.(2008)
Argentina	2008	10	ND	ND	100	NI	ND	LC	Pereyra et al.(2010)
Brasil	2010	105.509	74.1	NI-17,000.0	NI	NI	29.8	NI	Mallmann e Dikin (2011)
<b>Aflatoxinas</b>									
Brasil	2004	1	6140	NA	NI	NI	100	LC	Zlotowski et al.( 2004)
Brasil	2011	753	5.11	NI	NI	NI	67.9	ELISA	Horn et al.(2011)
<b>Ocratoxina</b>									
Brasil	2006	26	NI	36-120	0.4	NI	31	LC	Rosa et al.( 2009)
Itália	2009	8	NI	0.43-38.4	0.1	1	100	LC	Pozzo et al. (2010)
Polônia	1999	40	NI	ND-13.5	NI	NI	37.5	LC	Kotowski et al.(2000)

LOQ limite de detecção; LOD limite de detecção; NI não informado; NA não aplicado; ND Não detectado; LC cromatografia líquida; ELISA teste imunoenzimático; TLC cromatografia de camada delgada.

### 2.3.2 Fumonisin

Quimicamente, as fumonisinas (FBs) são aminopolióis de cadeia longa ( $C_{34}H_{59}NO_{15}$ ) esterificada no  $C_{14}$  e  $C_{15}$  com dois grupos de ácido tricarbóxico (Figura 3) (CASADO et al., 2001; WAŚKIEWICZ; BESZTERDA; GOLÍŃSKI, 2012). Existem várias FBs identificadas, mas fumonisinas  $B_1$  ( $FB_1$ ) e fumonisinas  $B_2$  ( $FB_2$ ) são os mais importantes e constituem até 70% das FBs encontradas em alimentos naturalmente contaminados (NIDERKORN et al., 2009). Espécies fúngicas do gênero *Fusarium* especialmente por *F. verticillioides* são as principais produtoras destas toxinas (GRENIER et al., 2012).

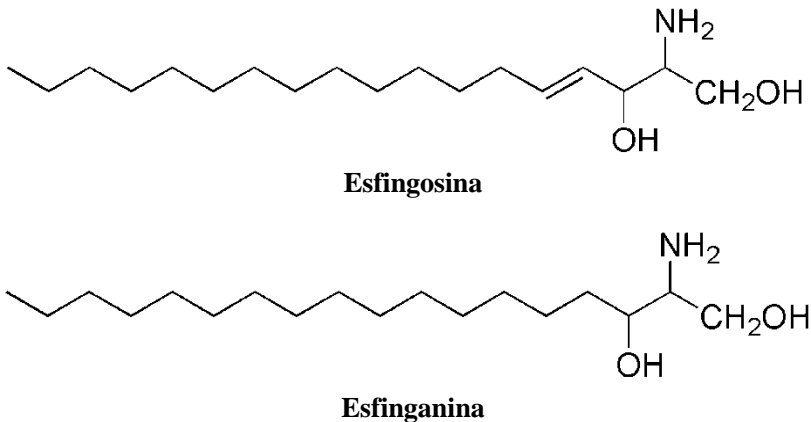
Estas substâncias são pouco absorvidas e rapidamente excretadas pelo organismo animal, possuem efeito hepatotóxico, renal e nefrotóxico (GAZZOTTI et al., 2011, GRENIER et al., 2012). As dietas contaminadas por FBs, destinadas a suínos, provocam inapetência e depressão, induzindo toxicidade cardiovascular e edema pulmonar (LOVATTO et al., 2007; BRYDEN, 2012). O coração e pâncreas também podem ser afetados por dietas contendo FBs (DILKIN et al., 2010).



**Figura 3.** Estrutura das fumonisinas (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

O consumo de dietas contaminadas por FBs podem causar a redução do ganho de peso em diferentes espécies animais. Delgado e Wolt (2011) verificou que leitões alimentados com 1000 µg de FB<sub>1</sub>/kg diminuíram o ganho de peso diário em até 8%.

A FB<sub>1</sub> é estruturalmente semelhante a esfingosina e esfinganina (Figura 4) e é conhecida por inibir a enzima ceramida e interferir na biossíntese de esfingolípídios (LALLÈS et al., 2010; GRENIER et al., 2012). A inibição da biossíntese de esfingolípídios pode ter um profundo efeito sobre a célula, uma vez que estes componentes têm um importante papel na estrutura da membrana celular, comunicação celular, na interação intracelular e na matriz celular e na regulação de fatores de crescimento.



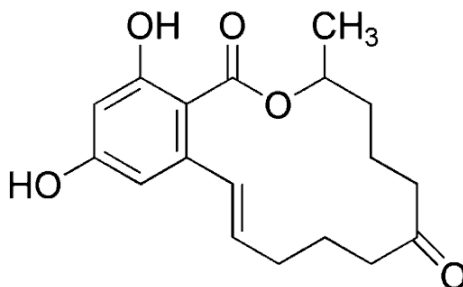
**Figura 4.** Estrutura química da esfinganina e esfingosina.

### 2.3.3 Zearalenona

Zearalenona (ZON) é uma micotoxina produzida por espécies de fungos do gênero *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearu*, *F. tricinctum*) (GAJECKA et al., 2011). Quimicamente é uma lactona macrocíclica (Figura 5) que exhibe fluorescência azul em comprimentos de onda de luz ultravioleta de 360 nm e uma fluorescência verde muito intensa quando excitada com comprimento de onda de 260 nm (AGAG, 2004). É estável durante o armazenamento, moagem e não se decompõe quando exposta a temperaturas elevadas (ATOUI et al., 2012).



Diferentes espécies animais, incluindo o homem, podem adquirir problemas pelo consumo de alimentos contaminados pela ZON. O sistema reprodutivo é o principal alvo da toxicidade da ZON (MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008), sendo que o suíno é a espécie mais sensível. Esta toxina age como hormônio feminino, pois altera a produção de estrogênio do organismo animal (SCUSSEL, 1998).



**Figura 5.** Estrutura química da zearalenona.

O efeito estrogênico da ZON em marrãs e porcas inclui abortos, falso cio, aumento do número de fetos natimortos e mumificados - Figura 6- (ZAIN, 2011). Pode também ser observado inchaço da vulva e glândulas mamárias, falsa prenhez e intervalo de estro prolongado (FINK-GREMMELS; MALEKINEJAD, 2007; BRIONES-REYES; GÓMEZ-MARTINEZ; CUEVA-ROLÓN, 2007; MIZUTANI; NAGATOMI; MOCHIZUKI, 2011).

Em leitões a necrose do rabo, aumento das mamas, prolapso retal/vaginal e *splay-leg* são os sintomas mais comumente observados (MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2005). A redução da libido, diminuição do peso testicular e alteração da motilidade espermática são os sintomas verificados em machos reprodutores suínos (SCUSSEL, 1998; BENZONI et al., 2008).



(a)



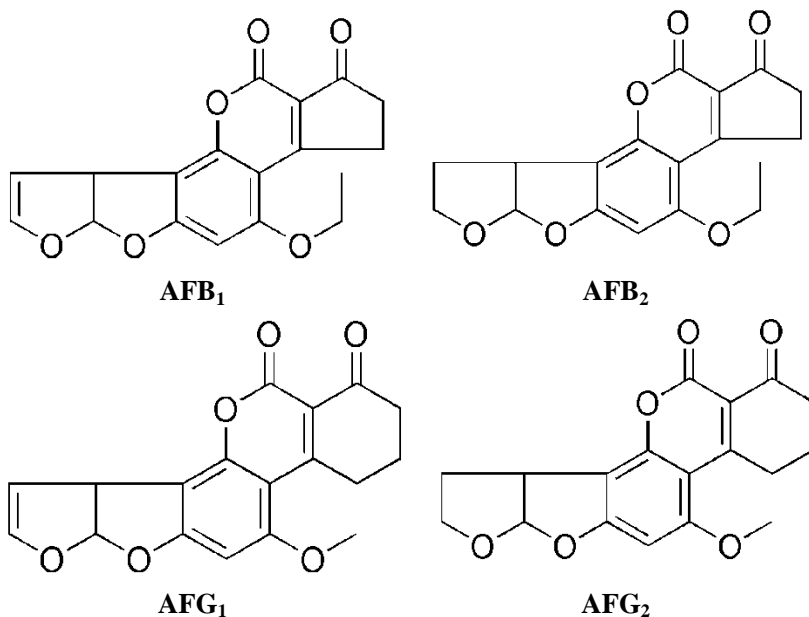
(b)

**Figura 6.** Efeito da zearalenona no nascimento de leitões (a) mumificados (b) natimortos (Fonte: do autor).

### 2.3.4 Aflatoxina

As aflatoxinas (AFLs) são produzidas por fungos do gênero *Apergillus*, *A.flavus* e *A. parasiticus* (ALDRED; MAGAN; OLSEN, 2004; KARAMI-OSBOO et al., 2012), possuem potencial carcinogênico, mutagênico, imunossupressor e teratogênico (ALAM et al., 2010).

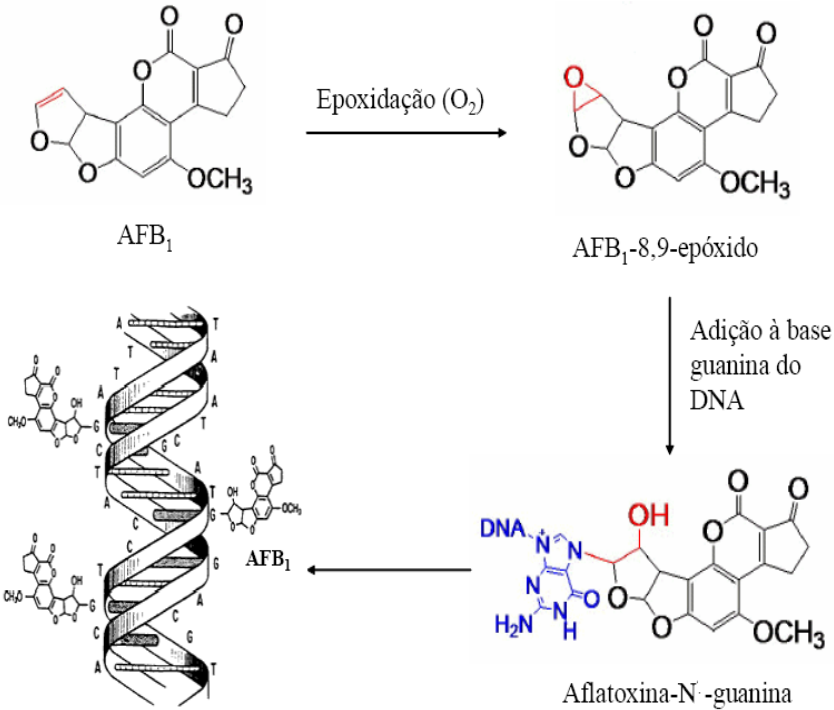
A estrutura química deste grupo é caracterizada pela ligação de dihidrofurano ou tetrahydrofurano a uma estrutura cumarínica (KAWASHIMA, 2004). As principais AFLs conhecidas são denominadas de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Figura 7), classificadas com base na fluorescência delas sob luz ultravioleta (UV) e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada.



**Figura 7.** Estruturas químicas das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

O metabólito mais importante é a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), devido à sua elevada hepatotoxicidade e maiores concentrações nos substratos. A forma ativada da AFB<sub>1</sub> é o composto identificado como 8,9-epóxido de

AFB<sub>1</sub>, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB<sub>1</sub> (Figura 8).



**Figura 8.** Mecanismo de ação da aflatoxina B<sub>1</sub> (HAYASHI, 2007)

Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas.

A ligação da AFB<sub>1</sub>-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB<sub>1</sub>. As AFLs possuem efeito hepatotóxico, carcinogênico e imunotóxico, sendo o fígado o órgão alvo da ação da aflatoxicose. Suínos e caninos são as espécies mais sensíveis, sendo normalmente animais jovens os mais afetados (YU et al., 2005; ZLOTOWSKI et al., 2004). Os principais sinais clínicos são a perda de apetite, letargia, fraqueza e morte (MALLMANN; DIKIN, 2011).

A redução da capacidade reprodutiva, conversão alimentar, taxa de crescimento e ganho de peso são também sintomas observados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Exposição de diferentes animais aos efeitos tóxicos das aflatoxinas

<b>Animal</b>	<b>Nível (µg/kg)</b>	<b>Efeitos tóxicos</b>	
<b>Frangos</b>	5 a 10	Necrose hepática, hemorragia, morte	
	2,5	Hemorragia, redução do crescimento	
	600	Hematomas, redução da resistência a doenças	
	>250	Possível redução da função do sistema imunológico	
<b>Suínos</b>	10 a 20	Hemorragia e lesão hepática aguda	
	2 a 4	Danos hepáticos, crescimento lento. Múltiplas exposições podem acarretar em morte	
	800	Subaguda e pode ser letal. Necrose hepática, icterícia, hemorragias e fibrose hepática acompanhada de crescimento lento e falta de apetite	
	200 a 500	Redução do crescimento, supressão do sistema imunológico, redução da resposta a vacinas	
<b>Bovinos</b>	10 a 20	Icterícia, hemorragias, necrose hepática. Morte em 1-2 semanas	
	Leiteiro	2 a 4	Redução da produção de leite, disfunção ruminal. Resíduos de AFLs no leite.
	Bezerros	200	Exposição de 2 a 4 semanas pode causar redução do ganho de peso, hemorragias e possível supressão imunológica

Oswailer (2005)

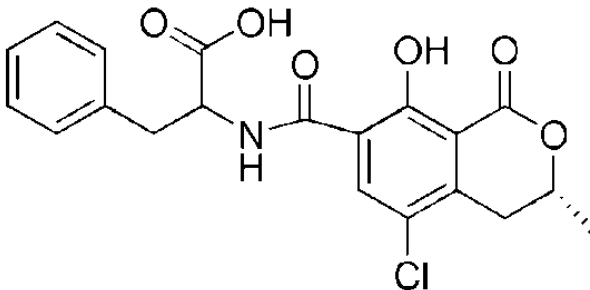
### 2.3.5 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) é produzida por fungos do gênero *Penicillium verrucosum* e por várias espécies de *Aspergillus*, como *A.*

*ocraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius* - Figura 9 - (DUARTE; PENA; LINO, 2010;AFSAH-HEJRI; JINAP; MIRHOSSEINI, 2012). O rim é o órgão alvo da ação da OTA, sendo suínos e aves as espécies mais afetadas.

A biossíntese da OTA pode ser influenciada por fatores intrínsecos, tais como pH, umidade e composição do substrato, bem como fatores extrínsecos, tais como temperatura (KHALESÍ; KHATIB, 2011).

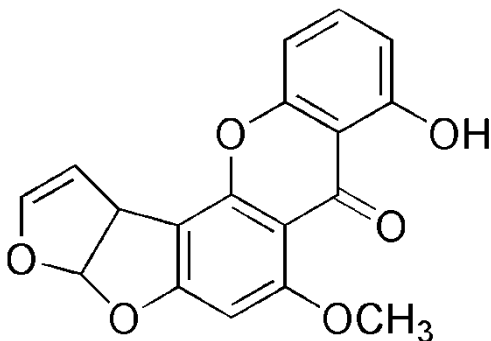
O mecanismo de ação tóxica da OTA é experimentalmente atribuído à inibição competitiva de enzimas da cadeia respiratória celular como a ATPase e o succinato desidrogenase, e da citocromo C oxidase (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Hussein e Brasel (2001) citam ainda que a OTA tem como outro mecanismo de ação a interrupção da síntese proteica através da ação competitiva do fenillaloniil-tRNA sintetase.



**Figura 9.** Estrutura química da ocratoxina A.

### 2.3.6 Esterigmatocistina

A esterigmatocistina (EST) é um intermediário na biossíntese de AFLs e é muito semelhante a AFLs em sua estrutura química e atividade biológica (Figura 10). Ela está quimicamente relacionada à AFLs por conter um grupo dihidrofurano condensado ligado à porção xantonica (SCOTT, 1994; SCUSSEL,1998). A proliferação dos ductos biliares, hemorragia, necrose renal e hepática são os principais sintomas observados nos animais contaminados com esta micotoxina (SCUSSEL,1998). Pode também apresentar efeitos carcinogênicos e hepatogênicos, porém não é tão tóxica quando comparada a AFB<sub>1</sub>.

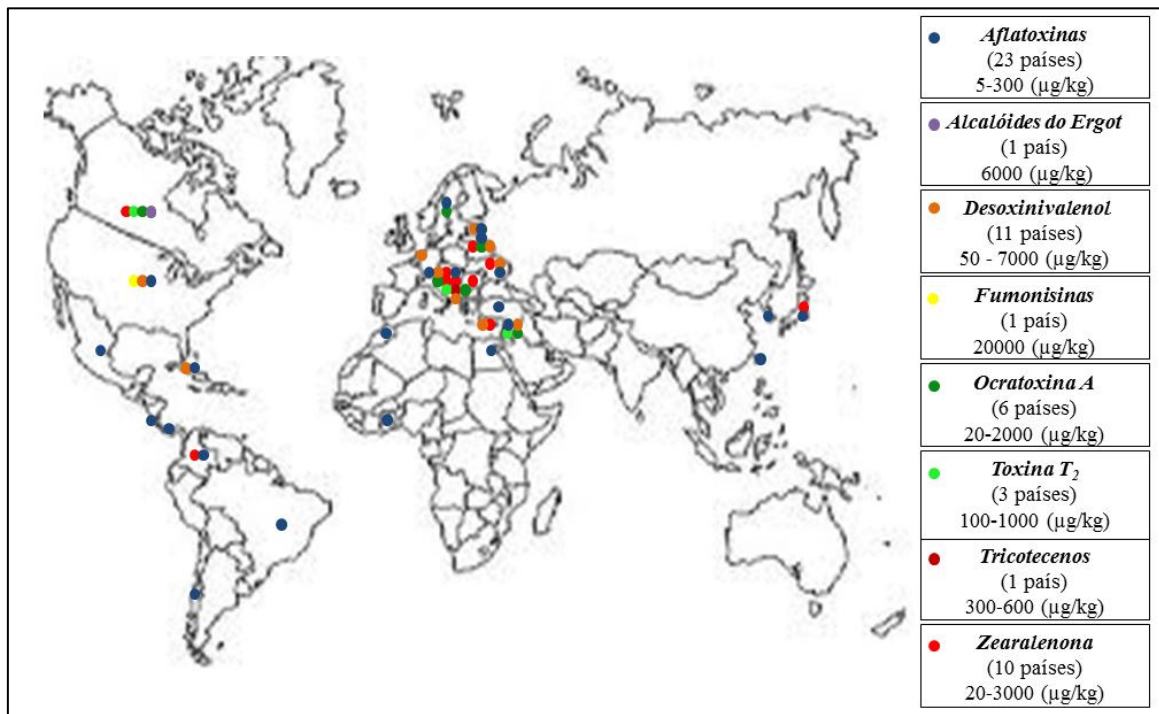


**Figura 10.** Estrutura química da esterigmatocistina.

### 2.3.7 Legislação para micotoxinas em rações para suínos

Para evitar os efeitos nocivos das micotoxinas na alimentação animal e humana, várias legislações têm sido adotadas em diferentes nações. Considerando diferentes matrizes alimentares, aproximadamente 100 países possuem legislação específica para estes contaminantes (ZAIN, 2011).

No Brasil, foram recentemente estabelecidos os limites toleráveis para: AFLs ( $AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$  e  $AFM_1$ ), OTA, desoxivalenol (DON), FBs ( $FB_1 + FB_2$ ), patulina (PTL) e ZON, presentes em alimentos comercializados para a alimentação humana (BRASIL, 2011). Com relação à alimentação animal, o Ministério da Agricultura (BRASIL, 1988) estabeleceu que para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal o limite máximo de AFLs presente pode ser de  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  de  $AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$ .



Adapta: FAO (2004)

**Figura 11.** Legislação para micotoxinas encontradas em ingredientes e rações para suínos de diferentes países.



Aproximadamente 30 países localizados no continente europeu, asiático, africano e americano possuem legislações para diferentes micotoxinas presentes em ingredientes e rações destinadas a suínos (Figura 11). Os níveis permitidos nestes diferentes países, de AFLs, alcalóides do Ergot, DON, FBs, OTA, toxina T<sub>2</sub>, tricotecenos e ZON variam de 5 a 20000 µg/kg.

As legislações levam em conta critérios como a idade, peso e sexo do animal. Geralmente animais mais jovens possuem maior sensibilidade e os limites recomendados são inferiores e mais criteriosos (YU et al., 2005). As fêmeas também são mais afetadas pelos efeitos de micotoxinas, e países como Canadá, Lituânia e Ucrânia estabeleceram limites próprios para estes animais. Aproximadamente 30 países aderiram critérios quanto à quantidade de AFLs na alimentação de suínos, estabelecendo limites de 5 a 300 µg/kg. A maior adoção dessa legislação se deve a maior quantidade de estudos realizados, tanto para a alimentação humana e animal e também por se tratar da primeira micotoxina a ser descoberta (SILVA et al., 2008).

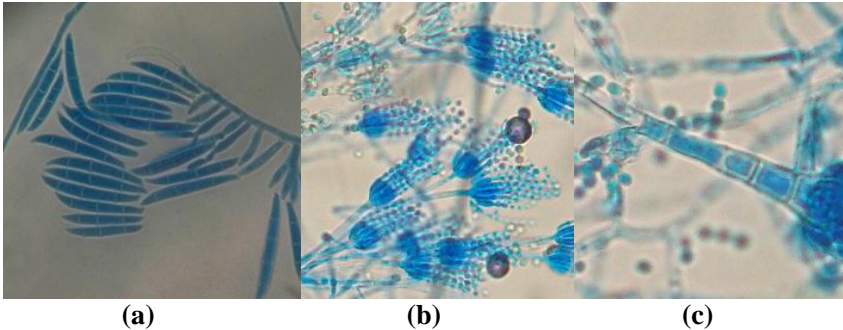
## 2.4 Fungos *versus* rações para suínos

Fungos são microrganismos multicelulares e filamentosos que, ao infestarem os grãos e alimentos, podem produzir substâncias tóxicas, as micotoxinas. A estrutura dos fungos é formada por filamentos denominados hifas que, em conjunto, formam o micélio. O micélio pode ter duas funções distintas: promover a fixação do bolor no substrato e promover a reprodução, através da produção de esporos.

Os fungos toxigênicos podem crescer tanto no campo, durante a colheita e armazenamento, sendo do gênero *Fusarium* (pré-colheita), *Penicillium* (pós-colheita) e *Aspergillus* (pré/pós-colheita) os mais encontrados em diferentes matrizes (CORCUERA et al., 2011). Na Figura 12 são apresentados os fungos mais encontrados.

Fatores ambientais como temperatura, umidade, pH e atividade de água podem propiciar a sua produção (GARCIA et al., 2011). Umidade e temperatura tem uma grande influência sobre o crescimento de fungos e sobre a produção de micotoxinas (BRYDEN, 2012). Alguns destes fatores de crescimento fúngico em alimentos são (PITT; HOCKING, 1997):

*Temperatura:* de forma geral, os fungos apresentam baixa resistência ao calor. A temperatura ótima de crescimento encontra-se na faixa de 25 a 28 °C;



**Figura 12.** Principais fungos produtores micotoxinas (a) *Fusarium* (b) *Penicillium* (c) *Aspergillus* (Fonte: do autor).

*Atividade de água:* significa a quantidade de água em um alimento, não comprometida com ligações químicas. Os fungos de campo só crescem com elevada atividade de água ( $>0,90$ ), como é o caso do gênero *Fusarium*. Os fungos capazes de crescer com atividade de água  $<0,85$  são caracterizados como fungos de armazenamento, estando inseridos nessa classificação os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*;

*pH:* esse é um fator que afeta pouco os fungos, visto que apresentam uma tolerância bem maior a variações (3,0 a 8,0), quando comparados a bactérias;

*Atmosfera de armazenamento:* a maior parte dos problemas de deterioração de alimentos por fungos filamentosos ocorre na presença de oxigênio. Elevadas concentrações de gás carbônico diminuem o crescimento fúngico;

*Características nutricionais:* o metabolismo fúngico é favorecido nos substratos ricos em carboidratos. Na Tabela 5 podem ser observadas as principais características para o desenvolvimento fúngico e produção da FBs, ZON, AFLs e OTA.

**Tabela 5.** Principais características relacionadas com a produção de fungos e de micotoxinas

Micotoxinas	Fungos	Características ideais para o desenvolvimento			Referências
		Temperatura (min-max °C)	Aw	Umidade Relativa (%)	
FBs	<i>Fusarium verticillioides F. proliferatum</i>	22,5 -27.5	0,87	85 -90	SAMSON et al., 2004
ZON	<i>F. graminearum F. culmonorum F. tritinctum F. oxysporum F. avenaceum</i>	21-30	0,87-0,09	85 -90	SAMSON et al., 2004
AFLs	<i>Aspergillus flavus A.parasiticus A. nomius</i>	6-45	0,78-0,87	83-85	MALLOZZI e CORRÊA 1998; HUSSEIN e BRASEL 2001 YU et al., 2005
OTA	<i>A.ochraceus Penicillium vernicosum P. veridicatum</i>	12-37	0.76-0.83	80 -90	BAKKER,1999; SAMSON et al., 2004

FBs: fumonisinas; ZON: zearalenona; AFLs: aflatoxina; OTA: ocratoxina A

Além da produção de toxinas, outros danos podem ser causados pela ação dos fungos, como aparecimento de sabores e odores indesejáveis, os quais diminuem a palatabilidade e prejudicam o consumo pelos animais. Além disso, estas substâncias são capazes de reduzir o valor nutricional dos alimentos, uma vez que, os organismos vivos, utilizam-se dos nutrientes do alimento para seu próprio sustento (BÜNZEN; HAESE, 2006). Nas plantas e em seus grãos, provocam redução do potencial de germinação, descoloração, reduções nos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de açúcares totais (JULIATTI et al., 2007).

#### 2.4.1 Identificação de fungos toxigênicos

A detecção, quantificação e identificação dos fungos em alimentos e *commodities* agrícolas é essencial para se compreender e prever o fenômeno da produção de micotoxinas. A identificação dos fungos toxigênicos que colonizam os alimentos é baseada em suas estruturas morfológicas e estruturas reprodutivas (SANTOS et al., 2010). Apesar dos avanços recentes na taxonomia fúngica, os métodos tradicionais de diagnóstico utilizados na identificação micológica de rotina alimentar são baseados em características macroscópicas e microscópicas, através da realização de culturas de fungos em meios apropriados (OLIVERI; TORTA; CATARA, 2008).

Para identificação das estruturas, os fungos isolados devem ser cultivados em meios de cultura apropriados e corados com técnicas capazes de propiciar a manutenção e melhor observação das estruturas. Em muitos casos, pode não ocorrer a produção de estruturas reprodutivas, sendo necessário assim alterar as condições de cultivo.

***Aspegillus:*** é um fungo filamentosos que possui várias estruturas de hifas septadas, irradiando conídios em sua vida assexuada (PAN et al., 2011). O gênero apresenta conídio eretos, simples, com uma vesícula dilatada, globosa ou clavada na sua extremidade. Algumas espécies podem ser facilmente distinguidas, enquanto outras são identificadas com maior dificuldade (YOKOYAMA et al., 2001).

***Penicillium:*** no gênero *Penicillium*, os esporos assexuais produzem numa estrutura típica do gênero designada de *penicillus* (*penicilli*, que em latim significa pincel). A dificuldade de taxinomia e identificação prende-se com a variabilidade inerente do gênero. Admite-se que cerca de 70 a 80% das estirpes são identificáveis morfológicamente com confiança (MACHADO, 2006).

***Fusarium*:** o gênero *Fusarium* é caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta a purpura escuro ou do creme a laranja), com micélio aéreo e difuso (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980). Morfologicamente, fungos do gênero *Fusarium* são de difícil identificação (CHANDRA et al., 2011). A esporulação envolve a produção de vários tipos de esporos, como: macroconídios, microconídios, clamidósporos e fragmentos de hifas. Dependem ainda do tamanho e da forma da espécie envolvida (CHAMPEIL; DORÉ; FOURBET, 2004). Algumas espécies são particularmente comuns no solo, onde podem persistir sob a forma de clamidósporos ou como hifas, enquanto outras espécies produzem conídios disseminados pelo ar, colonizando normalmente ramos, folhas, inflorescências e frutos (MENEZES et al., 2010).

## **2.5 Medidas de controle na proliferação de fungos e produção de micotoxinas**

Os alimentos são frequentemente colonizados por cepas toxigênicas de fungos, durante o cultivo, armazenamento e processamento, levando a perdas na qualidade da produção e no valor nutricional dos alimentos (PRAKASH et al., 2012). Por isso, são necessários cuidados com relação ao controle do crescimento fúngico, a fim de reduzir a deterioração e a produção de toxinas. A forma mais eficaz para prevenir os problemas causados por micotoxinas é evitar que o fungo cresça sobre o substrato. Para atingir tal objetivo, medidas preventivas devem ser adotadas, como: desenvolvimento de variedade resistentes, técnicas agrícolas adequadas (cultivo, manuseio durante a colheita, secagem), métodos eficientes de armazenagem e transporte (SCUSSEL, 1998).

*Desenvolvimento de variedades de grãos resistentes:* grãos com pericarpo mais resistente apresentam maior resistência à penetração e proliferação de fungos e, conseqüentemente, a produção de micotoxinas é dificultada ou suprimida (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009)

*Técnicas agrícolas adequadas:* A utilização de agrotóxicos deve ser feita corretamente, uma vez que fungos podem desenvolver resistência a estes compostos (MOURÃO et al., 2003). O sistema de irrigação deve ser controlado, pois esta pode manter a umidade relativa elevada, disseminando diferentes espécies fúngicas. Além disso, a colheita deve ser realizada em dias secos para evitar a absorção de umidade (SCUSSEL, 1998).

*Métodos eficientes de armazenamento:* a correta secagem dos grãos antes do armazenamento é de fundamental importância para a manutenção da qualidade do grão (GUTKOSKI, 2000). Medidas devem ser controladas como, a temperatura, umidade relativa e presença de insetos (ZAIN, 2011). A boa aeração do local de armazenagem assegura a temperatura e umidade uniformes, evitando a formação de bolores.

*Iluminação:* o comprimento de onda da luz e sua intensidade podem alterar o metabolismo secundário de espécies produtoras de toxina, inclusive ocasionar sua inibição (SCHMIDT-HEYDT et al., 2011). Foi demonstrado que a luz em geral, e luz vermelha e azul, em particular, tem propriedade de inibição no crescimento e na biossíntese da toxina, especialmente de espécies produtoras de OTA (FANELLI et al., 2012).

*Limpeza:* o armazenamento deve ser realizado em local limpo e bem ventilado, podendo ser feito em diferentes silos ou em sacas. A limpeza dos grãos também é uma prática preventiva que deve ser utilizada. Grãos sujos contêm mais micotoxinas que grãos limpos, já que os fungos tendem a crescer em grãos sujos e danificados (BÜNZEN; HAESE, 2006). Produtos danificados por insetos ou mesmo mofados não devem ser misturados com grãos sadios, porque o material infestado com fungo pode servir como foco de contaminação do lote inteiro.

*Métodos de descontaminação:* estratégias de descontaminação de alimentos contaminados já vem sendo utilizadas, por meio de métodos químicos, físicos e biológicos, evitando assim perdas econômicas e melhorando a qualidade do produto (MORENO et. al., 2000). Existem programas de descontaminação que visam controlar o desenvolvimento de fungos em grãos armazenados, como o uso do amoníaco, bissulfito de sódio, formaldeído e ácido ascórbico. A utilização de ozônio, como método de degradação de fungos e micotoxinas também vem sendo empregado em diferentes matrizes alimentares (FARAG et al., 2006; OZTEKIN; ZORLUGENC; ZORLUGENC, 2006; GIORDANO; NONES; SCUSSEL, 2012).

Para o combate de fungos e de micotoxinas, é importante considerar o a relação custo/benefício, visto que os resultados podem ser variáveis e ainda alguns produtos podem promover a redução da palatabilidade (BÜNZEN; HAESE, 2006).

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARNINK, A.J.A.; VERSTEGEN, M.W.A. Nutrition, key factor to reduce environmental load from pig production. **Livestock Science**, n.1-3, v.109, p.194-203, mai. 2007.

ABIEPCS – Associação Brasileira da Indústria Processadoras e Exportadoras de Carne Suína. Carne Suína: avaliação dos resultados de 2010 e perspectivas para 2011. Disponível em: [www.abiepcs.org.br](http://www.abiepcs.org.br). Acesso em: 13 jun. 2012.

AFFSAH-HEJRI, L.; JINAP, S.; MIRHOSSEINI, H. Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions. **Food Control**, n.1, v. 23, p. 113-119, jan.2012.

AGAG, B.I. Mycotoxins in foods and feeds zearalenone. **Ass. Univ. Bull. Environ. Res.** v.7, p.159-176, out. 2004.

ALAM, S.; SHAH, H.U.; MAGAN, N.; QAZI, J.I.; ARIF, M. Effects of calcium propionate and water activity on growth and aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus*. **Pakistan Journal of Zoology**, n.1, v.42, p. 57-62, 2010.

ALBUQUERQUE, D. M. N. **Resíduo desidratado de cervejaria para suínos em crescimento e terminação**. 2009. 27f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Programa de pós-graduação em ciência animal, UFP, Piauí.

ALDRED, D.; MAGAN, N.; OLSEN, M. The use of HACCP in the control of mycotoxins: the case of cereals. In: *Micotoxins in Food: detection and control*, Woodhead Publishing, 2004.

ALMEIDA, A.V.A.F.; BOTURA, M.B.; ABREU, R.D.; BITTENCOURT, T.C.C.; BATATINHA, M.J. M. Ocorrência de Aflatoxinas em milho destinado a alimentação de aves no estado da Bahia. **Arquivo Instituto Biológico**, n.3, v.76, p. 353-358, jul, 2009.

ANGONESE, A.R.; CAMPOS, A. T.; ZACARKIM, C. E.; MATSUO, M. S.; CUNHA, F. Eficiência energética de sistema de produção de suínos com tratamento dos resíduos em biodigestor **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, n.3,v.10, p.745–750, dez. 2006.

AROUCA, C. L. C. **Exigências de fósforo disponível para suínos selecionados geneticamente para deposição de carne em diferentes fases de crescimento, dos 15 aos 120 kg.** 2008. 81f. Tese (Doutor em Veterinária) – Programa de pós-graduação em medicina veterinária, UFMG, 2008.

ASSIS, F.O. Poluição hídrica por dejetos de suínos: um estudo de caso na área rural do município de Quilombo, Santa Catarina. 2006. 182f. Dissertação (Mestre em Geografia), Programa de pós-graduação em geografia, UFPR, 2006.

ATOUI, A.; EL KHOURY, A.; KALLASSY, M.; LEBRIHI, A. Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. **International Journal of Food Microbiology.** n.1-2, v.154, p.59-65, mar. 2012.

BAKKER-ARKEMA, F. W. CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume IV Agro-Processing Engineering, In: American Society of Agricultural Engineers. 1999.

BARROS, R. **Efeito da vitamina D ativada no desempenho zootécnico e qualidade óssea de suínos.** 2010. 57f. Dissertação (Mestre em Veterinária) – Programa de pós-graduação em ciências veterinária, UFPR, Curitiba.

BASSI, M. S.; LADEIRA, M. M.; CHIZZOTTI, M. L.; CHIZZOTTI, F. H. M.; OLIVEIRA, D. M.; MACHADO O. R.; CARVALHO, J. R. R.; NOGUEIRA, A.A. Grãos de oleaginosas na alimentação de novilhos zebuínos: consumo, digestibilidade e desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n.2, v.41, p.353-359, sep. 2012.

BELLAVER, C. Produção animal e qualidade de vida em sociedades em transição. In: I conferencia virtual internacional sobre qualidade da carne suína. Concórdia. Embrapa: suínos e aves. 2000.

BELLAVER, C. Ingredientes de Origem Animal Destinados à Fabricação de Rações. 2001. Disponível em: [http://www.fiesp.com.br/sindicato/sincobesp\\_08/](http://www.fiesp.com.br/sindicato/sincobesp_08/) Acesso em: 06 nov. 2011.



BENZONI, E.; MINERVINI, F.; GIANNOCCARO, A.; FORNELLI, F.; VIGO, D.; VISCONTI, A. Influence of *in vitro* exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine 16 sperm quality. **Reproductive Toxicology**, n.4,v.25, p.461-467, ago. 2008.

BINDER, E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology**, n.1 2, v. 133, p. 149-166, feb.2007.

BITTENCOURT, C.A.F.; OLIVEIRA, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, n.2, v. 16, p. 117-120, Feb. 2005.

BRASIL, A. P. R.; REZENDE, S. T.; PELÚZIO, M. C. G.; GUIMARÃES, V. M. Removal of oligosaccharides in soybean flour and nutritional effects in rats. **Food Chemistry**, v. 118, n.2, p. 251-255, set. 2009.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Limites para presença de micotoxinas em alimentos pela aplicação da Resolução RDC nº 07, de 18 de Fevereiro de 2011. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/e-legs](http://www.anvisa.gov.br/e-legs)>. Acesso em: 14 abril. 2011.

BRASIL, D. M. **Apontamentos sobre o valor do prejuízo ecológico: Alguns parâmetros da suinocultura em Braço do Norte**. 2002. 222f. Dissertação (Mestre em Geografia), UFSC, Florianópolis.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria MA/SNAD/SFA nº7 de 9 de Nov. de 1988. Diário Oficial da União, 9 nov. 1988. Sec. I, p. 21.968.

BRIONES-REYES D.; GÓMEZ-MARTINEZ L.; CUEVA-ROLÓN R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico. **Food Chemistry**, n.2, v. 100, p.693-698, dez. 2007.

BRYDEN, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, n.1-2, v. 173, p. 134-158, abr.2012.

BÜNZEN, S.; HAESE, D. Controle de micotoxinas na alimentação de aves e suínos, **Revista Eletrônica Nutritime**, n.1, v.3, p.299-304, fev. 2006.

BÜNZEN, S.; SALGUERO, S.; ALBINO, L. F.T.; ROSTAGNO, H. S. Recentes avanços na nutrição de suínos. In: Simpósio Brasil Sul de Suinocultura, Chapecó, 2008.

CAMPOS, J. A.; TINÔCO, I. F. F.; BAÊTA, F. C.; SILVA, J. N.; CARVALHO, C. S.; MAUIRI, A. L. Ambiente térmico e desempenho de suínos em dois modelos de maternidade e creche **Revista Ceres**, n.3, v.55, p.187-193, 2008.

CARTER, S. D.; CROMWELL, G. L. Influence of somatotropin on the phosphorus requirement of finishing pigs: II. Carcass characteristics, tissue accretion rate and chemical composition of the ham. **Journal of Animal Science**, n.2, v. 76, p. 596-605, fev. 1998.

CASADO, J.M.; THEUMER, M.; MASIH, D.T.; CHULZE, S.; RUBINSTEIN, H.R. Experimental subchronic mycotoxicosis in mice: individual and combined effects of dietary exposure to fumonisins and aflatoxin B<sub>1</sub>. **Food and Chemical Toxicology**, n.6, v.39, p. 579-586, jun. 2001.

CHAMPEIL, A.; DORÉ, T.; FOURBET, J.F. Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. **Plant Science**, n.6, v.166, p. 1389-1415, jun.2004.

CHANDRA, N.S.; WULFF, E.G.; UDAYASHANKAR, A.C.; NANDINI, B.P.; NIRANJANA, S.R.; MORTENSEN, C.N.; PRAKASH, H.S.. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. **Applied Microbiology Biotechnology**, n.5, v. 90, p. 1625–1639, abr.2011.

CORCUERA, L.A.; IBÁÑEZ-VEA, M.; VETTORAZZI, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; CERAINA, A.L. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney. **Journal of Chromatography B**, n.26,v. 879, p.2733-2740, set. 2011.

DANTAS, W. M. F.; RIBEIRO, J. D.; GUIMARÃES, J. D.; FARIAS, S. K.; GUIMARÃES, S. E. F.; SARAIVA, A.; OLIVEIRA, T. T. Perfil eletrolítico e peso corporal em suínos submetidos a dietas com diferentes teores de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.10, v.45, p.1205-1210, out. 2010.

DELGADO, J. E.; WOLT, J. D. Fumonisin B<sub>1</sub> Toxicity in Grower-Finisher Pigs: A Comparative Analysis of Genetically Engineered Bt Corn and non-Bt Corn by Using Quantitative Dietary Exposure Assessment Modeling. **International Journal of Environmental Research Public Health**. n.8,v.8, p.3180-3190, ago.2011.

DILKIN, P.; DIREITO, G.; SIMAS, M.M.S.; MALLMANN, C.A.; CORRÊA, B.. Toxicokinetics and toxicological effects of single oral dose of fumonisin B<sub>1</sub> containing *Fusarium verticillioides* culture material in weaned piglets. **Chemico Biological Interactions**, n.3,v. 185, p.157-162, mar. 2010.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of solil fungi. In: Academic Press, 1980.

DREW, M.D.; BORGESON, T.L.; THIESSEN, D.L. Processing of feed ingredients to enhance nutrient digestibility in finfish: a review. **Animal Feed Science and Technology**, n.2, v.138, p.118-136. out. 2007.

DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C.M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, n.2, v.27, p.187-198, abr. 2010.

FANELLI, F.; SCHMIDT-HEYDT, M.; HAIDUKOWSKI, M.; GEISEN, R.; LOGRIECO, A.; MULÈ, G. Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and FUM1 gene expression by *Fusarium proliferatu*. **International Journal of Food Microbiology**, n.1-2,v. 153, p. 148-153, fev.2012.

FAO, 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper No. 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

FARAG, R. S., RASHED, M. M., ABO-HGGER, A. A. A. Aflatoxin destruction by microwave heating. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, n.3, v. 47, p. 197-208. 2006.

FERREIRA, A.S.; LIMA, K.R.S. As raças nacionais de suínos serão extintas. **Ação Ambiental**. v.3, p.24-26, 2001.

FERRIS, J. T.; CASTELL, J.G.; TORNERO, O.B.; GIMENO, S.C. Micotoxinas y cancer pediátrico. **Revista Especial de Pediatría**, n.3, v.57, p.279-280, 2001.

FINK-GREMMELS, J., MALEKINEJAD, H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, n.3 4, v.137, p.326-341, out. 2007.

GAJECKA, M.; RYBARCZYK, L.; JAKIMIUK, E.; ZIELONKA L.; OBREMSKI, K.; ZWIERZCHOWSKI, W.; GAJECKI, M. The effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone on uterine histology in sexually immature gilts. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2011.

GARALEVICIENE, D.; PETTERSSON, H.; AGNEDAL, M. Occurrence of trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in cereals and mixed feed from central Lithuania. **Mycotoxin Research**, n.2, v. 18, p.1-13. 2002.

GARCIA, D.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. **International Journal of Food Microbiology**, n.1-2, v.153, p.21-27, fev.2011.

GAZZOTTI, T.; ZIRONI, E.; LUGOBONI, B.; BARBAROSSA, A.; PIVA, A.; PAGLIUCA, G. Analysis of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and their hydrolysed metabolites in pig liver by LC-MS/MS. **Food Chemistry**, n.4, v. 125, p. 1379-1384, abr. 2011.

GIORDANO, B. N. E.; NONES, J.; SCUSSEL, V. M. Susceptibility of the In-Shell Brazil Nut Mycoflora and Aflatoxin Contamination to

Ozone Gas Treatment During Storage. **Journal of Agricultural Science**, n. 8, v. 4, mai.2012.

GOFF, G. L.; NOBLET, J.; CHERBUT, C. Intrinsic ability of the faecal microbial flora to ferment dietary fibre at different growth stages of pigs. **Livestock Production Science**. n.1, v. 81, p.75-87, mai. 2003.

GOMES, J. D. F.; FUKUSHIMA, R. S.; PUTRINO, S. M.; GROSSKLAUS, C.; LIMA, G. J. M. M. Efeitos do incremento da fibra em detergente neutro na dieta de suínos sobre a morfologia dos órgãos digestivos e não digestivos. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, n. 2, v. 43, p. 202-209, 2006.

GONÇALVES L. M. F.; COSTA, F.A. L. Leptospiroses em suínos no Brasil. **Revista da Patologia Tropical**, n.1, v.40, p. 1-14, jan-mar, 2010.

GONZÁLES, F.H.D.; SILVA,S.C. Introdução a bioquímica clinica veterinária. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

GRENIER, B.; BRACARENSE A. P.F.L.; SCHWARTZ, H.E.; TRUMEL, C.; COSSALTER, A. M.; SCHATZMAYR, G.; KOLF-CLAUW, M.; MOLL, W.; OSWALD, I. P. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B<sub>1</sub> correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. **Biochemical Pharmacology**, n.10, v.83, p.1465-1473, mai. 2012.

GUTKOSKI, L. C. Composição química. In: Composição química, valor nutricional e processamento, 2000.

HAYASHI, L. **Anticorpo Monoclonal Anti-AFB1: Coluna de imunoafinidade e espectrofluorimetria para controle de qualidade de alimentos**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) - Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, UEL, Londrina.

HORN, M.; BORDIGNON, J.; ASSUNÇÃO, M.; LUCHTENBERG, R.; SCUSSEL, V. M. Zearalenone, Fumonisin and Aflatoxins Survey in in Swines Feed Produced in the South of Brazil. In: Mycored Argentina, 2011.

HUSSEIN S.; BRASEL J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, n.2, v. 167, p.101-134, out. 2001.

JHA, R.; OVEREND, D. N.; SIMMINS, P. H.; HICKLING, D.; ZIJLSTRA, R. T. Chemical characteristics, feed processing quality, growth performance and energy digestibility among wheat classes in pelleted diets fed to weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, n.1-2, v. 170, p.78-90, nov. 2011.

JORGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n 5, p. 550-554, jul. 1998.

JULIATTI, F. C.; ZUZA, J.L. M. F.; SOUZA, P. P.; POLIZEL, A. C. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de Fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, n.2, v. 23, p. 34-41, dez.2007.

KARAMI-OSBOO, R.; MIRABOLFATHY, M.; KAMRAN,R.; SHETAB-BOUSHEHRI, M.; SARKARI, S.; Aflatoxin B<sub>1</sub> in maize harvested over 3 years in Iran. **Food Control**, n.1, v. 23, p. 271-274, jan.2012.

KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidas e comercializadas em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 110f. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) - Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, UEC, Campinas.

KHALESI, M.; KHATIB, N. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n.2, v. 32, p.113-121, jun.2011.

KLASING, K.C. Researcher detail link between nutrition and disease status. **Feedstuffs**, Minnetonka, n.3, v.32, p.37-38, jan.1992.

KOPINSKI, J. Phosphorus for pigs. 2002. Queensland government, Disponível em: <http://www.dpi.qld.gov.au/pigs/4417>. Acesso em: 12 jun. 2012.

KÖPPEN, M.; KOCH, D.; SIEGEL S.; MERKEL R.; NEHLS, I. Determination of mycotoxins in foods: Current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.6, v. 86, p. 1595-1612, mai, 2010.

KOTOWSKI, K.; GRABARKIEWICZ, J. S; WASKIEWICZ, A.; KOSTECKI, M.; GOLINSKI, P. Ochratoxin A in porcine blood and in consumed feed samples. **Mycotoxin Research**, n.2, v. 16, p. 66-72, 2000.

LALLÈS, J.P.; LESSARD, M.; OSWALD, I.P.; DAVID, J.C. Consumption of fumonisin B<sub>1</sub> for 9 days induces stress proteins along the gastrointestinal tract of pigs. **Toxicon**, n.2-3 v. 55, p. 244-249, jul.2010.

LIMA, R. F.; GONÇALVES, M. B. F.; SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L.; ALMEIDA, H. S. L. Sistema laboratorial de fracionamento de carboidratos de concentrados energéticos. **Acta Scientiarum**, v. 28, n. 2, p. 215-221, 2006.

LOVATTO, P.A.; LEHNEN C.R.; CAVAZINI N.; BERTOLIN K.; HAUSCHILD L. Relação entre fumonisinas na dieta de leitões na creche e a ocorrência do vício de sucção, desempenho e características de alguns órgãos. **Ciência Rural**, n.4, v. 37, p. 1091-1096, jul. 2007.

MACHADO, A. P. S. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água**. 2006. 50 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia do Ambiente) - Programa de pós-graduação em Tecnologia do Ambiente, UM.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.F.; FINK-GREMMELS, J. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. **Veterinary Research**, n.5-6, v. 36, p.799-810, dez, 2005.

MALLMANN, C.A.; DIKIN, P. Mycotoxins and Mycotoxicoses in Swine. Special nutrients: the Mycotoxins specialist, 2011.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; WENTZ, I. Aflatoxinas - aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, v.24, n.3, p.635-643, maio/junho, 1994.

MALLOZZI, A.B.; CORRÊA, B. Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. **Boletim Técnico Instituto Biológico**, v.12, p.5- 26, 1998.

MANFIO, D.; MARTINS, M.; TONON, K. M. ; M. BEBER ; SCUSSEL, V. M. . Avaliação de micotoxinas em cereais, leguminosas e outros produtos alimentícios. In: XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2011, Ribeirão Preto.

MARIANTE, A. S.; CASTRO, S.T.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; PAIVA, S.T.; GERMANO, J.L. Pig biodiversity in Brazil. **Arch. Zootec.**, v.52, p.245-248, 2003.

MARTINS, H. M. L.; ALMEIDA, I. F.M.; CAMACHO, C. R.L.; SANTOS, S. M.O.; COSTA, J.M.G.; BERNARDO, F. M.A. Occurrence of fumonisins in feed for swine and horses Incidencia de fumonisinas en piensos para cerdos y caballos. **Revista Iberoamericana de micología**, 2011.

MARTINS, H.M; MARQUES, M.; ALMEIDA, I.; GUERRA, M.M.; BERNARDO, F. Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. **Mycotoxin Research**, n.1, v.24, p.19-23, 2008.

MELLAGI, A.P. G.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P. WENTZ, I. Influência do tamanho da leitegada, parição e presença de mumificados na duração da gestação em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.3, v.34, p. 307-311, 2006.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de *trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, n.1, v. 34, p.132 139, fev. 2010.

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Zearalenone and reproductive function in farm animals. **International Journal of Molecular Science**, n.12, v.9, p. 2570-2584, dez. 2008.

MIZUTANI, K.; NAGATOMI, Y.; MOCHIZUKI, N. Metabolism of Zearalenone in the Course of Beer Fermentation. **Toxins (Brasel)**, n.2,v.3, p 134-14, fev. 2011.



MORENO, M.E. Use of propionic acid salts to inhibit aflatoxin production in stores grains of maize. **Revista Agro ciência**, n.4, v.34, p.477-484, ago. 2000.

MOTA, K. C. N.; ATHAYDE, A. A. R.; FERREIRA DE PAULA, A. C. C.; LEITE, P. C.; VIANA, C. H. Utilização do mangarito (*Xanthosoma mafaffa* Schott) na dieta de suínos na fase de crescimento e terminação. In: Xii Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2012, Cuiabá.

MOURÃO, S. A.; VILELA, E. F.; ZANUNCIO, J. C.; ZAMBOLIM, L.; TUELHER, E. S. Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Neotropical Entomology**, n.1, v.32, p.103 106, jan. 2003.

NIDERKORN, V.; MORGAVI, D.; ABOAB, B.; LEMAIRE, M.; BOUDRA, H. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in binding of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, n.3, v.106, p. 977-985, mar. 2009.

NONES, J.; SCUSSEL, V.M. Avaliação da qualidade de ingredientes e rações para suínos em uma propriedade rural do norte de Santa Catarina fumonisinas. In: International Conference on Pet Food Quality & Safety & 14th National Mycotoxin Meeting Abstract Book, Florianopolis, 2010.

NRC – National Research Council. Nutrient Requirements of Swine, 10th Edition. National Academy Press, Washington, DC. 1998.

NUTRIFARMA – Ciência e Tecnologia e Nutrição Animal: Suinocultura. Disponível em: [www.nutrifarma.ind.br](http://www.nutrifarma.ind.br). Acesso em: 19 jun 2012.

OLIVEIRA, A.P.A.; NUNES, R.C.; RONER, M. N. B.; STRINGHINI, J.H.; RUFINO, L.M.; FARIAS, L. A. Desempenho e avaliação da carcaça em suínos alimentados Com rações de terminação com fitase associada à retirada de microminerais, vitaminas e fósforo inorgânico. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 775-783, out./dez. 2010.

OLIVERI, C.; TORTA, L. CATARA, V. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from

vineyards in Sicily. **International Journal of Food Microbiology**, n.1-2, v. 127, p.147-154, set. 2008.

OSWEILER, W. Aflatoxins and animal health. In: Iowa State University, 2005.

OZTEKIN, S.; ZORLUGENC, B.; ZORLUGENC, F. K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. **Journal Food Engineering**, n.3, v.75, p.396-399, 2006.

PAN, Y. L.; CHOW, N.H.; CHANG, T.C.; CHANG, H.C. Identification of lethal *Aspergillus* at early growth stages based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, n.3, v.70, p. 344-354, jul. 2011.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botânica Brasileira**, n.4, v.23, p. 1129-1132, abr. 2009.

PERDOMO, C. C.; LIMA, G. J. M. M.; NONES, K. Produção de suínos e meio ambiente. In: Seminário nacional de desenvolvimento da suinocultura, Concórdia, 2001.

PEREYRA, C. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M.; DALCERO A. Fungi and mycotoxins in feed intended for sows at different reproductive stages in Argentina. **Veterinary Medicine International**. v. 2010, p.1-7. 2, jun.2010.

PEREYRA, G., PEREYRA, C.M., RAMIREZ, M.L., ROSA, C.A.R., DALCERO, A.M., CAVAGLIERI, L.R. Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentine. **Letters Applied Microbiology**, n.5, v. 46, p.555-561, mar. 2008.

PITT J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. In: Blackie Academic and Professional, 1997.

POROLNIK, G. V.; LOVATTO, P. A.; ROSSI, C.A. R.; LEHNEN, C. R.; GARCIA, G. G.; ANDRETTA, I. Produção de suínos inteiros com ou sem a suplementação de aminoácido desempenho e custo de alimento. **Ciência Rural**, n.2, v.42, p.340-345, feb. 2012.

POZZO, L.; CAVALLARIN, L.; NUCERA, D.; ANTONIAZZI, S.; SCHIAVONE, A. A survey of ochatoxin A contamination in feeds and sera from organic and standard swine farms in northwest Italy. **Journal of Science of Food and Agriculture**, n.9, v.90, p. 1467-1472, jul. 2010.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N.K. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. **International Journal of Food Microbiology**, n.1-2, v.153, p. 183-191, nov.2012.

QING-HUA, H.; YANG, X.; DAN, W.; MIN, K.; ZHI-BING, H.; YAN-PING, L. Simultaneous multiresidue determination of mycotoxins in cereal samples by polyvinylidene fluoride membrane based dot immunoassay. **Food Chemistry**, n.1, v.134, p.507-512, set. 2012.

REGINA, R. Nutrição Animal principais ingredientes e manejo de aves e suínos. Cargill, São Paulo, 2010.

REMUS, A.; ANDRETTA, I.; KIPPER, M.; LEHNEN, C. R.; LOVATTO, P. A. Zearalenona na alimentação de suínos e aves: estudos meta-analíticos. In: I congresso de ciência e tecnologia da UTFPR, Paraná, 2011.

RIBEIRO, A. M.L.; PINHEIRO, C.C.; GIANFELICE, M. Nutrientes que afetam a imunidade dos leitões. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.1, v.36, p. 119-124, 2008.

ROCHA, G. C.; DONZELE, J. L.; OLIVEIRA, R. F. M.; SILVA, F. C. O.; KIEFER, C.; BRUSTOLINI, P. C.; PEREIRA, C. M. C.; ALEBRANTE, L. Avaliação dos níveis de zeólita em dietas para suínos em fase de crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 1, v.41, jan. 2012.

ROPPA, L. Suinocultura mundial: situação atual e perspectivas. **Revista Porkworld**, v. 25, p. 20-35, 2005.

RODRIGUEZ, C.A.R.; HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B. Soro prevalência de anticorpos anti-parvovírus suíno em suínos do município de Uruará, Estado do Pará. **Arquivo Instituto Biológico**, n.4, v.70, p.501-503, dez. 2003.

ROIGÉ, M. B.; ARANGUREN, S. M.; RICCIO, M. B.; PEREYRA, S.; SORACI, A.L.; TAPIA, M. O. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, n.4, v. 26, p. 233-237, dez. 2009.

ROSA, C.A.R.; KELLER, K.M.; KELLER, L.A.M.; PEREYRA, M.L.G.; PEREYRA, C.M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI L.R, LOPES C.W.G.. Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. **Toxicon**, n.2, v. 53, p. 283-288, fev. 2009.

ROSTAGNO, H. S. Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais 3a Edição Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Zootecnia, 2011.

SAMSON, R.A.; HOCKSTRA, E. S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food and airborne fungi. Wageningen Press, Utrecht Ponson and Looyen, 2004.

SANTOS, C.; FRAGA, M. E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, v.161, p. 168-175, jan.2010.

SANTOS, S. P.; NUNES, R.C.; LOPES, E.L.; RONEI, M. N. B.; STRINGUINI, J.H.; OLIVEIRA, A. P. A.; RUFINO, L.M. Retirada do suplemento micromineral-vitamínico, redução de fósforo inorgânico e adição de fitase em rações de suínos na fase de terminação. **Ciência Animal Brasileira**, n.3, v. 9, p. 663-671, jul.2008.

SANTOS, Z. A. S.; FREITAS, R. T. F.; FIALHO, E. T.; RODRIGUES, P. B.; LIMA, J.A.F.; CARELLOS, D.C.; BRANCO, P. A. C.; CANTARELLI, V. S. Valor nutricional de alimentos para suínos determinado na Universidade Federal de Lavras. **Ciência e Agrotecnologia**, n.1, v.29, p.232-237, jan. 2005.

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

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. Produção de Suínos - Tipo Carne. **Boletim Técnico**, 2007.

SBARDELLA, M. **Óleo de arroz na alimentação de leitões recém desmamados**. 2011. 103f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Programa de pós-graduação Escola Luiz de Queiroz, ESALQ, São Paulo.

SCHMIDT-HEYDT, M.; RÜFER, C.; RAUPP, F.; BRUCHMANN, A.; PERRONE, G.; GEISEN, R. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. **International Journal of Food Microbiology**, n.1,v.145, p. 229-237, jan.2011.

SCOTT, M. *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. In: *Mycotoxins in Grain- Compounds Other than Aflatoxin*. 1994.

SCUSSEL, V. M.; LORINI, I. ; MIIKE, L. H. Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas. In: *Armazenagem de grãos*. 1 ed. v. 1, p. 739-756, 2002.

SCUSSEL. V. M. **Micotoxinas em Alimentos**, 1. ed. Florianópolis: Insular, 1998.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLLOS, D.; MORENO, M. A.; CARVALHO, L.F.O.S. **Clinica Veterinária e Sistemas Intensivos de Produção Suínos e Relatos de Casos Clínicos**. 1. Ed. Goiania: impresso do Brasil, 2001.

SEIFERT, S.; WATZL, B. Inulin and Oligofructose: Review of experimental data on immune modulation. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 256 259, 2007.

SERRA, R.M.A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação de com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. Tese de doutorado (Engenharia Química e Biológica), Universidade do Minho, Braga, Portugal.

SILVA, J. O.; CÂNDIDO, L. M. B.; NOVELLO, D. ; MACHADO, C. Ocorrência de aflatoxinas em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida

de alta eficiência. **Ciência agrotecnologia**, n.4, v. 32, p. 1238-1244, jul.2008.

SILVA, L. P. da. **Composição química de trigo e de aveia e efeito dos teores e proporções de fibra alimentar sobre a resposta biológica de frangos de corte e ratos**. 2002. 188f. Tese (Doutor em Zootecnia) - Programa de pós-graduação em Zootecnia, UFRS, Porto Alegre.

SILVA, J.R. **Processo decisório de compra de carne suína, observando a segurança alimentar e a qualidade do produto na cidade de Porto Alegre**. 154f. 2007. Dissertação (Mestre em Agronegócios) – Programa de pós-graduação em agronegócios, UFRGS, Porto Alegre

SMITH, O.B.; AKINBAMIJO, O.O. Micronutrients and reproduction in farm animals. **Animal Reproduction Science**, n.2,v.60-61,p.549-560, jul. 2000.

STAHLY, T. S. Nutrient needs for high lean pigs. Manitoba agriculture, food and rural initiatives, 2007. Disponível em: <http://www.gov.mb.ca/agriculture/livestock/pork/>. Acesso em: 12 jun. 2012.

TAVARES, S.G.; BROGIN, W.J.; MACEDO, C.A.B.; FACCHI, O.; DAMO, C.; NONES, J. Análise do Trânsito Inter e Intra estadual de Suínos Procedentes do Estado de Santa Catarina no Ano de 2011. In: III Conferência Nacional de Defesa Agropecuária, 2012, Salvador.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. The Mineral Nutrition of Livestock. 3rd edition. In: CABI Publisher, 1999.

VIEIRA, V.F. **Mapeamento do risco da poluição suinícola em águas superficiais como subsídio ao ordenamento territorial: um estudo de caso em Braço do Norte/SC**. 2006. 137f. Dissertação (Mestre em Gestão Territorial). Programa de pós-graduação em geografia, UFSC, Florianópolis.

VILANÇA, D. M. Importância da Nutrição Animal. 2010. Disponível em: <http://www.alcouro.com.br/noticias/11/06/2010/importancia-nutricao-animal> Acesso em: 25 jun. 2012.

WARRISS, P.D.; BROWN S.N. Bem-Estar de Suínos e Qualidade da Carne In:1ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína, Concórdia, 2000.

WAŚKIEWICZ, A.; BESZTERDA, M.; GOLIŃSKI, P. Occurrence of fumonisins in food-An interdisciplinary approach to the problem. **Food Control**, n.2, v.26, p. 491-499, ago. 2012.

YOKOYAMA, K.; WANG, L.; MIYAJI, M. NISHIMURA K. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene. **Microbiology Letters**, n.2, v.200, p. 241-246, jun.2001.

YU, J.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases **Revista Iberoamericana Micologia**, n.4, v, p.194-202. dez. 2005.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, n.2, v. 15, p.129-144, abr. 2011.

ZARDO, A.O.; LIMA, G. M. M. Alimentos para suínos. Boletim informativo. Bipers, pesquisa e extensão, Embrapa, dez, 1999.

ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA A.M.R.; ROZZA, D.B., DRIEMEIER, D., MALLMANN, C.A.; MIGLIAVACCA, F.A.. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.4, v.24, p. 207-210, dez. 2004.

### **3 CAPÍTULO 2**

## **NUTRITIONAL QUALITY AND SAFETY ASSESSMENT OF INGREDIENTS AND FEED GIVEN TO PREGNANT SWINE AND PIGLETS**



### 3 NUTRITIONAL QUALITY AND SAFETY ASSESSMENT OF INGREDIENTS AND FEED GIVEN TO PREGNANT SWINE AND PIGLETS

Nones, J.; Horn, M. B.; Luchtenberg, R.; Nones, J; Scussel, V.M.

Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants – LABMICO.  
Department of Food Science and Technology. Center for Agricultural  
Sciences, Federal University of Santa Catarina, Rod Admar Gonzaga  
1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brazil.

#### 3.1 ABSTRACT

The assessment of the nutritional composition and quality of feed is of fundamental importance, as feed represents a large percentage of animal production cost. Changes in feed composition can alter metabolisms, reduce digestive capacity and growth, hence affecting the production performance and profits which are more critical in smaller swine farms. In this paper we report on an evaluation of the nutritional quality [proteins, lipids, carbohydrates, fibre, calcium (Ca) and phosphorus (P)] and safety [mycotoxins, moisture content (mc) and water activity ( $a_w$ )] of feed ingredients and final products in pregnant swine (gilts/sows) and off-spring (piglets) from a small production farm in Southern Brazil. From the nutrition quality data obtained, feed ingredients such as *soybean meal*, *rice meal* and *corn* presented protein average content of 46.35%, 13.94% and 8.88%, respectively. As far as anti-nutritional factors are concerned, the urease level in the *soybean meal* used for swine feed production was of 0.03%. For the two different swine formulations analysed, the fibre values obtained were 1.74% and 2.14% for piglet and pregnancy feed, respectively. The Ca and P levels found in the two formulation samples were 0.499 & 0.715% and 0.753 & 0.963%, respectively. As far as the samples' *safety* parameters are concerned, the average mc &  $a_w$  obtained were 12.30% & 0.66% for corn, 9.77% & 0.64 for rice meal and 12.93% & 0.67% for soybean meal. In addition to this, the moisture levels found were high enough for fungi proliferation and mycotoxin production. 10% of samples showed some contamination by mycotoxins (AFLs and ZON). OTA and EST were not found in any of the tests performed (LOD: 1; LOQ: 2µg/kg). Our results demonstrated that small farms are able to produce animal feed within the recommended nutritional standards. However, the

implementation of quality assurance practices, to prevent nutritional fluctuations are necessary and can contribute to improving the production process and then enhancing its profitability.

**Key words:** nutritional quality, feed, protein, carbohydrates, lipids, mycotoxins, swine.

### 3.2 RESUMO

#### **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NUTRICIONAL E SEGURANÇA ALIMENTAR DE INGREDIENTES E RAÇÕES FORNECIDOS PARA SUÍNOS GESTANTES E LEITÕES**

A avaliação da composição nutricional e da segurança alimentar de rações é de fundamental importância, pois a alimentação representa uma vasta percentagem dos custos da produção animal. Mudanças na composição podem alterar o metabolismo, reduzir a capacidade digestiva e crescimento, afetando o desempenho animal e a lucratividade, o que pode ser muito crítico, especialmente em pequenas propriedades rurais. Neste trabalho foi avaliado a qualidade nutricional [proteínas, lipídeos, carboidratos, fibra, cálcio (Ca) e fósforo (P)] e a segurança alimentar [micotoxinas, umidade (mc) e atividade de água ( $a_w$ )] de ingredientes e rações fornecidos para suínos gestantes e leitões de uma pequena propriedade rural do Sul do Brasil. Com relação à qualidade nutricional, os dados obtidos demonstraram que farelo de soja, farelo de arroz e milho apresentam, em média, 46.35%, 13.94% e 8.88% de proteína, respectivamente. Com relação a fatores antinutricionais, o nível de urease presente no farelo de soja usado para alimentar suínos foi de 0.03% (0.01 a 0.09). Para as duas diferentes formulações de rações analisadas, os valores de fibra obtidos foram de 1.74% e 2.14% para leitões e animais em gestação, respectivamente. Os níveis de Ca e P encontrados nestas duas formulações de rações foram de 0.499 e 0.715% e de 0.753 e 0.963%, respectivamente. Os parâmetros da segurança alimentar foram avaliados quantificando-se a mc e  $a_w$ . Os dados obtidos revelaram níveis de mc e  $a_w$  de 12.30% e 0.66% para milho, 9.77% e 0.64 para farelo de arroz e 12.93% e 0.67% para farelo de soja. Os níveis de mc encontrados foram altos o suficiente para poder induzir proliferação de fungos e produção de micotoxinas. 10% das amostras apresentaram contaminação por micotoxinas (AFLs and ZON), sendo que OTA e EST não foram encontradas em nenhuma das amostras analisadas (LOD: 1; LOQ: 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Os resultados

demonstraram que pequenas propriedades são capazes de produzir ração animal respeitando os padrões nutricionais recomendados. Porém, a implementação de práticas de qualidade e segurança alimentar com o intuito de prevenir variações nutricionais são necessárias, as quais podem contribuir para melhorar o processo de produção e, conseqüentemente, aumentar a lucratividade.

**Palavras-chaves:** qualidade nutricional, alimentação, proteína, carboidratos, lipídeos, micotoxinas, suínos

### 3.3 INTRODUCTION

Swine growth performance depends upon numerous factors including genetics, management practices, health status and type of diet (Kil and Stein, 2010). Swine production reached about 100 million tons worldwide and Brazil is one of the world's largest producers (ABIPECS, 2012). Swine feed accounts for the highest cost of the swine production system (Landerio et al., 2011) and its nutritional requirements vary according to the genetic potential, age, sex and weight of the animal.

Ingredients used in feed, such as corn, are considered excellent sources of metabolized energy for swine (Yong et al., 2010; Prandini et al., 2011). Likewise, soybean meal is the main source of vegetable protein used in animal feed (Jeziorny et al., 2010; Song et al., 2010). Despite being high in protein, soybean meal has antinutritional factors such as trypsin inhibitors, which may alter the digestive process and affect animal growth. These pernicious effects can be eliminated by heat and can be measured the enzyme urease assessment. Fibre-rich feed prevents gastric lesions. Minerals generally constitute 4 to 6% of animal body and calcium (Ca) and phosphorus (P), apart from being important for their bone structure, can boost the immune system and, thus, improve the animal's health.

Therefore, the quality of ingredients used in feed processing can significantly affect the quality of pork at the end of the production chain. Alteration in the feed's chemical composition, the presence of fungi and/or mycotoxins can affect animal metabolism, interfere with the digestive process and affect animal development and health. Animal nutrition has a major impact on the lipid levels found in pork (Alonso et al., 2010). Much research has been conducted to evaluate the impact of a wide range of feed ingredients and feed additives on various aspects of gut health and development in swine (Lange et al., 2010). However,

little is known about the actual quality of the ingredients that are purchased by small swine producing farms from feed suppliers or of the quality and safety of feed prepared on their premises.

The aim of this study is to evaluate the quality and safety of feed ingredients and final products for pregnant (gilt/sow) and piglets in a small swine producing farm from Southern Brazil over a period of 7 months

### 3.4 MATERIALS AND METHODS

**Samples:** Two types of swine feed samples were collected for analysis *feed ingredients* (*grain*: corn; *meal*: soybeans and rice) used *feed final products* for pregnant swine (gilts/sows) and piglets from a small farm, located in Southern Brazil. Table 1 shows the swine daily feeding routine.

**Table 1.** Swine daily feeding routine

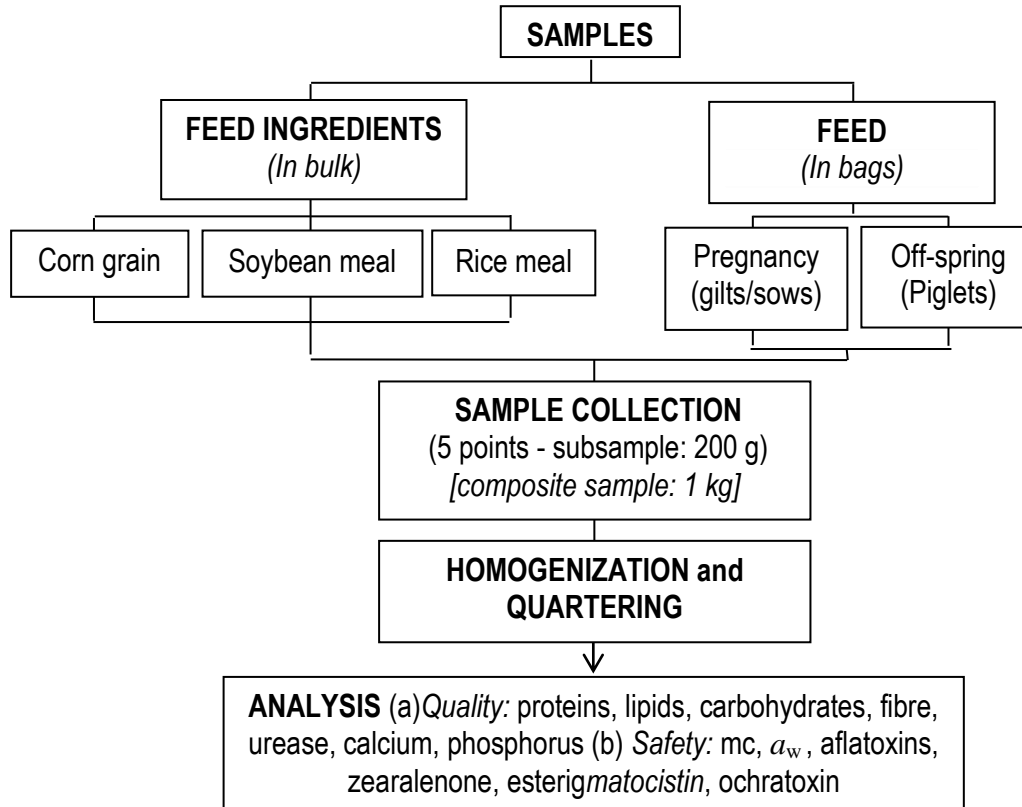
Feed type	Feeding		Feed composition (%)			
	Quantity (kg)	Periodicity (times per day)	Corn	Soybean meal	Rice meal	Other*
<i>Pregnant</i>						
Gilts	2.5	2	65	16	15	4
Sows	2.5	2	65	16	15	4
<i>Off-springs</i>						
Piglets	1.0	all the time	60	29	5	6

\* mix of *minerals* (Ca, P, sodium, chrome, copper, iron, cobalt, selenium) and *vitamins* (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, D<sub>3</sub>, K<sub>3</sub>)

**Reagents, solvents and standards:** *Reagents* - ammonium molybdate vanadate, ammonium oxalate, ammonium sulphate, celyte, copper carbonate, copper sulphate, ferric chloride, methyl red, orthophosphate, potassium chloride, potassium sulphate, potassium permanganate, sodium hydroxide, oxalic acid, sulfuric acid, formic acid, chloric acid and acetic acid, all from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil); *solvents* - acetone, chloroform, ethyl acetate, methanol, and toluene, all from Carlo Erba (Milano, Italy); *standards*: AFLs (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>), ZON, EST and OTA, all from Sigma (Steinheim, Germany).

**Sample collection and preparation:** *Collection* - samples were collected from August 2010 to February 2011 in a small farm located in Santa Catarina state, Southern Brazil, at Doutor Pedrinho town. They were collected from silos (stored in bulk/loose) and storehouses (stored in bags). Corn and soybean meal were collected from silos of 50 and 20 ton capacity, respectively. Rice meal from local suppliers and feed for pregnant swine and piglets prepared on the premises were collected from 25 kg bags. 200 g of each sample type were gathered from different collection points to get a total sample of 1 kg (composite sample) of each ingredient and feed (Figure 1). *Preparation* - each sample was homogenized and divided into smaller portions (analytical samples) for analysis of proximate composition (lipids, fibre, ash, protein, Ca, P), mc,  $a_w$ , urease and mycotoxins (AFLs, ZON, EST and OTA).

**Evaluation of swine feed nutritional quality:** analysis of lipids, fibre, Ca, P, ash and urease activity were performed according to standard number 108 of the Ministry of Agriculture of Brazil - MAPA (Brazil, 1993). Protein and mc analyses were performed by the AOAC method (2005). *Protein:* analysed by sample digestion with sulphuric acid catalysed by copper sulphate and potassium sulphate to accelerate the reaction. A portion of the sample was transferred to Kjeldahl flask with catalyst mixture and sulphuric acid. The sample was cooled and, after addition of water and sodium hydroxide, was distilled. Next, distilled water and sulphuric acid were added. Excess acidity was corrected with sodium hydroxide solution (AOAC, 2005). *Carbohydrate:* carbohydrate content was obtained by subtracting the sum of the contents of proteins, lipid, fibre, mc and ash from one hundred. *Lipids:* the fraction extraction was performed by vapour drag. The sample was transferred to a cartridge extractor and dried at 105°C. The condenser was adjusted and sufficient amount of solvent was kept throughout the process. Calculations were based on the difference in weight and percentage (Brazil, 1993). *Fibre:* determined by analysing the insoluble organic residue of the sample, after acid (sulfuric acid) and alkaline (sodium hydroxide) digestion. Performed by a reflux system, filtration (vacuum in a Buchner funnel) and incineration in a muffle (550°C).



**Figure 1.** Flowchart of swine ingredients and feed sample collection and analysis.

Calculations were performed as suggested by MAPA (Brazil, 1993). *Ash*: the method is based on the elimination of volatile organic and inorganic matter at a high temperature (550 to 600°C). The residue is called ash. The percentage of ash is calculated by the difference in sample weight, before and after three hour incineration, (Brazil, 1993)

*Calcium*: the analysis was based on the precipitation of Ca from the solution obtained from the ashes of the sample in the presence of ammonium oxalate. The resulting precipitate (Ca oxalate) is dissolved in chloric acid to form oxalic acid, which is analysed by oximetry (through titration with sulfuric acid, potassium permanganate and methyl red).

*Phosphorus*: the amount of P determinant by colorimetry. From a reaction of the acid solution of orthophosphate with ammonium molybdate vanadate, a yellow complex is formed, which is measured colorimetrically. The absorbance was compared to a standard curve previously prepared (Brazil, 1993). *Urease activity*: calculated by observation of pH variation, resulting from the ammonia released by the enzymatic action of urease (Brazil, 1993).

***Evaluation of swine feed safety: Determinations of AFLs, OTA, ZON and EST***: was performed by the method described by Soares and Rodrigues-Amaya (1989). Briefly, each sample was extracted with methanol and potassium chloride (4%), filtered and, after that, ammonium sulphate (30%) was added, followed by moderate stirring and filtration. The resulting filtrate was transferred to a separation funnel, and toxins were extracted with chloroform. Extracts were collected in a beaker and submitted to solvent evaporation. Extracts were re-suspended in 200 µL of toluene and immediately subjected to thin layer chromatography. The analyses was performed in cuba saturated with the following solvent system: toluene – ethyl acetate – formic acid (60:40:0.5). The toxins were detected under UV light and quantified by comparison to toxin standards ( $\lambda$ : 256 & 365 nm). The limits of quantification (LOQ) and determination (LOD) were 2 and 1 µg/L, respectively. *Moisture content*: performed according to AOAC (2005), which consists of drying the sample in an oven at 110°C ( $\pm$  5 °C). *Water activity*: determination was carried out by the Aqualab 4 method.

***Statistic analysis***: performed by variance analysis (ANOVA) and Turkey's test, to evaluate significant differences among the means of Ca, P and urease activity ( $P < 0.05$ ) using GraphPad Prism 4.0 software. The results were expressed as the mean values and standard errors.

### 3.5 RESULTS AND DISCUSSION

The data obtained showed that the nutritional quality and safety of feed ingredients and final products (for pregnant swine and piglets), used for feeding swine in a small farm in Southern Brazil, showed little variation over the standards established by NRC (1998) and Rostagno (2011). The quality (proximate composition, sample collection details, feed formulation standards) and the safety (mycotoxins, mc and  $a_w$ ) data are shown in Tables 2 and 3.

#### *Ingredient and feed proximate composition*

*Protein:* The protein content of the soybean meal samples evaluated ranged from 44.06 to 47.15%. Those values were higher than those reported for protein by Karr-Lilienthal (2005) (29.0 to 42.2%). The protein content of rice meal samples was lower than that of soybean (12.20 to 15.36). These values are in agreement with those published by Huang (2005), which reported crude protein values from 15.7 to 17.2% for rice meal. The protein content of corn samples ranged from 7.37 to 20.22. Corn contains a relatively low concentration of protein (8%) compared with wheat and barley (11%) (Cowieson et al., 2005). The values for protein found in all ingredients (corn, soybean and rice meal) were in agreement with NRC (1998) and Rostagno (2011), with the sole exception of one corn sample that showed a higher protein content.

*Carbohydrates:* Of the feed ingredients evaluated, soybean meal showed an average carbohydrate content of 28.59% followed by rice meal with 39.99% and corn with 72.67%, values that are in agreement with those reported in the literature (Karr-Lilienthal et al., 2005; Amissah et al., 2003; Kereliuk et al., 1995). Only one corn sample showed 56.25% of carbohydrate, which is lower than the average (76.8%), proposed by Kereliuk (1995).

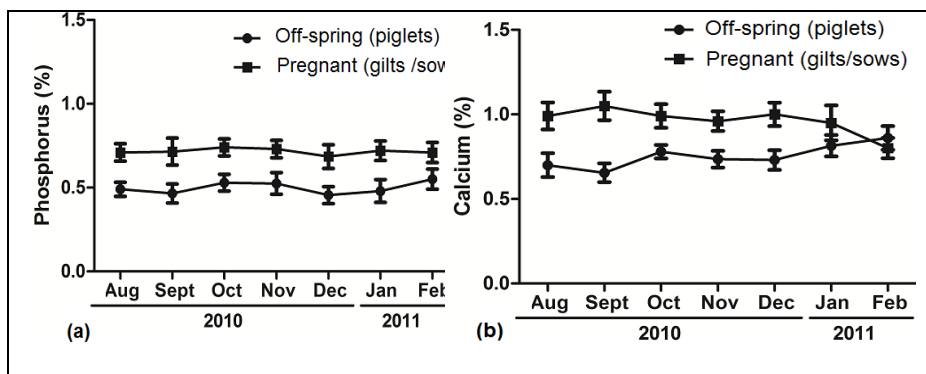
*Lipids:* the lipid content of corn samples ranged between 2.64 and 3.90, lower than found by Aisha (2004) (from 4.9 to 6.2%). This may reflect factors such as: corn variety, growing conditions, drying temperature, starch structure, lipid starch matrices and the presence of various anti-nutritive factors (Cowieson et al., 2005). The lipid content in rice meal samples ranged from 15.38 to 23.16, values similar to those reported by Huang (2005)(23.3 to 24.9%). However, they are higher than those recommended by NRC (1998) and Rostagno (2011). The lipid content found in soybean meal ranged from 1.72 to 3.27%. Feed



for pregnant swine had higher lipid content (5.07%) than that of piglets (2.95%).

*Fibre:* corn samples had the lowest amount of crude fibre (1.12%). Soybean meal also showed low fibre content, averaging 3.69%. Rice meal showed the highest values averaging 7.09%. Fibre content values were lower than recommended in corn, rice meal and in soybean samples (NRC, 1998; Rostagno, 2011). Fibre values obtained for pregnant swine and piglets were 1.74% and 2.14 %, respectively.

*Ash:* The average ash content value for rice meal was 8.71%, similar to that found by Huang (2005), (9.2 to 11.3%). Corn and soybean meal samples showed lower values, ranging from 0.96 to 6.24 and 5.67 to 6.25, respectively. Piglet feed had a lower percentage (4.61%) of ash in relation to pregnant swine feed (5.59%), which is consistent with the different metabolic needs of the animals. Nutrient requirements (per unit of diet) of P, decreases with increasing age and body weight (NRC, 1998). The average content of P was found to be 0.499 and 0.715% for piglets and pregnant swine feed, respectively (Figure 2, a). Dietary P deficiencies not only affect growth, but also adversely affect bone mineralisation (Varley et al., 2011). The average content of Ca was found to be 0.753 and 0.963% for piglets and pregnant swine feed, respectively (Figure 2, b). The values of P and Ca found match the requirements considered ideal for these life stages of the animals (NRC, 1998).



**Figure 2.** Average of (a) phosphorus and (b) calcium levels detected in feed for piglets and pregnant swine ( $P > 0.05$ ).

**Table 2.** Ingredients proximate composition used for swine feed formulation

Feed Ingredient	Number of samples	Composition (%)						$a_w$	Collection date	
		Protein	Carbohydrates	Lipids	Fibre	Ashes	Mc		Month	Year
<b><i>Corn</i></b>										
	12	8.27	74.41	2.64	1.47	1.14	12.07	0.67	Aug	2010
		8.03	73.21	3.09	1.57	0.98	13.12	0.64	Aug	
		7.80	73.75	3.53	1.48	1.13	12.31	0.71	Sept	
		8.00	73.69	3.76	1.13	1.08	12.34	0.66	Sept	
		8.11	74.57	3.82	0.68	1.08	11.74	0.69	Oct	
		7.99	76.09	3.68	0.83	0.96	10.45	0.69	Nov	
		7.86	74.94	3.90	0.53	1.23	11.54	0.63	Nov	
		7.66	73.20	3.69	0.78	1.03	13.64	0.69	Dec	
		7.37	74.19	3.34	1.45	1.14	12.51	0.65	Dec	
		20.22	56.25	3.64	1.09	6.24	12.56	0.60	Jan	2011
		7.83	73.92	3.41	1.34	1.12	12.38	0.67	Jan	
		7.41	73.80	3.64	1.12	1.09	12.94	0.67	Feb	
	<i>Average:</i>	8.88	72.67	3.51	1.12	1.52	12.30	0.66	NA	
	<i>Max:</i>	20.22	76.09	3.90	1.57	6.24	13.64	0.71	NA	
	<i>Min:</i>	7.37	56.25	2.64	0.53	0.96	10.45	0.60	NA	
	<i>Standard</i>	7.9-8.3	NS	3.6-3.9	1.7	1.3	NS	NS	NA	
<b><i>Rice</i></b>										
	12	14.13	44.50	17.99	6.03	8.21	9.14	0.68	Aug	2010
		13.28	40.15	20.38	7.49	8.94	9.76	0.61	Aug	
		14.13	40.11	19.81	8.18	7.98	9.79	0.68	Sept	
		14.34	36.68	21.35	7.20	8.23	9.26	0.68	Sept	
		13.33	42.24	15.38	8.69	9.59	10.77	0.64	Oct	
		14.25	38.83	20.72	7.45	9.02	9.73	0.69	Nov	

		12.87	42.57	22.08	5.91	7.97	8.60	0.68	Nov	
		12.20	46.18	16.65	7.21	7.32	10.44	0.66	Dec	
		14.07	40.40	21.60	5.95	8.12	9.86	0.63	Dec	
		14.14	36.38	22.24	8.13	8.84	10.27	0.54	Jan	2011
		15.36	35.20	23.16	6.76	10.02	9.50	0.58	Jan	
		15.13	36.68	21.86	6.04	10.23	10.06	0.66	Feb	
	<i>Average:</i>	13.94	39.99	20.27	7.09	8.71	9.77	0.64	NA	
	<i>Max:</i>	15.36	46.18	23.16	8.69	10.23	10.77	0.69	NA	
	<i>Min:</i>	12.20	35.20	15.38	5.91	7.32	8.60	0.54	NA	
	<i>Standard</i>	13.1-13.3	NS	13-14.5	8.1	9.0	NS	NS	NA	
<b>Soybean</b>										
	12	44.06	31.82	2.29	3.32	6.03	12.48	0.70	Aug	2010
		47.14	26.56	2.94	3.54	5.67	14.15	0.66	Aug	
		46.86	27.54	3.09	3.49	5.68	13.34	0.70	Sept	
		46.94	28.82	2.76	3.68	5.86	11.94	0.69	Sept	
		45.86	28.48	2.42	3.56	5.94	13.74	0.65	Oct	
		46.23	29.67	1.81	4.29	6.05	11.95	0.67	Nov	
		47.15	28.83	1.72	4.11	6.25	11.94	0.67	Nov	
		46.83	27.99	1.90	3.45	6.11	13.72	0.69	Dec	
		46.30	27.75	3.27	4.15	5.89	12.64	0.69	Dec	
		45.22	29.52	2.93	3.64	5.74	12.95	0.63	Jan	2011
		46.52	27.09	3.03	3.72	5.99	13.65	0.66	Jan	
		47.14	29.00	1.97	3.33	5.93	12.63	0.68	Feb	
	<i>Average:</i>	46.35	28.59	2.51	3.69	5.93	12.93	0.67	NA	
	<i>Max:</i>	47.15	31.82	3.27	4.29	6.25	14.15	0.70	NA	
	<i>Min:</i>	44.06	26.56	1.72	3.32	5.67	11.94	0.63	NA	
	<i>Standard</i>	44-45	NS	1.5-1.7	5.3	5.8	NS	NS	NA	
<i>Total general:</i>		36								

NA: not applicable; NS: not specified; Standard: Rostagno (2011) and NRC (1998)

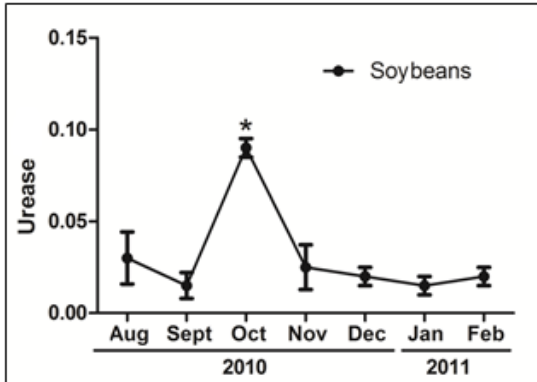
**Table 3.** Proximate composition of feed for pregnant swine and piglets

Feed	Number of samples	Composition (%)						$a_w$	Collection date	
		Protein	Carbohydrates	Lipids	Fibre	Ashes	Mc		Month	Year
<b><i>Pregnancy</i></b>										
	12	16.53	61.97	1.01	2.04	6.55	11.90	0.92	Aug	2010
		14.60	58.44	5.61	2.50	6.31	12.54	0.68	Aug	
		14.84	61.89	3.76	1.99	5.28	12.24	0.76	Sept	
		15.48	61.35	5.04	1.80	5.09	11.24	0.72	Sept	
		14.83	61.08	4.98	1.99	5.43	11.69	0.65	Oct	
		14.81	60.28	5.98	2.04	5.60	11.29	0.68	Nov	
		14.81	61.54	5.88	1.89	5.27	10.61	0.66	Nov	
		15.00	58.66	5.46	2.54	5.70	12.64	0.68	Dec	
		14.13	59.04	5.85	2.63	5.44	12.91	0.67	Dec	
		15.18	59.96	6.02	1.90	5.61	11.33	0.55	Jan	2011
		14.84	59.84	6.10	1.81	5.62	11.79	0.62	Jan	
		16.33	58.87	5.19	2.57	5.19	11.85	0.67	Feb	
	<i>Average:</i>	15.12	60.24	5.07	2.14	5.59	11.84	0.68	NA	
	<i>Max:</i>	16.53	61.97	6.10	2.63	6.55	12.91	0.92	NA	
	<i>Min:</i>	14.13	58.44	1.01	1.80	5.09	10.61	0.55	NA	
<b><i>Off-spring</i></b>										
	12	25.40	54.73	0.60	1.60	5.68	11.99	0.91	Aug	2010
		20.89	58.07	2.62	1.72	4.73	11.97	0.64	Aug	
		19.78	58.81	2.63	1.59	4.32	12.87	0.74	Sept	
		20.97	57.78	3.24	1.80	4.27	11.94	0.69	Sept	
		18.78	58.19	2.30	1.73	4.96	14.04	0.73	Oct	
		20.58	58.87	3.18	1.54	4.31	11.52	0.68	Nov	
		19.65	59.91	3.41	1.89	4.41	10.73	0.65	Nov	
		19.38	57.61	3.66	1.81	4.44	13.10	0.68	Dec	

	20.13	57.30	3.10	2.18	4.77	12.52	0.66	Dec	2011
	20.54	57.65	3.73	1.62	4.55	11.91	0.59	Jan	
	20.50	57.98	3.34	1.65	4.49	12.04	0.65	Jan	
	19.63	58.50	3.53	1.80	4.40	12.14	0.66	Feb	
<i>Average:</i>	20.52	57.95	2.95	1.74	4.61	12.23	0.69	NA	
<i>Max:</i>	25.40	59.91	3.73	2.18	5.68	14.04	0.91	NA	
<i>Min:</i>	18.78	54.73	0.60	1.54	4.27	10.73	0.59	NA	
<hr/>									
<i>Total general:</i>	24								
<hr/>									

NA: not applicable; NS: not specified

*Urease*: urease activity in soybeans can detect the presence of toxic factors such as trypsin inhibitors (White et al., 2000). The urease activity of soybeans in the current study ranged from 0.01 to 0.09, with an average of 0.03 (Figure 3). The values found were in agreement with Drew (2007) who considered an urease activity of 0.05 to 0.30 as ideal.



**Figure 3.** Urease activity of soybean samples (\* $P < 0.05$ ).

### ***Ingredients and swine feed safety***

*Mc and aw*: high mc grains can be stored with maintenance of the nutrient content (Pieper et al., 2011). However, excess mc may facilitate the spread of fungi and thus lead to the development of mycotoxins that could harm livestock. The mc levels of samples were 9.77, 12.30, 12.93%, for rice meal, corn and soybeans meal, respectively. Samples of feed for piglets and pregnant swine showed mc 12.23 and 11.84%, respectively. Our data showed an mc value above the ideal, which may contribute to the presence of mycotoxins in feed and consequent generation of health problems. According to Scussel et al (2002), mc should be below 12% for grains to prevent the proliferation of fungi and production of mycotoxins.

Regarding  $a_w$ , feed for piglets and pregnant swine displayed mean values of 0.69 and 0.68, respectively. The values were similar to those found by Rosa et al. (2009) (0.628). Of the 60 samples analysed, only four (6.66%) presented  $a_w$  lower than 0.6 (minimum  $a_w$  limit for fungi growth). Two samples showed values of  $a_w$  greater than 0.9. No significant quantities of mycotoxins are produced for  $a_w$  below 0.95 (Nielsen, 2003).

*Mycotoxin:* of the total number of samples analysed, 5 (8.33%) presented some AFLs contamination [rice meal (1), corn (1) off-spring feed (3)] and only one (pregnancy feed, 64.10 µg/kg) by ZON. The levels of AFLs presented in samples were 83.33, 34.52 and 49.31 µg/kg for rice meal, corn, off-spring feed, respectively. Pereyra et al. (2008) reported 33.33% of AFLs contamination in samples of swine feed at levels of 30 to 70 µg/kg. In the present study, 25% of samples had AFLs contamination, at levels between 182 and 311 µg/kg. Other studies also reported some contamination by AFLs, OTA e ZON in swine feed (Thieu et al., 2008; Rosa et al., 2009). EST and OTA were not found in any of the samples analysed. The ingredients and swine feed were compared against existing regulations of Chile, United State of America, Estonia and Mexico, which tolerate levels of AFLs contamination of 100-300 µg/kg (FAO, 2004). Likewise, the ingredients and feed were considered safe, due to the absence of OTA and ZON values below those recommended by international legislation (maximum levels for OTA and ZON are 20-2000 µg/kg e 20-3000 µg/kg, respectively) (FAO, 2004).

### 3.6 CONCLUSION

Although most of the nutrient data obtained in this work were in accordance with the standards established in Brazil (Rostagno, 2011) and in the rest of the world (NRC, 1998), some of them were not in accordance with recommended levels (fibre and lipids). We must consider that the chemical and nutritional constituents of animal feeds are important for livestock nutrition and growth, but are only part of the animal feed matrix. Other points relating to management, genetics and animal health must be taken into consideration. The presence of mycotoxin in feed requires periodic monitoring in order to prevent the occurrence of mycotoxicosis in animal production, and thus reducing economic losses and minimizing hazards to swine health. Small farms are capable of producing animal feed within the recommended nutritional standards. However, the implementation of quality assurance practices, aimed at preventing nutritional fluctuations, is highly recommended. The emergence of laws aimed at standardizing the specific nutritional values of these foods may be alternatives to improve production and profitability.

### 3.7 REFERENCES

**ABIPECS. 2012.** Associação Brasileira da Indústria Processadoras e Exportadoras de Carne Suína. Online [www.abipecs.org.br](http://www.abipecs.org.br).

**Aisha, S. M. F. and El Tinay, A.H. 2004.** Effect of genotype, malt pre-treatment and cooking on in vitro protein digestibility and protein fractions of corn. *Food Chem.* **84**: 613 619.

**Alonso, V., Campo, M. M., Provincial, L., Roncalés, P. and Beltrán, J. A. 2010.** Effect of protein level in commercial diets on pork meat quality. *Meat Sci.* **85**: 7 14.

**Amissah, J. G.N., Ellis, W. O., Oduro, I. and Manful, J. T. 2003.** Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. *Food Control.* **14**: 21 24.

**AOAC. 2005.** Official Methods of Analysis of AOAC International, (18th edition), Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD.

**Brazil. 1993.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 108, de 17 de março.

**Brazil. 1988.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 7, de 9 de novembro.

**Cowieson, A. J. 2005.** Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Animal Feed Science and Technology.* **119**: 293 305.

**Huang, S. C., Shiau, C. Y., Liu, T. E., Chu, C. L. and Hwang, D. F. 2005.** Effects of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs. *Meat Sci.* **70**: 613 619.

**Drew, M.D., Borgeson, T.L. and Thiessen, D.L. 2007.** *Anim. Feed Sci. Technol.* **138**: 118 136.

**FAO, 2004.** Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper No. 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.



**Jezierny, D., Mosenthin, R. and Bauer, E. 2010.** The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **157**: 111 128.

**Karr-Lilienthal, L. K., Kadzere, C. T., Grieshop, C. M. and Fahey, G. C., 2005.** Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to non ruminants: A review. *Livest Prod Sci.* **97**: 1 12.

**Kereliuk, G. R., Sosulski, F. W. and Kaldy, M. S. G. 1995.** Carbohydrates of North American corn (*Zea mays*). *Food Res Int.* **28**: 311 315.

**Kil, D.Y. and Stein, H. H. 2010.** Management and feeding strategies to ameliorate the impact of removing antibiotic growth promoters from diets fed to weanling pigs. *Can. J. Anim. Sci.* **90**: 447 460.

**Landero, J. L., Beltranena, E., Cervantes, M., Morales, A. and Zijlstra, R. T. 2011.** The effect of feeding solvent-extracted canola meal on growth performance and diet nutrient digestibility in weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **170**: 136 140.

**Lange, C. F. M., Pluske, J., Gong, J. and Nyachoti, C. M. 2010.** Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livest Sci.* **134**: 124 134.

**Nielsen, K. F 2003.** Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Gen Biol.* **39**: 103 117.

**NRC, 1998.** National Research Council (NRC), 1998. Nutrient Requirements of Swine, 10th Edition. National Academy Press, Washington, DC.

**Pereyra, G., Pereyra, C. M., Ramirez, M. L., Rosa, C. A. R., Dalcero, A. M. and Cavaglieri, L. R. 2008.** Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentina. *Lett Appl Microbiol.* **46**: 555 561.

**Pieper, R., Hackl, W., Korn, U., Zeyner, A., Souffrant, W. B. and Pieper, B. 2011.** Effect of ensiling triticale, barley and wheat grains at different moisture content and addition of *Lactobacillus plantarum*

(DSMZ 8866 and 8862) on fermentation characteristics and nutrient digestibility in pigs. *Anim Feed Sci Technol.* **164**: 96 105.

**Prandini, A., Sigolo, S., Morlacchini, M., Marocco, A., Lo Pinto, M. 2011.** High-protein maize in diets for growing pigs. *Anim Feed Sci Technol.* **165**: 105 110.

**Rosa, C. A. R., Keller, K. M., Keller, L. A. M., Pereyra, M. L. G., Pereyra, C. M., Dalcerro, A. M., Cavaglieri, L. R., Lopes, C. W. G. 2009.** Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. *Toxicon.* **53**: 283 288.

**Rostagno, H. S. 2011.** Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais 3a Edição Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Zootecnia.

**Scussel V M. 2002.** Fungos em Grãos Armazenados. In: Lorini I.; Miike, L; Scussel, Vm. Armazenagem de Grãos. Ed. Biogeneziz.

**Soares, L. M. V. and Rodriguez-Amaya, D. B. 1989.** 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.* **72**: 22 26.

**Song, Y. S., Pérez, V. G., Pettigrew, J. E., Martinez-Villaluenga, C., Gonzalez, E. M. 2010.** Fermentation of soybean meal and its inclusion in diets for newly weaned pigs reduced diarrhea and measures of immunoreactivity in the plasma. *Anim. Feed Sci Technol.* **159**: 41 49.

**Thieu, N. Q., Ogle, B. and Pettersson, H. 2008.** Screening of Aflatoxins and Zearalenone in feedstuffs and complete feeds for pigs in Southern Vietnam. *Trop Anim Health Prod.* **40**: 77 83.

**Varley, P. F., Callan, J. J. and O'doherty, J. V. 2011.** Effect of dietary phosphorus and calcium level and phytase addition on performance, bone parameters, apparent nutrient digestibility, mineral and nitrogen utilization of weaner pigs and the subsequent effect on finisher pig bone parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* **165**: 201 209

**White, C. E., Campbell, D. R. and McDowell, L. R. 2000.** Effects of dry matter content on trypsin inhibitors and urease activity in heat

treated soya beans fed to weaned piglets. *Animal feed Sci. Technol.* **87**: 105 115.

**Yong, L., Zhengfeng, F., Jinjun, D., Gary, P., Yingjun, R. and Jian, P. 2010.** Corn extrusion and enzyme addition improves digestibility of corn/soy based diets by pigs: *In vitro* and *in vivo* studies. *Anim. Feed Sci. Technol.* **158**: 146 154.

#### **4 CAPÍTULO 3**

### **EVALUATION OF FUNGI AND FUMONISINS IN SWINE FEED AND ITS INGREDIENTS ON A FARM IN SANTA CATARINA, BRAZIL**

## EVALUATION OF FUNGI AND FUMONISINS IN SWINE FEED AND ITS INGREDIENTS ON A FARM IN SANTA CATARINA, BRAZIL

Nones, J.; Savi, G.; Horn, M. B.; Scussel V.M.

Laboratory of mycotoxicology and other contaminants – LABMICO. Department of Food Science and Technology. Center for Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianopolis, SC, Brazil.  
\*vildescussel\_2000@yahoo.co.uk

### 4.1 ABSTRACT

Fungi are filamentous multicellular organisms that can grow in/on grains and foods and produce toxic substances called mycotoxins. The aim of our research was to assess the safety of ingredients (soybean meal, corn, rice meal) and *final products* (feed) for off-spring (piglets) and pregnant adult swine (gilts/sows) from a small farm in Southern Brazil. For fungi, the residue of pre cleaned corn showed the highest total number of counts with 3.5 (3 to 3.8), followed by the corn sample with 2.8 (1.7 to 4.0) logcfu/g. The rice and soybean meal samples had lower counts of 2.9 (1.7 to 3.9) and 1.3 0 to 2.9) logcfu/g, respectively. The pregnancy and offspring feed samples showed counts of 2.6 (0 to 3.7) and 2.1 (0 to 3.7) logcfu/g, respectively. The main fungal genera found were *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp for all samples. FBs were found in samples of corn, rice and soybean meal with an average of 795.9, 138.8 and 198.3 µg/kg, respectively. The residue of pre cleaned corn had the highest rate of contamination of 83% and 100% for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>, respectively. The total for both FBs was 3915 µg/kg. More than 50% of the samples of feed for swine analysed were contaminated by FB<sub>1</sub>. The rate of contamination was higher for offspring feed than for pregnancy feed, with an average of 411.3 (171.1-728.1) µg/kg and 296.9 (58.5-531.2) µg/kg, respectively. The rate of contamination by FB<sub>2</sub> in samples was higher for offspring feed (33.33%) than for pregnancy feed (25%), and the average levels of contamination were 363.8 (51.1-792) and 457.4 (81.2-997.6) µg/kg, respectively. It should be noted, therefore, that continuous exposure to seemingly low levels of contamination can lead to serious problems in the product chain. Thus, our research suggests the need for constant

monitoring, both during processing and storage of animal feed and its ingredients.

**Keywords:** fumonisin, mycology, swine, feed

## 4.2 INTRODUCTION

Moulds infect most agricultural commodities, and the mycotoxins they produce represent a major challenge in the control and inspection of foodstuffs (Maul et al., 2012). The growth of moulds and resulting production of mycotoxins depends on the interaction of multiple variables such as pH, water activity (aw), solute concentration, temperature, atmosphere and time (Garcia et al., 2011). *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp. are the most common filamentous moulds found in stored cereal grains and feeds (Rosa et al., 2009; Lee et al., 2010). Although the detection of fungi does not necessarily imply the presence of mycotoxins, several studies around the world have reported a high incidence of mycotoxins in feed for animal consumption (Placinta et al., 1999). Fumonisin (FBs) is one of the mycotoxins produced by fungi of the genus *Fusarium* in favorable conditions of high moisture content and temperature (Dilkin et al., 2002).

Symptoms of contamination by FBs depend on the type of mycotoxin, the amount and duration of the exposure, the age, health and sex of the exposed individual, as well as dietary status and interactions with other toxins (Bennett and Klich, 2003). The negative effect of FBs on the growth and health of livestock makes them a major problem for many production systems (Roigé et al., 2009). Fumonisin causes various swine diseases: liver and kidney toxicity and carcinogenicity, pulmonary edema, immunosuppression and neurotoxicity (Gazzotti et al., 2011, Grenier et al., 2012). Swine feed contaminated by FBs can cause loss of appetite, depression, cardiovascular toxicity and induced pulmonary edema (Bryden, 2012).

Considering that the region where the collections were made has a humid subtropical climate, and that factors of humidity and temperature are essential for toxigenic fungi growth the aim of this work was to assess the safety of *ingredients* (soybeans, corn, rice bran), *final products* (feed) for offspring (piglets) and pregnant adult swine (gilts/sows) and *residue* (pre cleaned corn) stored in a small swine farm in the South of Brazil. This was achieved by testing for the presence of toxigenic fungi and their correlation with the presence of FBs.

### 4.3 MATERIAL AND METHODS

#### Material

**Samples:** Two types of swine feed samples were collected for analysis *feed ingredients* (grain: corn; meal: soybeans and rice) used feed *final products* for pregnant swine (gilts/sows) and piglets from a small farm, located in Southern Brazil.

**Reagents, Solvents, Standards and Culture Media** *Reagents* - methanol, phosphoric acid, 2-mercaptoethanol, acetic acid, sodium dihydrogen phosphate solution, ophthaldialdehyde (OPA). All HPLC grade, from (Vetec). *Solvents* - methanol Vetec. All HPLC grade. Ultrapure water (MilliQ system - Millipore), *Standards:* FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> (Sigma). *Culture media:* malt extract agar-MEA; peptone agar, dichloran rose bengal chloranphenicol agar (DRBC) (Himedia).

#### Methods

**Samples collection and preparation:** *Collection* - samples were collected from August 2010 to February 2011 in a small farm located in Santa Catarina state, Southern Brazil, at Doutor Pedrinho town. They were collected from silos (stored in bulk/loose) and storehouses (stored in bags). Corn and soybean meal were collected from silos of 50 and 20 ton capacity, respectively. Rice meal from local suppliers and feed for *pregnant* swine and piglets prepared on the premises were collected from 25 kg bags. 200 g of each sample type were gathered from different collection points to get a total sample of 1 kg (composite sample) of each ingredient and feed. *Preparation* - each sample was homogenized and divided into smaller portions (analytical samples) for mycological and mycotoxin (FBs) analysis.

**Mycology tests and FBs analysis:** *Mycology:* For total fungi count the method used was Pitt and Hocking (1997), applying serial dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-3}$ ) and staining by dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC). The identification of fungi gender was carried out according to Samson (2002). *FBs:* analysed by liquid chromatography and fluorescence detector (LC/FD) at 335 and 440 nm wavelength (excitation and emission, respectively), as described by AOAC (2005). LOD was 0.5 and LOQ was 1 µg/kg for both, FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>.

**Statistical Analyses:** Total fungal counts data were transformed using a logarithmical function  $\log_{10}(x+1)$ . Performed by variance analysis (ANOVA) and Turkey's test, to evaluate significant differences among the means ( $P < 0.05$ ) using GraphPad Prism 4.0 software. The results were expressed as the mean values and standard errors.

#### 4.4 RESULTS AND DISCUSSION

Molds and yeasts were found in more than 95% of the samples. The main fungal genera were *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp. Conditions of moisture and water activity in the samples appeared altered, which can cause fungal growth and production of FBs.

##### *Total count of molds and yeasts*

The residue from pre-cleaning corn showed the highest total number of mold counts 3.5 (3 to 3.8) logcfu/g, followed by corn with 2.8 (1.7 to 4.0) logcfu/g (Table 1).

This result proves that pre-cleaning can reduce mold counts in corn. Values higher than those in our corn samples had been found by Rosa et al (2009), (4.44 logcfu/g). Rice and soybean meal samples had counts of 2.9 (1.7 to 3.9) logcfu/g and 1.3 (0 to 2.9) logcfu/g, respectively. Pregnancy and off-spring feed samples showed counts of 2.6 (0 to 3.7) and 2.1 (0 to 3.7) logcfu/g, respectively. Pereyra et al. (2008) found total mold counts over 5.0 logcfu/g in compound feed intended for fattening swine. None of our samples counts exceeded 5.0 logcfu/g, which may indicate the hygienic quality of feed is in accordance with GMP (2005).



**Table 1.** Total count for molds and yeasts in ingredients and feed samples

	<i>Ingredients (logcfu/g)</i>			<i>Residue***</i>	<i>Feed(logcfu/g)</i>		<i>Collection data</i>	
	<i>Soybean*</i>	<i>Rice*</i>	<i>Corn*</i>		<i>Pregnancy*</i>	<i>Off-spring**</i>	<i>Month</i>	<i>Year</i>
	0	3.1	4.0	3.8	0	0	Aug	2010
	0	3.3	1.7	3.8	0	0	Aug	
	1.7	2.8	1.7	3.4	3.6	3.0	Sept	
	2.9	1.7	2.2	3.6	2.5	3.3	Sept	
	0	3.8	3.2	3.3	3.4	2.0	Oct	
	2.3	2.9	2.8	3.6	2.8	2.2	Nov	
	2.0	1.7	2.6	3.0	3.0	2.5	Nov	
	1.7	3.9	3.9	3.4	3.7	3.2	Dec	
	0	2.8	3.2	3.7	3.4	3.7	Dec	
	2.5	2.9	2.1	3.5	2.9	0	Jan	
	2.8	2.7	2.5	3.0	3.0	3.0	Jan	
	0	3.0	3.9	3.8	3.2	2.5	Feb	
<b>Average:</b>	1.3	2.9	2.8	3.5	2.6	2.1	na	
<b>Max:</b>	2.9	3.9	4.0	3.8	3.7	3.7	na	
<b>Min:</b>	0	1.7	1.7	3.0	0	0	na	

na: not applied \* significant differences soybean with rice, corn, residue and pregnancy (P<0.05)

\*\* significant differences residue with off-spring (P<0.05)

### ***Fungal genera identified***

In this work, the following were identified: (a) five storage fungi (*Cephalosporum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Peziza* and *Rhizopus*), (b) three harvest fungi (*Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma*) and (c) three harvest and storage fungi (*Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*). The largest amount of fungal genera identified in the samples corresponded to *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* sp. Many studies have shown that these genera are found in most feeds (Bragulat et al., 1995; Rosa et al., 2006). *Fusarium* fungi were found in lower quantities in samples of soybean meal and corn, which may be due to the process of harvesting the grain and to weather conditions. *Fusarium* toxins are produced in cereal grains due to high moisture conditions around harvest (Bryden, 2012).

**Table 2.** Identification of fungal genera in ingredient and feed samples

<b>GENERA</b>	<b>SAMPLES (%)</b>					
	<b>Ingredients</b>			<b>Residue</b>	<b>Feed</b>	
	<b>Soybean</b>	<b>Rice</b>	<b>Corn</b>		<b>Pregnancy</b>	<b>Off-spring</b>
<b>Storage</b>						
<i>Cephalosporum</i>	+	ni	ni	+	ni	+
<i>Geotrichum</i>	+	ni	ni	+	ni	ni
<i>Mucor</i>	+	+++	+	+	+	+
<i>Peziza</i>	ni	+	ni	ni	ni	ni
<i>Rhizopus</i>	ni	+	+	+	+	+
<b>Harvest</b>						
<i>Alternaria</i>	ni	+	ni	ni	ni	ni
<i>Fusarium</i>	+	++	+	++	++	++
<i>Trichoderma</i>	+	+	++	++	++	++
<b>Storage and Harvest</b>						
<i>Aspergillus</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Botrytis</i>	+	ni	+	+	ni	ni
<i>Penicillium</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++

ni not identified + found in 1 to 4 samples ++ found in 5 to 8 samples +++ found in 9 to 12 samples

### *Levels of fumonisins*

Regarding the presence of FBs, corn was the ingredient that had the highest rate of contamination. 83.33% of our samples showed contamination by FB<sub>1</sub> and 58.3 3% by FB<sub>2</sub>, showing rates of 121.3-1405 µg/kg and 49.8-680.9 µg/kg, respectively. Similarly, a study published by Prandini (2011) found contamination by FBs in corn samples ranging from 300 to 1200 µg/kg FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were detected in all feed and corn samples (100%). In another study by Pereyra et al. (2008) the mean values ranged from 3210 to 4020 µg/kg for FB<sub>1</sub> and from 1300 to 1950 µg/kg for FB<sub>2</sub>. It was interesting to observe that the cleaning of corn leads to a significant reduction in the presence of FBs. The average contamination of the residue of pre cleaning corn was 2093 and 1822 µg/kg for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>, respectively. After cleaning, the average levels found in corn fell to 526.2 and 269.7 µg/kg, respectively. By the same token, it can be concluded that damaged grains separated by the process of sifting, are more susceptible to contamination by FBs (Scussel et al., 2002).

More than 50% of the samples of feed for swine analysed were contaminated by FB<sub>1</sub>. The average rate of contamination was higher for off-spring feed (411.3 µg/kg) than for pregnancy feed (296.9µg/kg ) (Table 3).

In a study by Martins et al. (2008) no contamination by FB<sub>1</sub> was found in any of the 285 samples of swine feed evaluated. However, and in accordance with our results, Martins et al., (2011) found contamination by FBs in swine feed. in 32.9% of 82 samples. The percentage of contamination by FB<sub>2</sub> was higher in off-spring feed (33.33%) than in pregnancy feed (25%), with an average level of contamination of 363.8 (51.1-792) and 457.4 (81.2-997.6) µg/kg, respectively. Pereyra et al. (2008) found that more than 90% of swine feed samples were contaminated with FB<sub>2</sub>.

**Table 3.** Presence of FBs in *ingredients* and *feeds* herds

<i>Sample</i>	<i>Number</i>	<i>FB<sub>1</sub> (µg/kg)</i>			<i>FB<sub>2</sub> (µg/kg)</i>			<i>FBs (µg/kg)</i>
		<i>(%)</i>	<i>Average</i>	<i>Range</i>	<i>(%)</i>	<i>Average</i>	<i>Range</i>	
<b><i>Ingredients</i></b>								
Soybeans	12	33.33	198.3	40-537.8	nd	nd	nd	198.3
Rice	12	33.33	138.8	68.4-264.9	8.33	nd	ND-174.7	138.8
Corn	12	83.33	526.2	121.3-1405	58.33	269.7	49.8-680.9	795.9
<b><i>Feed</i></b>								
Pregnancy	12	58.33	296.9	58.5-531.2	25.00	457.4	81.2-997.6	754.3
Off-springs	12	58.33	411.3	171.1-728.1	33.33	363.8	51.1-792	775.1
<b><i>Residue</i></b>								
Pre-cleaning	12	83.33	2093	57-6051	100.00	1822	223.5-4844	3915
<b><i>Total sample</i></b>	<b>72</b>	na	na	na	na	na	na	na

nd: not detected; na: not applied

## 4.5 CONCLUSION

The United States of America is the only country in the world to have established parameters for the presence of FBs (20000 µg/Kg)(FAO, 2004). The results for all ingredients and feed in this study are within these parameters. In spite of this, it is important to emphasize that constant exposure of the animals to FBs, even at low levels of concentration, can have a great impact, both sanitary and consequently financial, on the production chain. For this reason, periodic monitoring for the presence of FBs in ingredients and feed is required to reduce the risk of dangerous diseases and protect profitability.

Many factors contribute to the proliferation of molds and the consequent production of mycotoxins. These include cultural practices, harvesting practices, transport and storage conditions, relative humidity, aeration and the presence of insects. Alternatives for the elimination of mycotoxins in feed have been studied. However, it still seems most productive to constantly monitor the quality of both ingredients and feeds within a property.

## 4.6 REFERENCES

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, (18th edition), Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD, 2005.

Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**, 497-516.

Bragulat MR, Abarca ML, Castella O, Cabañes J (1995) Mycological survey on mixed poultry feeds and mixed rabbit feeds. *Journal of Science of Food Agriculture*, **67**, 215-220.

Bryden WL (2012) Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, **173**, 134-158.

Dilkin P, Mallmann CA, Almeida CAA, Stefanon E, Fontana FZ, Milbradt EL (2002) Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. *Brazilian Journal of Microbiology*, **33**, 111-118.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper No. 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 2004.

Garcia D, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S (2011) Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity, *International Journal of Food Microbiology*, **153**, 21-27.

Gazzotti T, Zironi E, Lugoboni B, Barbarossa A, Piva A, Pagliuca G (2011) Analysis of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and their hydrolyzed metabolites in pig liver by LC-MS/MS. *Food Chemistry*, **125** 1379-1384.

GMP (2005) Regulations on Product Standards in the Animal Feed Sector.

Grenier B, Bracarense APFL, Schwartz HE, Trumel C, Cossalter AM, Schatzmayr G, Kolf-Clauw M, Moll W, Oswald IP (2012) The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B<sub>1</sub> correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochemical Pharmacology*, **831**, 465-1473.

Lee K, Kim BH, Lee C (2010) Occurrence of *Fusarium* mycotoxin beauvericin in animal feeds in Korea. *Animal Feed Science and Technology*, **157**, 190-194.

Martins HML, Almeida IFM, Camacho CRL, Santos SMO, Costa JMG, Bernardo FMA (2011) Occurrence of fumonisins in feed for swine and horses. *Revista Iberoamericana de Micología*.

Martins HM, Marques M, Almeida I, Guerra MM, Bernardo F (2008) Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. *Mycotoxin Research*, **24**, 19-23.

Maul R, Müller C, Rie S, Koch M, Methner FJ, Irene N (2012) Germination induces the glucosylation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various grains. *Food Chemistry*, **131**, 274-279.

Pereyra G, Pereyra CM, Ramirez ML, Rosa CAR, Dalcero AM, Cavaglieri LR (2008) Determination of mycobiota and mycotoxins in

pig feed in central Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, **46**, 555-561.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. (Eds.). (1997) *Fungi and Food Spoilage*, second ed. Chapman & Hall, Cambridge, 593.

Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed and Science and Technology*, **78**, 21-37.

Prandini A, Sigolo S, Morlacchini M, Marocco A, Lo Pinto M (2011) High-protein maize in diets for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, **165**, 105-110.

Roigé MB, Aranguren SM, Riccio MB, Pereyra S, Soraci AL, Tapia MO (2009) Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, **26**, 233-237.

Rosa CAR, Keller KM, Keller LAM, Pereyra MLG, Pereyra CM, Dalcerro AM, Cavaglieri LR (2009) Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. *Toxicon*, **53**, 283-288.

Rosa CAR, Ribeiro JMM, Fraga M.J, Gatti M, Cavaglieri LR, Magnoli CE, Dalcerro AM, Lopes CWG (2006) Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Veterinary Microbiology*, **113**, 89-96.

Samson RA, Hockstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (2002) *Introduction to food and airborne fungi*. Wageningen Press, The Netherlands: Utrecht Ponson & Looyen.

Scussel VM (2002) Fungos em Grãos Armazenados. In: Lorini I; Miike, L; Scussel, Vm. *Armazenagem de Grãos*. Ed. Biogeneziz, Cap. 9, Campinas SP, 938.





**5 CAPÍTULO 4**

**ANALYSIS OF THE PRESENCE OF MYCOTOXINS IN SWINE  
FEED AND ITS POSSIBLE EFFECTS ON SEMEN QUALITY**



## 5 ANALYSIS OF THE PRESENCE OF MYCOTOXINS IN SWINE FEED AND ITS POSSIBLE EFFECTS ON SEMEN QUALITY

Nones, Janaína; Nones, Jader; Scussel, Vildes Maria

Laboratory of Mycotoxicology and Other Contaminants – LABMICO. Department of Food Science and Technology. Center for Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Rod Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brazil.

### 5.1 ABSTRACT

The presence of mycotoxins in swine feed can trigger off serious problems. Besides influencing the quality and quantity of semen produced, it can also cause weight loss, as well as alterations of the immune and reproductive systems. This study reports on an assessment of male swine reproductive parameters over the years 2010 to 2011, in a small rural property in Santa Catarina State, Brazil, seeking to correlate them with possible contamination of the swine's diet by different mycotoxins. Out of a total of 12 samples of feed collected between August 2010 and February 2011, 58.3% were found to be contaminated with fumonisins (FBs). Only one sample of feed was contaminated by the zearalenone (ZON) (64.10 µg/kg). No contamination by aflatoxins (AFLs), ochratoxin A (OTA) and sterigmatocystin (EST) was detected. 75 swine semen samples were collected and analysed in relation to reproductive parameters (motility, volume, sperm density). The findings were correlated to the levels of mycotoxins in feed given to the sample donors. Despite the high levels of mycotoxin contamination of the feed (FBs and ZON), no significant variations in motility, volume or sperm density were observed in this study.

**Key words:** reproduction, feed, mycotoxins, semen, swine.

## 5.2 RESUMO

### ANÁLISE DA PRESENÇA DE MICOTOXINAS EM RAÇÕES PARA SUÍNOS E SEUS POSSÍVEIS EFEITOS NA QUALIDADE DO SÊMEN

A presença de micotoxinas em alimentos para suínos pode desencadear sérios problemas. Além de influenciar na qualidade e quantidade do sêmen produzido, pode também causar a perda de peso, assim como alterações no sistema imunológico e reprodutivo. Este estudo relata uma avaliação dos parâmetros reprodutivos de machos suínos ao longo dos anos de 2010 a 2011, em uma pequena propriedade rural localizada em Santa Catarina, Brasil, buscando correlacionar estes dados com a possível contaminação das dietas de suínos por diferentes micotoxinas. Do total de 12 amostras coletadas entre agosto de 2010 a fevereiro de 2011, 58,3% estavam contaminadas por fumonisinas (FBs). Apenas uma amostra de ração estava contaminada por zearalenona (ZON) (64.10 µg/kg). Nenhuma contaminação foi detectada para aflatoxina (AFLs), ocratoxina (OTA) e esterigmatocistina (EST). Foram coletadas 75 amostras de sêmen suínos e analisadas em relação aos parâmetros reprodutivos (motilidade, volume e densidade espermática). Os resultados foram correlacionados com os níveis de micotoxinas da ração fornecida aos reprodutores. Apesar dos elevados níveis de contaminação nas rações (FBs e ZON), não foi observado neste estudo variações significativa na motilidade, volume ou densidade espermática.

**Palavras-chave:** reprodução, ração, micotoxinas, sêmen, suíno.

## 5.3 INTRODUCTION

The improvement in the efficiency of swine production, in recent years, is the result of the implementation of several new biotechnologies and production practices (Gerrits et al., 2005). Artificial insemination (AI), for example, can increase the quantity and quality of swine breeding. AI has replaced natural mating because it is a faster, easier and cheaper means of introducing superior genes in sow herds, while minimizing the risk of disease (Vazquez et al., 2008; Maes et al., 2008). To control and improve the quality of swine reproduction, it is necessary to evaluate genetic and environmental factors such as nutrition (including food safety) and health (Ewuola and Egbunike, 2010). Mycotoxins found in animal feed are among the known causes of some reproductive swine disorders (Biró et al., 2003).

Mycotoxins are toxins produced as secondary metabolites by filamentous fungi which, when present in feed, cause serious damage to a squad of swine. These metabolites constitute a toxigenic group that can cause disease and even death in human beings and other animals (Zain, 2011). Aflatoxins (AFLs), fumonisins (FBs), zearalenone (ZON), ochratoxin A (OTA) and sterigmatocystin (EST) are the major mycotoxins whose presence has been associated with reproductive problems. They contribute to reproductive disorders in swine breeding units by causing the animal to reduce food intake, delay growth or by affecting vital organs, reducing weight gain, lowering immunity, or causing reproductive alterations that influence semen quantity and quality (Biró et al., 2003).

AFLs cause a direct lysis of sperm cell membrane, which results in the loss of lysozyme, an enzyme which facilitates the penetration of the ova by spermatozoa (Shuaib et al., 2010). The EST has a similar mechanism and effect to AFLs. However, it is less toxic. Diets formulated with ingredients contaminated with FBs can negatively influence swine spermatogenesis (Ewuola and Egbunike, 2010). In breeding, ZON causes decreased production of testosterone, testicle weight, induction of feminization, decreased libido (D'Mello et al., 1999; Zinedine et al., 2007, Benzoni et al., 2008) and induced germinal epithelial degeneration and altered sperm formation in boars (Zain, 2011). OTA can also potentially affect sperm production and semen quality of boars (Solti et al., 1999; Duarte et al., 2011).

Mycotoxins have been shown to affect such functional parameters in boars as sperm stability, motility and spermatogenesis. For this reason, the aim of this study has been twofold: to analyse possible contamination of boar feed by mycotoxins (FBs, ZON, OTA, AFLs and EST) and to correlate these findings with those gathered for reproductive parameters of male swine over the years 2010 to 2011 in a small rural property in the State of Santa Catarina/Brazil.

## **5.4 MATERIALS AND METHODS**

### ***Swine farm characteristics***

This study was conducted on a farm situated in the Itajaí Valley region, in Santa Catarina State, Southern Brazil, between August 2010 and February 2011.

### *Assessment of parameters used for the sperm quality determination*

*Semen collection:* 75 semen samples were collected from two boars: breeder A and breeder B (Table 1).

*Semen analyses: Volume:* the ejaculate volume was measured directly as per the markings on the collection bottle (Lima et al., 2007). *Density:* to quantify sperm density, a semen sample (1 mL) was collected and placed in a sperm densimeter with saline. *Motility:* motility was evaluated on a scale from 0 to 100%, according to Scheid (1993).

**Table 1.** Breeders used in the study

Male swine	Collection	
	Breeder	Number of Samples
A	37	August/February
B	38	August/February
<b>Total</b>	<b>75</b>	NA

NA. not applied

### *Assessment of feed mycotoxin contamination*

*Sample collection:* breeder's feed samples, were collected for analysis of FBs, ZON, OTA, AFLs and EST for the period specified. The main breed feed composition can be seen in Table 2. 1 kg samples were collected from each of the 25 kg bags, stored in the property's shed.

**Table 2.** Composition of the feed intended for swine breeding

Ingredients	Amount	
	(kg)	(%)
Corn	325	65
Soyabean meal	80	16
Rice meal	75	15
Minerals	20	4
Total	100	500

*Assesment of AFLs, OTA, ZON and EST contamination:* was performed by the method described by Soares and Rodrigues-Amaya (1989).

Briefly, each sample was extracted with methanol and potassium chloride (4%), filtered and, after that, ammonium sulphate (30%) was added, followed by moderate stirring and filtration. The resulting filtrate was transferred to a separation funnel, and toxins were extracted with chloroform. Extracts were collected in a beaker and submitted to solvent evaporation. Extracts were re-suspended in 200  $\mu\text{L}$  of toluene and immediately subjected to thin layer chromatography. The analyses was performed in cuba saturated with the following solvent system: toluene – ethyl acetate – formic acid (60:40:0.5). The toxins were detected under UV light and quantified by comparison against toxin standards ( $\lambda$ : 256 & 365 nm). The limits of quantification (LOQ) and determination (LOD) were 2 and 1  $\mu\text{g/L}$ , respectively.

*FBs: Analysed* by liquid chromatography and fluorescence detector (LC/FD) at 335 and 440 nm wavelength (excitation and emission, respectively), as described by AOAC (2005). LOD was 0.5 and LOQ was 1  $\mu\text{g/kg}$  for both,  $\text{FB}_1$  and  $\text{FB}_2$ .

**Statistical Analysis:** performed by variance analysis (ANOVA) and Turkey's test, to evaluate significant differences among the means ( $P < 0.05$ ) using GraphPad Prism 4.0 software. The results were expressed as the mean values and standard errors.

## 5.5 RESULTS AND DISCUSSION

The first objective of this study was achieved by analyzing breeder feed to detect mycotoxins. 58.3% of a total of 12 samples, collected between August 2010 and February 2011, were found to be contaminated with FBs.  $\text{FB}_1$  ranging from 58.5 to 531.2  $\mu\text{g/kg}$ , with an average of 173.2  $\mu\text{g/kg}$ , was detected in seven samples.  $\text{FB}_2$  was found in three samples and contamination ranged from 81.2 to 997.6  $\mu\text{g/kg}$ , with an average of 114.4  $\mu\text{g/kg}$ . Only one sample (8.3%) of feed was contaminated by ZON (64.10  $\mu\text{g/kg}$ ). No contamination by AFLs, OTA or EST was found (Table 3).

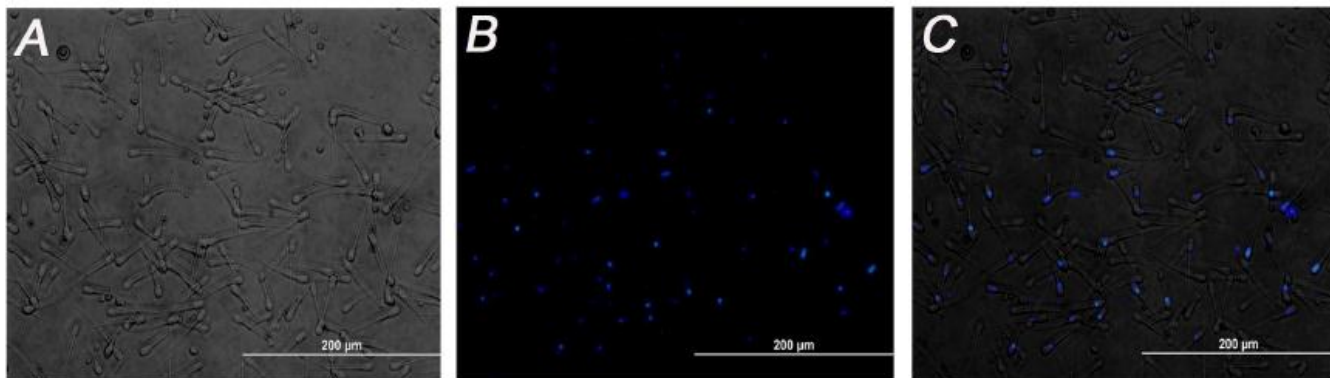
The second objective of this study involved attempting to correlate the presence of mycotoxins to the existence of alterations of the quantity and quality of breeder sperm (sperm motility, volume of the ejaculate and sperm density). Sperm motility is considered one of the most important parameters in evaluating the fertilizing ability of sperm (Benzoni et al., 2008). According to our results, motility remained at 80% and was, therefore, not affected by FBs and ZON (Figure 1).

**Table 3.** Assessment of swine breeder feed samples for mycotoxins

<i>Feed</i>	<b>Mycotoxins (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>						<b>Collection month</b>
	<b>FB<sub>1</sub></b>	<b>FB<sub>2</sub></b>	<b>ZON</b>	<b>OTA</b>	<b>AFLs</b>	<b>EST</b>	
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	August
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	August
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	September
	58.5	ND	ND	ND	ND	ND	September
	429.0	ND	ND	ND	ND	ND	October
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	November
	ND	ND	64.1	ND	ND	ND	November
	200.6	ND	ND	ND	ND	ND	December
	515.2	293.6	ND	ND	ND	ND	December
	205.1	ND	ND	ND	ND	ND	January
	531.2	997.6	ND	ND	ND	ND	January
	138.9	81.2	ND	ND	ND	ND	February
<i>Positive samples (n)</i>	7	3	1	0	0	0	
<i>(%)</i>	58.3	25.0	8.3	0	0	0	
<i>Average (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</i>	173.2	114.4	5.3	0	0	0	
<i>Max (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</i>	531.2	997.6	64.1	0	0	0	
<i>Min (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</i>	58.5	81.2	ND	0	0	0	

ND not detected





**Figure 1.** (A) Photomicrograph of boar semen (B) Sperm nuclei staining by DAPI (C) Overlap of A and B.

Our results are consistent with data published by Rajkovic (2007), which shows no semen alterations by FBs and EST. Differently, Alm and collaborators (2002) show that ZON was able to decrease sperm motility. The fact that a very low level of ZON was present in our sample, may explain the fact that motility was not affected in our study.

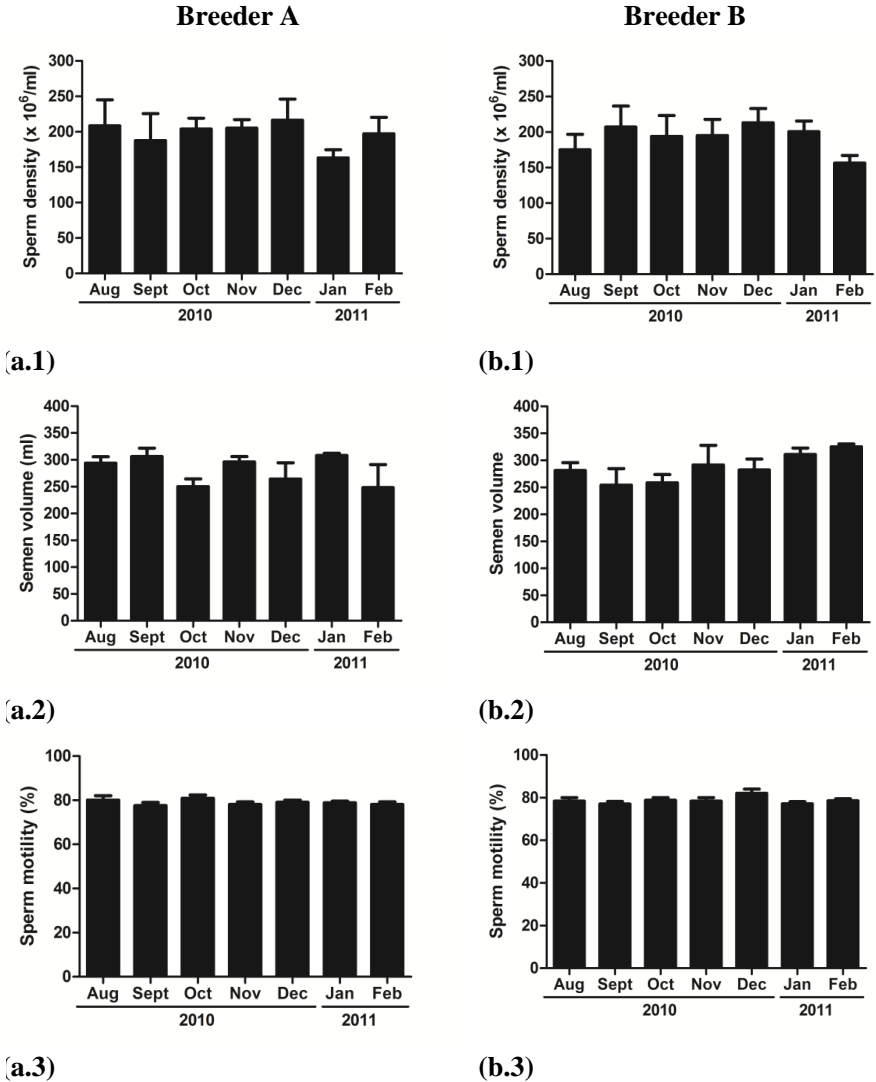
AFLs and OTA can deteriorate semen quality, for example, by increasing abnormalities in sperm morphology and decreasing its motility (Alm et al., 2002). However, no contamination by these mycotoxins was found in our samples.

The average semen volume for breeders A and B was 280.88 ( $\pm$  26.13) and 286.16 ( $\pm$  25.75) (mL), respectively. Statistical analysis revealed no significant variation of this parameter in the relevant months (Figure 2). Our results are in agreement with Kozink (2004), i.e. volume of an ejaculate ranges from 75 to 400 mL.

Likewise, sperm density did not change significantly (Figure 2). In our study, contamination levels found in the feed, ranged from 58.5 to 531.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for FB<sub>1</sub> to 81.2 to 997.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for FB<sub>2</sub>. Gbore and Egbunike (2008) found that levels of 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of feed lowered sperm production. Our results may be interpreted as too low to cause any alterations. Furthermore, important environmental factors may affect sperm production. These include temperature, photoperiod, humidity and nutrition (Ewuola and Egbunike, 2010; Purdy et al., 2010). These factors being under control, as is the case for the property in focus, may contribute to preventing or minimizing the risk of spermatogenic pathologies, even in the presence of feed contaminants.

## 5.6 CONCLUSION

Our results show the presence of mycotoxins (FBs and ZON) in breeder feed given to boars in a small property in the South of Brazil between 2010 and 2011. In spite of this, no changes were found in semen quality (motility, sperm density, volume of ejaculate). Therefore, no correlation between these factors can be asserted. Other factors that may be considered in future studies include higher concentrations of contaminants than those found in this article, follow up for longer periods of exposure to contaminated feed, or focus on other parameters than were covered in this study. Any or all of these may eventually be shown to be responsible for reproductive alterations.



**Figure 2.** Breeders A and B semen analysis: a.1 and b.1 - sperm density; a.2 and b.2 - semen volume; a.3 and b.3 - sperm motility.

## 5.7 REFERENCES

- Alm, K., M. Dahlbom, M. Säynäjärvi, M.A. Andersson, M.S. Salkinoja-Salonen and M.C. Andersson. 2002. Impaired semen quality of AI bulls fed with moldy hay: a case report. *Theriogenology*. 58: 1497-1502.
- AOAC. 2005. Association Official Method of Analysis of AOAC internacional. Thiex, NJW (E.d.) Animal feed. Art 965-16. Sampling of animal feed and food. Art. 930.15. 18 ed. Maryland.
- Benzoni, E., F. Minervini, A. Giannoccaro, F. Fornelli, D. Vigo and Visconti A. 2008. Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reprod. Toxicol.* 25: 461-467.
- Biró, K., I. Barna-Vetró, T. Pécsi, E. Szabo, G. Winkler, J. Fink-Gremmels and L. Solti. 2003. Assesment of spermatological parameters in ochratoxin A- challenged boars. *Theriogenology*. 60:199-207.
- D'Mello, J.P.F., C.M. Placinta and A.M.C. Macdonald. 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Sci Technol.* 80:183-205.
- Duarte, S. C., C. M. Lino and A. Pena. 2011. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: an undesirable mycotoxin with health and performance effects. *Vet Microbiol.* 154:1-13.
- Ewuola, E.O. and G.N. Egbunike. 2010. Gonadal and extra-gonadal sperm reserves and sperm production of pubertal rabbits fed dietary fumonisin B1. *Anim Reprod Sci.* 119:282-286.
- Gbore, F.A. and G.N. Egbunike. 2008. Testicular and epididymal sperm reserves and sperm production of pubertal boars fed dietary fumonisin B<sub>1</sub>. *Anim Reprod Sci.* 105: 392-397.
- Gerrits, R. J., J. K. Lunney, L. A. Johnson, V. G. Pursel, R.R. Kraeling, G. A. Rohrer and J. R. Dobrinsky. 2005. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology*, 63:283-299.

Kozink, D. M., M.J. Estienne, A.F. Harper and J.W. Knight. 2004. Effects of dietary L-carnitine supplementation on semen characteristics in boars. *Theriogenology*. 61:1247-1258.

Lima, F.P., L.D.S. Murgas, S. L. Oliveira, D. Lima, A. L. N. Alvarenga and E. T. Fialho. 2007. Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática e atividade da aspartato amino transferase no sêmen resfriado de suíno. *Ciência Agrotecnologia*. 31: 1506-1511.

Minervini, F., G.M. Lacalandra, A. Filannino, A. Garbetta, M. Nicassio, M. E. Dell'aquila and A. Visconti. 2010a. Toxic effects induced by mycotoxin Fumonisin B<sub>1</sub> on equine spermatozoa: Assessment of viability, sperm chromatin structure stability, ROS production and motility. *Toxicol In Vitro*. 24:2072-2078.

Maes, D., H. Nauwynck, T. Rijsselaere, B. Mateusen, P. Vyt, A. Kruif and A. Van Soom. 2008. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*. 70:1337-1345.

Purdy, P.H., N. Tharpb, T. Stewartb, S.F. Spillera and H.D. Blackburna. 2010. Implications of the pH and temperature of diluted, cooled boar semen on fresh and frozen-thawed sperm motility characteristics. *Theriogenology*. 74:1304-1310.

Rajkovic, A., M. Uyttendaele and J. Debevere. 2007. Computer aided boar semen motility analysis for cereulide detection in different food matrices. *Int J of Food Microbiol*. 114:92-99.

Scheid I. R. 1993. Manual de inseminação artificial de suínos: procedimentos e métodos no laboratório. Brazil, Santa Catarina.

Shuaib, F. M.B., J. Ehiri, A. Abdullahi, J.H. Williams and P. E. Jolly, 2010. Reproductive health effects of aflatoxins: A review of the literature. *Reprod Toxicol*. 29:262-270.

Soares, L. M. V. and D. B. Rodriguez-Amaya. 1989. 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*. 72: 22-26.

Solti L., T. Pécsi, I. Barna-Vetró, F. Szász, K. Biró and E. Szabo. 1999. Analysis of serum and seminal plasma after feeding ochratoxin A with breeding boars. *Anim. Reprod. Sci.* 56:123-132.

Vazquez, J.M., J. Roca, M.A. Gil, C. Cuello, I. Parrilla, J.L. Vazquez and E.A. 2008. New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology* 70:1216-1224.

Zain, M.E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Society.* 15:129-144.

Zinedine, A., J. M. Soriano, J. C Molto and J. Manes. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45:1-18.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através deste trabalho foi possível avaliar a qualidade e segurança de *ingredientes* (milho, farelo de soja e de arroz), *rações* (gestação e inicial) e *resíduo da pré-limpeza do milho*, fornecidos para suínos da pequena propriedade em estudo do Vale do Itajaí, Estado de Santa Catarina.

Os dados de composição das *rações* e *ingredientes* quanto a proteína, lipídeo, Ca e P estavam de acordo com os limites, necessários para a nutrição dos animais, estabelecidos por Rostagno (2011) e NRC (1998). No entanto, a quantidade de fibra apresentou valores inferiores aos recomendados em 33% das amostras de milho, 41% das amostras de farelo de arroz e 100% das amostras de farelo de soja, os quais deverão ser corrigidos para que possam favorecer uma boa digestibilidade nas dietas futuras desses animais.

A contaminação por AFLs e ZON foi encontrada em apenas 6,9% amostras de *ingredientes* e *rações*. As AFLs foram encontradas em amostras de farelo de arroz, milho e ração inicial a níveis de 43,33, 34,52 e 49,31  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Apenas uma amostra de ração gestação estava contaminada com ZON (64,10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), sendo esta ração fornecida a fêmeas gestantes e machos reprodutores no plantel de estudo. OTA e EST não foram encontradas em nenhuma amostra analisada, o que indica maior segurança na dieta com relação a essas toxinas. Já as FBs foram encontradas nas amostras de milho, farelo de arroz e de soja, sendo as médias de contaminação, 795,9, 138,8 e 198,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Como esperado o resíduo da *pré-limpeza* do milho apresentou as maiores contaminações, sendo que 83 e 100% das amostras avaliadas estavam contaminadas por FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, respectivamente. Mais de 50% das amostras de rações para suínos analisadas continham contaminações por FB<sub>1</sub>. A porcentagem de contaminação por FB<sub>2</sub> foi maior na ração inicial (33,33%) do que na ração de gestação (25%).

Com relação à contagem de bolores e leveduras, o resíduo da *pré-limpeza* do milho foi o que apresentou maior valor, demonstrando que a limpeza do milho realizada antes da moagem do grão pode ajudar na diminuição do número de bolores e leveduras encontrados no milho. Nas amostras de *ingredientes* e *rações* foram identificados 11 gêneros fúngicos, sendo os mais comumente encontrados os do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*.

Apenas duas amostras de rações (gestação e inicial) apresentaram valores superiores a 0,9 para  $a_w$ , o que pode propiciar o

desencadeamento fúngico. A mc das amostras de farelo de arroz, milho e soja foram de 9,77, 12,30 e 12,93%. Já as rações de inicial e gestação apresentaram mc de 11,84 e 12,23%, respectivamente.

Com o intuito de correlacionar a presença de micotoxicose *versus* diminuição da qualidade espermática, características morfológicas do sêmen suíno foram realizadas. No entanto, mesmo havendo a presença de micotoxinas nos ingredientes utilizados na ração de suínos (reprodutores), nenhuma alteração na motilidade, vigor e densidade espermática foi observada.

Em síntese, através desse estudo, podemos verificar que a propriedade de estudo é capazes de produzir alimentos para animais com qualidade, no entanto o acompanhamento físico-químico e micotoxicológico pode contribuir na detecção de ingredientes e/ou rações que estejam fora dos padrões recomendados.

Uma legislação nacional que contemple níveis para todas as micotoxinas que ocasionam problemas na saúde e desenvolvimento do suíno, principalmente a ZON, FBs, OTA e DON, faz-se necessária. Da mesma forma, os níveis de composição centesimal devem ser estabelecidos, uma vez que a legislação brasileira de 1988 (BRASIL, 1988) foi revogada, necessitando novos parâmetros de comparação e de controle.

Cabe ressaltar que a detecção de dietas que estão em desacordo com as Tabelas nutricionais e com valores pré-estabelecidos, poderão contribuir para correção de problemas relacionados à fabricação de rações, minimizando o desencadeamento de patologias, ampliando a produção e, conseqüentemente, contribuindo para maximização da lucratividade.

No futuro, a aquisição de ingredientes e rações, com base no pagamento do seu teor nutricional, bem como o surgimento de leis destinadas a padronizar os valores nutricionais e de micotoxinas específicos, poderão ser uma alternativa mais justa para compradores e fornecedores destas matérias primas. Além disso, alternativas rápidas, baratas e eficazes para detecção de micotoxinas, bem como seus metabólitos na urina, sangue e órgãos específicos como o fígado e rins do suíno deverão ser aprimoradas e implantadas. Da mesma forma, técnicas para eliminação desses contaminantes poderão evitar qualquer efeito adverso no desempenho do animal, bem como garantir a qualidade e segurança da carne e seus subprodutos que serão fornecidos como alimento humano.



## **8 APÊNDICE**

### **ZEARALENONE, METABOLITES AND THEIR EFFECTS ON SWINE REPRODUCTIVE PERFORMANCE: A REVIEW**



## 8.1 ZEARALENONE, METABOLITES AND THEIR EFFECTS ON SWINE REPRODUCTIVE PERFORMANCE: A REVIEW

Nones J.; Scussel, V. M.

Laboratory of Mycotoxicology and Other Contaminants – LABMICO. Department of Food Science and Technology. Center for Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Rod Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianopolis, SC, Brazil.  
[\\*vildescussel\\_2000@yahoo.co.uk](mailto:vildescussel_2000@yahoo.co.uk)

### Abstract

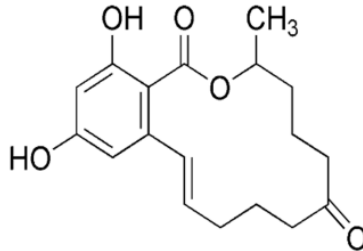
Alterations on estrogenic hormones balance during swine growth can lead to serious problems to swine reproductive performance. One of the factors that may contributed to changes on swine estrogen hormones balance is the presence of zearalenone (ZON) in fungi contaminated feed and/or their ingredients (maize / barley / wheat / oats / sorghum). ZON is produced by *Fusarium* species (*F.culmorum*, *F. graminearum* and *F. tricinctum*) under influence of high temperature and relative humidity. When ZON is ingested, it is transformed into metabolites (ZAN,  $\alpha$ -ZOL,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL and  $\beta$ -ZOL) which also have estrogenic properties and lead to fertility reduction. Some ZON toxic effects are the development of defective sperm and oocytes (boar and sow, respectively); abortion (stillbirth, mummified); off-spring reduced size and weight apart from changes on progesterone and estradiol serum levels. Either ZON or the metabolites have been reported in swine, poultry, cattle and horses feed at levels varying as low as 3 up to 165.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  which have caused serious economic losses worldwide, apart from the risk of being tranferred to meat/liver, food of human consuption. This revision presents updated overview on relevant work reported in the last 15 years regarding ZON and metabolites characteristics, their effects on swine performance and feed contamination.

**Keyword:** Zearalenone, Swine, Metabolites, Disease, Health, Toxicity.

### Introduction

Mycotoxins are produced by fungi and can be found contaminating either feed ingredients and/or in the final product due to the low grain quality utilized and/or the environmental conditions

allowing them to grow. The main toxins affecting animals are aflatoxins, ochatoxin A, fumonisins, zearalenone (ZON) among others. Swine are highly sensitive, especially to ZON toxic effect (Figure 1).



**Figure 1.** Chemical structure of zearalenone.

ZON is produced by several species of *Fusarium* such as *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. tricinctum* among others (Gajecka *et al.* 2011; Liu *et al.*, 2012) (Table 1) which are prevalent in temperate regions and commonly found in cereals grown in America, Europe, Africa and Asia continents (Creppy, 2002; Tiemann *et al.* 2003). The production of ZON by *Fusarium* is influenced by the interaction of several factors such as moisture content, relative humidity and especially by temperature variation (Table 1).

The highest amounts of ZON produced by *Fusarium* species have been observed below 25°C, at high amplitude of daily temperature and at 16% humidity (Zwierzchowski *et al.* 2005; Nuryono *et al.* 2005; Kinani *et al.* 2008).

ZON can be found in several cereal crops such as maize, barley, wheat, oats, sorghum and sesame seeds, as well as in hay and corn silage (Marin *et al.* 2010). Different animal's species including humans can acquire problems by consuming food contaminated by ZON, and swine are the species most sensitive to this feed contaminant.

Considering that swine are the most ZON sensitive animal species and the need of updating information regarding its derivatives, the purpose of this revision is to present an overview of the relevant work carried out in the last 15 years regarding their characteristics, effects on swine performance, feed contamination and regulation.

**Table 1.** Majors zearalenone fungi producing species and their optimal development temperature

<i>Fusarium species</i>	<b>Temperature (°C)</b>		
	<b>Optimal</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<i>F. avenaceum</i>	25	-3	31
<i>F. crockwellense</i> (Synonym: <i>F. cerealis</i> )	21	0	30
<i>F. equiseti</i>	21- 30	-3	>35
<i>F. graminearum</i>	25	0	31
<i>F. oxysporum</i> (Synonym: <i>F. redolens</i> )	25-30	5	37
<i>F. tritinctum</i>	22-23	0-10	31- 32.5
<i>F. culmonorum</i>	25	0	31

(Samson and Hoekstra, 2004)

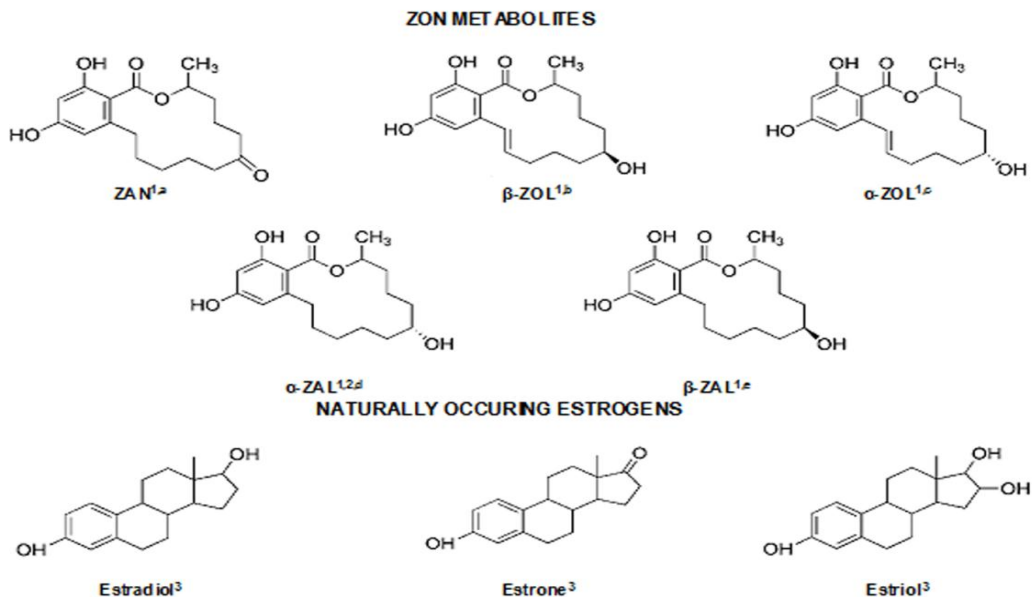
## Zearalenone and metabolites formation and characteristics

When a contaminated feed is ingested by the animal, ZON is absorbed and metabolized by the intestine and liver tissues through redox reactions producing several metabolites: zearalanone (ZAN),  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) and  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL) which have similar chemical structures estrogenic hormones. Figure 2 presents ZON and metabolites chemical structures with their similarities to the natural estrogens (estradiol, estrone and estriol). ZON and metabolites lead to negative reproductive effects by changing estrogen hormone natural balance. They are considered endocrine disruptors since they regulate hormonal activity at the pre-receptor level (Penning *et al.* 2004).

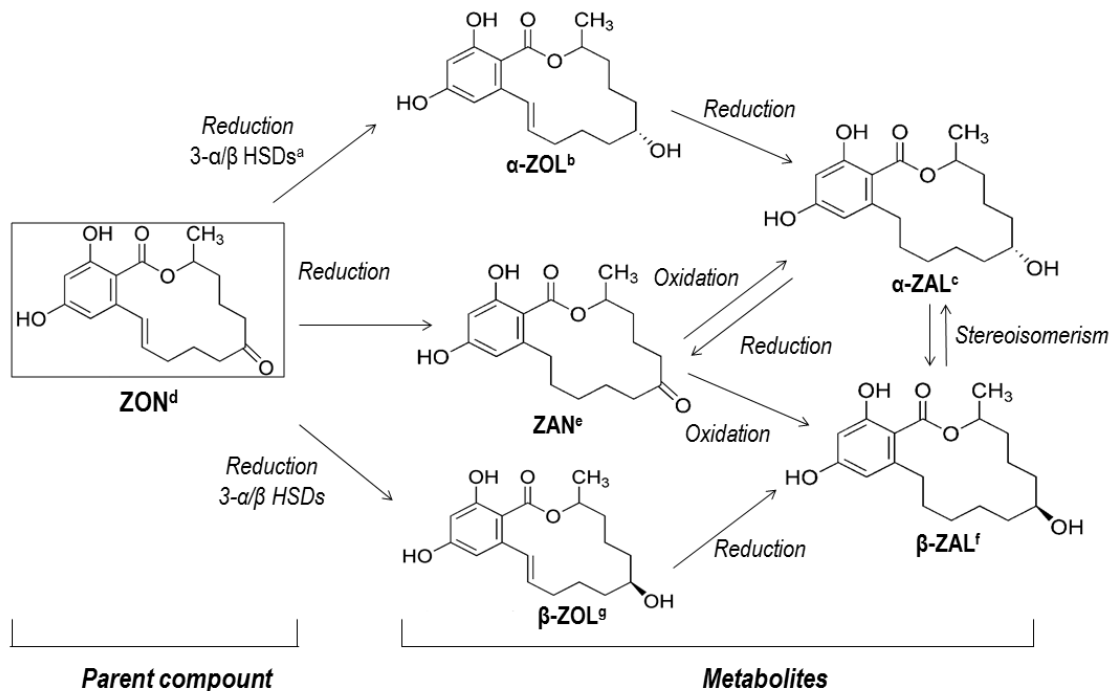
Swine have been found to convert ZON predominantly to  $\alpha$ -ZOL in the liver, the small intestines and even in granulose cells (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007). According to studies carried out by Malekinejad *et al.* (2006a) there are differences between animal species in the hepatic biotransformation of ZON. The authors demonstrated that swine seem to convert ZON mainly into  $\alpha$ -ZOL, whereas in cattle  $\beta$ -ZOL is the dominant hepatic metabolite.

In several animal species and probably in humans,  $\alpha$ - and  $\beta$ -ZOL are produced through ZON reduction, in the liver by 3- $\alpha/\beta$  hydroxysteroid dehydrogenases (Ayed *et al.*, 2011). These enzymes play an essential role in the homeostasis of the natural occurring steroid hormones (Figure 3). They catalyze not only the final step in the biosynthesis of androgens, estrogens, and progesterone, but also convert the receptor active keto-steroids into their less active reduced forms, thus regulating the hormone activity at the pre-receptor level (Malekinejad *et al.*, 2006b).

The formation of  $\alpha$ -ZAL from ZON or  $\alpha$ -ZOL is controversial because  $\alpha$ -ZAL is also the active component in commercial anabolic growth promoters. Which has been allowed their use in some countries including the United States, but are banned in the European Union (Sorensen and Elbaek, 2005). Complications in pharmacokinetic distribution and secondary effects attributed to other unidentified factors can make it difficult to decipher the direct toxicity mechanism of  $\alpha$ -ZOL to the cells (Yang *et al.*, 2007). The major metabolites of  $\alpha$ -ZAL are ZAN and  $\beta$ -ZAL by oxidoreduction and a stereoisomerism reactions, respectively (Zheng *et al.*, 2011).



**Figure 2.** Molecular structures of ZON, its metabolites and the naturally occurring estrogens. <sup>a</sup>ZAN: zearalanone; <sup>b</sup>β-ZOL: β-zearalenol; <sup>c</sup>α-ZOL: α-zearalenol; <sup>d</sup>α-ZAL: α-zearalanol; <sup>e</sup>β-ZAL: β-zearalanol; (<sup>1</sup>Produced by fungi and in the animal body; <sup>2</sup>used as hormone in animals. <sup>3</sup>only produced in the body).



**Figure 3.** Biotransformation of zearalenone in its metabolites by swine liver and intestinal tissues cells (<sup>a</sup> 3-α/β hydroxysteroid dehydrogenases; <sup>b</sup> α-zearalenol; <sup>c</sup> α-zearalanol; <sup>d</sup> zearalenone; <sup>e</sup> zearalanone; <sup>f</sup> β-zearalanol; <sup>g</sup> β-zearalenol; \* intestinal tract flora).



Important to emphasize that, although these metabolites are produced mainly by the animal metabolism, they can be also produced by fungi, however at much lower concentrations though. The biotransformation of ZON by *Fusarium* produces mainly  $\alpha$ -ZOL and  $\beta$ -ZOL (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

### **Zearalenone and metabolites physical-chemical properties**

Chemically, ZON (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>) is a resorcylic acid lactone, described as 6-[10-hydroxy-6-oxo-*trans*-1-undecenyl]-B-resorcylic acid lactone (Zinedine *et al.*, 2007). It is white in color, crystalline in structure, has a melting point of 164-165 °C and molecular weight of 318.36. It is insoluble in water, however soluble in aqueous alkali and various organic solvents (Döll and Dänicke, 2011). The name is derived partly from the generic name of the *host plant* infected by *Fusarium* (corn = *Zea*) and partly from its chemistry (*ral* = from resorcylic acid lactone, *en* = from double bond at C-1-2, and *one* = from ketone) (Urry *et al.*, 1966).

ZON is a stable, either during the storage/milling and processing/cooking conditions, and does not decompose at high temperatures (Atoui *et al.*, 2012). The fluorescence properties of ZON are sensitive to the toxin environment and is modulated by solvent, pH, and water quenching phenomena (Appell and Bosma, 2011). ZON and some of its derivatives develop a blue-green fluoresce under ultraviolet radiation (360 nm) and is even more intense when irradiated at 260 nm (Agag, 2004). However the fluorescence decreases with the double bond C<sub>11</sub>-C<sub>12</sub> reduction in the ZOLs metabolites (Miles *et al.*, 1996).

The five metabolites chemical structure differences are related to the (a) double bonds between C<sub>10</sub> and C<sub>11</sub> and (b) hydroxyl or ketone group at C<sub>6</sub>. Their molecular formula vary with the hydrogens number, being for ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL,  $\alpha$ -ZOL and  $\beta$ -ZOL of C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>, C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>, C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub> and C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>, respectively. Other differences are the isomery for the  $\alpha$  and  $\beta$  metabolites. Due to those differences the properties slightly differ: density (1.148 to 1.174), boiling point (576 to 599°C), refractive index (1.526 to 1.548) and flash point (207.8 to 217.9°C) (Table 2).

**Table 2.** Physical-chemical properties of zearalenone and its metabolites

<b>Compound</b>	<b>Molecular formula</b>	<b>Mass (g/mol)</b>	<b>Density (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Boiling point (°C)</b>	<b>Refractive index</b>	<b>Flash point (°C)</b>	<b>CAS Number</b>
<i>Parent</i>							
ZON	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	318.3643	1.169	600.396	1.539	219.503	17.924-92-4
<i>Metabolites</i>							
ZAN	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	320.3802	1.148	576.8	1.526	209.1	5.975-78-0
α-ZAL	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	322.3960	1.153	576	1.535	207.8	26.538-44-3
B-ZAL	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	322.3960	1.153	576	1.535	207.9	42.422-68-4
α-ZOL	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	320.3802	1.174	599	1.548	217.9	36.455-72-8
β-ZOL	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	320.3802	1.174	599	1.548	217.9	71.030-11-0

CAS (2011)

## Toxic effects of zearalenone and metabolites on swine

The toxic effects of ZON and its metabolites, described as having estrogenic properties, are related to the chemical structure of this mycotoxin, which is similar to the naturally occurring estrogens, estradiol, estrone and estriol - Figure 2 (Gromadzka *et al.*, 2009). Therefore their reproductive system is the major target of ZON toxicity.

ZON binds to estrogen receptors, causing functional and morphological changes in the responsive reproductive organs (Shier *et al.*, 2001). It also inhibits protein and DNA synthesis and triggers lipid peroxidation and cell death (Ayed-Boussema *et al.*, 2011). ZON has been shown to be immunotoxic and genotoxic, and to induce DNA-adduct formation *in vitro* cultures of bovine lymphocytes. It has a rather low oral acute toxicity; however the sub chronic and chronic toxicities are dominated by its estrogenicity. ZON is rapidly absorbed after oral administration. ZON has low acute toxicity after either oral or interperitoneal administration in mice, rats and guinea swine (oral LD<sub>50</sub> values of >4000 up to >20,000 mg/kg bw) (JECFA 2000). It intoxication is associated with decreased fertility, to reduced litter size, changed weight of adrenal, thyroid, pituitary glands in offspring and change in serum levels of progesterone and estradiol (Table 3).

Swine during growth, when affected by ZON, develop several changes such as reduction of fertility, reduced litter size, low weight, as well as progesterone and changes on estradiol serum levels (Table 3).

Estrogenic effects of ZON on *gilts* and *sows* include edematous uterus, ovarian cysts, increased follicular maturation and number of stillborns and decreased fertilization rate (Zain, 2011) (Figure 4). It can also be observed intensification of cell proliferation in the uterus and oviduct, swelling of the vulva and mammary glands, pseudo pregnancy through prolonged estrus intervals (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007; Mizutani *et al.*, 2011; Briones-Reyes *et al.*, 2007).

*Gilts*: gilts are more sensitive than sows (Edwards *et al.*, 1987). Research indicated that feeding feed to *gilts* contaminated with low concentrations of ZON (0.235 to 0.358 mg/kg) significantly reduced the intrinsic quality of the oocyte collected from these animals (Alm *et al.*, 2006). After administration of a single dose of ZON at 200 µg/kg body weight (µg/kg bw) in sexually immature gilts, α-ZOL was the main metabolite present in the blood at nanogram levels (Benzoni *et al.*, 2008). *Sows*: in the sows reproductive cycle, ZON contamination at levels of 5 to 10 mg/kg in feed causes, after weaning, a prolonged cycle or even anestrus (Meyer *et al.*, 2000).

**Table 3.** Zearalenone toxic effect on swine growth at different stages and time of exposure versus levels of contamination

Swine	Age (days)	Weight (kg)	Level of contamination ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Toxic effects	Reference
<b>Piglets</b>					
	NI	6	250	Uterus hyperemia and blood vessel dilatation Concentrations of serum protein and albumin decreasing	Feng <i>et al.</i> , 2008
<b>Boar</b>					
	77	23- 54	40	Reduced libido, associated with a decreased testosterone concentration in plasma	Berger <i>et al.</i> , 1981
<b>Gilts</b>					
	60	40	20-40	Endometrial hyperaemia and advanced hyalinization of the endometrial connective tissue	Gajecka <i>et al.</i> , 2011
	75	26.50	0-2000	Increased uterus weight and vulva width	Wang <i>et al.</i> , 2010
	180	103	4-358	Histopathological alterations with different degrees on glycogen reduction and increase of hemosiderine particles in the liver cells	Tiemann <i>et al.</i> , 2006
	180	103	210-9570	Regulation of oocyte	Alm <i>et al.</i> , 2006
	NI	50	20-40	ZON do not induce apoptosis in porcine ovaries, and the inhibition of proliferation must be associated with other mechanisms	Wasowicz <i>et al.</i> , 2007
<b>Sows</b>					
	315	198	358	Changes in liver and spleen tissues	Tiemann <i>et al.</i> , 2008
	NI	153-197	3.5- 48	Lower serum activities	Goyarts <i>et al.</i> , 2007

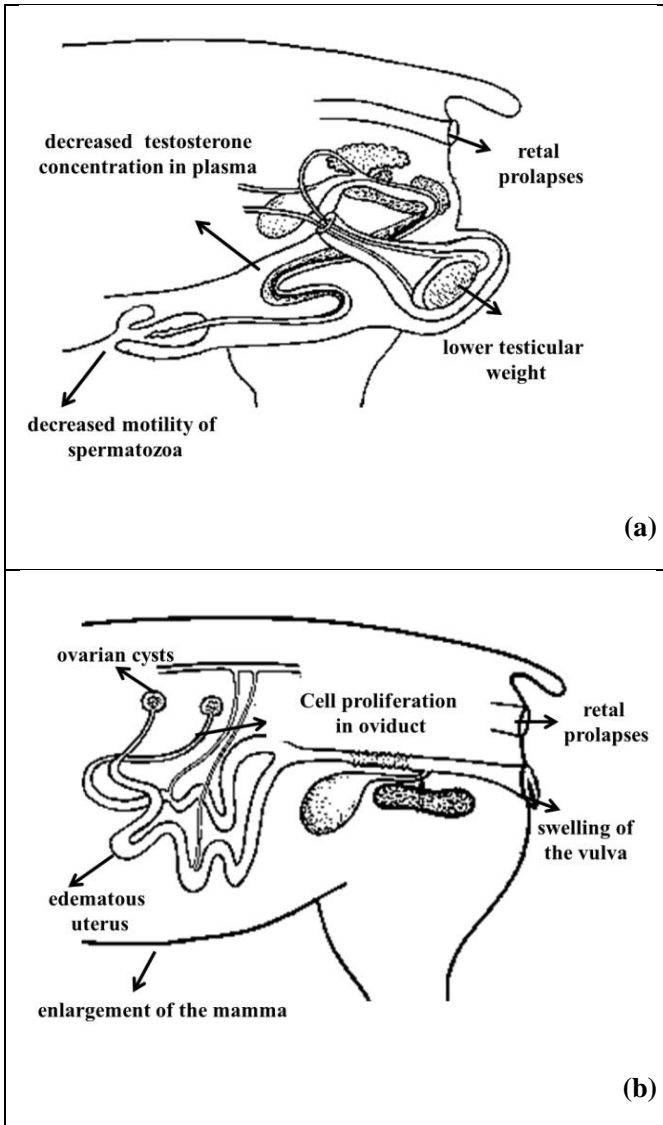
NI: not informed

However, little information is available on the negative effects of low concentrations of ZON (1.05 mg/kg diet) on nutrient availability, quantitative data about vulva and testis, histological damages on genital organs, and serum hormones in gender-dependent manner so far (Jiang *et al.*, 2012).

*Piglets:* studies have examined the possible impact of ZON during pregnancy and litter. When gilts/sows ingest ZON at doses of 100, 200, or even 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw during pregnancy, the result is fetal death and/or reduction of neonatal weight (Gajecka *et al.*, 2011). The influence of ZON on litter size can be explained by a negative impact on fertilization, but also by embryonic and fetal death of the piglets (Kanora and Maes, 2009). The piglets can be exposed in the utero as well as via sow's milk. Clinical symptoms indicative of exposure to ZON are essentially the same as described for adult animals (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007). Some piglets symptoms are reddening and swelling of the vulva, necrosis of the tail, enlargement of the mamma, weakness or splay-leg and vaginal and/or rectal prolapses (Etienne and Dourmad, 1994; Malekinejad *et al.*, 2005).

*Boars:* in toxicological experiments the effects of ZON on reproductive performance have been observed in **boars** such as lower testicular weight and decreased motility of spermatozoa (Figure 4). A reduced libido, associated with a decreased testosterone concentration in plasma. Moreover, exposure of boar semen to ZON or  $\alpha$ -ZOL at concentrations of 40 to 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of diluted semen induced significant reductions in sperm motility, viability and binding ability to zone pellucid (Tsakmakidis *et al.*, 2007).  $\beta$ -ZOL exclusively affected motility parameters (Benzoni *et al.*, 2008).

The metabolites  $\alpha$ -ZAL, ZAN and  $\beta$ -ZAL which have endocrine-related biological activity, are less biologically active than  $\alpha$ -ZAL (Zheng *et al.*, 2011). Although these metabolites have different structures, they cause similar effects in swine (Table 4). Among these metabolites,  $\alpha$ -ZOL,  $\alpha$ -ZAL, and  $\beta$ -ZAL have relatively higher estrogenic activity than that of ZON as follows:  $\alpha$ -ZOL >  $\alpha$ -ZAL >  $\beta$ -ZAL > ZON >  $\beta$ -ZOL (Shier *et al.*, 2001).



**Figure 4.** Swine reproduction organs alterations by ZON feed contamination: (a) *boars* and (b) *gilts/sows*.

**Table 4.** Zearalenone and its metabolite toxic effects of swine

Compound	Toxic effects	Reference
<b>Parent</b>		
ZON	Functional and morphologic changes in the reproductive organs	Shier <i>et al.</i> , 2001
<b>Metabolites</b>		
ZAN	Estrogenic potency	Marin <i>et al.</i> , 2010
$\alpha$ -ZAL	Fetal development defects	Trout <i>et al.</i> , 2007
$\beta$ -ZAL	Estrogenic potency	Marin <i>et al.</i> , 2010
$\alpha$ -ZOL	Fertilization ability of boar sperm defects	Benzoni <i>et al.</i> , 2008
$\beta$ -ZOL	Increasing maturation of swine oocytes in vitro defects	Frizzell <i>et al.</i> , 2011; Alm <i>et al.</i> , 2002

### Regulation for zearalenone worldwide

The exposure to contaminated food, the kinetic parameters including absorption, distribution in the body, metabolism and excretion, determine the doses and the toxin concentrations at target sites (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007). Concerned with the estrogenic action of ZON, several countries established levels of tolerance to avoid control of food contaminating. For human consumption some countries including Austria, Brazil, France, Italy, Romania, Russia, and Uruguay, have specific regulations for ZON, ranging from 0.03 to 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , applied to either specific foodstuffs or all foods (FAO, 2004; Brazil, 2011). For feeding gilts, sows, piglets and swine only 8 countries joined a specific legislation for ZON (Table 5). European Committee has limited its concentration to 100  $\mu\text{g}$  ZON/kg in piglets and gilts diets (EC, 2006). The lowest limit allowed in Ukraine was determined by combined feed for sows (pregnant, feeding), breeding boars, and piglets younger than 2 months which is 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Canada is the country that has the highest limit allowed to feed for gilts and sows with 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The same limit was set by Ukraine for combined feed for swine (for pork) over 50 kg of weight. European regulation does not consider residues from animal products in the assessment of ZON exposure for humans, assuming that “secondary human exposure resulting from meat, milk and eggs is expected to be low, contributing only marginally to the daily intake” (EFSA, 2004).

## Residues of zearalenone and its metabolites in foods of animal origin

Several studies have reported contamination of ZON in food for animals and humans consumption world wide (Table 6) at levels varying as low as 3 up to 165.000 µg/kg which have caused serious economic losses worldwide, apart from the risk of being transferred to meat/liver, food of human consumption. However, when it comes to detection of ZON metabolites, data are still poorly reported and studied (Table 7). The amount of detectable ZON in animal tissues depends on the contamination of feed, treatment of animals with ZON or  $\alpha$ -ZOL duration of exposure to the toxin, the persistence of ZON in the animal and species variation in response to the mycotoxin (JECFA, 2000)..

The great concern of ZON metabolites residues in food is due to its biotransformation in the animal organism originating their residues in meat and liver mainly. In Puerto Rico, residues of estrogenic compounds in red meat and poultry remain two of the most likely causes of premature thelarche (Saenz de Rodriguez and Toro-Sola, 1982).

In a study with piglets fed diets with increasing ZON concentrations (0.01, 0.06, 0.15, 0.22, 0.42 µg/kg) for 5 weeks, the mean total ZON (parent) and  $\alpha$ -ZOL (metabolite) concentrations detected in the liver were 1.8/0.3, 0.2/0.1, 2.1/1.1, 2.9/1.7 and 5.3/2.8 µg/kg for ZON/ $\alpha$ -ZOL, respectively (Döll *et al.*, 2003). In a similar study carried out with swine (fed a diet containing 700 µg ZON/kg for 18 days), the maximum level of parent and metabolites ( $\alpha$ -ZOL and  $\beta$ -ZOL) were 3.1, 12 and 4.8 µg/kg detected in the liver of while  $\alpha$ -ZAL and  $\alpha$ -ZOL contents of up to 13.3 and 14.5 µg/kg were detected in the meat, respectively (EFSA, 2011).

### Measures to control spread of zearalenone

ZON is formed in the grains by *Fusarium* during the pre-harvest period; therefore it is necessary to control those fungi growing conditions in order to reduce toxins production. Applying control measures to reduce *Fusarium* proliferation can decrease the ZON formation and swine feed contamination. *Fusarium* species are probably the most prevalent toxin-producing fungi of temperate regions. Thus those typical temperatures, humidity and their abrupt variation allow *Fusarium* fungi growth (Creppy, 2002). Wheat, triticale and maize grains are vulnerable to *Fusarium* infection and are more contaminated with ZON than to other cereal (Döll and Dänicke, 2011). Environmental



and other conditions allow fungal colonization, therefore the control should start from temperature reduction, relative humidity evaluation and insect infestation control (Zain, 2011). Moreover, detoxification strategies for contaminated foods and feeds to reduce or eliminate the toxic effects of ZON by chemical, physical, and biological methods are crucial to improve food safety and prevent economic losses (Zinedine *et al.*, 2007). Despite this, measures to *prevent* ZON accumulation are the most effective approach to reduce exposure to that mycotoxin (Habschied *et al.*, 2011).

### **Methods of detection of Zearalenone and metabolites**

Several analytical methods have been developed to separate and detect these macrocyclic lactone mycotoxins in different samples such as foods, animal feeds and complex biological matrices (Andres *et al.*, 2008). Many popular detection methods rely on the native fluorescence of ZON; a property associated with the electron rich resorcylic acid moiety of this toxin. These fluorescence based methods include LC methods coupled with fluorescence detection, capillary electrophoresis, and immunoassays (Appell and Bosma, 2011). High-performance liquid chromatography with fluorescence detection is usually chosen for the determination of ZON,  $\alpha$  and  $\beta$  ZOL due to their natural fluorescence (Saeger *et al.*, 2003). Other methods including gas chromatography coupled with flame ionization detection or with mass spectrometric detection, TOF (time of the flight) mass spectrometric and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Pérez-Torrado *et al.*, 2010; Andres *et al.*, 2008). Although ELISA is selected for rapid qualitative screening, it mostly fails in providing accurate quantitative results and a definite confirmation of the toxin. Better suited to the purpose is the commonly used GC or LC combined with different detectors, given their good performances in terms of accuracy, precision, sensitivity, and reproducibility (Liu *et al.*, 2012). Regarding LC coupled to tandem mass spectrometry a multi-toxins method developed by Driehuis *et al.* (2010) included ZON and its metabolites, allowing them to be quantified all together.

**Table 5.** Swine feed zearalenone tolerance levels for established for from different countries by FAO

Country	Products for swine			
	Complete feeding stuffs	Tolerance ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Feed	Tolerance ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
<b>Austria</b>	NI	NI	Breeding-swine	50
<b>Canada</b>	NI	NI	Gilts and sows	3000
<b>Cyprus</b>	Piglets	1000	NI	NI
	Swine other than piglets	1500	NI	NI
<b>Estonia</b>	Young cattle, swine and other young farm animals	100	NI	NI
	complete feeding stuffs for cattle, swine	50	NI	NI
<b>Lithuania</b>	NI	NI	Piglet	300
	NI	NI	Swine	100
<b>Serbia/ Montenegro</b>	NI	NI	Swine (until 50kg)	500
	NI	NI	Other type of swine	1000
<b>Slovenia</b>	NI	NI	Swine	1000
<b>Ukraine</b>	Sows (pregnant, feeding), breeding boars, piglets	40	NI	NI
	Swine fed for pork lighter than 50 kg	2000	NI	NI
	Swine fed for pork over 50 kg of weight	3000	NI	NI

NI: not informed; (FAO, 2004)

**Table 6.** Levels of zearalenone detected internationally in feed for animal and human consumption

Mammals	Country/ continent	Samples		Zearalenone ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Contaminated Samples (%)		References
		Year (s)	Number	Mean	Range	LOD	Method	
<b>ANIMAL</b>								
<b>Swine</b>								
	Portugal	NI	30	NI	104-356	50	TLC	Martins <i>et al.</i> , 2008
	Lithuania	1999	25	32	NI- 77	10	LC	Garaleviciene <i>et al.</i> , 2002
	Vietnam	2005	24	86	10-295	10	ELISA	Thieu <i>et al.</i> , 2008
	Argentina	2005	240	ND	ND	100	TLC	Pereyra <i>et al.</i> , 2008
	Argentina	2008	10	ND	ND	100	LC	Pereyra <i>et al.</i> , 2010
	Brazil	1994-2010	105.509	74.1	NI-17,000.0	NI	NI	Mallmann <i>et al.</i> , 2011
<b>Cattle</b>								
	Spain	NI	11	ND	ND	NI	LC	Jaimez <i>et al.</i> , 2004
	Turkey	NI	40	175.26	51.61-1023.25	NI	ELISA	Aksoy <i>et al.</i> , 2009
<b>Poultry*</b>								
	Indonesian	2001	18	32.2	10.1–122	3	LC	Nuryono <i>et al.</i> , 2005
	Slovak Republic	2003-2004	50	21	ND-86	7	LC	Labuda <i>et al.</i> , 2005
	Brazil	2003-2004	480	NI	100-7000	NI	TLC	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
	Lithuania	1999	27	27	NI-83	10	LC	Garaleviciene <i>et al.</i> , 2002

NI: not informed; ND: not detect; LC: liquid chromatography of high performance; ELISA: enzyme-linked immunoabsorbent assay TLC: thin layer chromatography.\* not of mammals origin

**Table 7.** Residues of zearalenone metabolites found in animal and human foods

Food	Metabolites	Samples		ZON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Contaminated samples (%)	Method	References
		Type	Number	Mean	Range			
<b>Animals</b>								
	$\beta$ -ZOL	Milk	53	NI	ND- 73.24	28	LC	Meucci <i>et al.</i> , 2011
	$\alpha$ -ZOL	Animal feed	7	ND	ND	ND	LC	Saeger <i>et al.</i> , 2003
<b>Humans</b>								
	ZOLs	Grasses and leaves	33	4.9	1.1-15	18	LC	Zheng <i>et al.</i> , 2011
	ZOLs	Beer	15	ND	ND	ND	LC	Maragou <i>et al.</i> , 2008
	$\alpha$ -ZOL	Corn	25	NI	36-71	24	LC	Cerveró <i>et al.</i> , 2007

NI: not informed; LC: liquid chromatography

## Conclusion

ZON and its metabolites are important contaminants that affect animal's health, and through pork, can be transferred to humans. Although there is lack of information regarding ZON and its metabolites toxic effects in humans, data on reproductive performance in animals have been registered and the possibility of their effects in humans cannot be excluded.

Oxidation and reduction reactions can cause ZON biotransformation, through enzymes such as 3- $\alpha$ / $\beta$  HSDs into  $\alpha$ - and  $\beta$ -ZOL,  $\alpha$ - and  $\beta$ -ZAL and ZAN. Swine are the most sensitive species to these toxins' estrogenic effects in different intensities among piglets, gilts, sows and boars. The age, weight and period of exposure affect the degree of toxicity and the decrease in fertility. Reduction of litter size, stillbirth and weight change are the symptoms observed. Only eight countries in the world have specific regulation for ingredient and feed for swine at levels varying from 40 to 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Levels that may soon be changed, due to numerous studies demonstrating the negative effect on swine health and performance, to levels even lower. There is a need for improvements in the levels tolerable in food for these contaminants. The application of measures for fungi proliferation control of *Fusarium* and production of ZON is of fundamental importance. Temperature and humidity in the period of harvest of grains and cereals should be controlled; application of *Fusarium*-resistant grain variety also should be applied. The use of toxin absorbents are another measure being adopted, but still with the need of further studies to better applicability and efficiency.

## References

- Agag, B.I., 2004. Mycotoxins in foods and feeds zearalenone. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 7:159-176.
- Aksoy, A., Yavuz, O., Kursad, Y., Guvec, D., Muglali, O.H., 2009. Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, T-2 toxin and zearalenone in compound animal feed. J Anim Vet Adv. 8:103-107.
- Alm, H., Brüssow, K.P., Torner, H., Vanselow, J., Tomek, W., Dänicke, S., Tiemann, U., 2006. Influence of *Fusarium*-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. Reprod Toxicol. 22:44-50.

Alm, H., Greising, T., Brussow, K.P., Torner, H., Tiemann, U. 2002. The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on *in vitro* maturation of pig oocytes and *in vitro* culture of pig zygotes. *Toxicol In Vitro*. 16:643-648.

Andrés, F., Zougagh, M., Castañeda, G., Ríos, A., 2008. Determination of zearalenone and its metabolites in urine samples by liquid chromatography with electrochemical detection using a carbon nanotube-modified electrode. *J Chromatogr A*. 1212:54-60.

Appell, M., Bosma, W. B., 2011. Effect of surfactants on the spectrofluorimetric properties of zearalenone. *J Lumin*. 131:2330-2334.

Atoui A., El Khoury, A., Kallassy, M., Lebrihi, A., 2012. Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. *Int J Food Microbiol*. 154:59-65.

Ayed, Y., Ayed-Boussema, I., Ouanes, Z., Bacha, H., 2011. *In vitro* and *in vivo* induction of chromosome aberrations by alpha- and beta-zearalenols: comparison with zearalenone. *Mutat Res*. 726:42-46.

Ayed-Boussema, I., Pascussi, J.M., Maure, P., Bacha, H., Hassen, W., 2011. Zearalenone activates pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and aryl hydrocarbon receptor and corresponding phase I target genes mRNA in primary cultures of human hepatocytes. *Environ Toxicol Pharmacol*. 31:79-87.

Benzoni, E., Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Vigo, D., Visconti, A., 2008. Influence of *in vitro* exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reprod Toxicol*. 25:461-467.

Berger, T., Esbenshade, K.L., Diekman, M.A., Hoagland, T., Tuite, J., 1981. Influence of prepubertal consumption of zearalenone on sexual development of boars. *J Anim Sci*. 53:1559-1564.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Limites para presença de micotoxinas em alimentos pela aplicação da Resolução RDC nº 07, de 18 de Fevereiro de 2011. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/e-legs](http://www.anvisa.gov.br/e-legs)>. Acesso em: 13 abril. 2012.

Briones-Reyes, D., Gómez-Martínez, L., Cueva-Rolón, R., 2007. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico. *Food Chem.* 100:693-698.

Chemical Abstracts Service, 2011. Available from: <http://www.cas.org/sent.html>

Cerveró, M.C., Castillo, M.A., Montes, R., Hernández, E., 2007. Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. *Rev Iberoam Micol.* 24:52-55.

Creppy, E.E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters.* 127:19-28.

Döll, S., Dänicke, S., 2011. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Prev Vet Med.* 102:132-145.

Döll, S., Dänicke, S., Ueberschär, K.H., Valenta, H., Schnurrbusch, U., Ganter, M., Klobasa, F., 2003. Flachowsky, G. Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Archiv Tierernahrung.* 57:311-334.

Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M., Giffel, M.C. 2010. Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs of Dairy Cows and Estimation of Total Dietary Intakes. *J Dairy Sci.* 91: 4261–4271

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

Edwards, S., Cantley, T.C., Rottinghaus, G.E., Osweiler, G.D., Day, B.N., 1987. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant sexually mature gilts. *Theriogenology.* 28:43-49.

European Food Safety Authority, 2004. Opinion on zearalenone, EFSA J, 89,1-35.

European Food Safety Authority, 2011. Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food, 6, 9-2197.

Etienne, M., Dourmad, J., 1994. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: A review. *Livest. Prod. Sci.* 40:99-113.

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

Feng, C., Yulin, M., Chunyi, X., Jingyun, M., Qingmei, X., Genhu, W., Yingzuo, B., Yongchang, C. 2008. The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs. *J Vet Sci.* 9:39-44.

Fink-Gremmels, J., Malekinejad, H., 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim Feed Sci Technol.* 137:326341.

Frizzell, C., Ndossi, D., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G., Sørli, M., Ropstad, E., Muller, M., Elliott, C.T., Connolly, L., 2011. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta- zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicol Lett.* 206:210-217.

Gajecka, M., Rybarczyk, L., Jakimiuk, E., Zielonka, L. Obremski, K., Zwierzchowski, W., Gajecki, M., 2011. The effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone on uterine histology in sexually immature gilts. *Theriogenology.* 75:1085-1094.

Garaleviciene, D., Pettersson, H., Agnedal, M., 2002. Occurrence of trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in cereals and mixed feed from central Lithuania. *Mycotoxin Res.* 18:1-13.

Goyarts, T., Danicke, S., Brussow, K.P., Valenta, H., Ueberschar, K.H., Tiemann, U., 2007. On the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from sows to their fetuses during days 35-70 of gestation. *Toxicol Lett.* 171:38-49.



Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Golin'Ski, P., Swietlik, J., 2009. Occurrence of estrogenic mycotoxin – Zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. *Water Res.* 43:1051-1059.

Habschied, K., Šarkanj, B., Klapac, T., Krstanović, V., 2011. Distribution of zearalenone in malted barley fractions dependent on *Fusarium graminearum* growing conditions. *Food Chemistry.* 129:329-332.

International Agency for Research on Cancer, 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthlene and stryrene, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 82, 21.

Jaimez, J., Fente, C.A., Franco, C.M., Cepeda, A., Vázquez, B., 2004. A survey of the fungal contamination and presence of ochratoxin A and zearalenone on Spanish feed and raw materials. *J Sci Food Agric.* 84:832-840.

Joint Expert Committee on Food Additives, 2000. Report. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series, 44.

Jiang, S.Z., Yang, Z.B., Yang, W.R., Wang, S.J., Liu, F.X., Johnston, L.A., Chi, F., Wang, Y., 2012. Effect of purified zearalenone with or without modified montmorillonite on nutrient availability, genital organs and serum hormones in post-weaning piglets. *Livest Sci.* 144:110-118.

Kanora, A., Maes D., 2009. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. *Vet. Med.* 54:565-576.

Kinani, S., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Porcher, J., Ait-Aïssa, S., 2008. Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography–mass spectrometry analysis of environmental samples. *J Chromatogr.* 1190: 307-315.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7:253-306.

Labuda, R., Parich, A., Berthiller, F., Tančinová, D., 2005. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. *Int J Food Microbiol.* 105:19-25.

Lioi, M.B., Santoro, A., Barbieri, R., Salzano, M., Ursini, V., 2004. Ochratoxin and zearalenone: A comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutat Res.* 557:19-24.

Liu, G., Han, Z., Nie, D., Yang, J., Zhao, Z., Zhang, J., Li, H., Liao, Y.; Song, S., Saeger, S., Wu A., 2012. Rapid and sensitive quantitation of zearalenone in food and feed by lateral flow immunoassay. *Food Control* (In press).

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R., Fink-Gremmels, J., 2006a. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet J.* 172:96-102.

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R.F., Fink-Gremmels, J., 2005. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Vet. Res.* 36:799-810.

Malekinejad, H., Van Tol, H.T.A., Colenbrander, B., Fink-Gremmels, J., 2006b. Expression of 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase mRNA in COCs and granulosa cells determines Zearalenone biotransformation. *Toxicol In Vitro.* 20:458-463.

Mallmann, C.A., Dikin, P., 2011. Mycotoxins and Mycotoxicoses in Swine. *Special nutrients: the Mycotoxins specialist.* 1-92.

Maragou, N.C., Rosenberg, E., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A., 2008. Direct determination of the estrogenic compounds 8-prenylnaringenin, zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol in beer by liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1202:47-57.

Marin, D.E., Taranu, I., Burlacu, R., Tudor, D.S., 2010. Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. *Toxicol.* 56:956-963.

Martins, H.M., Marques, M., Almeida, I., Guerra, M.M., Bernardo, F., 2008. Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. *Mycotoxin Res.* 24:19-23.

- Meucci, V., Soldani, G., Razzuoli, E., Saggese, G., Massart, F., 2011. Mycoestrogen Pollution of Italian Infant Food. *J Pediatr.* 159:278-283.
- Meyer, K., Usleber E., Martlbauer E., Bauer L., 2000. Occurrence of zearalenone, alpha and beta – zearalenone in bile of breeding sows in relation to reproductive performances. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift.* 113:374-379.
- Miles, C.O., Erasmuson, A.F., Wilkins, A.L., Towers, N.R., Smith, B.L., Garthwaite, I., Scahill, B.G., Hansen, R.P., 1996. Ovine metabolism of zearalenone to alpha-zearalanol (zeranol). *J. Agric. Food Chem.* 44:3244-3250.
- Mizutani, K., Nagatomi, Y., Mochizuki, N., 2011. Metabolism of Zearalenone in the Course of Beer Fermentation. *Toxins (Basel).* 3:134-14.
- Nuryono, N., Noviandi, C.T., Bohm, J., Razzazi-Fazeli, E., 2005. A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. *Food Control.* 16:65-71.
- Oliveira, G.R., Ribeiro, J.M., Fraga, M.E., Cavaglieri, L.R., Direito, G.M., Keller, K.M., Dalcero, A.M., Rosa, C.A., 2006. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia.* 162:355-362.
- Penning, T.M., Jin, Y., Steckelbroeck, S., Lanisnik-Rizner, T., Lewis, M. 2004. Structure-function of human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Mol Cell Endocrinol.* 215:63-72.
- Pereyra, C. M., Cavaglieri, L. R., Chiacchiera, S. M., Dalcero A., 2010. Fungi and mycotoxins in feed intended for sows at different reproductive stages in Argentina. *Vet Med Int.* 2010:1-7.
- Pereyra, G., Pereyra, C.M., Ramirez, M.L., Rosa, C.A.R., Dalcero, A.M., Cavaglieri, L.R., 2008. Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentine. *Lett Appl Microbiol* 46:555-561.

Pérez-Torrado, E., Blesa, J., Moltó, J.C., Font, G., 2010. Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry for determination of zearalenone in cereal flours. *Food Control*. 21:399-402.

Saeger, S., Sibanda, L., Peteghem, C. V., 2003. Analysis of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 487:137-143.

Saenz De Rodriguez, C.A., Toro-Sola, M.A. 1982. Anabolic steroids in meat and premature telarche. *Lancet*. 1:1-300.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., 2004. *Fusarium Link: Introduction to food and airborne fungi*. In Samson RA, Hoekstra ES, ed *CBS*, Netherlands. Netherlands: Samson RA, 120-157.

Shier, W.T., Shier, A.C., Xie, W., Mirocha, C.J., 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*. 39:1435-1438.

Sorensen, L.K., Elbaek, T.H., 2005. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 820:183-196.

Thieu, N.Q., Ogle, B., Pettersson, H., 2008. Screening of Aflatoxins and Zearalenone in feedstuffs and complete feeds for pigs in Southern Vietnam. *Trop Anim Health Prod*. 40:77-83.

Tiemann, U. Tomek, W., Schneider, F., Vanselow, J., 2003. Effects of the mycotoxins  $\alpha$ - and  $\beta$ - zeranol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries. *Reprod Toxicol*. 17:673-881.

Tiemann, U., Brussow, K.P., Kuchenmeister, U., Jonas, L., Kohlschein, P., Pohland, R., Danicke, S., 2006. 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 Chem Toxicol*. 44:1228-1235.

- Tiemann, U., Brüssow, K.P., Küchenmeister, U., Jonas, L., Pöhlend, R., Reischauer, A., Jäger, K., Dänicke, S., 2008. Changes in the spleen and liver of pregnant sows and full-term piglets after feeding diets naturally contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *Vet J.* 176:188-196.
- Trout, W.E., Herr, C.T., Richert, B.T., Singleton, W.L., Haglof, S.A., Diekman, M. A., 2007. Effects of Zeranone upon luteal maintenance and fetal development in peripubertal gilts. *Anim Reprod Sci.* 99:408-412.
- Tsakmakidis, I.A., Lymberopoulos, A.G., Vainas, E., Boscos, C.M., Kyriakis, S.C., Alexopoulos, C., 2007. Study on the in vitro effect of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol on boar sperm-zona pellucida interaction by hemizona assay application. *J Appl Toxicol.* 27:498-505.
- Urry, W.H., Wehrmeister, H.L., Hodge, E.B., Hidy, P.H., 1966. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Lett.* 27:3109-3114.
- Wang, D.F., Zhang, N.Y., Peng, Y.Z., Qi, D.S., 2010. Interaction of zearalenone and soybean isoflavone on the development of reproductive organs, reproductive hormones and estrogen receptor expression in prepubertal gilts. *Anim Reprod Sci.* 122:317-323.
- Wasowicz, K., Gajecka, M., Calka, J., Jakimiuk, E., Gajecki, M., 2005. Influence of chronic administration of zearalenone on the processes of apoptosis in the porcine ovary. *Vet Med.* 12:531-536.
- Yang, J., Zhang, Y., Wang, Y., Cui, S., 2007. Toxic effects of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicol In Vitro.* 21:558-565.
- Zain, M.E., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Society.* 15: 129-144.
- Zheng, H., Yiping, R., Hailong, Z., Lianjun, L., Zengxuan, C. And Yongjiang, W.A., 2011. Rapid method for simultaneous determination of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, zearalanone,  $\alpha$ -zearalanol and  $\beta$ -zearalanol in traditional Chinese medicines by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 879:411- 420.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of ZON: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45:1-18.

Zwierzchowski, W., Przybylowicz, M., Obremski, K., Zielonka, Ł., Skorska-Wyszynska, E., Gajeczka, M., Polak, M., Jakimiuk, E., Jana, B., Rybarczyk, L., Gajeczki, M., 2005. Level of zearalenone in blood serum and lesions in ovarian follicles of sexually immature gilts in the course of zearalenone micotoxicosis. *Polish J Vet Sci.* 8:209-218.