

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

DISSERTAÇÃO

ANÁLISES MICOLÓGICAS E MICOTOXICOLÓGICAS DE
RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE NO MUNICÍPIO DE SÃO
JOSÉ DO VALE DO RIO PRETO-RJ.

GLENDIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

2006

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

ANÁLISES MICOLÓGICAS E MICOTOXICOLÓGICAS DE RAÇÕES DE
FRANGOS DE CORTE NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DO VALE DO
RIO PRETO-RJ.

GLENDIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências em Microbiologia Veterinária

Seropédica, RJ
Novembro de 2006

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

GLEND A RIBEIRO DE OLIVEIRA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, em Microbiologia Veterinária.

Dissertação aprovada em / /

Carlos Alberto da Rocha Rosa Ph.D., L.D.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Fernando Augusto Curvello, D.Sc.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

a Renée Cavaglieri, D.Sc.
Universidade Nacional de Río Cuarto
Cordoba-Argentina

Lili

A Deus

Aos meus pais,

José Maria de Oliveira (in memorian) e
Elvinês Ribeiro de Oliveira.

À minha irmã

Samantha Ribeiro de Oliveira.

Aos meus avós

Maria Aparecida Lomba Ribeiro (in memorian),
Bolivar Ribeiro (in memorian),
Cândida da Silva Bastos de Oliveira (in memorian) e
Norberto de Oliveira (in memorian).

Ao meu marido

Leonardo Duarte Batista da Silva.

E especialmente à minha filha

Luiza Ribeiro de Oliveira Duarte Batista.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, especialmente ao Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária (DMIV/IV), pelo apoio oferecido à realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, pela confiança, apoio, orientação e especialmente pela amizade. Aos demais professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, pelos ensinamentos proferidos.

Ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária da UFRRJ, pela oportunidade de fazer parte dessa equipe.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária: Valcir, Luiz Jorge, Adevaldo, Joel e Joselita pelo auxílio técnico, colaboração e amizade.

Aos estagiários e bolsistas do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas do DMIV/IV Kelly, Luiz e Beatriz pelo incansável apoio.

À amiga e doutoranda Jéssika Mara Martins Ribeiro pelo companheirismo, amizade, dedicação e apoio incondicional.

À professora Lilia Renée Cavaglieri,, da Universidade Nacional de Rio Cuarto, pelo apoio e imprescindível colaboração para a publicação internacional.

À Beacon Analytical Systems Inc pelo fornecimento dos kits e do leitor de ELISA, necessários para realização deste trabalho.

Finalmente, a todos que contribuíram e torceram pelo sucesso deste trabalho, o meu muito obrigado.

BIOGRAFIA

Glenda Ribeiro de Oliveira, filha de José Maria de Oliveira e Elvinês Ribeiro de Oliveira nasceu no dia 2 de maio de 1974 no município de Barra do Piraí, Estado do Rio de Janeiro.

Estudou no Centro Educacional Miretta Baronto em Barra do Piraí-RJ de 1981 a 1988 concluindo o ensino fundamental. No ano de 1989 iniciou o ensino médio no Colégio Comercial Cândido Mendes, na mesma cidade e o concluiu em 1991, quando retornou ao seu colégio de origem.

No mesmo ano, foi aprovada no vestibular da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e em 1992, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária. Em 1996 desenvolveu atividades como bolsista de iniciação científica pelo Programa de Bolsa de Iniciação Científica-PIBIC/CNPq-UFRRJ. Em 1997 formou-se e iniciou sua carreira como médica veterinária autônoma na cidade do Rio de Janeiro e no ano seguinte mudou-se para Piracicaba-SP onde morou e trabalhou até 2001.

Ao final de 2001 foi aprovada em concurso público para a Secretaria de Estado de Agricultura, Pesca e Desenvolvimento do Interior - SEAAPI-RJ, no cargo de médica veterinária da Defesa Sanitária Animal.

Em 2002 foi selecionada para o Curso de Mestrado em Microbiologia Veterinária da UFRRJ.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1

2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Fungos	4
2.2 Micobiota toxígena em produtos vegetais e rações	5
2.3 Micotoxinas	7
2.4 Aflatoxinas	8
2.4.1 Características físicas e químicas das aflatoxinas	9
2.4.2 Ocorrência natural das aflatoxinas	10
2.4.3 Biotransformação da aflatoxina B₁ (AFB₁)	12
2.4.4 Toxidez das aflatoxinas em aves de produção	13
2.5 Fumonisinas	16
2.5.1 Características físicas e químicas das fumonisinas	16
2.5.2 Ocorrência natural das fumonisinas	18
2.5.3 Mecanismo de ação da fumonisina B₁	20
2.5.4 Toxidez das fumonisinas	20
2.6 Estudos de interação entre micotoxinas	23
2.7 Zearalenona	25
2.7.1 Características físicas e químicas da zearalenona	25
2.7.2 Ocorrência natural da zearalenona	26
2.7.3 Mecanismo de ação da zearalenona	27

2.8 Metodologias para detecção de micotoxinas	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Local e instalações	29
3.2 Amostras	29
3.3 Equipamentos	29
3.4 Isolamento, contagem e classificação da microbiota contaminante	30
3.4.1 Espécies fúngicas de referência	31
3.5 Testes de ELISA	31
3.6 Metodologia para cromatografias	32
3.6.1 Aflatoxinas por CLAE	32
3.6.2. Fumonisininas por CLAE	33
3.6.3 Zearalenona por CCD	33
3.7 Análises estatísticas	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Isolamento e contagem	35

4.2 Detecção de micotoxinas por ELISA	37
4.3 Detecção de micotoxinas por CLAE e CCD	44
5 CONCLUSÕES	45
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Estrutura química das principais aflatoxinas.	9
Figura 2- Estrutura química das principais fumonisinas.	17
Figura 3- Predominância de gêneros fúngicos em rações de frangos de corte coletadas em São José do Vale do Rio Preto	36
Figura 4a – Frequência de contaminação por Aflatoxina B ₁ das amostras de ração de frangos de corte analisadas	38
Figura 4b - Produção de Aflatoxina B ₁ em amostras de ração de frangos de corte nos diferentes períodos de coleta.	38
Figura 5 – Regressão linear dos padrões de Aflatoxina B ₁ .	39

Figura 6a – Frequência de contaminação por Fumonisina B ₁ das amostras de ração de frangos de corte analisadas	39
Figura 6b - Produção de Fumonisina B ₁ em amostras de ração de frangos de corte nos diferentes períodos de coleta	40
	41
Figura 7- Regressão linear dos padrões de Fumonisina B ₁ .	
Figura 8a– Frequência de contaminação por Zearalenona das amostras de ração de frangos de corte analisadas	41
Figura 8b - Produção de Zearalenona em amostras de ração de frangos de corte nos diferentes períodos de coleta	42
	42
Figura 9 - Regressão linear dos padrões de Zearalenona.	
Figura 10 - Regressão linear da correlação entre os valores de Aflatoxinas obtidos por ELISA e CLAE	43
Figura 11 - Regressão linear da correlação entre os valores de Fumonisinas obtidos por ELISA e CLAE	43

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Níveis de aflatoxinas, soma das quatro frações (B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂), detectados em amostras de produtos vegetais e rações animais comercializados no Brasil.	12
Tabela 2 – Níveis de fumonisinas detectados em amostras de produtos vegetais comercializados no Brasil.	20
Tabela 3 – Valores médios da contagem de propágulos fúngicos (UFC.g ⁻¹) em amostras de ração de frangos de corte..	36
Tabela 4 – Distribuição de espécies de <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i> nas amostras de ração para frangos de corte	38

636.08969

O48a

T

Oliveira, Glenda Ribeiro, 1974-
**Análises micológicas e micotoxicológicas
de rações de frangos de corte no município
de São José do Vale do Rio Preto-RJ /
Glenda Ribeiro Oliveira – 2006.**
76 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto da
Rocha Rosa.

Dissertação (Mestrado) –
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Instituto de
Veterinária.

Bibliografia: f. 49-66.

1. Microbiologia veterinária - Teses. 2. Frango de corte - Alimentação e rações - São José do Vale do Rio Preto (RJ) - Teses. 3. Aflatoxina - Teses. 4. Micotoxinas - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

Bibliotecário: _____

Data: __/__/____

RESUMO

OLIVEIRA, Glenda Ribeiro. Análises micológicas e micotoxicológicas em rações de frangos de corte no município de São José do Vale do Rio Preto-RJ. **Seropédica, UFRRJ, 2006 70p.** (Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

A ingestão de rações contaminadas por micotoxinas pode acarretar perdas no seu valor nutritivo e causar efeitos adversos à saúde animal e à produtividade. Os objetivos desse estudo foram: 1) estabelecer a frequência e a prevalência da microbiota presente em amostras de rações de frangos de corte provenientes de três fábricas em São José do Vale do Rio Preto-RJ, 2) verificar a ocorrência natural de aflatoxina B₁ (AFB₁), fumonisina B₁ (FB₁) e zearalenona (ZEA), utilizando a técnica biológica de imunoenaios-ELISA competitivo, com kits comerciais (Beacon Analytical Systems Inc, USA) e 3) verificar os resultados obtidos pelo método de ELISA, comparando-os com a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para AFB₁ e FB₁. A contagem dos propágulos fúngicos foi similar entre todos os meios de cultura testados (10³ UFC g⁻¹). *Penicillium* spp (41,26%) foi o gênero de maior prevalência seguido por *Aspergillus* spp (33,33%) e *Fusarium* spp. (20,63%). Aflatoxina B₁ foi encontrada em 66,27% das amostras analisadas pelos kits de ELISA, com valores variando entre 2 e 21 μg.kg⁻¹. Fumonisina B₁ foi encontrada em 97,87% e os valores variaram entre 0,3 e 9,1 μg.g⁻¹, co-ocorrendo com aflatoxina B₁ em 66,7% das amostras. Baixas concentrações de zearalenona foram encontradas (< 1 μg.g⁻¹) em 77,1% das amostras de ração. Foi obtida correlação entre os kits de ELISA (AFB₁ e FB₁) e as análises em CLAE, com valores de r²= 0,9922 e 0,9823, respectivamente. Em geral, os maiores níveis de micotoxinas foram encontrados durante os meses mais quentes do ano. O presente estudo mostra a ocorrência simultânea de duas micotoxinas carcinogênicas, AFB₁ e FB₁, juntamente com outra *Fusarium* micotoxina (zearalenona) em rações destinadas ao consumo de frangos. Algumas amostras apresentaram níveis de AFB₁ próximos ao máximo permitido, o que poderia afetar aves jovens. Uma resposta tóxica sinérgica é possível em animais sob exposição simultânea.

Palavras-chave: ELISA, CLAE, aflatoxina B₁, fumonisina B₁, zearalenona..

ABSTRACT

OLIVEIRA, Glenda Ribeiro. Mycological and mycotoxicological survey in poultry feeds from São José do Vale do Rio Preto-RJ.

Seropédica, UFRRJ, 2006 76p. (Dissertation, Magister Scientiae in Veterinary Microbiology).

The intake of mycotoxin-contaminated feeds may lead to nutrient losses and can have adverse effects on animal health and on productivity. The aims of this study were: 1) to determine the mycobiota present in poultry feed samples, obtained from three factories in the region of São José do Vale do Rio Preto, RJ, Brazil; 2) to evaluate the natural occurrence of aflatoxin B₁ (AFB₁), fumonisin B₁ (FB₁) and zearalenone using the method enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) competitive, commercial kits of Beacon Analytical Systems Inc, USA and 3) to verify the data results by the ELISA to AFB₁ and FB₁ comparing them with the high precision liquid chromatography methodology (HPLC) Fungal counts were similar between all culture media tested (10³ CFU.g⁻¹). *Penicillium* spp. (41,26%) was the most prevalent genus followed by *Aspergillus* spp. (33,33%) and *Fusarium* spp. (20,63%). Aflatoxin B₁ was found in 66,27% samples examined by ELISA kits and values ranged between 2 and 21µg.kg⁻¹. Fumonisin B₁ was found in 97,87% and levels ranged between 0,3 and 9,1µg.g⁻¹, co-occurring with aflatoxin B₁ in 66,7% of the samples. Low concentrations of zearalenone were found (<1 µg.g⁻¹) in 77,1% poultry feed samples. Correlation between the ELISA kits (AFB₁ and FB₁) and the HPLC analysis was obtained. Values were r²= 0,9922 and r²=0,9823, respectively. In general, the highest mycotoxin levels were found during the hottest month of sampling. The present study shows the simultaneous occurrence of two carcinogenic mycotoxins, aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ together with another *Fusarium* mycotoxin (zearalenone) in feed intended for poultry consumption. Many samples contained AFB₁ levels near the maximum permissible and it could affect young animals. A synergistic toxic response is possible in animals under simultaneous exposure.

Key words: ELISA, HPLC, aflatoxin B₁, fumonisin B₁, zearalenone

1. INTRODUÇÃO

A avicultura tem se destacado nas últimas décadas como um dos setores agrícolas que apresenta maior dinamismo dentre as atividades do agronegócio brasileiro. Seu crescimento é decorrente, sobretudo, dos avanços tecnológicos nas áreas de genética, nutrição, sanidade e manejo, os quais possibilitaram a instalação de uma indústria altamente eficiente e competitiva em todo mundo, particularmente no Brasil. Em um sistema com

elevado grau de tecnificação, tal como ocorre na avicultura de um modo geral, qualquer fator que afete negativamente a produção, determina enormes prejuízos aos produtores. Neste contexto, deve-se ressaltar a importância dos contaminantes naturais de rações, como as micotoxinas, as quais acarretam perdas consideráveis às criações de aves.

As micotoxinas são produtos tóxicos do metabolismo secundário de fungos contaminantes da cadeia alimentar. Os principais fungos produtores de micotoxinas estão compreendidos entre as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Penicillium*. Gêneros estes que reúnem espécies cuja maioria está amplamente disseminada na natureza utilizando quaisquer tipos de substratos.

Os fungos toxígenos podem contaminar os alimentos nas diferentes fases de produção e beneficiamento, desde o cultivo até o transporte e armazenagem. A contaminação é um processo aditivo, pode iniciar-se, por exemplo, com a presença de espécies de *Fusarium* a campo e desenvolver-se durante as operações de colheita e secagem. Toxinas adicionais podem ser produzidas no armazenamento devido à ação de fungos típicos de silos, principalmente as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*. Ressalta-se, ainda, o fato das micotoxinas apresentarem, de modo geral, grande estabilidade química, o que permite a sua persistência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem. Outro aspecto importante relacionado à ação dos fungos toxígenos é o impacto sobre o valor nutricional das matérias primas utilizadas na elaboração de rações causando empobrecimento energético dos grãos.

A contaminação das rações para aves e o processo crônico de intoxicação têm conotação caracterizada como grave em saúde coletiva. Isto se justifica em função da alta resistência das aves às micotoxinas. Conseqüentemente, os níveis de metabólitos tóxicos que potencialmente possam ocorrer em ovos, carnes e vísceras oriundos destes animais devem ser considerados.

As enfermidades causadas pelas micotoxinas são denominadas micotoxicoses, as quais são caracterizadas por síndromes difusas, porém, com predomínio de lesões na cavidade oral e em órgãos vitais como fígado e rins, levando à menor produtividade, maior incidência de doenças devido à imunossupressão e interferências com a capacidade reprodutiva.

No Brasil, devido às condições climáticas favoráveis, diversas micotoxinas têm sido identificadas em alimentos destinados ao consumo humano e animal. Contudo, deve-se destacar a importância das aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona, não apenas pela ocorrência frequente, mas também pelo elevado potencial tóxico para animais de produção.

Atualmente, considera-se que um dos aspectos mais importantes foi a mudança que a comunidade científica deu ao conceito de micotoxicose. O que a tem preocupado não é a contaminação por altos níveis de micotoxinas de ocorrência rara e esporádica, mas a ocorrência destes produtos tóxicos em pequenas quantidades em produtos vegetais básicos e seus subprodutos industrializados. A ingestão diária e constante de pequenas quantidades destes compostos, sem dúvida, possui um papel importante na indução e modulação de patologias no homem e nos animais.

A presença de micotoxinas nas várias etapas que envolvem a produção avícola configura-se como um grande desafio para a atividade atualmente. Apesar do alto patamar tecnológico em que se encontra o segmento avícola brasileiro hoje, alguns fatores continuam sem grandes alterações, como, por exemplo, a frequência e a intensidade da presença de micotoxinas nos alimentos destinados às aves.

Os números são expressivos e comprovados pela própria FAO, entidade de alimentação e agricultura ligada às Nações Unidas: nada menos que 25% dos grãos do mundo estão contaminados com micotoxinas. Conhecer os fungos toxígenos, as micotoxinas produzidas e seus efeitos tóxicos tornou-se indispensável aos médicos veterinários e a todos os profissionais voltados para a preservação da saúde animal e humana.

O município de São José do Vale do Rio Preto localizado na região serrana do Estado do Rio de Janeiro é considerado hoje, um dos pólos mais importantes da avicultura comercial fluminense.

Tendo em vista a relevância do município para a economia do Estado do Rio de Janeiro, os objetivos deste trabalho foram:

- a) estabelecer a frequência e a prevalência da micobiota contaminante em rações destinadas a frangos de corte no município de São José do Vale do Rio Preto;
- b) verificar a ocorrência de Aflatoxina B₁ (AFB₁), Fumonisina B₁ (FB₁) e Zearalenona (ZEA), determinando seus respectivos níveis de contaminação nas

rações, utilizando a técnica biológica de imunoensaios “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”-ELISA;

e

- c) comparar os resultados obtidos pelo método de ELISA para AFB₁ e FB₁ com a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos

Os fungos são microrganismos ubíquos, estando presentes tanto em climas tropicais quanto temperados. Entretanto, a maior biodiversidade de fungos ocorre em climas tropicais, portanto, nessas condições deve haver um maior cuidado com a contaminação e o crescimento de espécies toxígenas em produtos da agricultura, devido ao maior risco de produção de micotoxinas (Almeida et al., 2000). O Brasil, com seu clima predominantemente tropical, propicia condições ideais para a proliferação de fungos potencialmente toxígenos (Sabino et al., 1988).

Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento são: umidade, atividade de água, temperatura, período de armazenamento, nível de contaminação, matérias estranhas, insetos, nível de oxigênio, condições físicas da semente ou do grão e condições sanitárias da semente, do grão ou das rações (Dionello et al., 2000; Bueno et al., 2004). *Aspergillus spp.* e seus teleomorfos *Emericella* e *Eurotium* são usualmente relatados como contaminantes, com uma alta taxa em substratos orgânicos, especialmente em grãos estocados e rações (Kozakiewicz, 1989).

O gênero *Aspergillus spp.* distingue-se morfológicamente pela presença de uma estrutura denominada aspergilo derivada de *aspergillum*, composta de conidióforos com talos não septados e vesículas terminais, a qual dá origem a métulas e fiálides (células conidiogênicas) onde são formados os conídios. A maioria das espécies fúngicas cresce entre 15-30°C, com uma temperatura ótima entre 20-25°C, mas o *Aspergillus spp.* pode crescer em temperaturas mais elevadas (acima de 35°C). As condições ótimas para o crescimento fúngico podem não ser as mesmas para a produção de seus metabólitos secundários (Raper & Fennell, 1965). Esse gênero, um dos principais produtores de toxinas, tem potencial degradador e caráter saprófita, sendo capaz de se manter em desenvolvimento sob condições adversas. Em ambiente com baixas umidade e atividade de água, pode crescer e produzir toxinas que reduzem a qualidade nutritiva dos grãos e o seu valor de mercado, além de representar um perigo potencial ao consumidor (Dionello et al., 2000).

Os fungos do gênero *Fusarium* são comumente encontrados no solo, capazes de contaminar grãos, que podem ser usados em rações destinadas à nutrição de aves domésticas (Kubena et al., 1999). Esse gênero fúngico apresenta distribuição mundial e muitas espécies são consideradas importantes patógenos vegetais. Os fungos filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, fitotoxinas, além de compostos tóxicos, denominados micotoxinas. Embora existam dezenas de espécies de *Fusarium*, apenas um número limitado é responsável pela maior parte da contaminação de produtos agrícolas e alimentos por micotoxinas. Sabe-se que cepas de *Fusarium moniliforme* são capazes de produzir várias micotoxinas na natureza, tais como a moniliformina, fumonisinas, ácido fusárico, fusariocinas e zearalenona (Henry, et al., 2000).

Quando produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e pelos animais, provocando as micotoxicoses (Council for Agriculture Science and Technology, 2003; Moss, 1991).

2.2 Micobiota toxígena em produtos vegetais e rações

Diversos trabalhos sobre a contaminação de alimentos e rações por fungos toxígenos foram publicados no Brasil nos últimos anos. *Aspergillus flavus* foi isolado em 86,6% de 90 amostras de milho provenientes de diversas regiões do país (Asevedo et al., 1994). Estudos realizados em 130 amostras de milho recém-colhido e milho armazenado em São Paulo provenientes da colheita de 1991 demonstraram que *Fusarium spp.* foi o gênero fúngico dominante (84%), seguido de *Penicillium spp.* (55%) e *Aspergillus spp.* (41%) (Pozzi et al., 1995).

Outro estudo em 150 amostras de milho recém-colhido de várias regiões do Paraná demonstrou que a ocorrência natural de representantes dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foi de 98,7 a 100%, enquanto a ocorrência natural de espécies de *Aspergillus* foi de 2,7 a 27,7% nas regiões norte e centro-oeste do Estado, respectivamente. As amostras provenientes do centro-sul do Estado demonstraram a prevalência de espécies de *Fusarium spp.* (23,5 a 82,5% de espigas infectadas) e de *Penicillium spp.* (15 a 89% de espigas infectadas), segundo Ono (1999).

Rosa (2002) estudou a microbiota toxígena de produtos vegetais e rações destinadas à alimentação de frangos de corte em quatro fábricas de ração do Estado do Rio de Janeiro e observou que o gênero *Aspergillus spp.* foi prevalente (40,6%), seguido de *Penicillium spp.* (39,8 %) e *Fusarium spp.* (14,7%), dentre outros. Em 2006, Rosa et al. estudaram a microbiota e a habilidade em produzir ocratoxina A de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas de rações de frangos de corte provenientes destas mesmas fábricas. *Aspergillus flavus* e *Penicillium citrinum* foram as espécies de maior prevalência.

Fraga et al. (2007) monitoraram a contagem total da microbiota potencialmente aflatoxígena e ocratoxígena de espécies de *Aspergillus* e seus teleomorfos, durante o processo de manufatura de rações destinadas a frangos de corte oriundas de uma fábrica no Rio de Janeiro. *Aspergillus flavus* e *Eurotium chevalieri* foram as espécies de maior prevalência isoladas das amostras de milho e de ração inicial, seguidas por *A. candidus* e *A. niger*.

Dalcerro et al. (1997,1998) e Magnoli et al. (1998) pesquisaram a microbiota em rações para frangos de corte na Argentina durante o período de 1995 a 1997. As espécies de maior prevalência foram as pertencentes ao gênero *Penicillium spp.* em 98% das amostras, seguida de *Fusarium spp.* com 87% e *Aspergillus spp.* em 52%. Dentre as espécies do gênero *Aspergillus*, as mais frequentemente isoladas foram: *A. flavus* (32%) e *A. parasiticus* (30%), *Eurotium repens* (17%), *A. candidus* (15%), *A. tamarisii* (11,5%), *A. terreus* (12%), *A. fumigatus* (9,5%), *A. niger* (5,5%), *A. parvulus* (1%) e *A. oryzae* (0,5%).

Ogundero (1981) considerou em seus estudos a importância da alta incidência e abundância de espécies de *Aspergillus flavus* e *A. clavatus* como contaminantes de ração para frangos de corte na Nigéria. Este autor, em outro estudo, demonstrou uma alta prevalência destas espécies de *Aspergillus* e posteriormente enfatizou a alta capacidade toxígena dos isolados bem como o alto poder de deterioração daquelas sobre os nutrientes constituintes da ração (Ogundero, 1987).

Bauduret (1990) encontrou grande contaminação por fungos filamentosos em amostras de ração para frangos de corte na Islândia, constituída por: *Aspergillus flavus* (95%), *A. glaucus* (91%), *A. candidus* (72%), *A. niger* (64%), *A. restrictus* (40%), *A. fumigatus* (36%), *A. terreus* (36%), *A. wentii* (22%), *A. versicolor* (21%) e *A. ochraceus* (9%).

Fungos aflatoxígenos isolados de ração para aves na Índia apresentaram uma alta incidência, com níveis variando de 76% e 86% para *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente. Em outro estudo com fungos toxígenos em rações para frangos de corte Benkerroum & Tantaoui-Elaraki (2001) no Marrocos, observaram a prevalência de fungos em amostras de ração inicial, milho, cevada, trigo, farinha de peixe, soja e girassol. Identificaram 196 isolados fúngicos distribuídos em 10 gêneros, isto é, *Penicillium spp.* (35,7%), *Aspergillus spp.* (20,4%) *Fusarium spp.* (10,2%), *Alternaria spp.* (6,1%), *Mucor spp.* (18,9%) e outros gêneros (8,7%). As seis espécies de *Aspergillus* detectadas foram *A. niger* (14/40), *A. flavus* (10/40), *A. candidus* (5/40), *A. ochraceus* (4/40), *A. versicolor* (4/40) e *A. ornatus* (3/40).

2.3 Micotoxinas

Micotoxinas são compostos orgânicos de baixo peso molecular, produzidos como metabólitos secundários tóxicos por várias espécies de diferentes gêneros fúngicos, com estruturas químicas variadas e que ocorrem em uma variedade de substratos, incluindo produtos agrícolas (Diaz et al., 1994).

A formação do metabólito secundário está sujeito ao controle fisiológico geral que responde a fatores ambientais. Há muitas evidências que o metabolismo secundário tem menor prioridade que o crescimento na hierarquia da regulação. Quando um meio de cultura é rico, com nutrientes balanceados, microorganismos tipo selvagem não realizam o metabolismo secundário ou seu potencial é reduzido (Vining, 1990).

As principais classes de micotoxinas incluem as aflatoxinas, os tricotecenos, as fumonisinas, a zearalenona, as ocratoxinas e os alcalóides do ergot. A maioria das micotoxinas incluídas nesse grupo é produzida por três gêneros fúngicos, denominados *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os principais fungos produtores de micotoxinas não são patógenos vegetais agressivos, entretanto, as micotoxinas são produzidas nas plantas durante seu crescimento, quando portas de entrada são providas e as condições ambientais são apropriadas (Council for Agriculture Sciences and Technology, 2003).

A contaminação de alimentos por micotoxinas pode ocorrer a campo, na colheita, no transporte, no armazenamento e/ou na manufatura dos produtos (Smith & Henderson,

1991). Alguns fatores que influenciam a produção de micotoxinas, são: composição do substrato, temperatura, teor de água, pH, competição microbiana, danos causados por insetos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta (Bullerman et al., 1984; Coulombe, 1991; Frisvad & Samson, 1992; Scussel, 1998; Watson, 1987), sendo que a temperatura, a umidade e o tipo de substrato são os mais importantes (Mallozzi & Corrêa, 1998).

As micotoxinas podem estar presentes em alimentos processados a partir de produtos contaminados, podendo também ser metabolizadas pelo animal, e ocorrer na carne, em ovos e no leite. Podem estar presentes no alimento processado, na forma do composto inicial, ou podem ter sido previamente transformadas em outro metabólito tóxico no organismo animal (Council for Agriculture Science and Technology, 2003).

O milho (*Zea mays*) apresenta-se como uma das maiores lavouras brasileiras e em 2003/2004, a sua produção chegou à ordem de 36,7 milhões de toneladas, valor superior ao obtido no ano de 2002 com 29,2 milhões de toneladas (IBGE, 2005).

O balanço positivo da produção de grãos foi bastante benéfico para o setor agrícola, uma vez que a escassez do produto, em anos anteriores, vinha causando transtornos aos diversos segmentos que compõem a cadeia do produto, com maior reflexo na avicultura (IBGE, 2004). Na produção animal, aproximadamente 70% dos grãos de milho são destinados à ração. Em nosso país cerca de 59% das vendas das rações industrializadas são destinadas às aves (NTAFI, 2000).

Existem vários critérios para avaliar o impacto econômico das micotoxinas. Considera-se a perda de vida humana e animal, gastos com tratamentos médicos e tratamentos veterinários, perdas na produção animal, de alimentos e de ração, além de gastos relacionados com pesquisa visando minimizar o impacto e a severidade dos problemas ocasionados pelas micotoxinas (Hussein & Brasel, 2001).

A facilidade e a frequência com que as micotoxinas contaminam os produtos agrícolas, de maneira concomitante à exposição crônica dos animais a esses químicos, via contaminação de rações animais, podem significar a diferença entre lucro e perdas na indústria avícola (Kubena et al., 1999). Foi estimado que o custo anual, relacionado com a contaminação de grãos por micotoxinas, para a indústria agropecuária, está em torno de centenas de milhões de dólares (Council for Agriculture Sciences and Technology, 1989).

2.4 Aflatoxinas

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, descobertas em 1960, após provocarem surto tóxico em perus na Inglaterra (*Turkey-X-disease*). Neste surto, milhares de aves morreram após consumirem ração tendo como um dos seus constituintes a torta de amendoim, proveniente do Brasil. (Leeson et al., 1995).

São conhecidos, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂ (Coulombe, 1991). As aflatoxinas, no entanto, apresentam diferentes graus de atividade biológica: a aflatoxina B₁ (AFB₁), além de ser a mais frequentemente encontrada em substratos vegetais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de G₁, B₂ e G₂ (Leeson et al., 1995).

2.4.1 Características físicas e químicas das aflatoxinas

A estrutura química das aflatoxinas é muito semelhante, dado que são compostos químicos simples e de baixo peso molecular, sendo que todas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide, conforme se observa na Figura 1. As aflatoxinas B apresentam um anel ciclopentona na molécula, enquanto que as da série G apresentam anel lactona (Hussein & Brasel, 2001).

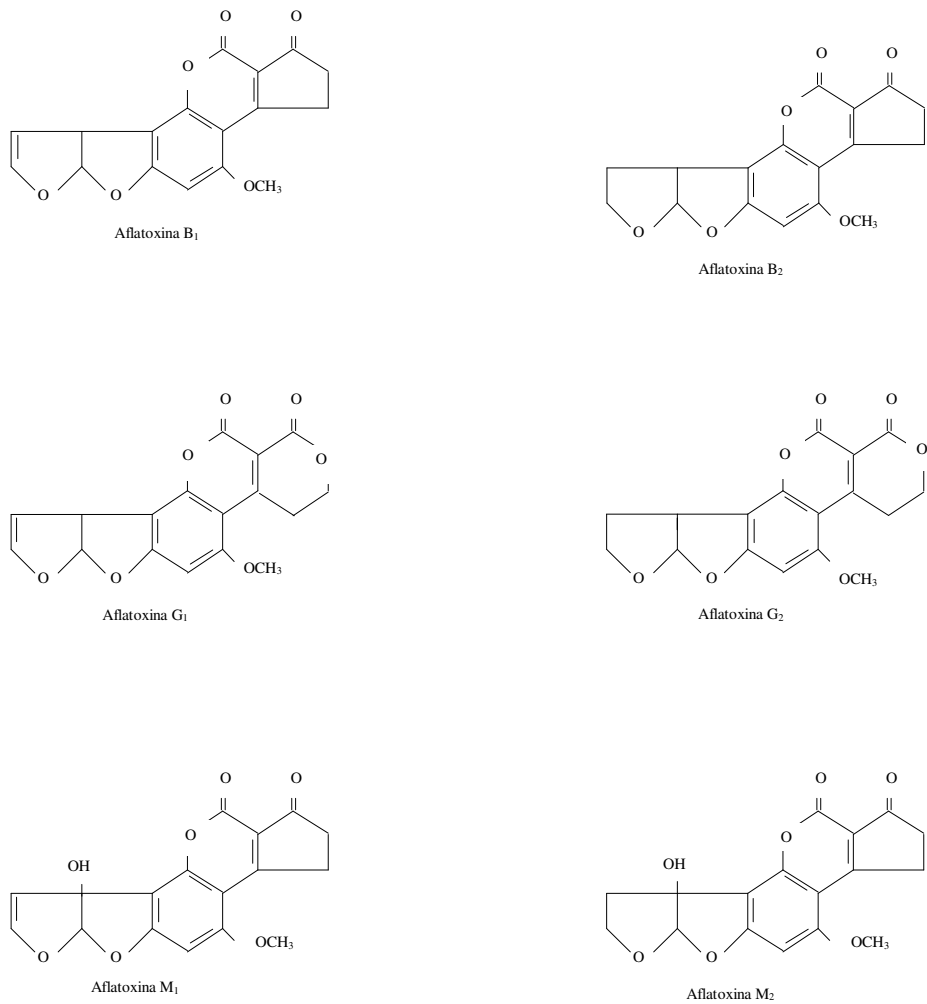


Figura 1- Estrutura química das principais aflatoxinas. Fonte: Diaz e Boermans, 1994.

Podemos classificar as aflatoxinas como compostos de natureza cristalina, termoestáveis e solúveis em solventes polares, como o clorofórmio e metanol. Podem ser destruídas totalmente na presença de soluções fortemente alcalinas, como a amônia e o hipoclorito (OPAS, 1983)

As aflatoxinas caracterizam-se pela elevada toxidez que apresentam. Em Saúde Animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos

tóxicos agudos, mutagênicos e carcinogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido (Osweiler, 1990). De modo análogo, em Saúde Pública, as aflatoxinas são identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados (McLean & Dutton, 1995).

2.4.2 Ocorrência natural das aflatoxinas

A ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus*, bem como de suas toxinas em alimentos e rações animais, apresenta distribuição mundial, com predomínio nas regiões de clima tropical e subtropical. A contaminação de produtos vegetais ocorre através do contato com os conídios do fungo, presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem. A utilização de práticas agrícolas incorretas, que prolongam o contato dos produtos com o solo, as lesões na superfície dos grãos, provocadas por insetos, e o armazenamento inadequado, em locais úmidos e sem ventilação, são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxígenos (Chu, 1991).

A ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com freqüência, principalmente no Estado de São Paulo, em alimentos destinados ao consumo humano e animal, sobretudo milho e rações. No período de 1980 a 1987, Sabino et al.(1988) relataram a ocorrência de AFB₁ em 7,79% das amostras de rações animais analisadas, com nível médio de 241,2µg.kg⁻¹ de AFB₁.

Oliveira et al. (1998) analisaram amostras de ração destinadas à alimentação de aves, provenientes de uma fábrica e de quatro granjas situadas em Manaus, Amazonas. O *Aspergillus spp.* foi o mais freqüente gênero isolado (71,7%), sendo que o *Aspergillus flavus* foi a espécie mais isolada dentro desse gênero (53,3%). Cerca de 44% das cepas de *A. flavus* produziram AFB₁ e AFB₂, com níveis variando entre 40,4 a 10.827µg.kg⁻¹ e de 79,4 a 2.835µg.kg⁻¹, respectivamente.

Recentemente, o Ministério da Saúde (Brasil, 2002) estabeleceu como limite máximo, 20µg.kg⁻¹ de aflatoxinas totais (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) em amendoim (incluindo produtos derivados) e milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído ou na forma de farinhas e sêmolos), destinados ao consumo humano.

Para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal, o Ministério da Agricultura (Brasil, 1988) estabeleceu um limite máximo de $50\mu\text{g.kg}^{-1}$ dado pela somatória de $\text{AFB}_1+\text{AFB}_2+\text{AFG}_1+\text{AFG}_2$. A União Européia estabeleceu como nível máximo o valor de $10\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB_1 para a ração pronta, destinada às aves. Países como Canadá, Chile e Estados Unidos adotaram como limite máximo o valor de $20\mu\text{g.kg}^{-1}$ de $\text{AFB}_1+\text{AFB}_2+\text{AFG}_1+\text{AFG}_2$ para a alimentação de aves de produção (Fonseca, 2003)

Levantamentos realizados no país indicam um elevado percentual de amostras positivas, com concentrações potencialmente capazes de originar efeitos deletérios na produtividade avícola. Os níveis de aflatoxinas encontrados em alimentos e rações, obtidos em alguns desses estudos podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 – Níveis de aflatoxinas, soma das quatro frações ($\text{B}_1 + \text{B}_2 + \text{G}_1 + \text{G}_2$), detectados em amostras de produtos vegetais e rações animais comercializados no Brasil.

Tipo de Produto	Origem das amostras	Frequência^a (%)	Nível médio ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Referência
Rações	Diversos Estados	25,5	50 – 7.800 ^b	SABINO, 1980
Milho	Minas Gerais	18,1	83	SABINO et al., 1986
Rações	Diversos Estados	10,4	241	SABINO et al., 1988
Milho	Região Sul	18,2	79	SABINO et al., 1989
Milho	Região Sudeste	8,6	35	SABINO et al., 1989
Milho	Rio Grande do Sul	28,9	1.906	SANTURIO et al., 1992
Rações e Milho	Rio Grande do Sul	24,9	4 – 1.906 ^b	BALDISSERA et al., 1993
Sorgo	Diversos Estados	12,8	7 – 33 ^b	SILVA et al., 2000
Rações	Rio de Janeiro	56,9	1 – 32 ^b	RIBEIRO et al., 2000

^a Número de amostras positivas / total de amostras analisadas;

^b valores referem-se às concentrações mínima e máxima.

É importante ressaltar que a concentração de aflatoxinas tende a aumentar ao longo da cadeia de produção e comercialização de rações. Jones et al., (1982) analisaram a matéria prima, a ração produzida na fábrica e, posteriormente, a mesma ração armazenada nos aviários, encontrando médias de contaminação de 1,2; 6,0 e 8,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas, respectivamente. Ainda no mesmo experimento, observou-se uma forte correlação entre o tempo de permanência da ração nos aviários, frequência e o nível de aflatoxinas encontrados. Os autores observaram que ótimas condições encontradas para a produção de aflatoxinas nas rações contidas nos aviários ocorreram com umidade relativa do ar entre 70-89% e temperatura ambiente entre 19-27°C.

2.4.3 Biotransformação da aflatoxina B₁ (AFB₁)

A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastrointestinal, e a sua biotransformação ocorre primariamente no fígado, por enzimas microsossomiais do sistema de funções oxidases mistas, associadas ao citocromo P-450 (Biehl & Buck, 1987). A AFB₁ é considerada uma das substâncias mais tóxicas para o fígado, sendo este o principal órgão atingido (Osweiler, 1990).

A AFB₁ é considerada um pró carcinógeno, que requer uma ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (Biehl & Buck, 1987; Hsieh & Atkinson, 1991). A forma ativada da AFB₁ é o composto eletrofilico altamente ativo, identificado como 8,9-óxido de AFB₁, ou AFB₁-epóxido, originado a partir da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóde da molécula de AFB₁ (Emerole et al., 1979). A AFB₁-epóxido é capaz de reagir rapidamente com macromoléculas, como o ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas, através de ligações covalentes (Biehl & Buck, 1987). Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas (Essigmann et al., 1982). A atividade biológica da molécula de DNA que está ligada à AFB₁-epóxido é alterada, originando assim os mecanismos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da

AFB₁. A formação desses adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA os quais podem ser retirados da molécula, após a sua formação, deixando sítios vagos, que tendem a ser preenchidos com adenina, resultando num ponto de mutação bastante significativo (Hsieh & Atkinson, 1991).

Os mecanismos de toxidez aguda das aflatoxinas estão ligados aos adutos formados pela ligação entre o RNA e proteínas à AFB₁-epóxido, o que acaba provocando a morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células. A inibição da síntese protéica no fígado e a diminuição das proteínas plasmáticas durante a aflatoxicose, são amplamente descritas na literatura (Tung et al., 1975; Kubena et al., 1991; Quezada et al., 2000).

As vias de biotransformação da AFB₁ variam entre as espécies animais e tal fato poderia justificar os diferentes graus de susceptibilidade à AFB₁ entre os indivíduos (Woogan, 1992). Não há estudos detalhados sobre os tipos e o grau de atividade do citocromo P-450 em aves de produção. Klein et al. (2000) relatam que já foram identificados 6 diferentes tipos de citocromos (citocromo p-450 1A2, 2A3, 2B7, 2C8, 2K1 e 3A3/4), responsáveis pela ativação da molécula de AFB₁. A presença ou ausência de um ou mais desses citocromos, bem como o seu grau de atividade, podem determinar a susceptibilidade da espécie animal à AFB₁, dentre outros.

2.4.4 Toxidez das aflatoxinas em aves de produção

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. Com relação às espécies exploradas na avicultura comercial, a susceptibilidade é maior em patos, seguidos de perus, gansos, faisões e frangos (Muller et al., 1970). Mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, a relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade e composição da dieta, entre outros fatores (Coulombe, 1991). Para muitas espécies, os machos são mais susceptíveis que as fêmeas,

ao passo que, em geral, a sensibilidade é acentuadamente maior nos jovens que nos adultos (McLean & Dutton, 1995).

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e do tempo de exposição, determinando, assim, intoxicações agudas e crônicas. A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxina, sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo. Caracteriza-se principalmente pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (Osweiler, 1990).

Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens (Leeson et al., 1995). Ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com baixos níveis de aflatoxinas por um longo período de tempo, podendo a exposição ao contaminante ser contínua ou intermitente. Esta patologia é de difícil diagnóstico, apesar de constituir a principal forma de intoxicação em condições naturais, o que ocasiona perdas econômicas consideráveis às criações animais (Pier, 1992).

Giambrone et al. (1985a) alimentaram frangos de corte por 35 dias, com rações contendo diferentes níveis de AFB₁, e observaram redução no ganho de peso e alterações histológicas no fígado, apenas nas aves que receberam diariamente rações com aflatoxina acima de 500µg.kg⁻¹. Contudo, em outro experimento, Giambrone et al. (1985b) não constataram sinais de aflatoxicose em frangos alimentados com níveis até 800µg.kg⁻¹ de AFB₁ por 5 semanas, porém perus submetidos aos mesmos tratamentos revelaram, além de baixos índices de ganho de peso e de conversão alimentar, um aumento na morbidade por causas variadas e na mortalidade. Os autores concluíram que níveis na ração de até 66µg.kg⁻¹ de AFB₁ são seguros na alimentação de frangos e perus. Os resultados obtidos por Kan et al. (1989) corroboram essa afirmativa, pois ao alimentarem frangos de corte com rações contendo 50 a 100µg.kg⁻¹ de AFB₁, não observaram nenhuma diferença entre os tratamentos quando comparados ao grupo controle.

Por outro lado, Doerr *et al.* (1983) realizaram dois experimentos com frangos de corte, submetendo-os à intoxicação em condições semelhantes às criações convencionais (densidade de 0,074m².ave). No experimento 1 encontraram significativa redução no peso vivo e eviscerado dos animais expostos a rações contendo níveis de 75, 225 e 675µg.kg⁻¹ de aflatoxinas, quando comparado ao grupo controle. Porém no experimento 2, efetuado sob

as mesmas condições do experimento 1, não houve diminuição significativa no peso vivo dos animais recebendo rações contaminadas com 300 e 900 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas. Os autores ressaltaram que, quando frangos de corte são alojados e manejados de maneira semelhante aos aviários comerciais, torna-se difícil predizer um nível seguro de contaminação na ração, devido aos vários efeitos ambientais capazes de produzir estresse nos animais, os quais podem potencializar os efeitos da aflatoxina.

Jones et al. (1982) avaliaram cinco integrações de frangos de corte, selecionando de cada uma, seis produtores, dividindo-os em 3 categorias (bom, regular e fraco), de acordo com um indicador de produtividade (média de peso de mercado x 100/conversão alimentar). Ao final do experimento, os autores constataram que os produtores classificados como bons tinham uma frequência de contaminação na ração de 18% (concentração média de 6,13 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), enquanto que os classificados como regulares e fracos apresentavam, respectivamente, frequências de contaminação de 22,1 e 31,3% (níveis médios de 6,5 e 14,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Os resultados apresentaram correlação significativa, entre os grupos, para taxa de mortalidade e condenação de carcaça.

No que concerne às poedeiras, as principais manifestações da aflatoxicose, em condições experimentais, incluem redução da produção e do peso dos ovos, aumento da gordura hepática e alteração de enzimas séricas (Leeson et al., 1995).

Oliveira et al. (2001) alimentaram galinhas poedeiras por 60 dias, com rações contendo 100, 300 e 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁. Os resultados indicaram que a AFB₁, a partir de 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, causou diminuição significativa no consumo de ração, enquanto que apenas os níveis de 300 e 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ causaram a diminuição significativa do peso das aves.

Reprodutoras de frangos de corte (Muthiah et al., 1998) e codornas poedeiras (Johri et al., 1990) tiveram significante diminuição no consumo de ração e na produção de ovos quando expostas a níveis acima de 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁.

As aflatoxinas também exercem efeitos sobre o sistema imunitário. Entre os efeitos de imunossupressão, demonstrados em aves domésticas e outros animais de experimentação, destacam-se aplasia do timo e da Bursa de Fabricius, redução do número e

da atividade de células T, diminuição da resposta de anticorpos, supressão da atividade fagocitária e redução de componentes humorais, como complemento (C4), interferon e imunoglobulinas IgG e IgA (Pestka & Bondy, 1990; Pier, 1992). Todas estas alterações contribuem para a ocorrência de infecções concomitantes, sobretudo por agentes virais e bacterianos, associados à exposição dos animais às rações contaminadas com aflatoxinas.

Ghosh et al. (1990) observaram que $300\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁ na ração de frangos de corte produzem imunossupressão sem efeitos clínicos aparentes, podendo acarretar no plantel morbidades e/ou mortalidades devido a infecções secundárias. Os sinais observados nos animais intoxicados incluíram diminuição significativa de linfócitos T, albuminas e globulinas.

2.5 Fumonisin

As fumonisin compreendem o mais recente grupo de micotoxinas descoberto. Desde seu isolamento em 1988, têm sido associadas a doenças animais previamente conhecidas como a leucoencefalomalácia equina e edema pulmonar suíno (Leeson *et al.*, 1995).

As fumonisin são produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*. O principal produtor é o *Fusarium moniliforme* (Shephard *et al.*, 1992), porém outras espécies de *Fusarium* também são produtoras, como *F. proliferatum* (Ross *et al.*, 1990), *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. dlamini* e *F. napiforme* (Nelson, 1992). Entretanto, fungos do gênero *Alternaria spp.* também podem produzir fumonisin (Chen *et al.*, 1992). São conhecidas, atualmente, 16 estruturas moleculares designadas pelo termo fumonisin (Musser &

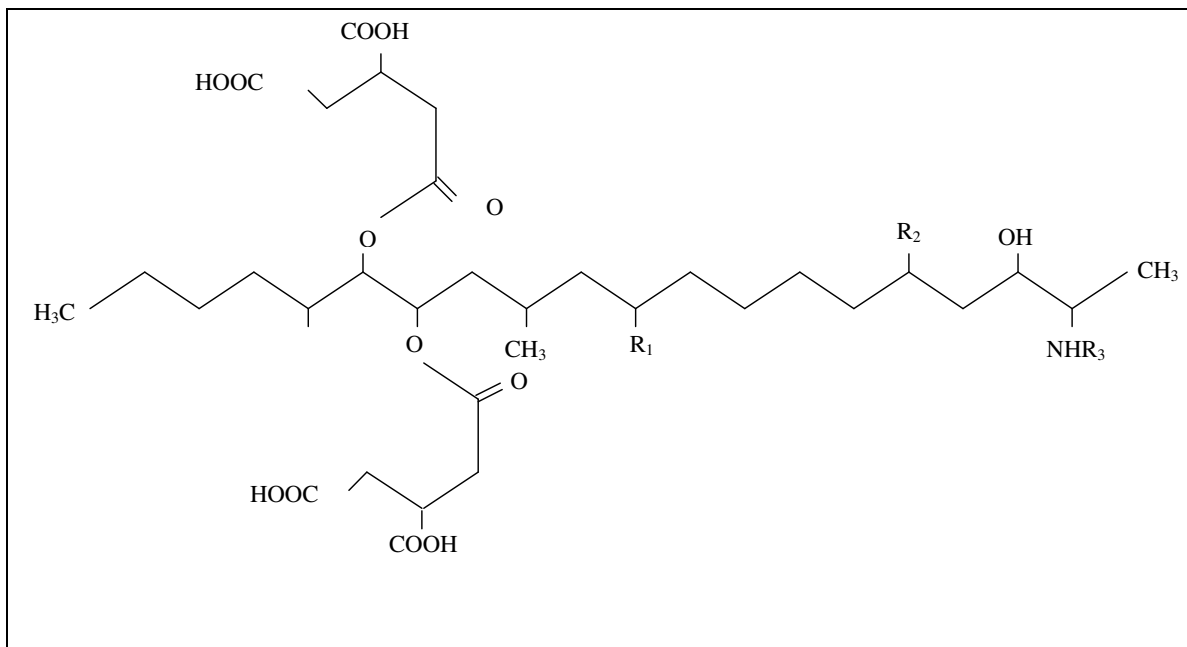
Plattner, 1997; Ah-Seo & Won Lee, 1999), porém a toxina predominantemente produzida por linhagens de *F. moniliforme* é a fumonisina B₁ (FB₁) (Norred, 1993). Somente a FB₁, além das fumonisinas B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃), foram detectadas quando a produção de fumonisinas ocorreu em condições naturais (Henry & Wyatt, 1993).

2.5.1 Características físicas e químicas das fumonisinas

As análises de ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa revelaram que a fumonisina B₁ é um diéster de propano 1,2,3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxicosano em que nos C14 e C15 os grupos hidroxilas são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1,2,3-ácido tricarbóxico (Bezuidenhout et al., 1988).

As variações do grupo hidroxil das moléculas de fumonisinas determinam seus diferentes tipos, conforme se observa na Figura 2.

As fumonisinas são compostos fortemente polares e hidrossolúveis, que se dissolvem muito bem em metanol, acetonitrila-água e são insolúveis em solventes orgânicos de baixa polaridade (Diaz & Boermans, 1994).



Fumonisina	R ₁	R ₂	R ₃
B ₁	OH	OH	H
B ₂	H	OH	H
B ₃	OH	H	H
B ₄	H	H	H
A ₁	OH	OH	CH ₂ CO
A ₂	H	OH	CH ₂ CO

Figura 2 – Estrutura química das principais fumonisinas. Fonte: Diaz e Boermans, 1994.

2.5.2 Ocorrência natural das fumonisinas

As micotoxinas produzidas pelos fungos do gênero *Fusarium spp.* normalmente estavam associadas a regiões de clima temperado, uma vez que esses fungos se desenvolvem melhor e são mais toxigênicos em temperaturas mais baixas, principalmente se comparado aos fungos do gênero *Aspergillus spp.* Entretanto diversos estudos demonstraram que as micotoxinas dos fungos do gênero *Fusarium spp.* estão presentes em praticamente todos os países (Placinta et al., 1999). Esses fungos estão presentes nos cereais, principalmente no trigo, milho e cevada (Miller, 1995).

A contaminação de grãos e cereais pode ocorrer ainda no campo, ou durante o armazenamento. O fungo desenvolve-se bem no milho em condições naturais onde, devido à dificuldade da colheita no estágio correto de maturação da planta e ao alto teor de umidade e armazenamento, encontra condições ideais para a produção de toxinas (Leeson et al., 1995).

O Brasil, devido à predominância de regiões de clima tropical e subtropical, tem apresentado grande incidência de fumonisinas no alimento, com altos níveis de contaminação em alguns casos (Tabela 2). Porém não existe legislação específica determinando qual o nível de contaminação considerado seguro para os alimentos destinados ao consumo humano e animal.

O primeiro relato sobre a ocorrência de fumonisinas na alimentação animal no Brasil foi feita por Sydenham et al. (1992). Foram coletadas 22 amostras de ração associadas a surtos confirmados de micotoxicoses em diversas espécies animais, como cavalos, porcos coelhos e frangos, de fazendas do Estado do Paraná. Ao analisar as amostras foi constatado que 20 delas foram positivas para a presença de FB₁, na concentração de 0,2 a 38,5µg.g⁻¹ e 18 foram positivas para a presença de FB₂ na concentração de 0,1 a 12,0µg.g⁻¹.

Desde então, a ocorrência de fumonisina B₁ em rações brasileiras tem sido demonstrada em vários estudos. Em relação à sua ocorrência natural em milho no Brasil, Hirooka et al. (1996) detectaram FB₁ e FB₂ em 97,4% e 94,8%, respectivamente, de 48

amostras analisadas (39 de Estado do Paraná e 9 de Mato Grosso). Orsi et al. (2000) observaram a ocorrência natural de fumonisinas em amostras de milho do Estado de São Paulo, verificando níveis médios de $9,72\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FB₁) e $7,67\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FB₂).

Em 2001, Mallmann et al. avaliaram a ocorrência de fumonisina B₁ em cereais e rações do sul do Brasil. Das 407 amostras coletadas entre os meses de janeiro de 1996 e junho de 1998, provenientes de diferentes granjas e indústrias agropecuárias, 32% eram positivas, sendo que as concentrações variaram de 0,086 até $78,92\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de FB₁.

Tabela 2 – Níveis de fumonisinas detectados em amostras de produtos vegetais comercializados no Brasil.

Tipo de produto	Origem das amostras	Freqüência^a	Nível médio	Referência
		(%)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
Fumonisina B ₁				
Milho	Mato Grosso do Sul	100,0	10,59	HIROOKA et al., 1996
Milho	Paraná	100,0	2,72 – 4,79 ^b	HIROOKA et al., 1996
Milho	São Paulo	76,0	1,00 – 6,58 ^b	CAMARGOS et al., 2000
Sorgo	Diversos Estados	74,2	1,10 – 1,50 ^b	SILVA et al., 2000

^a Número de amostras positivas / total de amostras analisadas;

^b valores referem-se às concentrações mínima e máxima.

A ocorrência de *Fusarium moniliforme* em milho parece estar correlacionada com altas taxas de câncer esofágico no homem em Transkei, África do Sul e na China. FB₁ e FB₂ foram encontradas em amostras de milho produzidas localmente e consumidas por habitantes de áreas rurais de Transkei (Council for Agriculture Sciences and Technology, 2003; Yoshizawa et al., 1994). Foi realizado um estudo retrospectivo a partir de amostras de milho coletadas durante o período de 1976 a 1989 em áreas da região de Transkei. Os resultados revelaram maiores níveis de contaminação por fumonisina no milho proveniente das áreas de maior incidência de câncer esofágico, em comparação às amostras vindas de áreas com baixa incidência da doença (Rheeder et al., 1992).

2.5.3 Mecanismo de ação da fumonisina B₁

O mecanismo de ação das fumonisinas ainda não é perfeitamente conhecido, mas Wang et al. (1991), propuseram que a FB₁ poderia intervir na biossíntese de esfingolipídios ou “turnover” de esfingosina, porque existe uma similaridade da molécula de FB₁ com o complexo amino álcool esfingosina, que é um dos trinta ou mais aminoalcoois de cadeia longa encontrados nos esfingolipídios de várias espécies. Os esfingolipídios mais abundantes dos tecidos animais são a esfingosina e os glicoesfingolipídios.

Estudos feitos com hepatócitos de roedores têm demonstrado que as fumonisinas bloqueiam a formação de esfingolipídios. Esta evidência corrobora a hipótese de que a interrupção da formação de esfingolipídios, com conseqüente acúmulo de esfinganina e esfingosina constituem o mecanismo pelo qual se manifestam os efeitos de toxicidade aguda e carcinogenicidade das fumonisinas (Norred, 1993). Os esfingolipídios são importantes para a manutenção da integridade da membrana celular, além da regulação de receptores de superfície celular, bombas de íons e outros sistemas vitais para o funcionamento e sobrevivência da célula (Leeson et al.,1995).

2.5.4 Toxidez das fumonisinas

As fumonisinas são extremamente tóxicas para eqüinos e suínos, entretanto, a FB₁ apresenta toxidez relativamente baixa para aves domésticas, tendo sido demonstrado em estudo anterior que a FB₁ pura, em de até 80µg.g⁻¹, não causou efeitos adversos no desempenho de frangos de corte em crescimento (Henry *et al.*,2000).

Embora haja necessidade de níveis consideravelmente mais altos de FB₁ para produzir sintomas em frangos de corte e em perus, efeitos tóxicos foram descritos, o que vem contradizer a idéia de que essa não é uma micotoxina de importância para a indústria avícola (Kubena et al., 1999).

A maioria dos estudos para determinar os efeitos deletérios da fumonisina foi realizada a partir da incorporação de material de cultura de *Fusarium moniliforme* (FCM), com concentrações conhecidas de FB₁ em dietas de aves. Os resultados desses experimentos demonstraram que as dietas contaminadas por *F. moniliforme*, contendo FB₁, afetam adversamente o desempenho e outras funções fisiológicas de aves. Porém sabe-se que várias micotoxinas diferentes podem ser produzidas por *F. moniliforme*. Assim sendo, Henry et al. (2000) conduziram um estudo para determinar os efeitos da FB₁ purificada em frangos de corte, visando comparar os achados, com os resultados verificados em que FCM foi utilizado. Esse experimento foi justificado pelo fato de que não se deve associar todos os efeitos relacionados ao consumo de FCM na dieta, exclusivamente à FB₁. A partir dos achados desse estudo, os autores concluíram que, aparentemente o uso de FCM em estudos com FB₁ é apropriado.

Em estudo com frangos de corte recebendo ração com 300µg.g⁻¹ de FB₁, durante as duas primeiras semanas de vida, Brown et al. (1992) observaram diarreia, 19% de redução no ganho de peso do fígado, além de alterações histológicas, como necrose hepática multifocal, hiperplasia biliar, necrose de músculos e raquitismo.

Javed et al. (1993) administraram diferentes níveis de FB₁ (61 - 646µg.g⁻¹), FB₂ (14 - 98µg.g⁻¹) e moniliformina (66 - 367µg.g⁻¹), isoladas ou em combinação, para frangos de corte em diferentes idades. Todos os grupos demonstraram sinais clínicos evidentes de intoxicação, além de redução no ganho de peso e aumento na mortalidade, sendo que a interação entre FB₁ e moniliformina exacerbou os efeitos tóxicos.

Weibking et al. (1993) avaliaram frangos de corte submetidos à ração com diferentes níveis de FB₁, observando lesões no fígado e redução no ganho de peso nos grupos que receberam rações contendo níveis de 225 e 450µg.g⁻¹ de FB₁, respectivamente. Animais tratados com 75µg.g⁻¹ de FB₁ apresentaram apenas redução na biossíntese de

esfingolípídios, quando comparados com o grupo controle, indicando que aquele nível pode ser tóxico para aves, apesar de não resultar em sinais clínicos evidentes.

Kubena et al. (1999) estudaram os efeitos da intoxicação crônica de galinhas poedeiras por fumonisina, suplementada através de material de cultura de *Fusarium moniliforme*, em níveis de 100 a 200 μg de $\text{FB}_1 \cdot \text{g}^{-1}$ de ração. Os resultados indicaram que as galinhas poedeiras podem ser capazes de tolerar concentrações relativamente altas de FB_1 por longos períodos de tempo, sem afetar de maneira adversa a saúde e o desempenho desses animais.

Bermudez et al. (1995) avaliaram os efeitos da intoxicação de patos brancos Pekin de 1 dia por FB_1 a partir da inclusão de FCM na dieta, o que forneceu níveis de 0, 100, 200 e 400 μg de $\text{FB}_1 \cdot \text{g}^{-1}$ de ração, durante 21 dias. As aves recebendo ração intoxicada apresentaram redução no consumo e no ganho de peso, numa relação dose-dependente. Os níveis dietéticos crescentes de FB_1 foram associados com o aumento de peso absoluto do fígado, coração rim, pâncreas e proventrículo. A relação hepática esfinganina:esfingosina aumentou significativamente nos patos que receberam FB_1 . Foi verificada hiperplasia hepatocelular em todas as aves que receberam ração contaminada pela micotoxina. Entretanto, hiperplasia biliar só foi observada nas aves intoxicadas com 400 μg de $\text{FB}_1 \cdot \text{g}^{-1}$ de ração. Os autores concluíram que os patos são relativamente resistentes aos efeitos tóxicos da FB_1 .

Henry et al. (2000) investigaram a toxidez da FB_1 em frangos de corte a partir da incorporação da toxina purificada (98,1% pura) sob níveis de 0, 20, 40 e 80 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de ração, sendo que as aves foram alimentadas do dia 0 até os 21 dias de idade. Os resultados indicaram que a concentração hepática de esfinganina e a relação esfinganina:esfingosina estavam aumentadas em todos os grupos tratados.

Espada et al. (1994) estudaram os efeitos da micotoxicose por fumonisina em frangos de corte, avaliando parâmetros de desempenho e de bioquímica sérica. Para tanto, três experimentos foram realizados, sendo que, no primeiro deles, frangos de dois dias receberam dieta contendo 10 μg de $\text{FB}_1 \cdot \text{g}^{-1}$ de ração purificada por 6 dias. Nos experimentos 2 e 3, frangos de 2 dias receberam dieta em que foi incluído FCM que suplementava níveis

de FB₁ em 30µg.g⁻¹ administrados por 2 semanas e 300µg.g⁻¹ durante 8 dias. Comparadas com o grupo controle, as aves intoxicadas apresentaram diarreia, diminuição do ganho de peso, aumento do peso relativo de fígado e diminuição do peso relativo do baço. A redução do peso relativo do órgão linfóide, observada pela supressão da imunidade humoral e da função fagocitária dos macrófagos, contribuiu com o aumento da susceptibilidade das aves às infecções bacterianas durante intoxicações. A fumonisina também causou diminuição dos níveis séricos de triglicérides, ácido úrico, fosfatase alcalina e aumento dos níveis de GGT, AST, LDH, creatinina quinase e colesterol. Os autores relataram que tais alterações poderiam refletir em danos hepáticos e o aumento significativo na atividade da AST proporciona evidência de toxicose, concluindo que, mesmo baixas doses de fumonisina são tóxicas para frangos de corte jovens.

A imunossupressão também é apontada como um dos principais efeitos tóxicos da FB₁. Li *et al.* (1999) não observaram redução no ganho de peso ou aumento na conversão alimentar de frangos alimentados com 200µg.g⁻¹ de FB₁, porém constataram diminuição na imunidade humoral e na supressão de linfócitos.

2.6 Estudos de interação entre micotoxinas

Fungos e micotoxinas possuem uma ampla distribuição mundial, e diferentes espécies fúngicas, bem como suas micotoxinas, podem estar presentes em um mesmo substrato. Para a formulação das rações utilizadas na alimentação animal, são utilizados diferentes tipos de grãos, de diferentes origens, o que aumenta a possibilidade da ocorrência de duas ou mais micotoxinas em uma mesma dieta. Estudos indicam que a toxidez de algumas micotoxinas pode ou não ser aumentada de uma maneira aditiva ou sinérgica, quando há a co-ocorrência de duas ou mais micotoxinas na alimentação animal (Bermudez *et al.*, 1997; Casado *et al.*, 2001; Kubena *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000; Weibiking *et al.*, 1994).

Kubena *et al.* (1995) realizaram o estudo dos efeitos da FB₁, em combinação com aflatoxinas, em perus, fornecendo às aves ração contendo 200µg.g⁻¹ de FB₁ e 750µg kg⁻¹ de

aflatoxinas (79% AFB₁, 16% AFG₁, 4% AFB₂ e 1% AFG₂). As aves alimentadas com ração contendo apenas a FB₁ apresentaram redução de 10% no ganho de peso em relação ao grupo controle. As aves tratadas com aflatoxinas tiveram uma redução de 39%, e as tratadas com as micotoxinas combinadas tiveram redução de 47% no ganho de peso em relação ao grupo controle. Além disso, observou-se uma diminuição significativa do peso relativo do fígado, nas aves que receberam o tratamento combinado. Os autores concluíram que os efeitos da FB₁ e das aflatoxinas, quando combinados, podem ser mais severos do que quando estão presentes isoladamente. Anteriormente, Weibking et al. (1994) obtiveram resultados semelhantes em um estudo efetuado com perus jovens.

Sobre a ocorrência simultânea das aflatoxinas e das fumonisinas no campo, Kpodo et al. (2000) analisaram 15 amostras de milho coletadas em Ghana, onde foi observado que todas as amostras foram positivas para a presença de fumonisinas. Em 53% das amostras foi encontrada a co-ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas, sendo que a amostra com a maior concentração de aflatoxinas (662µg.kg⁻¹) também apresentava 1043µg.g⁻¹ de fumonisinas totais. A amostra que apresentou a maior concentração de fumonisinas (2534µg.g⁻¹) também apresentava 89µg.kg⁻¹ de aflatoxinas totais.

Shetty & Bhat (1997) demonstraram pela primeira vez na Índia, a co-contaminação de milho e rações para aves com fumonisinas e aflatoxinas.

Almeida et al. (2000) ao analisarem amostras de grãos de milho recém colhido, provenientes de 3 regiões do Estado de São Paulo, detectaram a predominância dos gêneros *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Dentro do gênero *Aspergillus* spp., o *A. flavus* foi a espécie mais isolada nas amostras, sendo que 60% de suas cepas isoladas produziram aflatoxinas, que variaram de 615 a 30750µg.kg⁻¹ de AFB₁, e 11 a 22µg.kg⁻¹ de AFB₂. No gênero *Fusarium* spp., o *F. moniliforme* foi a espécie mais frequentemente isolada, sendo que 100% de suas cepas isoladas produziram fumonisinas, que variaram de 20 a 2168µg.g⁻¹ de FB₁ e de 10 a 280µg.g⁻¹ de FB₂.

Pozzi et al. (1995) analisaram amostras de milho do Estado de São Paulo, verificando que 84% das amostras foram positivas para o fungo do gênero *Fusarium* spp, 55% para o gênero *Penicillium* spp. e 41% para *Aspergillus* spp, demonstrando uma

possível co-ocorrência de diferentes micotoxinas nessas amostras. Entre os fungos do gênero *Fusarium* spp, a espécie predominantemente isolada foi o *F. moniliforme* (81%), enquanto o *Aspergillus flavus* (36%) foi a espécie mais isolada em seu gênero.

2.7 Zearalenona

A zearalenona é produzida por fungos do gênero *Fusarium*, classificados na categoria dos *Fungi Imperfecti*. Devido a um grande número de fungos do gênero *Fusarium* serem encontrados no estágio sexual ou perfeito, estes são classificados como *Ascomycetes*. No estágio imperfeito do fungo, que produz a zearalenona, podem-se exemplificar os fungos *Fusarium graminearum* ou *Fusarium roseum* e o estágio sexual perfeito como *Gibberella zeae*. Os micélios e esporos dos organismos deste grupo são caracteristicamente de cores vermelhas ou “pink” (Lillehoj, 1973).

De onze variedades do gênero *Fusarium* spp., as variedades *Fusarium graminearum* (*F. roseum*), *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichoides* e *F. moniliforme* produzem quantidades significativas de zearalenona, sob condições laboratoriais. A bioprodução indica que as enzimas envolvidas na síntese da zearalenona são ativadas sob reduzidas temperaturas, em torno de 10°C (Lillehoj, 1973, OMS, 1983). Em uma única colheita, acima de 80% da amostra de grãos de uma região poderão estar contaminadas pelo fungo (Lillehoj, 1973).

2.7.1 Características físico-químicas

A zearalenona, metabólito secundário com características estrogênicas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* (Long & Diekman, 1986), é uma beta-lactona do ácido fenólico resorcílico, classificada de acordo com sua origem biossintética, como um nonacétido dentro do grupo dos policétidos (Turner, 1971). A zearalenona (C₁₈H₂₂O₅) é um composto cristalino branco, com massa molecular relativa de 318, temperatura de fusão de

164 - 165°C e coeficientes máximos de absorção de 27700 na faixa de onda de 236nm, de 13.909 na faixa de 274nm e de 6.020 na de 316nm (OPAS, 1983).

Tem-se isolado diversos derivados da zearalenona em culturas fúngicas (8'-hidroxizearalenona, 5'-formilzearalenona, zearalenol, 6'8-diidroxizearalenona), porém nenhum destes foi encontrado até o momento, como contaminante natural dos alimentos (OPAS, 1983).

A toxina exibe uma fluorescência azul-esverdeada quando excitada por luz ultravioleta (U.V.), de onda longa (360nm) e uma fluorescência verde mais intensa quando exposta à luz U.V. de onda curta (260nm) (OPAS, 1983).

2.7.2 Ocorrência natural

O aparecimento da zearalenona nos alimentos está ligado a condições ambientais favoráveis. Temperaturas de 20 a 25°C favorecem o crescimento do fungo, porém temperaturas relativamente mais frias (8 a 14°C) são requeridas para uma ótima produção de zearalenona (James & Smith, 1982). Portanto é provável que a zearalenona seja frequente em regiões que apresentem tais condições ambientais.

O aparecimento do hiperestrogenismo, relacionado com a zearalenona, anteriormente conhecida como toxina F2, foi descrito pela primeira vez há mais de meio século por McNutt et al. (1928). Posteriormente, esta síndrome foi descrita em diversos países, como Austrália (1937), Irlanda (1952), França e Itália (1962), Iugoslávia (1963), Romênia (1967), Hungria e Dinamarca (1968) e Canadá (1971) (OPAS, 1983).

Em trabalhos realizados nos E.U.A. entre 1968 e 1969 encontrou-se 1% das amostras de alimentos contaminadas por zearalenona, em concentrações que oscilavam entre 450 e 800µg.kg⁻¹ (ppb) (OPAS., apud Stowel et al., 1971). Em 1972, em outro trabalho, no qual as condições climáticas daquele ano foram favoráveis ao aparecimento de micotoxinas, 17% das amostras de milho apresentavam quantidades de zearalenona que variavam de 0,1 a 5,0µg.kg⁻¹ (OPAS., apud Eppley et al., 1974). Na Argentina, Odriozola et al. (1985) encontraram 21% das amostras de milho provenientes de silos abertos, silagem e farinhas peletizadas contaminadas por zearalenona, em níveis que variavam entre 100 e

1.600ppb. Tanto a incidência desta toxina como os níveis verificados foram maiores nas amostras do milho mantido empilhado.

Na Alemanha, na região de Schleswig Holstein, foram encontrados 11,7% de 120 amostras de rações comerciais e cevada utilizadas nessa região para a alimentação de suínos, com níveis de zearalenona que chegavam a 217 ppb (Krause, 1985).

Na Suécia, analisando-se o milho importado por aquele país, além de outras micotoxinas encontraram-se 41% das amostras contaminadas por zearalenona (Olsem, 1986).

No Brasil, Santo et al.(1985) descreveram a síndrome do hiperestrogenismo em várias granjas suinícolas do Rio Grande do Sul, onde 90% das amostras encaminhadas ao laboratório apresentavam resultado positivo para fungos do gênero *Fusarium*.

2.7.3 Mecanismo de ação

Não se tem dados precisos sobre a absorção da zearalenona pelo sistema digestivo, mas esta toxina parece ser metabolizada no fígado, sendo transformada em dois metabólitos, sendo um o beta-zearalenol, produzido em maior quantidade, e o outro o alfa-zearalenol produzido em menor quantidade na maioria das espécies, mas que tem maior atividade uterotrófica (Pompa et al., 1986)

Acredita-se que a enzima que catalisa a redução de zearalenona para zearalenol seja a 3-alfa-hidroxi-esteróide desidrogenase (3 α -HSD). Esta enzima é conhecida por degradar o 5 α -androstam-3,17-dione, um produto do metabolismo dos esteróides (Olsem et al., 1981; James & Smith, 1982).

A zearalenona e seus metabólitos mostraram que interagem com receptores estrogênicos, tendo efeitos sobre as secreções endometriais, síntese de proteínas uterinas e aumento do peso uterino (Boyd & Wittliff, 1978; Katzenellenbogen et al, 1979) e causando a manutenção do corpo lúteo na ausência de conceptos (Long & Dieckman, 1984), o que é denominado de pseudogestação.

As alterações no trato reprodutivo, induzidas pela zearalenona (Kurtz et al, 1969; Chang et al., 1979), ocorrem devido ao decréscimo dos níveis de progesterona, assim como pelo aumento da atividade estrogênica. Como consequência, verificam-se alterações na

atividade secretória do endométrio e, portanto, do meio ambiente no lúmen uterino (Long & Dieckman, 1984).

2.8 Metodologias para detecção de micotoxinas

Os primeiros métodos para a determinação de aflatoxinas em alimentos foram desenvolvidos em meados dos anos 60, tendo como base a propriedade fluorescente da toxina, quando exposta à luz ultravioleta. Deste modo, a técnica de identificação e quantificação utilizada de início, e ainda largamente empregada na atualidade, foi a cromatografia de camada delgada (CCD) (OPAS, 1983). Posteriormente, com o desenvolvimento dos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), houve um incremento notável no grau de precisão das análises, porém, com o aumento significativo dos custos das mesmas (Chu, 1984; Stubblefield & Van Egmond, 1989).

No início da década de 80 surgiu uma nova perspectiva para a análise de aflatoxinas, com a introdução de métodos imunológicos, ou imunoenaios, fundamentados nas reações específicas entre anticorpos e antígenos, com destaque para os de radioimunoensaio, cromatografia de imunoafinidade e de ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA) (Frémy & Chu, 1989; Pestka et al., 1995).

Existem, atualmente, conjuntos de ELISA, produzidos em escala comercial, para execução de análise de micotoxinas em alimentos. Esses sistemas são de execução simples, e podem ser empregados diretamente nas amostras, uma vez que não requerem etapas de

purificação devido às altas especificidade e sensibilidade dos anticorpos. Esta característica representa uma vantagem considerável do método, pois permite a sua aplicação em grande número de amostras, em intervalo de tempo relativamente pequeno, o que não ocorre com os métodos cromatográficos (Märtlbauer et al., 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e instalações

As análises micotoxicológicas foram realizadas nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.2 Amostras

Durante o período compreendido entre maio de 2003 e abril de 2004, foram coletadas 48 amostras de rações para frangos de corte em três criatórios avícolas no município de São José do Vale do Rio Preto, Estado do Rio de Janeiro. O plano de amostragem utilizado foi o seguinte: cada amostra de 1kg foi obtida a partir da homogeneização e subdivisão de 25 amostras de 10kg na linha de produção da fábrica (Dalcerro et al.; 1997). A formulação das rações utilizadas encontra-se no Anexo 1.

3.3 Equipamentos

a) Cromatógrafos Líquidos - Foram utilizados os cromatógrafos líquidos de alta eficiência (Waters Associates®, Inc., Miliford, M.A. - EUA) equipado com duas bombas Waters (modelo 510), injetor Rheodyne (Rheodyne®, Cotati, California – EUA) com *loop* de 20µL, detector de fluorescência Waters (modelo 420) e de absorvância Lambda-Max Waters (modelo 481) e integrador registrador (modelo 740) e detector de arranjo de diodos D-6000 Merck-Hitachi, (Hitachi Ltd. ®, Tóquio, Japão), equipado com *Workstation* com *software* de controle D-6, do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e um sistema Hewlett-Packard® equipado com detector de fluorescência Spectrofluorescence. Ambos os sistemas tiveram seus detectores de fluorescência equipados com filtros de excitação de 330nm e de emissão de 460nm.

b) Leitor de ELISA: modelo Quick ELISA, Drake Eletrônica e Comércio Ltda, Lote/ n° série 322.

c) Estufa BOD Ética

3.4 Isolamento, contagem e classificação da microbiota contaminante

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC.g⁻¹) de fungos filamentosos e leveduras foi realizada segundo metodologia de diluição decimal seriada descrita por Pitt & Hocking (1997), conforme a seguir:

Agitou-se em liquidificador, em copo estéril, 10 gramas da amostra em 90mL de água peptonada a 0,1% . A partir desta diluição inicial (10⁻¹) preparou-se diluições decimais seriadas até 10⁻⁴. Inoculou-se (em triplicata) alíquotas de 0,1mL de cada uma das diluições nos meios de cultivo, tais como: Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC) utilizado para contagem geral (King et al. 1979, modificado por Pitt & Hocking, 1985); Dichloran 18% Glicerol Ágar (DG18) um meio seletivo para fungos xerofílicos (Hocking & Pitt, 1980) e o meio Dichloran Cloranfenicol Peptona Ágar (DCPA) para isolamento de espécies do gênero *Fusarium spp.* (Andrews & Pitt, 1986)

As placas de DRBC, DG18 foram incubadas a 25°C por 7 dias em estufa BOD Ética. As placas de DCPA foram incubadas a 24°C por 7 dias em fotoperíodos de 12h sob luz fria e luz negra alternadamente com lâmpadas fluorescentes. Todas as placas foram observadas diariamente, onde as placas de meios para enumeração foram selecionadas dentre aquelas que apresentaram em torno de 10 a 100 UFC.g⁻¹ (Dalcero et al., 1997).

As colônias fúngicas selecionadas para identificação foram repicadas em Malte Extract Ágar (MEA), em tubos inclinados e mantidas a 4°C. O repique nos meios próprios para identificação da espécie foi feito de acordo com os métodos propostos para cada gênero (Klich, 2002; Pitt & Hocking, 1997; Nelson et al., 1983), descritos nos Anexos 2,3 e 4.

Todos os meios de cultivo foram preparados nos laboratórios do NPMM utilizando drogas e reagentes certificados Merck-Quimitra e Sigma Co., de acordo com os formulários contidos no Anexo 5.

3.4.1 Espécies fúngicas de referência

As espécies fúngicas de referência foram depositadas na Coleção Micológica do Departamento de Biologia - CMDB-IOC/FIOCRUZ sob os seguintes números de registro: CMDB 0473, CMDB 0474, CMDB 0475, CMDB 0476, CMDB 0477, CMDB 0478, CMDB 0479, CMDB 0480, CMDB 0481, CMDB 0482, CMDB 0483 e CMDB 0484. Os códigos das amostras isoladas foram demonstrados no Anexo 6.

3.5 Testes de ELISA

Para a realização dos testes foram utilizados kits comerciais desenvolvidos e produzidos pela Beacon Analytical Systems Inc. O kit Beacon em placa utiliza o método de ELISA competitivo para análise quantitativa das micotoxinas. Foram utilizados três kits distintos, um específico para cada toxina procurada: aflatoxina B₁, fumonisina B₁ e zearalenona.

A micotoxina é extraída da amostra agitando-a com metanol e água. O extrato obtido é filtrado e depois testado através de imunoensaio. O conjugado Micotoxina-HRP-Enzima é pipetado nos poços seguido dos calibradores ou amostras de extrato. Em seguida, pipeta-se o anticorpo da micotoxina para iniciar a reação. Durante uma incubação de 10 minutos a micotoxina da amostra e o conjugado Micotoxina-HRP-Enzima competem por um número limitado de anticorpos. Passados os 10 minutos de incubação, o conteúdo dos poços é descartado e a placa é lavada para remoção de qualquer enzima que não tenha se ligado ao anticorpo. Um substrato de limpeza é adicionado aos poços e qualquer toxina do conjugado-enzima se converterá na cor azul. Seguindo uma incubação de 5 minutos, a reação é interrompida e a intensidade da cor de cada poço é lida. As amostras de cores desconhecidas são comparadas com as cores dos calibradores e a concentração da micotoxina das amostras é obtida.

Resultados semi-quantitativos são obtidos por simples comparação das absorvâncias das amostras com a absorvância dos calibradores. Amostras contendo cores mais claras que um poço de calibrador tem uma concentração de micotoxina maior que a concentração do calibrador. Amostras contendo cores mais escuras que um poço de calibrador tem uma concentração menor que a concentração do calibrador. Uma interpretação quantitativa requer um gráfico das absorvâncias dos calibradores (eixo X) vezes o logaritmo da concentração dos calibradores (eixo Y) em papel gráfico. Uma linha reta é traçada através dos pontos dos calibradores e as absorvâncias das amostras são inseridas nesta linha. O ponto correspondente do eixo Y é a concentração da amostra.

3.6 Metodologia para Cromatografias

3.6.1 Aflatoxinas por CLAE

Análises de aflatoxina B₁ (AFB₁) foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando-se a metodologia proposta por Trucksess et al. (1994). Uma porção de 50g de ração foi extraída com 100 ml de acetonitrila:água (90:10, v/v) por agitação, durante 2 minutos em Shaker. A mistura foi filtrada utilizando-se papel de filtro Whatman nº 4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA) e uma alíquota de 3mL foi retirada e colocada em tubo de cultura de 10mL. Uma coluna multifuncional (Mycosep 224 MC, Romer Labs®, USA) foi empurrada lentamente dentro do tubo de cultura. O extrato foi forçado através do cartucho, através de uma válvula de única via. O extrato purificado (0,5mL) foi coletado numa coluna reservatório. Uma alíquota (200µL) foi derivatizada com 700µL de ácido trifluoracético-ácido acético-água (20:10:70, v/v). A aflatoxina derivatizada foi analisada utilizando-se o sistema de CLAE. Separações cromatográficas foram realizadas em coluna de fase reversa (Varian, 150 X 4,6mm id., 5-µ tamanho de partícula). Água-metanol-acetonitrila (4:1:1, v/v) foi usado com fase móvel numa razão de fluxo de 1mL.min⁻¹. A fluorescência da aflatoxina derivatizada foi registrada pela excitação e emissão de comprimento de onda de λ 360nm e λ 460nm, respectivamente. Curvas padrão foram construídas com diferentes níveis de AFB₁. Essa toxina foi quantificada por

correlação dos maiores picos dos extratos das amostras com essas curvas padrão. O limite de detecção deste método analítico foi de 1ng.g^{-1} , cuja recuperação de AFB₁ foi de 82%.

3.6.2 Fumonisinias por CLAE

A análise de fumonisina B₁ (FB₁) foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia proposta por Shephard et al (1990) e modificada por Doko et al. (1995). 15g de uma amostra foram extraídas com 50mL de acetonitrila:água (1:1, v/v) e agitada por 30 minutos. A mistura foi filtrada através de papel de filtro Whatman nº4. Uma alíquota (50µL) foi derivatizada com 200µL de solução de oftaldialdeído (OPA) obtida por adição de 5mL de tetraborato de sódio a 0,1M e 50µL de 2-mercaptoetanol a 1mL de metanol contendo 40mg de OPA. As amostras derivatizadas (20µL) foram analisadas pelo sistema de CLAE, conforme descrito acima. A fase móvel usada foi metanol: fosfato diidrogenado sódico a 0,1M (75:25, v/v) ajustado ao pH 3,35 com ácido fosfórico, numa razão de fluxo de $1,5\text{mL.min}^{-1}$. A fluorescência de fumonisina OPA-derivada foi registrada por excitação e emissão de comprimento de onda de λ 335nm e λ 440nm, respectivamente. Curvas padrão foram construídas com diferentes níveis de FB₁. Essa toxina foi quantificada por correlação dos maiores picos dos extratos das amostras com essas curvas padrão. O limite de detecção deste método analítico foi de 20ng.g^{-1} .

3.6.3 Zearalenona por CCD

A análise de zearalenona (ZEA) foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1995). 25g de amostra de ração foram extraídas com 125mL de metanol: água (60:40, v/v), 8mL de hexano, 2g de NaCl e agitadas por 30 minutos em um shaker orbital. A mistura foi filtrada através de papel de filtro Whatman nº 4 e 25mL do filtrado fase metanol:água foram extraídos duas vezes com 25 e 15mL de clorofórmio, respectivamente. A fase clorofórmio foi concentrada para secagem utilizando um rotavapor e o extrato redissolvido em 200µL de benzeno:acetonitrila (98:2, v/v). O extrato foi desenvolvido para ZEA pela aplicação de “spots” de 2µL, 5µL e 10µL para cada extrato juntamente com as soluções padrão de

toxinas em cromatofolhas de alumínio sílica gel 60 CCD (20 x 20cm, Merck, Alemanha) e desenvolvidas com clorofórmio: acetona (90:10, v/v). Cromatogramas foram secos em ar e observados sob luz ultravioleta em 365 e 254nm. As quantidades relativas de ZEA determinadas quantitativamente por comparação visual sob luz ultravioleta com soluções padrão de concentrações de toxinas conhecidas.

3.7 Análises Estatísticas

As análises de dados foram realizadas por análise de variância. Os dados de micotoxinas obtidos foram transformados usando a função logarítmica $\log_{10}(x + 1)$ antes da utilização da análise de variância. O teste de Scheffé foi usado para determinar diferenças significativas entre as metodologias.(QUINN & KEOUGH, 2002). As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (SAS Institute, Cary, NC).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e contagem

Os resultados obtidos forneceram a contagem dos propágulos fúngicos, expressa por meio de unidades formadoras de colônia por grama (UFC.g⁻¹) de amostra analisada, demonstrados na Tabela 3. Os valores médios obtidos em meio DRBC, variaram de 2,8 x 10² UFC.g⁻¹ na ração pré-inicial a 1,13 x 10⁴ UFC.g⁻¹ observados na ração de engorda. Os fungos xerofílicos foram contados em meio DG18, apresentando carga fúngica que variou de 9 x 10² UFC.g⁻¹ obtidas na ração pré-inicial a 1,79 x 10⁴ UFC.g⁻¹, obtidas na ração de abate. Para as espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* foi utilizado o meio DCPA, onde os valores médios obtidos variaram de 1,2 x 10³ UFC.g⁻¹, na ração pré-inicial a 1,68 x 10⁴ UFC.g⁻¹ na ração de abate.

Tabela 3 – Valores médios da contagem de propágulos fúngicos (UFC.g⁻¹) em amostras de ração de frangos de corte

Ração	DRBC	DG18	DCPA
Pré-inicial	2,8 x 10 ²	9 x 10 ²	1,2 x 10 ³
Inicial	7,4 x 10 ³	5,1 x 10 ³	6,9 x 10 ³
Engorda	1,13 x 10 ⁴	6,9 x 10 ³	1,08 x 10 ⁴
Abate	7,5 x 10 ²	1,79 x 10 ⁴	1,68 x 10 ⁴

Os resultados obtidos mostraram que as amostras de ração, embora procedentes de uma área de clima tropical, excetuando-se a ração de engorda, não exibiram contaminação com carga fúngica elevada e superior aos limites tolerados estabelecidos para qualidade higiênica da ração, isto é, da ordem de 1 x 10⁴ UFC.g⁻¹ (GMP, 2005). Esses resultados diferem de estudos recentes realizados por Accensi et al. (2004) e Rosa et al. (2006), onde as contagens encontradas estiveram acima de 1 x 10⁵ UFC.g⁻¹.

Observou-se predominância da população de fungos filamentosos sobre a de leveduras, sendo isoladas um total de 63 cepas de espécies pertencentes a quatro gêneros fúngicos: *Penicillium spp.* (41,26%), *Aspergillus spp.* (33,33%), *Fusarium spp.* (20,63%), e

Cladosporium spp. (4,76%), como demonstrado na Figura 3. Bragulat et al. (1995) demonstraram em seus estudos que a maioria das rações apresenta como flora predominante espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, enquanto Magnoli et al. (2002) encontraram uma prevalência de espécies de *Fusarium* e *Penicillium* em rações para aves, seguida de *Aspergillus spp.*

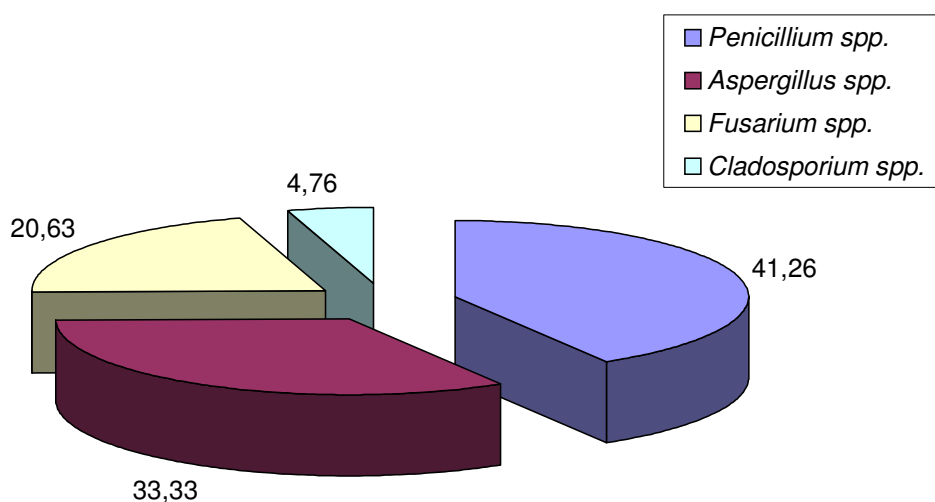


Figura 3 - Predominância de gêneros fúngicos em amostras de rações de frangos de corte coletadas em São José do Vale do Rio Preto.

Em agosto de 1998 a International Society of Plant Pathology, durante o VIII International Workshop of *Fusarium* decidiu trocar o nome de *Fusarium moniliforme* para *Fusarium verticillioides* (Seifert, et al., 2003). Os nomes dados pelos autores na Revisão de Literatura foram mantidos neste trabalho, entretanto, a partir deste capítulo, referem-se tão somente a *Fusarium verticillioides*

Penicillium citrinum, *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum* foram as espécies com a maior frequência de isolamento, em ordem decrescente, conforme Tabela 4. A prevalência das espécies: *Penicillium citrinum* e

Aspergillus flavus está de acordo com resultados obtidos por Accensi et al. (2004), Adebajo et al. (1994), Dalcerro et al. (1997) e Magnoli et al. (1998)

Embora as espécies de *Penicillium spp.* tenham sido predominantes, houve apenas o isolamento de *P. citrinum*, potencial produtor de citrinina, não sendo o isolamento das demais digno de nota.

As espécies do gênero *Fusarium*, embora em menor prevalência, foram identificadas como sendo das espécies *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, potenciais produtoras de zearalenona e fumonisinas, respectivamente.

Tabela 4 – Distribuição de espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* nas amostras de ração para frangos de corte.

Espécies Fungicas	Frequência (%)
<i>P. citrinum</i>	35
<i>A. flavus</i>	25
<i>F. verticillioides</i>	15
<i>F. graminearum</i>	8
<i>A. niger</i>	6
<i>P. rugulosum</i>	5
<i>A. fumigatus</i>	3
<i>F. funiculosum</i>	2
<i>F. subglutinans</i>	2

Limite de contagem da técnica 10^2 UFC.g⁻¹

4.2 Detecção de micotoxinas por ELISA

Os resultados indicaram uma contaminação por aflatoxinas em 63,27% das amostras, com suas concentrações variando de 2 a 21µg.kg⁻¹ (Figura 4a). Observa-se que a maior produção de aflatoxinas em ração de frangos de corte na região estudada ocorreu no mês de fevereiro e a menor em março de 2004 (Figura 4b).

As médias de recuperação de aflatoxina B₁ foram de 87 e 91%, com picos de 5 e 10 μg.kg⁻¹, respectivamente. Uma boa correlação foi obtida para o kit de aflatoxina B₁, com r²= 0,978 (Figura 5).

Para a análise de fumonisinas, 97,87% das amostras testadas apresentaram-se contaminadas com concentrações variando de 0,3 a 9,1 μg.g⁻¹, sendo que 25,53% das amostras apresentaram níveis superiores a 6ppm (Figura 6a). Observa-se que a menor produção de fumonisina B₁ ocorreu nos mês de julho de 2003 e a maior em fevereiro de 2004, entretanto não houve diferença significativa na produção de fumonisina no período de amostragem(Figura 6b).

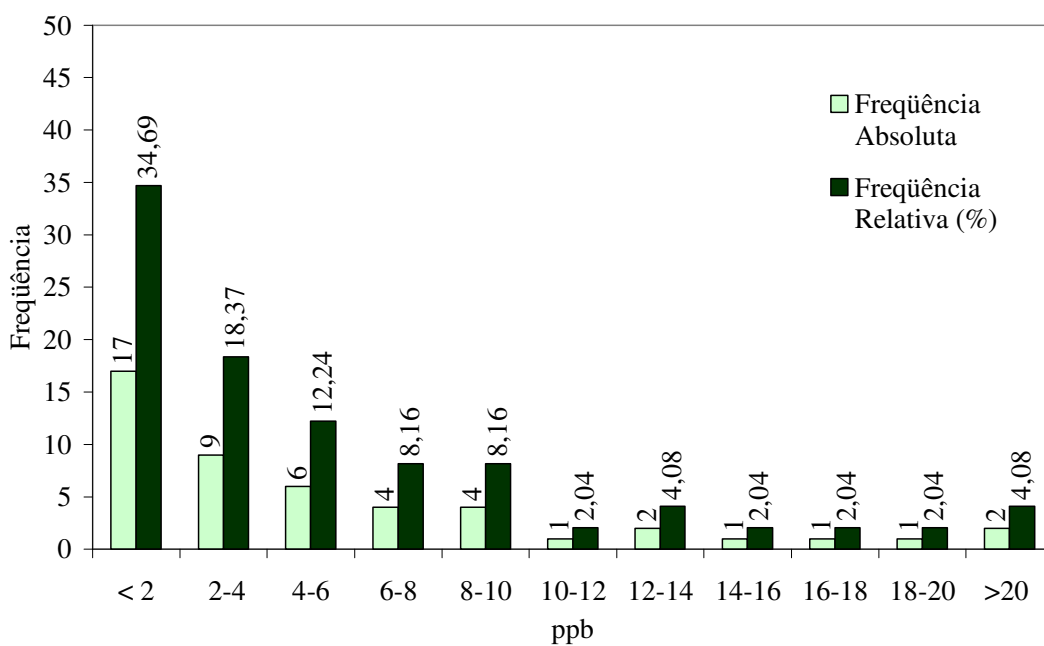


Figura 4a – Frequência de contaminação por Aflatoxina B₁ das amostras de ração de frangos de corte analisadas.

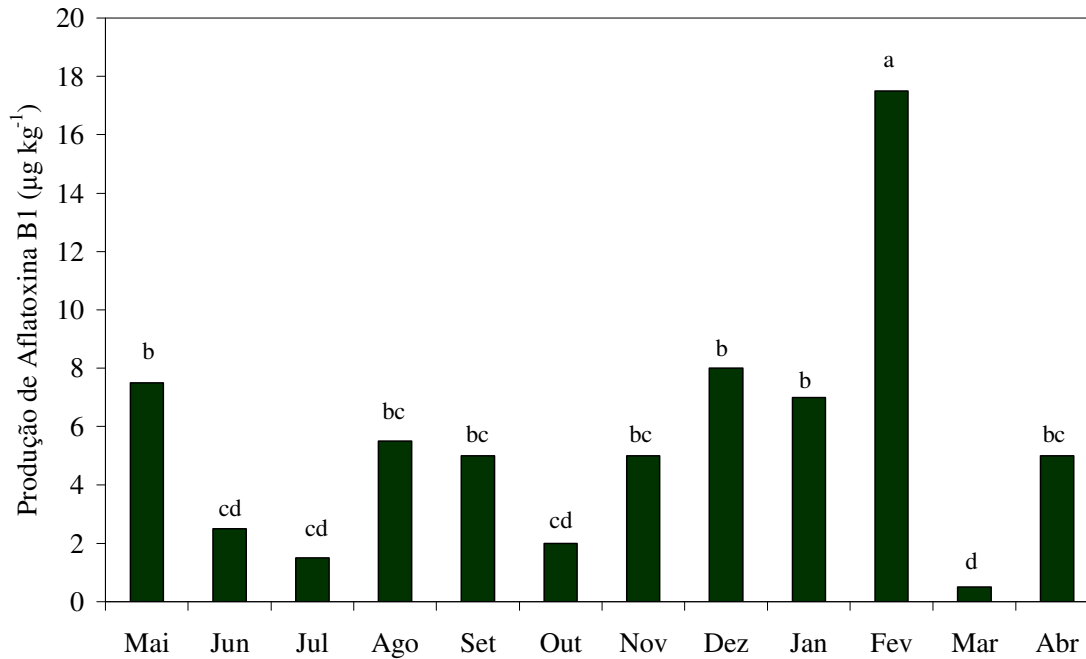


Figura 4b - Produção de Aflatoxina B₁ em amostras de ração de frangos de corte nos diferentes períodos de coleta. As letras em comum não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Scheffè (P<0,001).

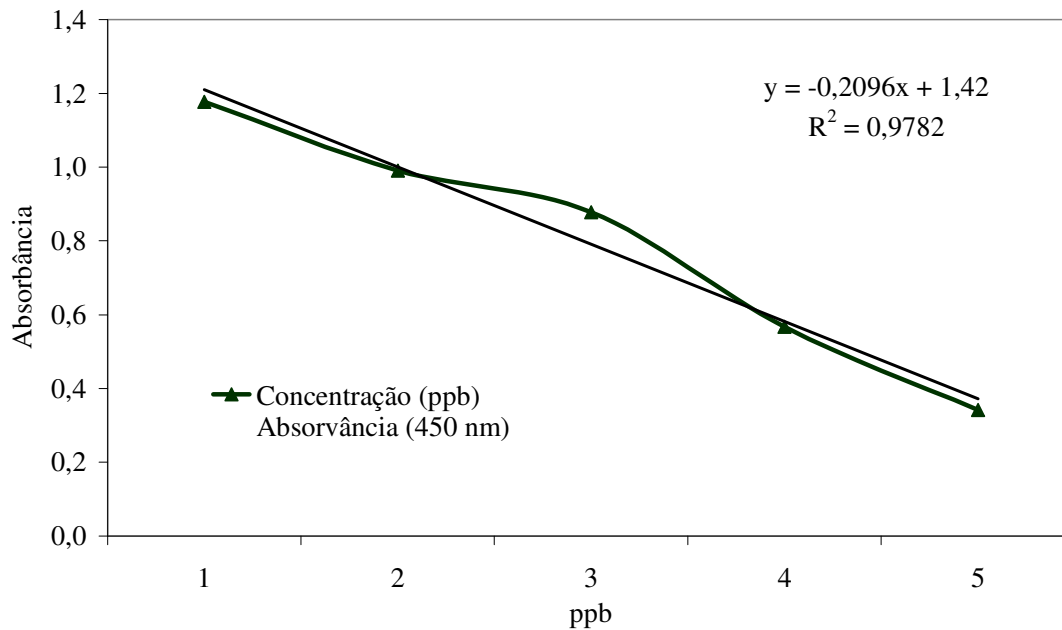


Figura 5 – Regressão linear dos padrões de Aflatoxina B₁.

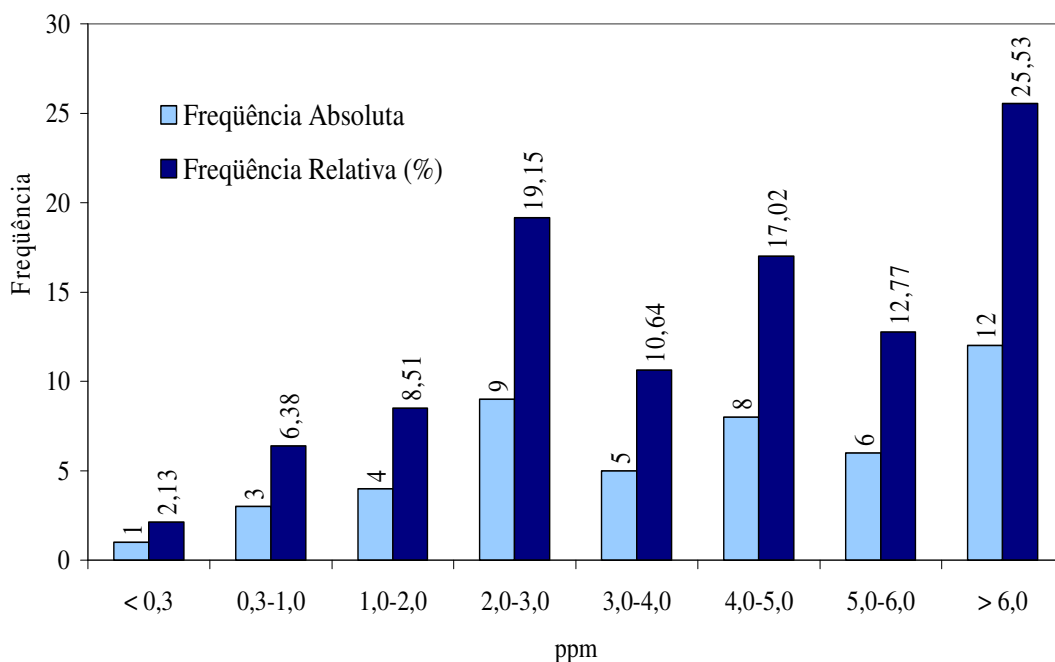


Figura 6a – Frequência de contaminação por Fumonisina B₁ das amostras de ração de frangos de corte analisadas.

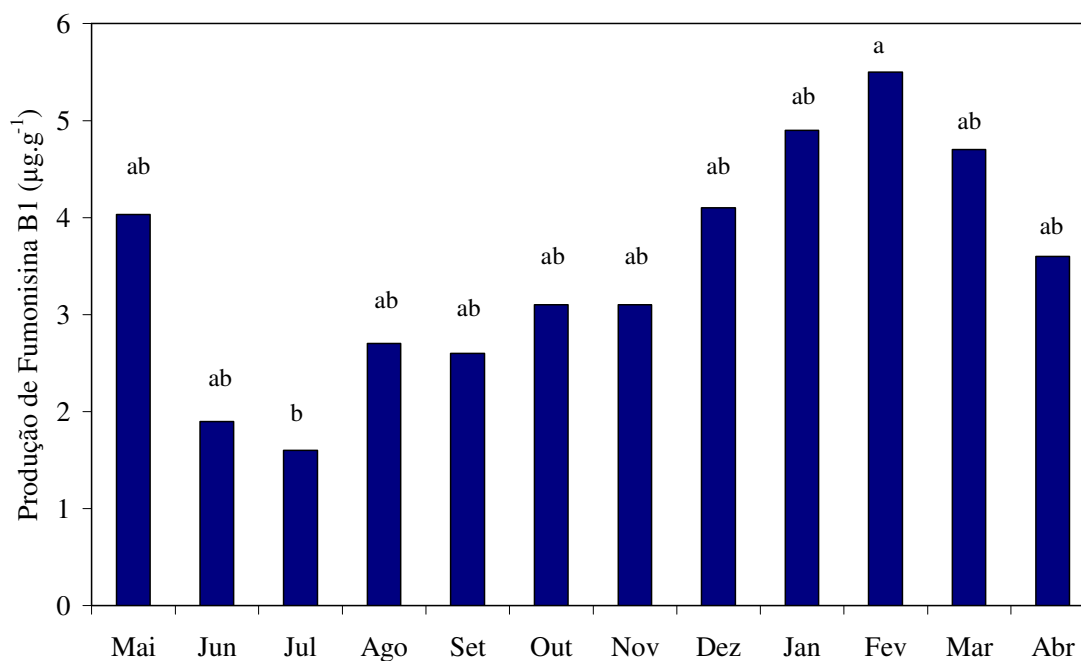


Figura 6b - Produção de Fumonisina B₁ em amostras de ração de frangos de corte nos diferentes períodos de coleta. As letras em comum não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Scheffè (P<0,01).

A média de recuperação para fumonisina B₁ foi de 80% quando as amostras apresentavam pico de 0,5µg.g⁻¹. Uma correlação de $r^2 = 0,986$ foi obtida para o kit de fumonisina B₁ (Figura 7).

Também pela técnica de ELISA, observou-se a co-contaminação por fumonisinas e aflatoxinas em 66,7% das amostras analisadas. Trabalhos anteriores demonstram a alta prevalência de fumonisinas e aflatoxinas em rações à base de milho e outros alimentos para animais (Dutton & Kinsey, 1995; Shetty & Bhat, 1997; Siame et al., 1998). Ali et al. (1998) demonstraram que todas as amostras contaminadas com aflatoxinas também estavam contaminadas com fumonisinas. Estudos desenvolvidos na Argentina têm demonstrado a incidência de micotoxinas em rações de frangos. Dalcerro et al. (1997) encontraram AFB₁ ocorrendo em 48% das amostras analisadas. Magnoli et al. (2002) observaram fumonisinas e AFB₁ co-ocorrendo em 60% das amostras, assemelhando-se aos resultados do presente estudo.

Zearalenona foi encontrada em baixas concentrações nas amostras, numa frequência de 77,1%, com níveis <1µg.g⁻¹ (Figura 8a).

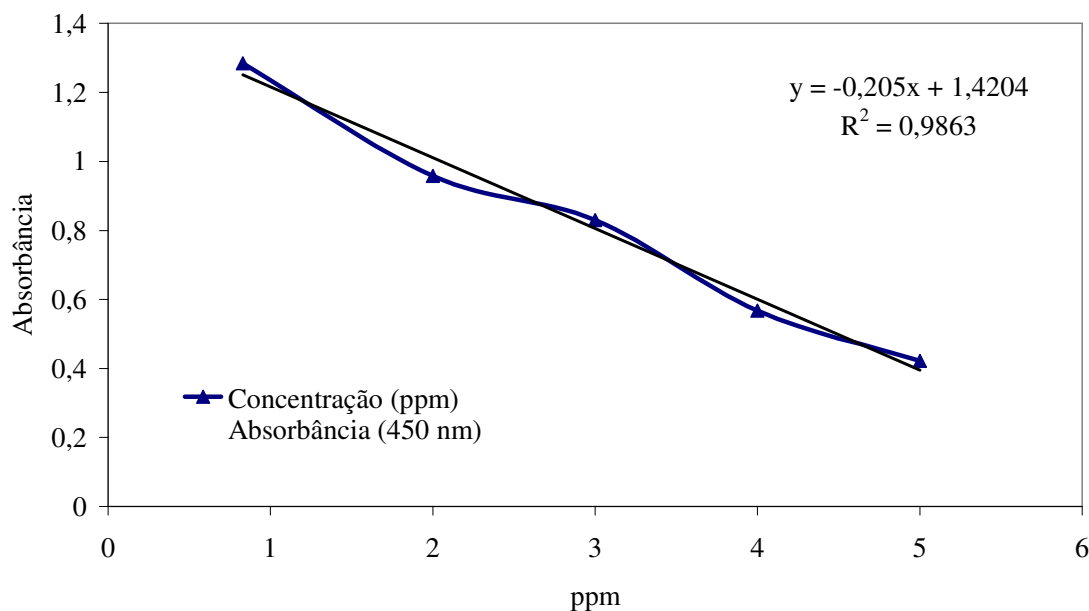


Figura 7- Regressão linear dos padrões de Fumonisina B₁.

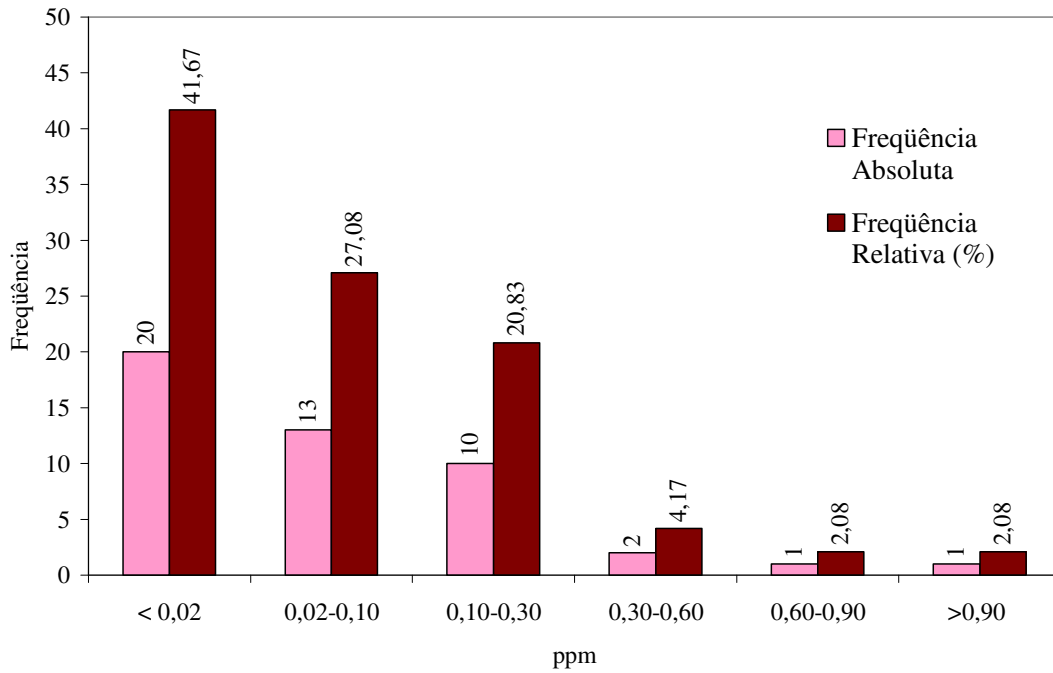


Figura 8a– Frequência de contaminação por Zearalenona das amostras de ração de frangos de corte analisadas.

Os níveis mais elevados de Zearalenona detectados em amostras de ração ocorreram no mês de março de 2004 (Figura 8b).

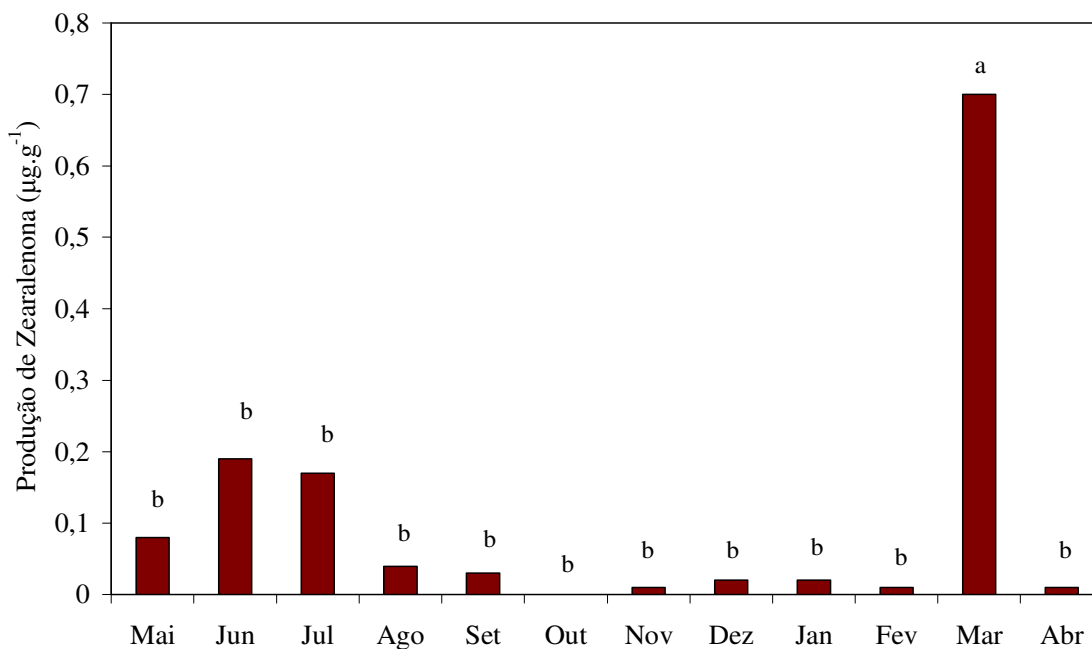


Figura 8b - Produção de Zearalenona em amostras de ração de frangos de corte nos diferentes períodos de coleta. As letras em comum não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Scheffè ($P < 0,01$).

Uma boa correlação foi obtida para o kit de Zearalenona com $r^2 = 0,969$ (Figura 9).

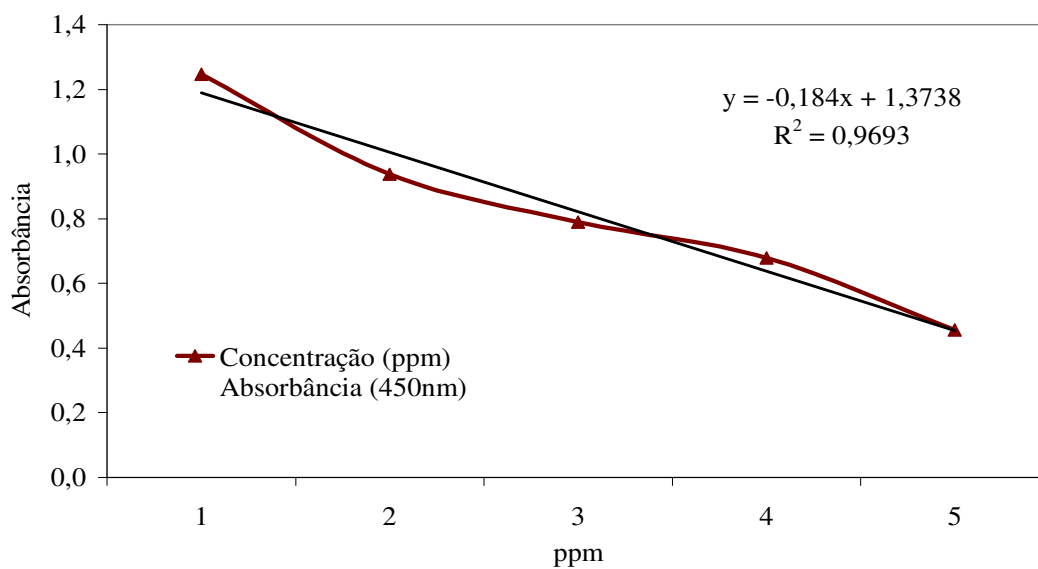


Figura 9 - Regressão linear dos padrões de Zearalenona.

Uma boa correlação foi obtida para os kits (Aflatoxinas, Fumonisinias) e as análises das mesmas amostras em CLAE, cujos valores de r^2 foram 0,9922 e 0,9823, respectivamente (Figuras 10 e 11).

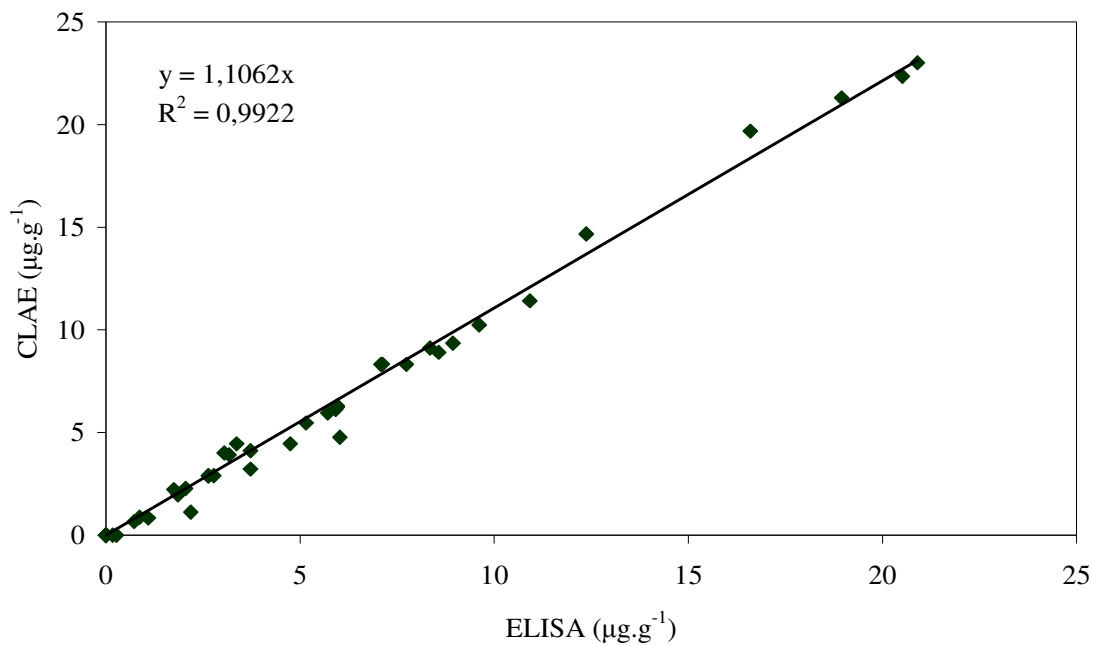


Figura 10 - Regressão linear da correlação entre os valores de Aflatoxinas obtidos por ELISA e CLAE.

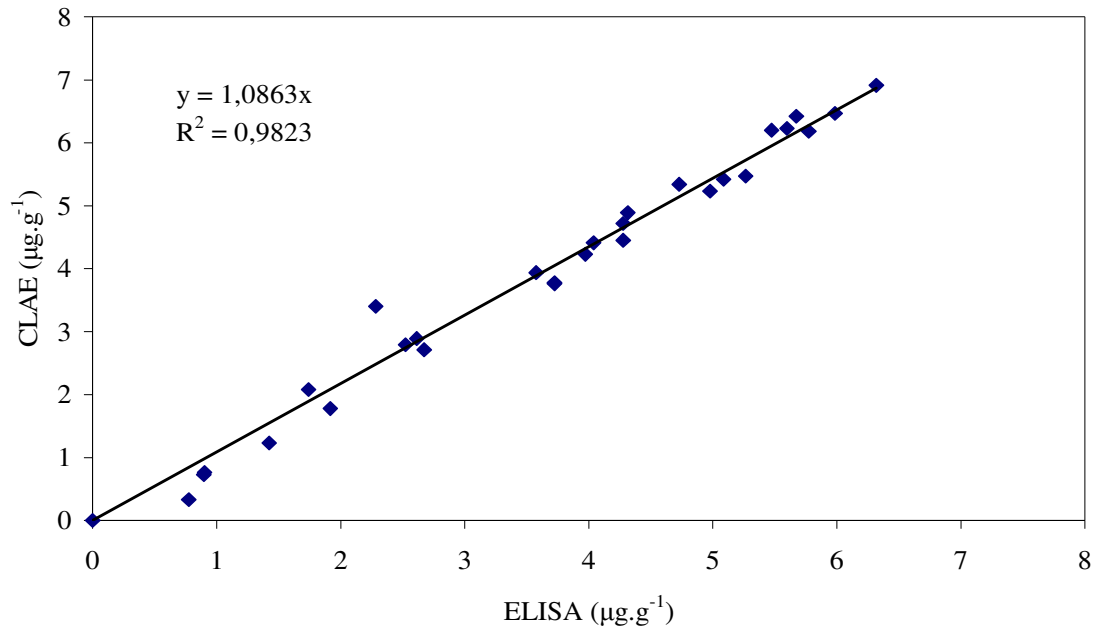


Figura 11 - Regressão linear da correlação entre os valores de Fumonisin obtidos por ELISA e CLAE.

4.3 Detecção de micotoxinas por CLAE e CCD

A ocorrência de micotoxinas foi definida como a percentagem total de amostras de ração de frangos nas quais cada micotoxina esteve presente. FB_1 foi a mais freqüente (97,8%) seguida de ZEA (77,1%) e AFB_1 (66,7%). FB_1 e AFB_1 co-ocorreram em 64,5% das amostras testadas.

Níveis de AFB_1 variaram de 1,2 a $17,5\mu\text{g.kg}^{-1}$. Não houve diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os meses testados exceto fevereiro e março quando a maior e a menor produção de AFB_1 foram encontradas.

Níveis de FB₁ variaram de 1,5 a 5,5µg.g⁻¹. Nos meses de fevereiro e julho foram encontrados os níveis de FB₁ máximo e mínimo, respectivamente. Não houve diferenças significativas (P < 0,001) entre os meses testados.

Níveis de ZEA variaram de 0,1 a 0,7µg.g⁻¹. Amostras coletadas em março apresentaram os maiores níveis de contaminação.

Embora os níveis de toxinas detectados nas rações tenham sido abaixo dos limites estabelecidos, os resultados mostraram que algumas amostras apresentavam níveis de AFB₁ muito próximos ao máximo permitido, o que poderia afetar aves mais jovens.

Evidenciou-se a co-ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em ração para aves na região de São José do Vale do Rio Preto. Tal fato pode ser responsável por efeitos tóxicos aditivos sobre as funções metabólicas, influenciando a produção de carne, com conseqüente perda econômica.

Resultados indicam a necessidade de produtores e em particular das autoridades brasileiras, em adotar procedimentos de controle de qualidade para monitorar a ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em rações. Observou-se, analisando a literatura nacional sobre as frequências e concentrações de micotoxinas nestes substratos, que não há estudos para esta região, tanto quanto são limitados os dados no que tange a este tipo de estudo de monitoramento. A identificação e a determinação das toxinas contaminantes revestem-se de grande importância para o estabelecimento e análise de risco da exposição do homem e dos animais domésticos a estas toxinas.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foram estabelecidas as seguintes conclusões:

1. As amostras de ração, excetuando-se a ração de engorda, não exibiram contaminação com carga fúngica elevada e superior aos limites tolerados estabelecidos para qualidade higiênica da ração, isto é, da ordem de 1×10^4 UFC.g⁻¹.
2. Houve predominância da população de fungos filamentosos sobre a de leveduras, sendo isoladas 63 cepas de espécies pertencentes a quatro gêneros fúngicos: *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* e *Cladosporium spp.*.
3. *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum* foram as espécies com a maior prevalência.
4. Aflatoxina B₁ foi detectada em 63,27% das amostras de ração para frangos de corte em níveis em níveis menores que os estabelecidos para ração no Brasil (50µg.kg⁻¹).
5. Houve co-ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em 66,7% das amostras analisadas, indicando um potencial sinergismo entre elas.

6. Zearalenona foi encontrada em baixas concentrações, em 77,1% das amostras analisadas.

7. .Obteve-se correlação entre os testes de Imunoensaio ELISA (Aflatoxinas, Fumonisinias) e as análises das mesmas amostras em CLAE.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCENSI, F.; ABARCA, M.L.; G.; CABAÑES, F.J. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. **Food Microbiol.**, v.21, p.623-627, 2004.
- ADEBAJO, L.O.; IDOWU, A.A.; ADESANYA, O.O. Mycoflora and mycotoxins production in Nigeria corn and corn-based snacks. **Mycopathologia**, v.126, p.183-192, 1994.
- AH-SEO, J.; WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.1331-1334, 1999.
- ALI, N.; SARDJONO, S.; YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T. Natural co-occurrence of aflatoxins and Fusarium mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. **Food Add. Contam.**, v.15, p.377-384, 1998.
- ALMEIDA, A.P.; CORRÊA, B.; MALLOZI, M.A.B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L.M.V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisins production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.321-326, 2000.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**, 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD Chap. 49, 1995.
- ASEVEDO, I.G.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C.R.; ALMEIDA, R.M.A.; SOUZA, V.M. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolate from stored maize. **Revista de Microbiologia**, v.25, n. 1, p.46-50, 1994.
- BALDISSERA, M.A.; SANTÚRIO, J.M.; CANTO, S.H.; PRANKE, P.H.; ALMEIDA, C.A.A.; SCHIMIDT, C. Aflatoxinas, ochratoxina e zearalenona em alimentos para

- consumo animal no sul do Brasil-Parte II. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.53, p.5-10, 1993.
- BAUDURET, P. A mycological and bacteriological survey on feed ingredients and mixed poultry feeds in Reunion Island. **Mycopathologia**, v. 109, p. 157-164, 1990.
- BENKERROUM, S.; TANTAOUI-ELARAKI, A. Study of toxigenic moulds and mycotoxins in poultry feeds. **Rev. Med. Veterinarie**, v. 152, n. 4, p. 335-342, 2001.
- BERMUDEZ, A.J.; LEDOUX, D.R.; ROTTHINGHAUS, G.E. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ in ducklings. **Avian Diseases**, v.39, p.879-886, 1995.
- BERMUDEZ, A.J.; LEDOUX, D.R.; ROTTHINGHAUS, G.E.; BENNETT, G.A. The individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin and fumonisin B₁ in turkeys. **Avian Diseases**, v.41, n.2, p.304-311, 1997.
- BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisin mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **J. Chem. Soc. Commun.**, p. 743-745, 1988.
- BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v.50, n.12, p.1058-1073, 1987.
- BOYD, P.A.; WITTTLIFF, J.L. Mechanism of *Fusarium* mycotoxin action in mammary gland. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.4, p.1-8, 1978.
- BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CASTELLA, O.; CABAÑES, J. Mycological survey on mixed poultry feeds and mixed rabbit feeds. **J. Sci. Food Agric.**, v.67, p.215-220, 1995.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria MA/ SNAD/ SFA nº 07, de 09/11/88. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 nov. 1988. Seção I, p.21968.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 274, ANVISA, de 15/10/02. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de out. 2002.

BROWN, T.P.; ROTTINGHAUS, G.E.; WILLIAMS, M.E. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: performance and pathology. **Avian Disease**, v.36, p.450-454, 1992.

BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v.47, n.8, p.637-646, 1984.

BUENO, D.J.; SILVA, J.O.; OLIVER, G. Fungal isolation and enumeration in foods. **Methods Mol. Biol.**, v.268, p.127-131, 2004.

CAMARGOS, S.M.; SOARES, L.M.V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLETTO, N. Fumonisin in corn cultivars grown during the 94/95 season in the state of São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá, SP. **Abstract Book**. Guarujá, SP: 2000. p.142.

CASADO, J.M.; THEUMER, M.; MASIH, D.T.; CHULZE, S.; RUBINSTEIN, H.R. Experimental subchronic mycotoxicoses in mice: individual and combined effects of dietary exposure to fumonisin and aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, n.6, p.579-586, 2001.

CHANG, K.; KURTZ, H.J.; MIROCHA, C.J. Effects of the mycotoxin zearalenone on swine production. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.9, p.1260-1267, 1979.

CHEN, J.; MIROCHA, C.J.; XIE, W.; HOGGE, L.; OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. *sp.lycopersici*. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p.3928-3931, 1992.

CHU, F.S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v.47, p. 562-569, 1984.

CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. **Mutation Research**, v.259, p.291-306, 1991.

COUNCIL FOR AGRICULTURALSCIENCES AND TECHNOLOGY TASK FORCE REPORT. **Mycotoxins: economic and health risks**. Ames, IA., 1989. n.16.

COUNCIL FOR AGRICULTURALSCIENCES AND TECHNOLOGY TASK FORCE REPORT. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, IA., 2003. n.139.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K. (Eds) **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.103-144.

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

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

DIAZ, G.J.; BOERMANS, H.J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Vet Human Toxicol.**, v.36, p. 548-555, 1994.

- DIONELLO, R.G.; RADIINZ, L.L.; ELIAS, M.C.; MEIRELLES, M.C.A. Método de secagem e sistema de armazenamento na ocorrência de micotoxinas em milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.25, p. 9-15, 2000.
- DOERR, J.A.; HUFF, W.E.; WABECK, C.J.; CHALOUPKA, G.W.; MAY, J.D.; MERKLEY, J.W. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v.62, p.1971-1977, 1983.
- DOKO, B.; RAPIOR, S.; VISCONTI, A.; SCHJOTH, J. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p.429-434, 1995.
- DUTTON, M.F.; KINSEY, A. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa. **Mycopathologia**, v.131, p.31-36, 1995.
- EMEROLE, G.O.; NESKOVIC, N.; DIXON, R.L. The detoxification of aflatoxin B₁ with glutathione in the rat. **Xenobiotica**, v.9, n.12, p.737-743, 1979.
- EPPLEY, R.M.; STOLOFF, L.; TRUCKSESS, M.W.; CHUNG, C.W. Survey of corn for Fusarium toxins. **J Assoc Off Anal Chem.**,v.57, n.3, p.632-635, 1974.
- ESPADA, Y.; GOPEGUI, R.R.; CUADRADAS, C.; CABAÑES, F.J. Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. **Avian Diseases**, v.38, p.454-460, 1994.
- ESSIGMANN, J.M.; CROY, R.G.; BENNETT, R.A.; WOGAN, G.N. Metabolic activation of aflatoxin B₁: patterns of DNA adduct formation, removal and excretion in relation to carcinogenesis. **Drug Metabolism Reviews**, v.13, n.4, p.581-602, 1982.
- FONSECA, H. Legislação sobre micotoxinas. Piracicaba, 2003. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>>. Acesso em 30 jun. 2006.

FRAGA, M.E.; CURVELLO, F.; GATTI, M.J.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v.31, n.3, p.343-353, 2007.

FRÉMY, J.M.; CHU, F.S. Immunochemical methods of analysis for aflatoxin M₁. In: Van Egmond, H.P., ed. **Mycotoxins in dairy products**. London, Elsevier Applied Science, p. 97-125, 1989.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Filamentous in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARARI, D.K. (Eds.) **Handbook of applied Mycology: "Mycotoxins in Ecological Systems"**. New York; Marcel Dekker, v.5, p.32-57, 1992.

GHOSH, R.C.; CHAUHAN, H.V.S.; ROY, S. Immunosuppression in broilers under experimental aflatoxicosis. **Brazilian Veterinary Journal**, v.146, p.457-462, 1990.

GIAMBRONE, J.J.; DIENER, U.L.; DAVIS, N.D.; PANANGALA, V.S.; HOERR, F.J. Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. **Poultry Science**, v.64, p.852-858, 1985a.

GIAMBRONE, J.J.; DIENER, U.L.; DAVIS, N.D.; PANANGALA, V.S.; HOERR, F. J. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. **Poultry Science**, v.64, p.1678-1684, 1985b.

GMP. Regulations on Product Standards in the Animal Feed Sector, GMP14, 2005.

HENRY, M.H.; WYATT, R.D. A review of fumonisin production by *Fusarium moniliforme* and fumonisin toxicoses in animals. **Applied Poultry Research**, v.2, p.188-192, 1993.

- HENRY, M.H.; WYATT, R.D.; FLETCHER, O.J. The toxicity of purified fumonisin B1 in broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, p.1378-1384, 2000.
- HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v.13, p.173-183, 1996.
- HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran-Glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.39, n.3, p.488-492, 1980.
- HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134, 2001.
- HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N. Bifuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.283, p.525-532, 1991.
- IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtabl>> Acesso em 01 de maio de 2005.
- JAMES, L.J.; SMITH, T.K. Effect of dietary alfafa on zearalenone toxicity and metabolism in rats and swine. **Journal of Animal Science**, v.55, n.1, p.140-148, 1982.
- JAVED, T.; BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L.; DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; COTE, L.M.; BUCK, W.B. Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or purified fumonisin B₁ and moniliformin. **Mycopathologia**, v.123, p.171-184, 1993.

JOHRI, T.S.; RASHMI, A.; SADAGOPAN, V.R. Effect of low dietary levels of aflatoxin on laying quails (*Coturnix coturnix japonica*) and their response to dietary modifications. **Indian Journal Animal Science**, v.60, p.355-359, 1990.

JONES, F.T.; HAGLER, W.H.; HAMILTON, P.B. Association of low levels of aflatoxin in feed with productivity losses in commercial broiler operations. **Poultry Science**, v.61, p.861-868, 1982.

KAN, C.A.; RUMP, R.; KOSUTZKY, J. Low level exposure of broilers and laying hens to aflatoxin B₁ from naturally contaminated corn. **Arch. Gefluegelkd**, v.53, p.204-206, 1989.

KATZZENELLENGOBEN, B.S.; KATZZENELLENGOBEN, J.A.; MODECAI, D. Zearalenones characterization of estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal beta-resorsylic acid lactones. **Endocrinology**, v.105, n.1, p.33-40, 1979.

KING, A.D.; HOCKING, A.D.; PITT, J.J. Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of fungi from foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.37, n.5, p.959-964, 1979.

KLEIN, P.J.; BUCKNER, R.; KELLY, J.; COULOMBE, JR., R.A. Biochemical basis for the extreme sensitivity of turkeys to aflatoxin B₁. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.165, n.1, p.45-52, 2000.

KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. CBS, Utrecht, Netherlands. 118 p., 2002.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycology Papers**, 161: 1-188, 1989.

KPODO, K.; THRANE, U.; HALD, B. *Fusaria* and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, n.2-3, p.147-157, 2000.

KRAUSE, H.P. Untersuchung zum Vorkommen der Mycotoxine Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, und Zearalenon im schweinefutter im Raum Süd-Schleswig-Holstein. Berlin, República Federal da Alemanha, 101p., **Tese de Doutorado**, 1985.

KUBENA, L.F.; HUFF, W.E.; HARVEY, R.B.; YERSIN, A.G.; ELISSALDE, M.H.; WITXEL, D.A.; GIROIR, L.E.; PHILLIPS, T.D.; PETERSON, H.D. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poult during aflatoxicosis. **Poultry Science**, v.70, n.8, p.1823-1830, 1991.

KUBENA, L.F.; EDRINGTON, T.S.; KAMPS-HOLTZAPPLE, C.; HARVEY, R.B.; ELISSALDE, M.H.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of feeding fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin singly and in combination to turkey poults. **Poultry Science**, v.74, n.8, p.1295-1303, 1995.

KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, T.S.; EDRINGTON, T.S.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of moniliformin present in *Fusarium fujikuroi* culture material and aflatoxin in broiler chicks, supplied by *Fusarium moniliforme* culture material, to laying hens. **Poultry Science**, v.76, n.2, p.265-270, 1997.

KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, T.S.; BAILEY, R.H.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of long-term feeding of diets containing moniliformin, supplied by *Fusarium fujikuroi* culture material, and fumonisin, supplied by *Fusarium moniliforme* culture material, to laying hens. **Poultry Science**, v.78, n.12, p.1499-1505, 1999.

- KURTZ, H.J.; NAIRN, M.E.; NELSON, G.H.; CHRISTENSEN, C.M.; MIROCHA, C.J.
Histologic changes in the genital tracts of swine fed estrogenic mycotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, n.4, p.551-556, 1969.
- LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995.
- LI, Y.C.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; FRITSCHKE, K.L.; ROTTINGHAUS, G.E.
Effects of fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1275-1282, 1999.
- LI, Y.C.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; FRITSCHKE, K.L.; ROTTINGHAUS, G.E.
The individual and combined effects of fumonisin B₁ and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poults. **Poultry Science**, v.79, n.6, p.871-878, 2000.
- LILLEHOJ, E.B. Feed sources and conditions conducive to production of aflatoxin, ochratoxin, *Fusarium* toxins and zearalenone. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.163, n.11, p.1281-1285, 1973.
- LONG, G.G.; DIEKMAN, M.A. Effect of purified zearalenone on early gestation in gilts. **Journal of Animal Science**, v.59, n 6, p.1662-1670, 1984.
- LONG, G.G.; DIEKMAN, M.A. Characterization of effects fo zearalenone in swine during early pregnancy. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n 1, p.184-187, 1986.
- MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M.A.
Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathología**, v. 142, p. 27-32, 1998.

MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; PALACIO, G.; ANGELETTI, A.; HALLAK, C.; DALCERO, A.M. The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, p.7-22, 2002.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; ALMEIDA, C.A.A.; DILKIN, P. Fumonisin B1 levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.1, p.41-45, 2001.

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

MÄRTLBAUER, E.; DIETRICH, R.; TERPLAN, G. Erfahrungen bei der Anwendung von Immunoassay zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln. **Arch. Lebens. Hyg.**, 42:3-6,1991.

MCLEAN, M.; DUTTON, M.F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacol. Ther.**, v.65, p.163-192, 1995.

McNUTT, S.H.; PURWIN, P.; MURRAY, C. Vulvovaginites in swine. **J. Am. Med. Vet. Assoc.**, v.73, p.484-492, 1928.

MILLER, J.D. Review: Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v.31, n.1, p.1-16, 1995.

MOSS, M.O. Economic importance of mycotoxins-recent incidence in the United States. **Animal Science**, v.27, p.3941-3949, 1991.

MULLER, R.D.; CARLSON, C.W.; SEMENIUK, G.; HARSHFIELD, G.S. The response of chicks, ducklings, goslings, pheasants and poult to graded levels of aflatoxin. **Poultry Science**, v.49, p.1346-1350, 1970.

MUSSER, S.M.; PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. **Journal of Agriculture. Food Chemistry**, v.45, p.1169-1173, 1997.

MUTHIAH, J.; REDDY, P.R.; CHANDRAN, N.D.J. Effect of graded levels of aflatoxin B₁ and the effect of direct fed microbials (DFM) on egg production in egg type breeders. **Indian Vet. J.**, v.75, p.231-233, 1998.

NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A.; MARASAS, W.F.O. (Eds.). ***Fusarium species. An Illustrated Manual for Identification.*** The Pennsylvania State University Press. University Park, PA/London, 1983.

NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v.117, p.29-36, 1992.

NORRED, W.P. Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal Toxicology Environmental Health**, v.38, p.309-328, 1993.

NTAFI (NATIONAL TRADE OF ANIMAL FEED INDUSTRIES) National Association of Animal Feed Manufacturers. Perfil da Industria Brasileira de Alimentação Animal. São Paulo, p. 8, 2000.

ODRIOZOLA, E.; BALLABENE, N.C.; LÓPEZ, T.A. Evaluación regional de la presencia de la micotoxina zearalenona en distintos alimentos de consumo animal. **Veterinaria Argentina**, v.2, n.15, p.431-435, 1985.

OGUNDERO, V.W. Cultural and nutritional studies of zoopathogenic fungi associated with livestock feeds in Nigeria. **Z. Allg. Mikrobiol.**, v. 21, p. 255-259, 1981.

OGUNDERO, V.W. Toxigenic fungi and deterioration of Nigerian poultry feeds. **Mycopathologia**, v. 100, p. 75-83, 1987.

OLIVEIRA, C.A.F.; ALBUQUERQUE, F.; CORRÊA, B.; KOBASHIGAWA, E.; REIS, T.A.; FAGUNDES, A.C.A.; LIMA, F.R. Produção e qualidade de ovos de poedeiras submetidas à intoxicação prolongada com aflatoxina B₁. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.68, n.2, p.1-4, 2001.

OLIVEIRA, J.A.A.; CORRÊA, B.; CASTRILLÓN, A.L.; CORTEZ, A.C.A. Ocorrência de filamentous fungi and aflatoxins in poultry feedstuffs. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.2, p.138-142, 1998.

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

OLSEN, M.; PETTERSSON, H.; SANDHOLM, K.; HOLMGERG, T.; RUTQVIST, H.; KIESSLING, K.H. The occurrence of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol in maize imported into Sweden. **Swedish Journal of Agricultural Research**, v.16, n.2, p.77-80, 1986.

ONO, E.Y.S.; SUGUIRA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAI, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 147, p. 139-148, 1999.

OPAS. Micotoxinas. Criterios de Salud Ambiental, 11. Washington, 1983. p.131.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POZZI, C.R.; SCHAMMASS, E.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M. Mycoflora and occurrence of fumonisin in freshly harvested and stored hybrid maize. **J. Stored Prod. Res.**, v.36, p.75-87, 2000.

- OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Vet. Med.**, v.85, p.89-94, 1990.
- PESTKA, J.J.; BONDY, G.S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.68, p.1009-1016, 1990.
- PESTKA, J.J.; ABOUZIED, M.N.; SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxin detection. **Food Technology**, v.49, p.120-128, 1995.
- PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal Animal Science**, v.70, p.3964-3967, 1992.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage** (Academic Press, Sidney. 1st edition), 1985.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage** (Black Academic & Professional-Chapman & Hall, London, 593 pp., 2nd edition), 1997.
- PLACINTA, C.M; D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v.78, n.1-2, p.21-37, 1999.
- POMPA, G.; MONTESSISSA, C.; LAURO, F.M. di; FADINI, L. The metabolism of zearalenone in subcellular fractions from rabbit and hen hepatocytes and its estrogenic activity in rabbits. **Toxicology**, v.42, n.1, p.69-75, 1986.
- POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.P.; CHACON-RECHE, N.O.; MEIRELLES, M.C.A. Post harvested and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Additives and Contaminants**, v.12, n.3, p.313-319, 1995.

- QUEZADA, T.; CUÉLLAR, H.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; VALDIVIA, A.G.; REYES, J.L. Effects of aflatoxin B₁ on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 125, n.3, p.265-272, 2000.
- QUINN, G.P.; KEOUGH, M.J. **Experimental Design Data analysis for biologists** Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, p.72-76, 2002.
- RAPER, K.B.; FENNEL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Willians & Wilkins. 686 p., 1965.
- RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPARD, G.S.; VANSCHALKWYF, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn and in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v.82, p.353-357, 1992.
- RIBEIRO, J.M.M.; ROSA, C.A.R.; CURVELLO, F.A., FRAGA, M.E. Toxigenic mycoflora and mycotoxins (aflatoxins and ochratoxin A) in poultry feed in Rio de Janeiro, Brazil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá, SP. **Abstract Book**. Guarujá, SP: 2000. p.133.
- ROSA, C.A.R. **Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimenta cão de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. Tese de Doutorado (Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2002.
- ROSA, C.A.R; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.E.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L.R.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M.; LOPES, C.W.G. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v.13, p.89-96, 2006.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, I.D.; OSWEILER, G.D.; RICE, G.L.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.3225-3226, 1990.

SABINO, M. Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.40, p.153-158, 1980.

SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.46, p.65-71, 1986.

SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H.; GIANNATTASIO, C.M.P. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.48, p.81-85, 1988.

SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O.; GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins in maize in Brazil. Part II. . **Food Additives and Contaminants**, v.6, p.327-331, 1989.

SANTO, C.R.M.; WENTZ, I.; REES, U. Estrogenismo em suínos. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias “Desidério Finamor”**, v.8, 1985.

SANTURIO, J.M.; BALDISSERA, M.A.; ALMEIDA, C.A.A.; AHMAD, S.H.E.; PRANKE, D.H.L.; HENRICHS, C.M.; ZANANDREA, S. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinadas ao consumo animal no sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., 1992, São Paulo, sp. **Anais**. São Paulo, SP: 1992. p.14.

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis:Insular, p.19-22, 1988.

SEIFERT, K.A., AOKI, T., BAAYEN R.P., BRAYFORD, D., BURGESS, L., W., CHULZE, MARASAS, W.F.O., NIRENBERG, H.I., O'DONNELL, K., RHEEDER, J., SAMUELS, G. S., GAMS, W., GESER, D., GRUYTER, J. DE, LESLIE, J.F. ., LOGRIECO, A., J., SUMMERELL, B.A., THRANE, U., WAALWIJK, C. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. **Mycological Research**, v.107, n.6, p. 643-644, 2003.

SHEPARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Liq. Chrom.**, v.13, p.2077-2087, 1990.

SHEPARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. Initial studies on the toxicokinetics of fumonisin B₁ in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.30, p.277-279, 1992.

SHETTY, P.H.; BHAT, R.V. Natural occurrence of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in Indian sorghum, maize and poultry feeds. **J Agric. Food Chem.**, v.45, p.2170-2173, 1997.

SIAME, B.A.; MPUCHANE, S.E.; GASHE, B.A.; ALLOTEY, G.F.; TEFFERA, G. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B₁ and zearalenone in foods and feeds in Botswana. **J. Food Prot.**, v.61, p.1670-1673, 1998.

STUBBLEFIELD, R.D.; VAN EGMOND, H.P. Chromatographic methods of analysis for aflatoxin M₁. In: Van Egmond, H.P., ed. **Mycotoxins in dairy products**. London, Elsevier Applied Science, p. 57-95, 1989.

SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; SHEPARD, G.S.; THIEL, P.G.; HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of

- confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.6, p. 994-997, 1992.
- SILVA, J.B.; POZZI, C.R.; MALLOZZI, M.A.B.; ORTEGA, E.M.; CORREA, B. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in stored brazilian sorghum. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá, SP. **Abstract Book**. Guarujá, SP: p.145, 2000.
- SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, p.816-841, 1991.
- TUNG, H.T.; WYATT, R.D.; THAXTON, P.; HAMILTON, P.B. Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis. **Toxicology, and Applied Pharmacology**, v.34, n.2, p.320-326, 1975.
- TURNER, W.B. **Fungal metabolites**, New York, Academic Press, 446 pp., 1971.
- TRUCKSESS, M.W.; STACK, M.E.; NESHEIM, S.; ALBERT, R.H.; ROMER, T.R. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: collaborative study. **J. AOAC Int.**, v.6, p.1512-1521, 1994.
- VINING, L.C. Functions of secondary metabolites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.44, p.395-427, 1990
- WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.H.; RILEY, R.T.; MERRILL JR., A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins, Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J. Biol. Chem.**, v.266, n.22, p. 14486-14490, 1991.
- WATSON, D.H. **Natural toxicants in food**. Chichester:Ellis Horwood, 1987. p.232-247.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Science**, v.72, p.456-466, 1993.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in the young turkey poult. **Poultry Science**, v.73, n.10, p.1517-1525, 1994.

WOGAN, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.374, p.123-137, 1992.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low- risk areas for human esophageal cancer in China. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, n.5, p.16262-1629, 1994.

ANEXO 1

Tabela A1.1 – Formulação da ração de frangos de corte, para um misturador com capacidade para 500kg.

Produto	Pré-inicial	Inicial	Engorda	Abate
Milho	277,00	299,00	304,00	333,50
Soja	176,00	152,00	137,00	113,00
Farinha de carne	28,00	27,00	27,00	25,00
Gordura	13,00	15,00	25,00	23,00
Calcário	1,00	2,00	2,00	2,00
Sal	2,00	2,00	2,00	2,00
Premix vitamínico*	1,50	1,50	1,50	0,75
Premix mineral**	1,50	1,50	1,50	0,75

* Premix vitamínico fornece (por kg de dieta): vitamina A, 2600 UI; vitamina D3, 845 UI; vitamina E, 3,25 UI; vitamina K3, 0,81mg; tiamina, 0,325mg; riboflavina, 1,625mg; piridoxina, 0,487mg; vitamina B 12, 3,9µg; ácido nicotínico, 125mg; pantotenato de cálcio, 2,6mg; antioxidante, 41,6mg.

** Premix mineral fornece (por kg de dieta): Ferro, 65mg; Cobre, 13mg; Zinco, 65mg; Manganês, 104 mg; Iodo, 1,3mg; Cobalto, 1,3mg; Selênio, 0,220mg.

ANEXO 2

Cada cepa de *Aspergillus* foi inoculada em três pontos equidistantes em duas placas contendo o meio CYA (incubadas uma a 25°C e outra a 37°C), em uma placa de CY20S e em outra contendo o meio MEA, ambas incubadas a 25°C, conforme Figura A2.1. Todas as placas foram incubadas por um período de sete dias.

Após o período de incubação, observam-se as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento solúvel, produção e cor de exsudato) e determinam-se as características de suas estruturas micromorfológicas, visando à identificação das espécies.

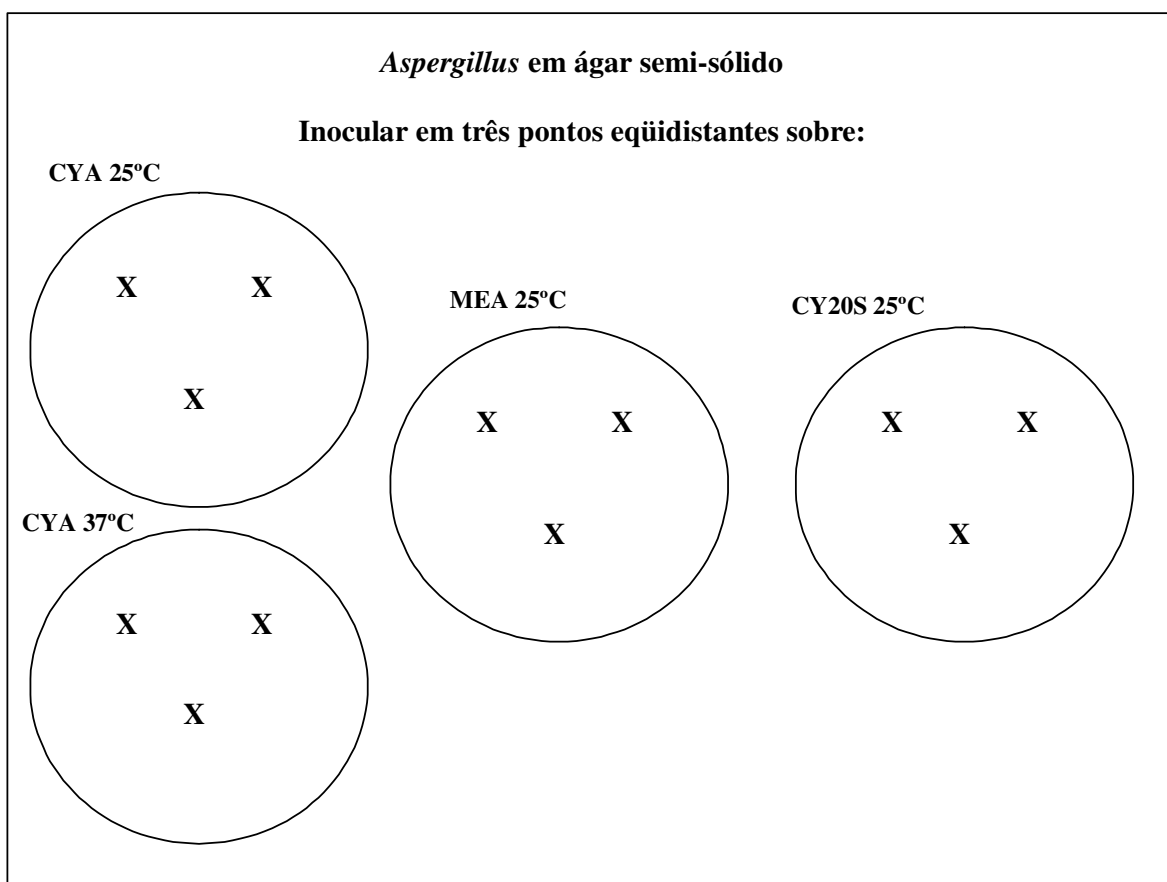


Figura A2.1 - Esquema de inoculação da cepa de *Aspergillus*, a ser identificada nos meios CYA, CY20S e MEA, após 7 dias de incubação às temperaturas mencionadas, segundo PITT & HOCKING, 1997 e KLICH, 2002.

ANEXO 3

PITT & HOCKING (1997) descrevem as chaves para a identificação do gênero *Penicillium*, baseadas no cultivo em três meios de cultura básicos: Agar Extrato de Malte (MEA), Agar Czapeck Extrato de Agar (CYA) e Agar Nitrato 25% Glicerol (G25N). As quatro placas contendo o meio CYA, são incubadas por sete dias em três temperaturas diferentes (5°C, 25°C e 37°C); das duas placas incubadas a 25°C, uma é inoculada em três pontos diferentes e equidistantes, com a cepa 1 e a outra com a cepa 2. Nas placas incubadas a 5°C e 37°C, são inoculadas as duas cepas, cada uma delas em dois pontos diferentes. As duas placas contendo o meio MEA são inoculadas, separadamente, em três pontos equidistantes entre si, com cada uma das duas cepas sendo incubadas à temperatura de 25°C por sete dias. Uma única placa do meio G25N é inoculada em dois pontos diferentes e equidistantes com as duas cepas, com incubação a 25°C por sete dias, conforme Figura A3.1.

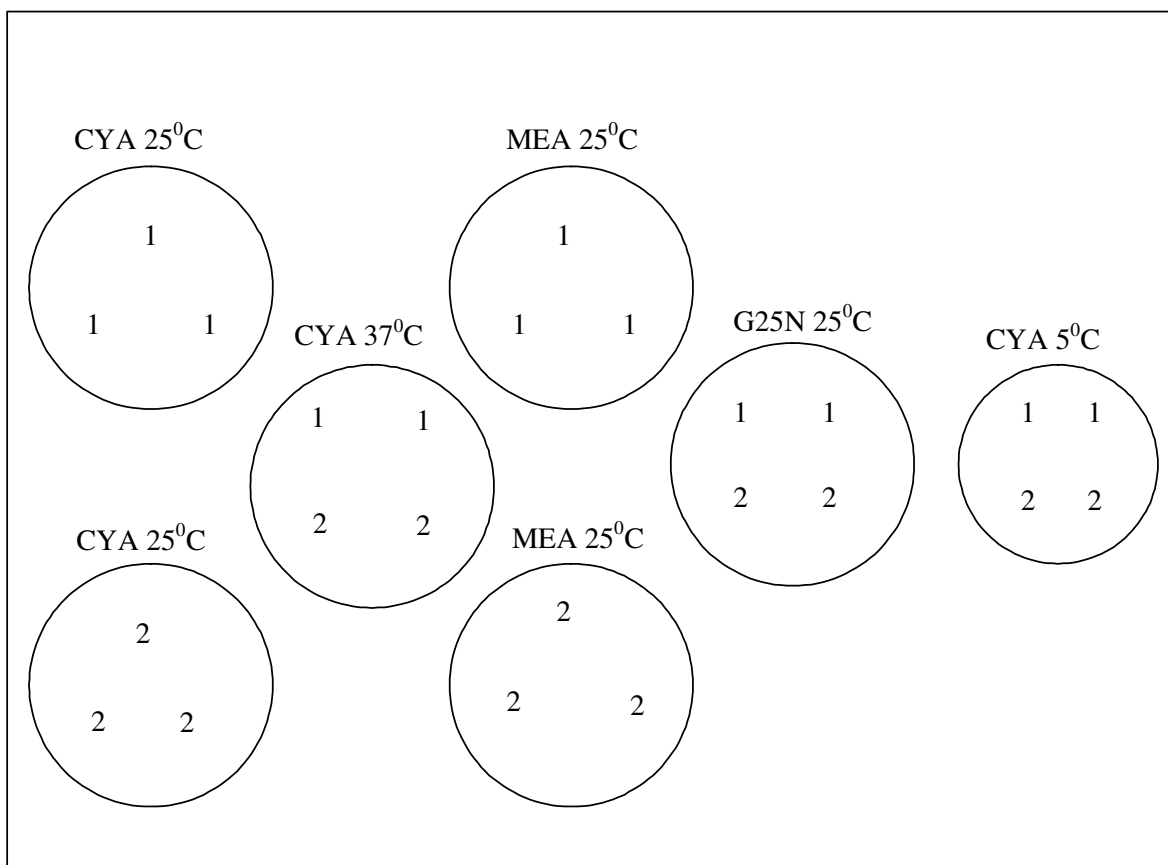


Figura A3.1 - Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero *Penicillium* a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37° C).

Após o período de sete dias de incubação, observam-se as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídeos e pigmento solúvel, produção e cor do exsudato) e determinam-se as características micromorfológicas, visando à identificação das espécies.

FIGURA A4.1 – Esquema de identificação de *Fusarium* segundo NELSON,1983

ANEXO 5

Composição dos meios de cultura utilizados no isolamento e identificação de fungos toxígenos e determinação da produção de micotoxinas.

1 - Ágar Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC)

Glicose	10 g
Peptona Bacteriológica	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
Ágar	15 g
Rose Bengal ^a	25 mg
Dichloran ^b	2 mg
Cloranfenicol	100 mg
Água Destilada	1 L

^a 5 % m/v em água, 0,5 mL

^b 0,2 % m/v em etanol, 1 mL

Obs: Após a adição e mistura de todos os ingredientes, esterilize por autoclavação a 121 ° C por 15 minutos. O pH final deverá estar entre 5,5 e 5,8. Armazene o meio preparado protegido da luz, pois os fotoprodutos de Rose Bengal são altamente inibidores de fungos, especialmente leveduras (PITT & HOCKING, 1997).

2 - Ágar Dichloran Glicerol 18 %

Glicose	10 g
Peptona Bacteriologica	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
Glicerol	220 g
Dichloran ^a	2 mg
Cloranfenicol	100 mg
Água Destilada	1 L

^a 0,2 % m/v em etanol, 1 mL

Obs: Para preparação deste meio, adicione os ingredientes de menor proporção e o ágar em um volume de água destilada de 800 mL. Aqueça para dissolver o ágar e então recomponha o volume a 1000 mL com água destilada. Adicione o Glicerol, observando uma concentração final de 18 % de m/m. Esterilize por autoclavação a 121 °C por 15 min. O pH final deverá estar entre 5,5 e 5,8 (PITT & HOCKING, 1997).

3 - Ágar Extrato de Malte (MEA)

Extrato de Malte	20 g
Glicose	1 g
Peptona Bacteriológica	20 g
Ágar	20 g
Água Destilada	1 L

4 - Ágar Nitrato 25% Glicerol (G25N)

KH ₂ PO ₄	0,75 g
Czapek Concentrado ^a	7,5 mL
Extrato de Levedura	3,7 g

Glicerol grau analítico	250 g
Ágar	12 g
Água destilada	750 mL

Obs: Após a adição e mistura de todos os ingredientes, esterilize por autoclavação a 121 °C por 15 minutos. O pH final deverá ser 7,0.

5 – Ágar Czapek 20 Sacarose (CY20S)

KH ₂ PO ₄	1 g
Czapek Concentrado ^a	10 mL
Solução de traço de metais	1 mL
Sacarose	200 g
Ágar	15 g
Água destilada	1 L

6 - Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA)

	1 g
Czapek Concentrado ^a	10 mL
Solução de traço de Metais ^b	1 mL
Extrato de Levedura em pó	5 g
Sacarose	30 g
Ágar	15 g
Água destilada	1 L

Obs: O pH final deverá estar entre 6,7 (PITT & HOCKING, 1997).

7 – Dichloran Chloramfenicol Peptone Agar (DCPA)

Peptona	15g
KH ₂ PO ₄	15g

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5g
Chloramfenicol	0,1g
Dichloran ^a	2mg
Ágar	15g
Água destilada	1L

^a 0,2 % m/v em etanol, 1 mL

^a – Czapek Concentrado

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
Água destilada	1 L

Obs: A Solução Concentrada de Czapek poderá ser conservada indefinidamente sem esterilização. O precipitado de Fe(OH)³ que é formado em função do tempo pode ser ressuspensionado por agitação antes do uso (PITT & HOCKING, 1997).

^b Solução de traço de Metais

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ ·5H ₂ O	1 g
Água destilada	100 mL

Obs: Poderá ser mantida indefinidamente sem esterilização (PITT & HOCKING, 1997).

ANEXO 6

Tabela A6.1 - Tabela de isolados de referência depositados na Coleção Micológica do Departamento de Biologia - CMDB-IOC/FIOCRUZ.

Nº de ordem	Espécie	Isolado	Nº UFRRJ	Nº CMDB
01	<i>Aspergillus flavus</i>	Gle 001	UFRRJ 034	CMDB 0473
02	<i>Aspergillus flavus</i>	Gle 021	UFRRJ 035	CMDB 0474
03	<i>Aspergillus flavus</i>	Gle 013	UFRRJ 036	CMDB 0475
04	<i>Aspergillus niger</i>	Gle 005	UFRRJ 037	CMDB 0476
05	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Gle 007	UFRRJ 038	CMDB 0477
06	<i>Penicillium citrinum</i>	Gle 010	UFRRJ 039	CMDB 0478
07	<i>Penicillium citrinum</i>	Gle 018	UFRRJ 040	CMDB 0479
08	<i>Penicillium funiculosum</i>	Gle 019	UFRRJ 041	CMDB 0480
09	<i>Fusarium verticillioides</i>	Gle 039	UFRRJ 042	CMDB 0481
10	<i>Fusarium verticillioides</i>	Gle 043	UFRRJ 043	CMDB 0482
11	<i>Fusarium graminearum</i>	Gle 054	UFRRJ 044	CMDB 0483
12	<i>Fusarium subglutinans</i>	Gle 015	UFRRJ 045	CMDB 0484