RONY OGIDO

**Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B₁ e
fumonisina B₁ em codornas: avaliação de parâmetros de
desempenho e de qualidade dos ovos**

PIRASSUNUNGA

2003

RONY OGIDO

**Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B₁ e fumonisina B₁
em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e de
qualidade dos ovos**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre, junto à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição Animal

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

PIRASSUNUNGA

2003

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1225 Ogido, Rony
FMVZ Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B1 e fumonisina B1 em codomas: avaliação de parâmetros de desempenho e de qualidade dos ovos / Rony Ogido. -- Pirassununga : R. Ogido, 2003.
109 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2003.
Área de concentração: Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.

1. Aflatoxina. 2. Micotoxinas. 3. Codomas. 4. Ovos.
I. Título.

PARECER

Interessado: Rony Ogido

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento já
concluído, utilizando-se 288 codornas.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em reunião de 11/12/2002, após analisar o projeto sob o número 233/2002, intitulado: "Efeitos da exposição prolongada de codornas à aflatoxina B1 e à fumonisina B1: avaliação de parâmetros de desempenho e de qualidade dos ovos", sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, constatou que o mesmo foi realizado empregando protocolo de experimentação compatível com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

Profª Drª Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Ogido, Rony

Título: Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B₁ e fumonisina B₁ em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e de qualidade dos ovos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Nutrição Animal.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, da FZEA/USP, pela confiança em mim depositada durante todo o curso, pelo exemplar modelo de integridade e determinação como professor e pesquisador, a quem seguirei admirando sempre.

Ao Prof. Dr. Benedito Corrêa, do ICB/USP, pela vital ajuda na produção da aflatoxina B₁, pelas análises laboratoriais das toxinas e por toda sua generosidade e amizade durante a realização do projeto.

Ao Prof. Dr. David R. Ledoux, da University of Missouri-Columbia (USA), pelo fornecimento da fumonisina B₁, pelas análises das amostras de ração e pela análise estatística dos dados coletados no experimento.

À pesquisadora Edlayne Gonçalez, do Instituto Biológico de São Paulo, por toda a colaboração e pela ajuda na produção da aflatoxina B₁.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, da FMVZ/USP, pelo auxílio no preparo das condições experimentais no Aviário da PCAPS/USP.

Ao Prof. Dr. Douglas Emygdio de Farias, da FZEA/USP, pelo empréstimo dos equipamentos utilizados nas análises de qualidade dos ovos.

Às estagiárias Daniela de Lara Pedroso e Marina Célia Marques, alunas de graduação da FZEA/USP, por toda a colaboração e dedicação no desenvolvimento prático do projeto. Sua amizade é inestimável para mim.

Ao funcionário do Aviário Experimental, Evanildo Moreira da Silva – “Edinho” – pela sua colaboração no andamento do experimento, pela sua extrema boa vontade e força de trabalho exemplares.

À Tatiana Alves dos Reis e toda a equipe do departamento de Micologia do ICB/USP, por me receberem tão bem em sua equipe de trabalho, pelo companheirismo e pelas amizades que levarei comigo, sempre.

À amiga e pós-graduanda Paula Butkeraitis, aluna de mestrado da FMVZ/USP, e ao pós graduando Ricardo Hotta, aluno de mestrado da FZEA/USP, pela colaboração no desenvolvimento prático do projeto.

À técnica Roice Eliana Rosim, da FZEA/USP, pela colaboração no desenvolvimento do experimento, pelo posterior cuidado às aves, ao final do experimento, e pela grande e inestimável amizade.

À bibliotecária Maria Cláudia Pestana, pela colaboração na correção das referências bibliográficas.

À Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

OGIDO, R. **Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B₁ e fumonisina B₁ em codornas:** avaliação de parâmetros de desempenho e de qualidade dos ovos. [Effects of prolonged intoxication of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in laying Japanese quail: evaluation of productivity and egg quality]. 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

O projeto avaliou os efeitos da aflatoxina B₁ (AFB₁) e fumonisina B₁ (FB₁), isoladas e associadas, sobre a produtividade e a qualidade dos ovos de codornas poedeiras (*Coturnix coturnix japonica*). Duzentas e oitenta e oito aves, adquiridas com idade de 8 semanas, foram subdivididas em 6 grupos experimentais (48 aves por grupo) e submetidas a 6 tipos de tratamentos, constituídos por rações contendo AFB₁ e FB₁ nas concentrações: (0 AFB₁+0 FB₁), (0 AFB₁+10 mg/kg FB₁), (50 µg/kg AFB₁+0 FB₁), (50 µg/kg AFB₁+10 mg/kg FB₁), (200 µg/kg AFB₁+0 FB₁), e (200 µg/kg AFB₁+10 mg/kg FB₁). As aves foram alimentadas durante 140 dias (5 ciclos de 28 dias). Os parâmetros de produtividade foram avaliados semanalmente, através do consumo de ração, peso dos ovos, índice de conversão alimentar e curva de produção. A qualidade dos ovos foi avaliada a cada ciclo de 28 dias, cada ovo produzido nesse dia foi analisado individualmente para a determinação do valor de unidade Haugh, gravidade específica e percentual do peso da casca. Ao final do 5º período experimental, o peso médio dos ovos foi significativamente menor ($p < 0,05$) nas aves alimentadas com 10 mg FB₁/kg, 50 µg/kg AFB₁, 200 µg/kg AFB₁ e com o tratamento de associação de 10 mg FB₁/kg + 50 µg/kg AFB₁. Em relação à produção de ovos, as codornas alimentadas com 10 mg FB₁/kg apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$), ao final do 3º, 4º e 5º ciclos. O consumo médio diário de ração foi significativamente menor ($p < 0,05$) nas aves alimentadas com 10 mg FB₁/kg, ao

final do 4° e 5° ciclos, enquanto que os níveis de 50 ou 200 µg/kg AFB₁ provocaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$), ao final do 5° período experimental. Ao final do 1°, 2° e 5° ciclos, o consumo médio de ração foi significativamente menor ($p < 0,05$) nas aves tratadas com 10 mg FB₁/kg + 50 µg/kg AFB₁. Os índices de conversão alimentar e os valores de Unidades Haugh não foram afetados ($p > 0,05$) pelos tratamentos. A gravidade específica dos ovos foi significativamente menor ($p < 0,05$) ao final do 5° ciclo, nas aves tratadas com 10 mg FB₁/kg + 200 µg/kg AFB₁. Observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na porcentagem do peso de casca, nas aves tratadas com 10 mg FB₁/kg ao final do 1° ciclo, entretanto, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos tratamentos com 200 µg/kg AFB₁ e também com 10 mg/kg FB₁ + 50 µg/kg AFB₁ ao final do 1° ciclo. Já ao final do 5° ciclo, o aumento na porcentagem de peso de casca ($p < 0,05$) ocorreu somente nas aves tratadas com 10 mg/kg FB₁ + 200 µg/kg AFB₁. Os resultados demonstraram que a administração prolongada de FB₁ e AFB₁, isoladas ou associadas nos níveis utilizados no presente experimento, pode causar prejuízos econômicos aos produtores de ovos de codornas.

Palavras-chave: Aflatoxina B₁. Fumonisina B₁. Micotoxinas. Codornas. Ovos.

ABSTRACT

OGIDO, R. **Effects of prolonged intoxication of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in laying Japanese quail:** evaluation of productivity and egg quality. [Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B₁ e fumonisina B₁ em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e de qualidade dos ovos]. 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

This study evaluated the individual and combined effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) and fumonisin B₁ (FB₁) on egg quality and performance of laying Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Two hundred twenty-eight birds were purchased at 8 week of age and randomly distributed into 6 experimental groups and given rations containing AFB₁ and FB₁ at the following levels: (0 AFB₁+0 FB₁), (0 AFB₁+10 mg/kg FB₁), (50 µg/kg AFB₁+0 FB₁), (50 µg/kg AFB₁+10 mg/kg FB₁), (200 µg/kg AFB₁+0 FB₁), e (200 µg/kg AFB₁+10 mg/kg FB₁). The birds were fed for 140 days (5 28-day laying periods). Each treatment consisted of four replicates of twelve quail. Egg production and individual egg weight were checked daily. Feed consumption and feed utilization were determined weekly. Eggs laid in the last day of each 28-day laying period were collected and submitted to individual analysis for specific gravity, Haugh units and percent egg shell. Results showed that average egg weight at the end of the fifth cycle was significantly lower ($p < 0,05$) for groups fed 10 mg FB₁/kg, 50 µg/kg AFB₁, 200 µg/kg AFB₁ and also for the group fed 10 mg FB₁/kg + 50 µg/kg AFB₁. Average egg production significantly decreased ($p < 0,05$) for groups fed 10 mg FB₁/kg by the end of the third, fourth and fifth cycles. Feed consumption was significantly lower ($p < 0,05$) for group exposed to 10 mg FB₁/kg, by the end of fourth and fifth cycles, whereas birds fed 50 or 200 µg/kg AFB₁ showed a significant decrease ($p < 0,05$) on feed consumption, by the end of fifth cycle. Birds exposed to

10 mg FB₁/kg + 50 µg/kg AFB₁ also showed lower values ($p < 0,05$) of feed consumption, by the end of first, second and fifth cycles. Feed utilization and Haugh units were not affected ($p > 0,05$) by AFB₁ and FB₁. Average egg specific gravity was significantly lower ($p < 0,05$) for group fed 10 mg FB₁/kg + 200 µg/kg AFB₁, by the end of fifth cycle. Percent egg shell was significantly lower ($p < 0,05$) for group exposed to 10 mg FB₁/kg, by the end of the first cycle, however, birds exposed to 200 µg/kg AFB₁ and also to 10 mg/kg FB₁ + 50 µg/kg AFB₁, showed a significantly increase ($p < 0,05$) of percent egg shell, by the of the first cycle. Percent egg shell was significantly higher ($p < 0,05$) for group fed 10 mg/kg FB₁ + 200 µg/kg AFB₁, by the end of fifth cycle. The results obtained in the present study showed that the prolonged administration of FB₁ and AFB₁, singly or combined at the levels checked, may cause economic losses to the quail egg producers.

Keywords: Aflatoxin B₁. Fumonisin B₁. Mycotoxin. Quail. Eggs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química das principais aflatoxinas	24
Figura 2 -	Produtos do metabolismo da AFB ₁	30
Figura 3 -	Estrutura química das principais fumonisinas	39
Figura 4 -	Estrutura molecular das fumonisinas B ₁ e B ₂ , efinganina e esfingosina	42
Figura 5 -	Mecanismo proposto de ação tóxica das fumonisinas	43
Figura 6 -	Vista geral das baterias com gaiolas dispostas em 4 andares	56
Figura 7 -	Gaiola provida de comedouro linear de chapa galvanizada	56
Figura 8 -	Gaiola provida de bebedouro automático “nipple”	57
Figura 9 -	Misturador horizontal/helicoidal, no momento do preparo das rações	65
Figura 10 -	Aplicação das soluções das amostras de ração, em placas de sílica gel, para quantificação de aflatoxinas	66
Figura 11 -	Representação esquemática das baterias (vista lateral), mostrando a disposição das gaiolas de acordo com os tratamentos	70
Figura 12 -	Aparelho Ames ®, S – 6428, utilizado para medir a altura de albúmen	72
Figura 13 -	Detalhe do Aparelho Ames®, utilizado para medir a altura de albúmen	72
Figura 14 -	Método de flutuação em solução salina, para determinação da densidade dos ovos	73

Figura 15 - Evolução dos valores de consumo médio de ração (g/ave/dia) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos	78
Figura 16 - Evolução dos valores de conversão alimentar (g/g) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos	80
Figura 17 - Evolução dos valores de produção de ovos (%) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos	82
Figura 18 - Evolução dos valores de peso médio dos ovos (g) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos	85
Figura 19 - Evolução dos valores de gravidade específica dos ovos (m/v) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos	87
Figura 20 - Evolução dos valores de percentual de casca (%) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos	89
Figura 21 - Evolução dos valores de Unidades Haugh nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos	91
Figura 22 - Evolução dos valores dos pesos das aves (g) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características físico-químicas das principais aflatoxinas. Washington, 1983	25
Tabela 2 -	Valores de DL ₅₀ após inoculação de dose única de AFB ₁ em diferentes espécies animais. Londres, 1984	32
Tabela 3 -	Características do ovo de codornas. São Paulo, 1999.....	53
Tabela 4 -	Níveis de garantia da ração matriz utilizada na preparação de todas as dietas experimentais, de acordo com a empresa fabricante. Pirassununga, 2002.....	58
Tabela 5 -	Níveis de AFB ₁ e FB ₁ encontrados na análise das rações utilizadas no experimento, de acordo com suas datas de preparo. Pirassununga, 2002	63
Tabela 6 -	Grupos experimentais e respectivos teores de AFB ₁ e FB ₁ nas rações. Pirassununga, 2002.....	69
Tabela 7 -	Consumo médio de ração (g/ave/dia) de acordo com os diferentes tratamentos. Pirassununga, 2002.....	76
Tabela 8 -	Conversão alimentar (g/g) de acordo com os diferentes tratamentos. Pirassununga, 2002	79
Tabela 9 -	Produção de ovos (%) de acordo com os diferentes tratamentos. Pirassununga, 2002	81
Tabela 10 -	Peso médio dos ovos (g) de acordo com os diferentes tratamentos. Pirassununga, 2002	84
Tabela 11 -	Gravidade específica dos ovos (m/v) de acordo com os diferentes tratamentos. Pirassununga, 2002.....	86

Tabela 12 - Percentual de casca dos ovos (%) de acordo com os diferentes tratamentos. Pirassununga, 2002.....	88
Tabela 13 - Unidades Haugh de acordo com os diferentes tratamentos. Pirassununga, 2002	90
Tabela 14 - Peso das aves (g) de acordo com os diferentes tratamentos. Pirassununga, 2002	92

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g/kg}$	Microgramas por kilograma
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFB _{2a}	Aflatoxina B _{2a}
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AFP ₁	Aflatoxina P ₁
AFQ ₁	Aflatoxina Q ₁
C ¹⁴	Carbono-14
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DL ₅₀	Dose letal média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FB ₁	Fuminisina B ₁
FB ₂	Fumonisina B ₂
FB ₃	Fumonisina B ₃
FDA	Food and Drug Administration
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
g	Grama
IARC	International Agency of Research on Cancer
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
m	Metro
mg/kg	Miligramma por kilograma
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
OPAS	Organización Panamericana de la Salud

p.c.	Peso corpóreo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
TDRI	Tropical Development and Research Institute
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
+	Mais
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
1.2	AFLATOXINAS.....	22
1.2.1	Características Físicas e Químicas das Aflatoxinas	23
1.2.2	Ocorrência Natural das Aflatoxinas	26
1.2.3	Biotransformação da Aflatoxina B₁.....	28
1.2.4	Toxidez das Aflatoxinas em Aves de Produção.....	31
1.3	FUMONISINAS	37
1.3.1	Características Físicas e Químicas das Fumonisinas.....	38
1.3.2	Ocorrência Natural das Fumonisinas	40
1.3.3	Mecanismo de Ação da Fumonisina B₁	42
1.3.4	Toxidez das Fumonisinas	46
1.4	ESTUDOS DE INTERAÇÃO ENTRE MICOTOXINAS.....	49
1.5	CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO DE OVOS DE CODORNAS NO BRASIL	52
2	OBJETIVOS	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1	ANIMAIS E INSTALAÇÕES.....	55
3.2	DIETA BÁSICA	58
3.3	REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	59
3.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE AFB ₁	60
3.5	PREPARO DO MATERIAL DE FB ₁	61
3.6	PREPARO E ANÁLISE DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS	63

3.6.1	Marcha Analítica para Determinação de AFB₁ na Ração	65
3.6.2	Marcha Analítica para Determinação de FB₁ na Ração	67
3.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	69
3.7.1	Índices de Produtividade Avaliados	70
3.7.2	Qualidade dos Ovos	71
3.7.3	Outras Variáveis Estudadas	73
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	74
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1	ÍNDICES DE PRODUTIVIDADE	75
4.2	QUALIDADE DOS OVOS	85
4.3	PESO DAS AVES	91
4.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
5	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

Nesse primeiro capítulo revisaremos as principais características das micotoxinas utilizadas no estudo descrito a seguir.

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As micotoxinas são produzidas principalmente pela estrutura micelial dos fungos filamentosos (HUSSEIN; BRASEL, 2001), sendo classificadas como metabólitos secundários que não possuem um significado bioquímico específico no crescimento e no desenvolvimento dos fungos (MOSS, 1998). As micotoxinas se desenvolvem em cereais e seus derivados amplamente utilizados na alimentação animal (CHU, 1991).

Atualmente, sabe-se que as micotoxinas estão presentes na alimentação humana e animal desde o surgimento da produção agrícola intensiva. O ergotismo é citado no Velho Testamento da Bíblia e, analisando-se os registros de alguns episódios de doenças e mortes ao longo da História, desde os tempos medievais na Europa, até a época da colonização inglesa na América do Norte, pode-se verificar que alguns foram causados pela presença de micotoxinas nos alimentos (MILLER, 1995).

A contaminação dos produtos vegetais ocorre através do contato com os esporos 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, o armazenamento inadequado, em locais úmidos e sem ventilação, são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxigênicos (CHU, 1991).

Os fungos toxigênicos são conhecidos por produzirem um ou mais desses metabólitos secundários. Entretanto, sabe-se que nem todos os fungos são toxigênicos e nem todos os metabólitos secundários dos fungos são tóxicos. Entre as micotoxinas de grande interesse para a Saúde Pública e de importância agroeconômica estão as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e os alcalóides do ergot. É importante ressaltar que uma única espécie de fungo é capaz de produzir uma ou várias micotoxinas, e uma mesma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de fungos (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

As micotoxinas são responsáveis por grandes perdas econômicas que ocorrem mundialmente, devido aos problemas que causam à saúde humana e animal, além da perda da produção agrícola (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Em 1993, a World Health Organization – International Agency for Research on Cancer (WHO-IARC, 1993) classificou as aflatoxinas de ocorrência natural como substâncias carcinogênicas para os humanos (grupo 1) enquanto que as fumonisinas foram classificadas como substâncias possivelmente carcinogênicas (grupo 2B).

Micotoxicose é o termo utilizado para definir qualquer enfermidade causada aos homens e animais pela exposição às micotoxinas. Os quadros tóxicos variam de acordo com a micotoxina, seu efeito dose-dependente, espécie animal e até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie. A micototoxicose é caracterizada por estar relacionada à alimentação, não é contagiosa, não é infecciosa e é sempre causada pelas toxinas produzidas por fungos (HUSSEIN; BRASEL, 2001). As micotoxinas

estão associadas principalmente a síndromes crônicas, como a imunossupressão e carcinogenicidade (MOSS, 1998).

As micotoxinas ganharam importância como contaminantes tóxicos da alimentação humana e animal desde o acontecimento ocorrido na Inglaterra, no início da década de 60, quando mais de 100 mil perus morreram após ingerirem torta de amendoim de origem brasileira. Este surto recebeu o nome de Doença “X” dos Perus e mais tarde foi descoberto que a causa dessa misteriosa doença, ocorreu devido à presença de aflatoxinas em um de seus ingredientes (ASPLIN; CARNAGHAN, 1961).

Os fungos e as micotoxinas possuem uma ampla distribuição mundial e diferentes espécies de fungos, 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 co-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; WEIBKING et al., 1994).

1.2 AFLATOXINAS

A presença das aflatoxinas nos alimentos e rações tem sido objeto de grande preocupação no mundo científico, desde a sua descoberta. As aflatoxinas são conhecidas por serem substâncias tóxicas, mutagênicas, teratogênicas, carcinogênicas e são apontadas como agentes causadores de câncer hepático, e

outros tipos de câncer, em humanos, além das perdas econômicas que causam na agricultura (RUSTOM, 1997).

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus spp*, espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nigrum* (MOSS, 1998). A incidência das aflatoxinas é relativamente maior em países de clima tropical ou subtropical, onde a temperatura e a umidade são favoráveis para o crescimento dos fungos. Segundo Smith e Moss (1985 apud HUSSEIN; BRASEL, 2001, p. 121)¹, o *A. flavus* tem um crescimento ótimo nas temperaturas entre 25 – 35 °C, com atividade de água no substrato no valor de 0,90. Gqaleni et al. (1997) verificaram que a produção das aflatoxinas pelo *A. flavus* é otimizado na temperatura de 30°C e atividade de água de 0,996.

1.2.1 Características Físicas e Químicas das Aflatoxinas

Há mais de 20 tipos de moléculas de aflatoxinas e seus derivados isolados, porém, os principais tipos estudados continuam sendo a B₁, B₂, G₁ e G₂ (HUSSEIN; BRASEL, 2001). 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 anel ciclopentona na molécula, enquanto que as da série G apresentam anel lactona.

As aflatoxinas, assim como outros compostos heterocíclicos, são substâncias fluorescentes com características próprias. Tanto a aflatoxina B₁ (AFB₁) como a

¹ SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins**: formation, analysis, and significance. Chichester: Wiley, 1985.

aflatoxina B₂ (AFB₂) apresentam uma fluorescência azul, enquanto que a aflatoxina G₁ (AFG₁) e a aflatoxina G₂ (AFG₂) apresentam uma fluorescência verde-amarelada sob luz ultra-violeta (SARGEANT, 1963; apud HUSSEIN; BRASEL, 2001, p. 104)².

Figura 1 – Estrutura química das principais aflatoxinas.

Apesar das semelhanças estruturais, as aflatoxinas apresentam diferentes graus de atividade biológica. A AFB₁, além de ser a mais freqüentemente encontrada em cereais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de G₁, B₂ e G₂ (COULOMBE, 1991). A aflatoxina B₁ é a mais tóxica, tanto nos casos de aflatoxicose

² SARGEANT, K. C. R. B. A. A .R. Chemistry and origin of aflatoxins. **Chemical Industry**, London, p. 53-55, 1963.

aguda como na crônica, enquanto que a aflatoxina M₁ (AFM₁), um produto de destoxificação presente no leite e que é resultante do metabolismo da AFB₁, é uma substância hepatotóxica tão potente quanto à AFB₁ (CARNAGHAN et al., 1963). Terao e Ueno (1978) demonstraram que a magnitude da toxidez da AFG₂, AFB₂ e AFG₁ correspondem a 10, 20 e 50% da AFB₁, respectivamente.

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). A tabela 1 apresenta as principais características físico-químicas das aflatoxinas de maior importância em saúde humana e animal.

Tabela 1 – Características físico-químicas das principais aflatoxinas – Washington – 1983

Aflatoxina	Fórmula química	Massa molecular	Temperatura de fusão (°C)	Emissão de fluorescência nanômetros (nm) e cor*
AFB₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	425 – azul
AFB₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425 – azul
AFG₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	450 – verde
AFG₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	450 – verde
AFM₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	425 – violeta azulada
AFM₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	425 – Violeta
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234	425

*Sob luz ultravioleta.
Fonte: OPAS (1983).

A decomposição das aflatoxinas ocorre na faixa de temperatura entre 237 –

306°C, variando de acordo com a atividade de água, pH do substrato e tempo de exposição ao calor. Por outro lado, os raios ultra-violeta da luz do sol são muito eficazes na desativação das moléculas de aflatoxinas. Não há um método totalmente eficaz para a inativação das aflatoxinas, sendo que a eficiência de cada processo depende do tipo de alimento a ser descontaminado, sua atividade de água, os tipos de aflatoxinas nele presentes, o nível de contaminação e o grau de associação em que as aflatoxinas estão ligadas aos constituintes do alimento, principalmente às proteínas (RUSTOM, 1997).

1.2.2 Ocorrência Natural das Aflatoxinas

O crescimento do *A. flavus* e a produção de aflatoxinas em seus substratos naturais são influenciados por diversos fatores, como os componentes minerais e a atividade de água do substrato, umidade ambiental, temperatura e os danos físicos presentes no substrato (VIQUEZ, 1994).

Apesar das maiores concentrações de aflatoxinas serem encontradas em grãos que estão mal armazenados em ambientes quentes e úmidos, também é possível detectar concentrações significantes de aflatoxinas no campo, antes da colheita. O milho e o amendoim continuam sendo as maiores fontes de aflatoxinas principalmente na Índia e América do Sul, porém outros cereais produzidos em clima tropical, bem como seus subprodutos também são susceptíveis à contaminação por aflatoxinas (MOSS, 1998).

Uma característica importante das aflatoxinas é a sua capacidade de se concentrar, isto é, seus níveis vão se acumulando ao longo da cadeia produtiva,

uma vez que são moléculas altamente estáveis em diferentes meios bióticos e abióticos (QUEZADA et al., 2000).

No levantamento realizado por Rodriguez-Amaya (2001), a contaminação do amendoim brasileiro e seus subprodutos, chega a níveis alarmantes. Foram analisadas amostras de amendoim das Regiões Sul e Sudeste, sendo que 27% e 49% das amostras analisadas estavam contaminadas com mais de 30 microgramas por kilograma ($\mu\text{g/kg}$) de aflatoxinas totais, respectivamente.

A ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência, 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 241,2 $\mu\text{g/kg}$ 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 frequente gênero isolado (71,7%), sendo que o *A. flavus* foi a espécie mais isolada dentro desse gênero (53,3%). Cerca de 44% das cepas de *A. flavus* produziram a AFB₁ e a AFB₂, com os níveis variando entre 40,4 a 10.827 $\mu\text{g/kg}$ e de 79,4 a 2.835 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente.

No período de 1998 a 2000, Caldas et al. (2002) analisaram amostras de amendoim e derivados, castanha-do-Pará, milho de pipoca e milho em grão do Distrito Federal. Cerca de 26,4% das amostras analisadas foram positivas para a presença de aflatoxinas, sendo que o milho em grão foi o produto com maior incidência de contaminação, correspondendo a 60% das amostras analisadas, com níveis maiores que 30 $\mu\text{g/kg}$.

Recentemente, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2002) estabeleceu como

limite máximo, 20 µg/kg de aflatoxinas totais (AFB₁ + AFG₁ + AFB₂ + AFG₂) em amendoim (incluindo produtos derivados) e milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído ou na forma de farinhas e sêmolos), destinados para consumo.

Para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente, ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal, o Ministério da Agricultura (BRASIL; 1988) estabelece um limite máximo de 50 µg/kg de AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂. A União Européia estabeleceu como nível máximo o valor de 10 µg/kg de AFB₁ para a ração pronta, destinada às aves. Países como o Canadá, Chile e Estados Unidos adotaram como limite máximo o valor de 20 µg/kg de AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂ para a alimentação de aves de produção (FONSECA, 2003). Através da literatura disponível, pode-se notar que não é difícil encontrar amostras no campo, com os níveis de AFB₁ acima das concentrações máximas recomendadas pelos órgãos oficiais.

1.2.3 Biotransformação da Aflatoxina B₁

A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastrointestinal, e a sua biotransformação ocorre primariamente no fígado, por enzimas microsomais 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 eletrofílico 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-furanóide da molécula de AFB₁ (EMEROLE et al., 1979). A forma ativada da AFB₁ é capaz de reagir rapidamente com macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) celular 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. A 8,9-óxido de AFB₁ também pode sofrer uma conjugação enzimática com uma molécula de glutathione reduzida, e ser excretada na urina ou pela bile (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, na posição N₇, ao nível do códon 249 do gene supressor de tumores p53. Esses adutos formados na molécula de DNA podem ser retirados da molécula, após a sua formação, deixando sítios vagos, que tendem a ser preenchidos com adenina, resultando um 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 (HSIEH; ATKINSON, 1991). A inibição da síntese protéica no fígado e a diminuição das proteínas plasmáticas durante a aflatoxicose, são amplamente descritas na literatura (KUBENA et al., 1991; QUEZADA et al., 2000; TUNG et al., 1975).

A biotransformação da AFB₁ inclui, além da epoxidação, as reações de hidroxilação e de O-demetilação (figura 2). Na reação de hidroxilação são formadas

as aflatoxinas M_1 (AFM_1), aflatoxina Q_1 (AFQ_1) e a aflatoxina B_{2a} (AFB_{2a}), enquanto que a aflatoxina P_1 (AFP_1) é formada na reação de O-demetilação. Esses quatro novos compostos possuem o grupo hidroxila em sua molécula, permitindo a sua conjugação com o ácido glicurônico ou sulfatos, tornando-as substâncias bastante solúveis em água. Essas substâncias podem então ser excretadas através da urina, bile e fezes (BIEHL; BUCK, 1987). A capacidade mutagênica desses produtos de biontransformação é menor do que a da AFB_1 (COULOMBE, 1991).

Figura 2 – Biotransformação da AFB_1

Fonte: modificado de Biehl e Buck (1987).

As vias de biotransformação da AFB₁ variam entre as espécies animais, 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 nos mamíferos, pelo menos 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 fatores.

1.2.4 Toxidez das Aflatoxinas em Aves de Produção

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 (HSIEH; ATKINSON, 1991).

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. 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 do que as fêmeas e em geral, a sensibilidade é

acentuadamente maior nos jovens do que nos adultos (LEESON et al., 1995). De acordo com Chang e Hamilton (1982), a Dose Letal Média (DL₅₀) para codornas com idade de 4 semanas, situa-se em torno de 19,5 miligramas por kilograma (mg/kg) de peso corpóreo (p.c.), após ingestão de dose única de aflatoxinas. A tabela 2 apresenta alguns valores de DL₅₀ para algumas espécies animais, após a inoculação única de AFB₁.

Tabela 2 – Valores de DL₅₀ após inoculação de dose única de AFB₁ em diferentes espécies animais – Londres – 1984.

Espécie Animal	DL₅₀ (mg/kg p.c.)
Pato de 1 dia	0,3 – 0,5
Coelho	0,3 – 0,5
Truta arco-íris	0,5
Porco	0,6
Cão	1,0
Ovelha	1,0 – 2,0
Macaco	2,2
Galinha	6,0 – 16,0
Camundongo	9,0
Rato (macho)	7,0
Rato (fêmea)	18,0

Fonte: TDRI (1984)

As aflatoxinas podem apresentar efeitos agudos ou crônicos. A síndrome tóxica aguda, denominada aflatoxicose, caracteriza-se pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e

morte (OSWEILER, 1990). O fígado é o principal órgão afetado, com lesões decorrentes da necrose hemorrágica, congestão centrolobular, proliferação das células dos ductos biliares e infiltração gordurosa dos hepatócitos (LEESON et al., 1995). Os efeitos de toxidez crônica também se caracterizam por lesões hepáticas, porém, em menor escala, e incluem câncer hepático e alterações genéticas (OSWEILER, 1990).

Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens (LEESON et al., 1995). Entre os efeitos crônicos causados pela ingestão de baixas doses de AFB₁ por um período prolongado, observa-se os efeitos de imunossupressão. A redução da contagem de linfócitos T, diminuição da produção de imunoglobulinas, diminuição da fagocitose e a diminuição da resistência das aves a várias doenças causadas por protozoários, bactérias e vírus foram descritas na literatura (QURESHI et al., 1998). A exposição prolongada à AFB₁ também pode comprometer a imunidade adquirida através dos programas de vacinação, deixando às aves mais susceptíveis as doenças (PIER, 1992).

Contudo, esta patologia é de difícil diagnóstico, apesar de constituir a principal forma de intoxicação em condições naturais, pois os sinais clínicos não são tão evidentes como na aflatoxicose aguda, o que ocasiona perdas econômicas consideráveis às criações (PIER, 1992).

Oliveira et al. (2001) alimentaram galinhas poedeiras por 60 dias, com rações contendo 100, 300 ou 500 µg de AFB₁/kg, os resultados indicaram que a AFB₁, a partir de 100 µg de AFB₁/kg, causou uma diminuição significativa no consumo de ração, enquanto que apenas os níveis de 300 ou 500 µg de AFB₁/kg causaram a diminuição significativa no peso das aves. A produção de ovos e a conversão

alimentar não foram alterados. Os resultados indicaram que a AFB₁, a partir de 100 µg de AFB₁/kg, pode alterar o desempenho de poedeiras jovens, enquanto que os parâmetros de qualidade dos ovos não foram alterados. Nesse mesmo estudo, Oliveira et al. (1999) observaram que os fígados das aves alimentadas com a AFB₁ apresentaram-se congestionados e com sinais de degeneração. A hiperplasia de ductos biliares foi constatada apenas nos grupos tratados com 300 ou 500 µg de AFB₁/kg. O desarranjo trabecular mostrou-se mais evidente no grupo alimentado com 500 µg de AFB₁/kg.

Qureshi et al. (1998) estudaram os efeitos dos resíduos de AFB₁ presentes nos ovos de galinhas, sobre a eclodibilidade e resposta imune das aves nascidas desses ovos. As poedeiras receberam em sua alimentação os níveis de 10.000 µg/kg de aflatoxinas na sua dieta, por 14 dias, e a análise de resíduos de AFB₁ mostrou que havia de 0,05 a 0,60 µg /kg de AFB₁ nos ovos. Foi detectada uma diminuição significativa de fertilidade e eclodibilidade dos ovos, também houve o aumento de morte embrionária. O número de macrófagos das aves que receberam a AFB₁ foi igual ao do grupo controle, entretanto, observou-se uma menor taxa de fagocitose dos macrófagos das aves tratadas com a AFB₁. A detecção da diminuição da resposta imune celular e humoral dessas aves em relação ao grupo controle, indica que as matrizes que ingerem aflatoxina em sua alimentação tendem a gerar descendentes mais susceptíveis a doenças.

Os perus são aves mais sensíveis aos efeitos tóxicos das aflatoxinas presentes na ração, em relação às galinhas (KLEIN et al., 2000). Kubena et al. (1995a), verificaram que perus fêmeas de 1 dia de idade, que receberam em sua ração 750 µg/kg de aflatoxinas (79% de AFB₁, cerca de 592 µg de AFB₁/kg), por 21 dias, apresentaram um menor ganho de peso em relação ao grupo controle, porém a

conversão alimentar dessas aves não foi alterada. No entanto, no experimento realizado por Weibiking et al. (1994), a dose de 200 µg/kg de aflatoxinas (sem a especificação das frações de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂) foi suficiente para causar um aumento significativo nos índices de conversão alimentar das aves tratadas com as aflatoxinas. Também houve uma redução significativa no ganho de peso desses perus de 1 dia de vida, tratados por 21 dias.

Oliveira et al. (2002) realizaram um estudo sobre a influência da administração prolongada de baixos níveis de AFB₁ na dieta de codornas poedeiras. As aves receberam em sua ração 0, 25, 50, ou 100 µg de AFB₁/kg por 168 dias, sendo analisados os índices de produtividade e a qualidade dos ovos. Os autores verificaram que não houve efeito da AFB₁ na produtividade dos ovos, conversão alimentar e peso corporal das aves, entretanto, o peso dos ovos e o consumo de ração das aves que receberam 50 ou 100 µg de AFB₁/kg foi significativamente menor. As aves do tratamento 100 µg de AFB₁/kg apresentaram um aumento significativo da porcentagem de casca em relação aos outros tratamentos. Todas as aves que receberam a AFB₁ em sua dieta apresentaram lesões hepáticas como a vacuolização das células por infiltração gordurosa. Apenas as aves alimentadas com 100 µg de AFB₁ /kg apresentaram proliferação dos ductos biliares e desarranjo trabecular. O trabalho mostra que a performance das codornas pode ser afetada quando estas recebem em sua alimentação uma dose igual ou superior a 50 µg de AFB₁/kg.

Parlat et al. (1999) também observaram uma diminuição significativa no consumo de ração e no ganho de peso das aves, quando forneceu 1.600 µg de AFB₁/kg na ração, em codornas fêmeas e machos de 10 dias de vida.

Washburn et al. (1985) observaram que galinhas poedeiras tratadas com

5.000 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas (sem a especificação das frações de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂) durante 12 meses, produziram ovos com peso significativamente menor e percentual de casca maior em relação às aves que não receberam a micotoxina. O autor conclui que devido às lesões hepáticas causadas pela ingestão das aflatoxinas, os lipídios e as proteínas plasmáticas produzidas no fígado estão diminuídos. Como são os principais precursores utilizados na formação da gema do ovo, o volume da gema dos ovos ficaria menor ou até deixaria de ser formada, e consequentemente, a produção e o peso dos ovos também ficariam menores. Finalmente, a porcentagem de casca também seria alterada, devido à alteração do volume da gema.

São raros os estudos prolongados de exposição à AFB₁, em codornas. Jhori et al. (1990) forneceram na ração os níveis de 200, 300, 500 e 750 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas (sem a especificação das frações de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂), para codornas poedeiras de 6 semanas de vida, durante 100 dias. Os níveis a partir de 300 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas causaram uma redução significativa no consumo de ração. A produção de ovos e o peso das aves ao final do experimento foram significativamente menores a partir dos níveis de 500 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas.

Ao alimentarem codornas poedeiras, durante 84 dias, com rações contendo 50, 100 e 200 μg de AFB₁/kg, Bintvihok et al. (1993) notaram uma diminuição significativa na produção de ovos em todas as aves que foram alimentadas com a AFB₁, entretanto os índices de conversão alimentar e o peso dos ovos não foram alterados.

Doerr e Ottinger (1980) forneceram 5.000 ou 10.000 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas (sem a especificação das frações de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂), para codornas fêmeas e machos de 1 semana de vida, por 4 semanas. Foi verificado que todas as

aves tratadas com as aflatoxinas apresentaram um ganho peso significativamente menor em relação ao grupo controle, entretanto, o menor ganho de peso foi mais acentuado nos machos. Observou-se que, após o término do período de intoxicação, os machos igualaram seu peso em relação ao grupo controle em 1 semana, enquanto que as fêmeas levaram 3 semanas para recuperarem seu peso. Chang e Hamilton (1982) observaram que o ganho de peso de codornas de 1 dia de vida, tratadas com ração contendo de 5.000 a 20.000 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas (sem a especificação das frações de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂), por 4 semanas, tiveram uma redução significativa de ganho de peso.

Em um outro experimento realizado com codornas poedeiras com 10 semanas de vida (SAWHNEY et al., 1973), foi verificado os efeitos da AFB₁ nas doses de 2.000, 4.000 e 6.000 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas (sem a especificação das frações de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂), por um período de 6 semanas. Foi observado que todos os tratamentos com aflatoxinas causaram uma diminuição significativa na produção, no peso e na eclodibilidade dos ovos. Os autores constataram, também, que a altura do albúmen dos ovos das aves tratadas com as aflatoxinas foi menor, mas sem diferença estatística significativa.

1.3 FUMONISINAS

O conhecimento científico sobre as fumonisinas é relativamente menor, quando comparado às aflatoxinas, embora sua ocorrência seja também bastante freqüente. Com distribuição mundial, os fungos do gênero *Fusarium spp*, produtores de fumonisinas, são importantes patógenos de cereais em todas as suas fases de

desenvolvimento, incluindo o período após a colheita quando os grãos são armazenados (DIAZ; BOERMANS, 1994). A contaminação dos grãos pelos fungos do gênero *Fusarium spp* muitas vezes é inevitável, pois esses fungos fitopatogênicos são facilmente encontrados no solo (D'MELLO et al., 1999).

As fumonisinas foram primeiramente isoladas de culturas de *F. moniliforme*, entretanto, outras espécies de *Fusarium spp* já foram identificadas como produtoras de fumonisinas (DIAZ; BOERMANS, 1994), como o *Fusarium proliferatum*, *Fusarium anthophilum*, *Fusarium napiforme* e *Fusarium nygamai* (MOSS, 1998). As condições ideais para o desenvolvimento dos fungos do gênero *Fusarium spp* incluem temperatura de 21°C e atividade de água entre 0,980-0,995, enquanto que a faixa de temperatura entre 12-24°C otimiza a sua produção de micotoxinas (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Segundo Dilkin et al. (2002), a temperatura ideal para a produção de FB₁ e FB₂, pelo *Fusarium moniliforme*, é de 24,5°C e 24,3°C, respectivamente.

Os fungos do gênero *Fusarium spp* são capazes de produzir uma variedade de micotoxinas, entre elas as fumonisinas, as fusarinas, moniliformina, toxina T-2, ácido fusárico, deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol e zearalenona (LI et al., 2000).

1.3.1 Características Físicas e Químicas das Fumonisin

Dezoito diferentes tipos de fumonisinas já foram isolados e identificados, porém a forma molecular predominante produzida pelo *Fusarium moniliforme* é a fumonisin B₁ (FB₁) a qual também apresenta maior toxidez (SEO; LEE, 1999). A FB₁ e a fumonisin B₂ (FB₂) são diésteres do ácido tricarbálico e álcoois polihídricos, que são muito semelhantes à estrutura da esfingosina (NORRED et al.,

1992). De acordo com Bezuidenhout et al. (1988), assim como as aflatoxinas, as fumonisinas são substâncias de baixo peso molecular. O peso molecular da FB₁ é 722 e sua fórmula, C₃₄H₅₉NO₁₅, enquanto que a FB₂ tem o peso molecular de 706 e a fórmula C₃₄H₅₉NO₁₄.

As variações do grupo hidroxil das moléculas de fumonisinas determinam seus diferentes tipos, conforme se observa na figura 3.

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

As fumonisinas são compostos fortemente polares e hidrossolúveis, que se dissolvem muito bem no metanol, acetonitrila-água e são insolúveis em solventes orgânicos de baixa polaridade (DIAZ; BOERMANS, 1994).

Como as fumonisinas não absorvem a luz ultra-violeta ou a luz visível, e não são substâncias fluorescentes, elas requerem a sua derivação para que possam ser identificadas e analisadas. A FB₁ e a FB₂ apresentam uma fluorescência verde-amarelada após a sua derivação (DIAZ; BOERMANS, 1994; SHEPARD, 1998).

As fumonisinas da série A são amidas, enquanto que as da série B possuem um grupo amina livre (DIAZ; BOERMANS, 1994).

Dupuy et al. (1993) verificaram que a molécula de FB₁ é muito resistente às altas temperaturas. Quando submetida às temperaturas de 75°C, 100°C, 125°C e 150°C por 8 horas, 75, 38 e 10 minutos, respectivamente, apenas 50% da FB₁ submetida a cada tratamento foram inativadas.

1.3.2 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 demonstram 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).

Apenas a FB₁, FB₂ e fumonisina B₃ (FB₃) foram detectadas no milho naturalmente contaminado. Geralmente, os alimentos contaminados apresentam a concentração de FB₁ entre 0,05 e 5,00 mg/kg. A concentração mais alta já relatada no milho naturalmente contaminado foi de 195 mg de FB₁/kg (ROSS et al., 1991).

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 – 38,5 µg/g e 18 foram positivas para a presença de FB₂ na concentração de 0,1 – 12,0 µg/g.

Hirooka et al. (1996) detectaram FB₁ e FB₂ em 97,4% e 94,8%, respectivamente, de amostras analisadas dos estados do Paraná e Mato Grosso. Orsi et al. (2000) observaram a ocorrência de fumonisinas em amostras de milho do Estado de São Paulo, com níveis médios de 9,72 mg/kg (FB₁) e 7,67 mg/kg (FB₂).

Uma pesquisa realizada no sul do Brasil (MALLMANN et al., 2001) analisou a presença de FB₁ em cereais e rações coletadas de diferentes granjas e indústrias agropecuárias. Das 407 amostras analisadas, 32% foram positivas para a presença da FB₁ e os níveis detectados variaram de 0,086 à 78,92 mg/g de FB₁, sendo que o milho analisado apresentou 78,92 mg/kg e as rações 68,33 mg/kg de FB₁.

No estudo realizado em 2 províncias da China, uma com alta incidência de câncer esofágico humano e a outra de baixa incidência, foi analisada a ocorrência de FB₁ e da FB₂ no milho consumido pela população (YOSHIZAWA et al., 1994). Em ambas as províncias os níveis médios encontrados de FB₁ e FB₂ foram próximos, cerca de 880 µg/kg de FB₁ e 390 µg/kg de FB₂, entretanto, na de alta incidência de

câncer esofágico, 48% das amostras foram positivas para as fumonisinas, enquanto que na província de baixa incidência o número de amostras positivas caiu para 25%.

De acordo com o Food and Drug Administration (2001), o nível máximo recomendado de fumonisinas totais na alimentação das aves e ruminantes é de 50 mg/kg, para cavalos 5 mg/kg e para suínos, 10 mg/kg.

1.3.3 Mecanismo de ação da Fumonisina B₁

Segundo Wang et al. (1991), a FB₁ interfere na biossíntese e degradação de esfingolípídeos, devido à similaridade estrutural entre estes e as moléculas de FB₁, FB₂ e (figura 4).

Figura 4 – Estrutura molecular das fumonisinas B₁ e B₂, esfinganina e esfingosina.

Fonte: Diaz e Boermans, 1994.

Para testar a hipótese de que as fumonisinas alteram a biossíntese dos esfingolipídeos, Wang et al. (1991) analisaram a capacidade dos hepatócitos de ratos em converter a molécula de serina, com o marcador carbono-14 (C^{14}), em esfingolipídeos carregando em sua molécula, o marcador citado, sob os efeitos da FB_1 .

A figura 5 apresenta esquematicamente os mecanismos de inibição das fumonisinas, na biossíntese de esfingolipídeos.

Figura 5 – Mecanismo proposto de ação tóxica das fumonisinas.

Fonte: Diaz e Boermans, 1994.

A incubação dos hepatócitos de ratos com a FB₁, inibiu a incorporação do marcador C¹⁴ na estrutura molecular da esfingosina. Essa mesma inibição também foi observada quando os hepatócitos foram incubados com a FB₂. Também foi notado que a FB₁ causou um aumento na concentração da molécula intermediária do ciclo, a esfinganina. Isso sugere que a FB₁ inibe a conversão da esfinganina em dihidroceramida, reação que é desencadeada pela ação da enzima n-acil-transferase. A biossíntese de outros fosfolipídios, na qual a molécula de serina também participa, não foram afetados pela presença das fumonisinas, indicando que as fumonisinas atuam especificamente na biossíntese de esfingolipídeos.

Foi testada a ação da FB₁ em altas doses, para verificar a possibilidade de sua atuação em outras fases da biossíntese de esfingolipídeos (WANG et al., 1991). Foi verificado que a FB₁ não reduziu a atividade da enzima serina palmitoiltransferase, também não foi detectado um acúmulo das moléculas de 3-cetoesfinganina e esfinganina.

Observou-se que a FB₁ atuou na transformação da esfinganina, já marcada com o C¹⁴, na molécula de dihidroxiceramida, mais especificamente inibindo a ação da enzima n-acil-transferase. Essa observação foi feita através do acúmulo de esfinganina livre, marcada com o C¹⁴, no interior da célula. Foi observada também uma diminuição dos níveis de esfingosina nas células expostas à FB₁. Essa diminuição significativa dos níveis de esfingosina ocorreu 24 horas após a exposição à FB₁, posteriormente ao aumento dos níveis de esfinganina, que aumentou 7 horas após a exposição à FB₁, em células epiteliais de rim de porcos (YOO et al., 1996).

A explicação detalhada da inibição da enzima n-acil-transferase, pela ação da FB₁ ainda é desconhecida, mas alguns autores postulam que, devido à semelhança estrutural entre as moléculas de esfinganina e esfingosina com a FB₁ e FB₂, tal fato

permite que a enzima n-acil-transferase reconheça essas substância como seus substratos, provocando uma inibição competitiva (DIAZ; BOERMANS, 1994; WANG et al., 1991).

A esfingosina serve como uma molécula base para a formação de outras substâncias, como a esfingomielina, cerebrosídeos, sulfatídeos, gangliosídeos e outros esfingolipídeos. Sabe-se que os esfingolipídeos estão envolvidos no controle do crescimento e diferenciação celular, na comunicação entre as células, sistemas de sinalização para as células e nos receptores celulares (WANG et al., 1991).

O acúmulo de esfinganina no interior das células, e a conseqüente depleção dos níveis de esfingolipídeos explica alguns dos efeitos patológicos provocados pelas fumonisinas (DIAZ; BOERMANS, 1994). A degeneração das células nervosas, observadas em eqüinos alimentados com fumonisinas (leucoencefalomalácia – LEM), pode ocorrer devido a diminuição dos níveis de esfingolipídeos, uma vez que as células do cérebro necessitam de altas concentrações dessas substâncias. O acúmulo de esfinganina no interior das células pode levar à morte celular, pois essas substâncias são altamente citotóxicas *per se*, causando a apoptose (SCHMELZ et al., 1998), ou pode haver um aumento da proliferação celular, uma vez que essas substâncias são mitogênicas, para alguns tipos de células. O acúmulo de esfinganina também pode provocar alterações nos receptores celulares e suas bombas de trocas iônicas.

De acordo com o estudo realizado por Yeung et al. (1996), a molécula de proteína quinase-C parece estar envolvida no mecanismo de ação da FB₁. Essa enzima, presente no citosol das células, está envolvida na sinalização intracelular, controlando a ativação ou a desativação de outros processos celulares. Algumas substâncias cancerígenas provocam o deslocamento da proteína quinase-C

citossólica, para a membrana celular, servindo como um receptor para essas substâncias.

Da mesma maneira, Yeung et al. (1996) demonstraram que, células do córtex cerebral de ratos, quando expostas à FB₁, passaram a apresentar um deslocamento das proteínas quinase-C, do citosol para a membrana celular. Esse efeito foi revertido quando esfingosina foi adicionada a meio, atuando como um agente anti-tumoral endógeno. Esse estudo está de acordo com o mecanismo de ação das fumonisinas proposto por Wang et al. (1991).

No estudo feito por Gelderblom et al. (1996), foi demonstrado que os hepatócitos expostos à FB₁ não apresentaram alterações na síntese protéica dessas células. Até o atual momento, o mecanismo de ação das fumonisinas ainda não foi totalmente elucidado.

1.3.4 Toxidez das Fumonisin

Desde a sua identificação, as fumonisinas têm sido associadas principalmente com duas doenças animais, a leucoencefalomalácia eqüina e o edema pulmonar suíno (ROSS et al., 1990). O consumo humano de cereais contaminados por fumonisinas tem sido relacionado com o aumento da incidência de câncer esofágico no sul da África e em algumas províncias da China (DIAZ; BOERMANS, 1994).

A toxidez da FB₁ é maior em relação à FB₂ e FB₃. Henry e Wyatt (2001) inocularam essas três substâncias purificadas, em ovos de galinhas com embriões de 72 horas de incubação. A FB₁ provocou a maior taxa de mortalidade (56%) de

embriões, seguido pela FB₃ (34%) e FB₂ (14,6%). Os autores também verificaram a ausência de efeitos teratogênicos das fumonisinas.

Os principais órgãos atingidos pelas ações tóxicas da FB₁ são o cérebro nos cavalos, e os pulmões nos suínos. Entretanto, lesões hepáticas severas são observadas nas aves, ratos, suínos e eqüinos, assim como lesões pancreáticas também já foram observadas nos suínos. Sabe-se que, quando comparado aos eqüinos e suínos, as aves domésticas são muito menos sensíveis aos efeitos tóxicos das fumonisinas (DIAZ; BOERMANS, 1994). De acordo com Rotter et al. (1996 apud D'MELLO et al., 1999, p. 199)³, os indivíduos machos são mais susceptíveis aos efeitos da FB₁, em relação às fêmeas.

Os sintomas mais graves como a diarreia, diminuição do consumo de alimentos, perda de peso corporal, aumento do peso relativo do fígado e rins e necrose hepática têm sido observados nas doses maiores que 150 mg/kg de fumonisinas, mas também há relatos de que até a dose de 75 mg/kg de fumonisinas poderia causar efeitos deletérios nos animais. Entretanto, estudos mais antigos analisavam os efeitos das fumonisinas totais, sem especificar as suas frações, o que indica a necessidade de estudos sobre os efeitos das fumonisinas, especificando a ação de cada uma delas no organismo (NORRED; VOSS, 1994).

Foi realizado um experimento para verificar os efeitos da FB₁ em frangos. As aves receberam na ração 0, 20, 40 e 80 mg de FB₁/kg. Nenhum dos tratamentos causou a diminuição do peso corporal e consumo de água nas aves, assim como o peso relativo dos rins, baço, fígado e bursa de Fabricius, que também não foram afetados (HENRY et al., 2000). Entretanto, todas as aves que receberam a FB₁

³ ROTTER, B. A.; THOMPSON, B. K.; PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L.; STEWART, B.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. E. Response of growing swine to dietary exposure to pure fumonisin FB₁ during an eight-week period: growth and clinical parameters. **Natural Toxins**, v. 4, p. 42-50, 1996.

apresentaram um aumento significativo, tanto na taxa de esfinganina das células hepáticas, como na relação esfinganina:esfingosina, o que condiz com o mecanismo de ação da FB₁ na biossíntese dos esfingolipídeos (WANG et al., 1991). Henry et al. (2000) analisaram no fígado dessas aves o teor de lipídios, observando que a exposição à FB₁ provocou uma diminuição dessas substâncias, num efeito dose-dependente. Os autores deduzem que a diminuição do peso relativo do fígado, reportado em outros estudos, ocorre devido a essa diminuição de lipídios, sugerindo que as aves alimentadas com a FB₁ utilizaram em seu metabolismo os lipídios estocados nesse órgão.

Qureshi et al. (1993) observaram que pintos de 1 dia, alimentados com 61 mg de FB₁/kg e 10,5 mg de FB₂/kg, durante 6 semanas, apresentaram diminuição significativa no peso relativo do baço, timo e fígado. Também houve uma diminuição na contagem de imunoglobulinas totais e uma menor atividade de fagocitose pelos macrófagos, tornando as aves mais susceptíveis a doenças. As principais alterações histopatológicas, observadas por Ledoux et al. (1992), em pintos de 1 dia, ocorreram no fígado, notando-se a hiperplasia hepatocelular e biliar, além de necrose hepática multifocal e hipertrofia das células de Kupffer.

Broomhead et al. (2002) forneceram na ração 0, 25 ou 50 mg de FB₁/kg, para frangos e perus de 1 dia de vida, durante 14 semanas. Apenas os frangos tratados com 50 mg de FB₁/kg apresentaram um menor consumo de alimento. Todas as aves apresentaram um aumento dos níveis da relação esfinganina:esfingosina, mas esse aumento foi mais pronunciado nos perus tratados com 50 mg de FB₁/kg. Os autores concluem que a dose de 50 mg de FB₁/kg é capaz de causar danos aos perus, mas não é tóxica para frangos.

No estudo prolongado realizado por Gelderblom et al. (2001), ratos foram alimentados com rações contendo 1, 10 ou 25 mg de FB₁/kg, durante 24 meses. Não foram detectadas alterações significativas no peso corporal e no consumo de ração dos animais. Entretanto, o peso relativo do fígado dos ratos tratados com a FB₁ foram menores. Alterações hepáticas foram observadas nos animais tratados com 25 mg de FB₁/kg, como necrose hepática, proliferação das células epiteliais dos ductos biliares e alguns sinais de fibrose. Também foi constatado um maior número de nódulos pré-neoplásicos no tecido hepático, sugerindo um efeito de hepatocarcinogenicidade da FB₁, e uma maior prevalência de infecções secundárias causadas por bactérias, nos órgãos das aves tratadas com 25 mg de FB₁/kg.

Não há referências de estudos sobre a toxidez da FB₁ em codornas. Grimes et al. (1993) relataram um caso de paralisia em codornas que apresentavam um quadro inicial de fraqueza nas pernas, que rapidamente progrediu para a paralisia total. Na análise da ração dessas aves foi detectada a FB₁ na concentração de 17 mg/kg. Foi feita a tentativa de reproduzir o quadro clínico das aves, fornecendo ração contaminada com a FB₁ na mesma concentração citada, mas os resultados esperados não foram alcançados. Contudo, os autores observaram que as aves que receberam ração contendo FB₁, em comparação com as aves do grupo controle, eram aves menos ativas e menos saudáveis.

1.4 ESTUDOS DE INTERAÇÃO ENTRE MICOTOXINAS

É importante ressaltar que a ocorrência simultânea de 2 ou mais micotoxinas pode determinar a somatória ou a potencialização dos efeitos tóxicos de cada uma em animais sensíveis.

Kubena et al. (1995a) realizaram o estudo dos efeitos da FB₁, em combinação com aflatoxinas, em perus, fornecendo às aves ração contendo 200 mg de FB₁/kg e 750 µg de aflatoxinas/kg (79% AFB₁, 16% AFG₁, 4% AFB₂, 1% FG₂). 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 a aflatoxina tiveram uma redução de 39%, e as aves tratadas com as duas micotoxinas tiveram uma redução de 47%. Além disso, observou-se uma diminuição significativa do peso relativo do fígado, nas aves que receberam ambas as toxinas. 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.

Casado et al. (2001) realizaram um estudo sobre a associação dos efeitos da AFB₁ e FB₁ na alimentação de camundongos, durante 90 dias. Foram formados 3 grupos experimentais, o primeiro grupo recebeu em sua alimentação 10 mg/kg de FB₁, o segundo grupo 10 µg/g de AFB₁ e o terceiro grupo 10 mg/kg de FB₁ + 10 µg/g de AFB₁. Foi observado que no trigésimo dia experimental, nenhuma alteração havia sido detectada. No sexagésimo dia, os camundongos do grupo controle não apresentavam lesões hepáticas, enquanto que 50% dos animais sacrificados tratados com a AFB₁ ou a FB₁ apresentavam inflamação e pontos de necrose no fígado e intestino delgado. Cerca de 70% dos camundongos tratados com ambas as toxinas apresentaram hiperplasia das células de Kupffer no fígado. No nonagésimo dia experimental, essas mesmas alterações foram encontradas, mas nas porcentagens de 80% nos animais tratados com a AFB₁, 90% nos indivíduos tratados com a FB₁ e 100% dos camundongos tratados com ambas as toxinas. Não

foram observadas variações significativas do peso corporal ou ganho de peso desses animais.

Carlson et al. (2001) conduziram um experimento com trutas arco-iris, estudando os efeitos da FB₁ quando administrada simultaneamente com a AFB₁. Ao final do estudo foi constatado que a FB₁ administrada singularmente (0; 3,2; 23 ou 104 mg/kg) por 34 semanas, não provocou o câncer de fígado nas trutas, mas quando administrada com a AFB₁ (23 ou 104 mg/kg de FB₁ + 100 µg/kg de AFB₁) por 42 semanas, houve um aumento significativo na incidência de câncer de fígado em relação ao grupo controle e aos outros grupos.

Sobre a ocorrência simultânea das aflatoxinas e das fumonisinas no campo, Kpodo et al. (2000) analisaram 15 amostras de milho coletados 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 que apresentou o maior nível de aflatoxinas (662 µg/kg) também apresentava 1.043 µg/kg de fumonisinas totais. A amostra que apresentou o maior nível de fumonisinas (2.534 µg/kg) também apresentava 89 µg/kg de aflatoxinas totais.

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 30.750 mg/kg de AFB₁, e 11 a 22 mg/kg de AFB₂. No gênero *Fusarium spp.*, o *F. moniliforme* foi a espécie mais freqüentemente isolada, sendo

que 100% de suas cepas isoladas produziram fumonisinas, que variaram de 20 a 2.168 mg de FB₁/g, e de 10 a 380 mg de FB₂/g.

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 *Fusarium moniliforme* (81%), enquanto que o *Aspergillus flavus* (36%) foi a espécie mais isolada em seu gênero.

Efeitos tóxicos potencializados já foram demonstrados entre a FB₁ e toxina T-2 (KUBENA et al., 1995b), moniliformina e aflatoxina (KUBENA et al., 1997) e moniliformina e deoxinivalenol (HARVEY et al., 1997). Contudo, estudos de associação de micotoxinas efetuados com codornas não existem na literatura disponível.

1.5 CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO DE OVOS DE CODORNAS NO BRASIL

Segundo a Revista Brasileira de Agropecuária (1999), cerca de 70% das criações de codorna no Brasil, concentra-se na Região Sudeste, principalmente no Estado de São Paulo, mas há também criadores nas Regiões Norte e Nordeste do país.

A tabela 3 apresenta as principais características do ovo de codornas.

Tabela 3 – Características do ovo de codornas – São Paulo – 1999

Características do Ovo	
Peso médio	9,60 gramas (g)
Peso da casca	1,003 g
Relação gema/clara/casca	6,25/1
Proteína da gema e da casca	12,77%
Gordura da gema e da clara	13,99% (hid.)
Umidade da gema e da clara	70,9%
Cálcio da casca seca	26,6%
Fósforo	0,466 mg

Fonte: Revista Brasileira de Agropecuária, 1999.

O número de aves é estimado em cerca de 6 milhões, com uma produção média de 350 mil dúzias de ovos por dia, que é inferior ao potencial de mercado estimado para tal produto. Os principais centros consumidores de ovos de codornas são os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Janeiro.

As preparações culinárias dos ovos de codornas, na alimentação humana incluem o cozimento para o consumo direto, ou na forma de aperitivos, bem como a fritura (omelete) e a utilização do produto como ingrediente na composição de patês e maioneses. O produto também já pode ser encontrado em conserva.

A atividade de produção de ovos de codornas no Brasil vem apresentando uma crescente profissionalização nos últimos anos, o que realça a importância do estudo dos fatores que afetam a produtividade desta espécie e a qualidade dos ovos, possibilitando uma maior competitividade/rentabilidade desse produto no mercado consumidor.

2 OBJETIVOS

Os efeitos das micotoxinas em baixas concentrações, em codornas poedeiras, ainda são pouco descritos na literatura. Não há relatos de estudos de associação dos efeitos da AFB₁ e FB₁ em codornas de postura. Tendo em vista a importância do estudo dos fatores que podem afetar a produtividade de poedeiras e a qualidade dos ovos, os objetivos do presente trabalho foram:

- a) Verificar os efeitos da ingestão prolongada de AFB₁ e FB₁, isoladas e associadas, administradas na ração [(0 AFB₁+0 FB₁), (0 AFB₁+10 mg/kg FB₁), (50 µg/kg AFB₁+0 FB₁), (50 µg/kg AFB₁+10 mg/kg FB₁), (200 µg/kg AFB₁+0 FB₁), e (200 µg/kg AFB₁+10 mg/kg FB₁)], sobre os índices de produtividade (conversão alimentar, peso dos ovos, consumo de ração, percentual de produção de ovos e peso das aves) de codornas com 8 semanas de idade;
- b) Avaliar a qualidade dos ovos produzidos através dos seguintes parâmetros: peso dos ovos, relação entre a altura do albúmen e o peso dos ovos (unidade Haugh), gravidade específica e porcentagem do peso da casca em relação ao peso total do ovo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo serão descritas as principais etapas da realização do experimento.

3.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

As aves utilizadas no experimento (no total de 288) foram adquiridas da Granja Piloto, localizada no Município de Sales de Oliveira, São Paulo. Todas as aves foram vacinadas em seu 21^o dia de vida contra Newcastle (cepa HB₁) e Bronquite Aviária (cepa H₁₂₀).

As aves foram recebidas com 38 dias de idade em 10 de junho de 2002. Todas as aves foram alojadas em um mesmo galpão, com as dimensões: de 5,0 x 6,0 metros (m) do Setor de Avicultura do *Campus* Administrativo da USP em Pirassununga/SP, em 3 baterias metálicas comerciais (medidas aproximadas de 1,0m [Altura] X 1,1m [Largura] X 1,1m [Profundidade]) compostas, cada uma, de 4 andares contendo 2 gaiolas em cada andar (total de 8 gaiolas por bateria - figura 6). As gaiolas, subdivididas em 2 compartimentos, foram confeccionadas em arame, possuindo comedouros individuais lineares de chapa galvanizada (localizado em toda a extensão frontal da gaiola – figura 7). Os bebedouros automáticos (“nipples”) ficavam dispostos na parte superior de cada gaiola, sendo que cada compartimento possuía 2 “nipples” (total de 4 “nipples” por gaiola – figura 8). A disposição das aves foi definida através de sorteio entre os diferentes tratamentos, de acordo com os

procedimentos descritos no item 3.7 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.

Figura 6 – Vista geral das baterias com gaiolas dispostas em 4 andares.

Figura 7 – Gaiola provida de comedouro linear de chapa galvanizada.

Figura 8 – Gaiola provida de bebedouro automático “nipple”.

Antes de serem definitivamente distribuídas nas gaiolas (unidades experimentais), as aves passaram por um período de observação de 1 mês, até que seus pesos e produção de ovos se estabilizassem. Um dia antes do início do período de intoxicação, as aves foram pesadas individualmente e foram separadas em 4 faixas de peso. Isso possibilitou uma melhor distribuição das aves entre os tratamentos, reduzindo ao mínimo possível as diferenças de peso das aves entre as gaiolas.

O galpão experimental possuía 5 janelas teladas, sendo 2 (aproximadamente 0,3m X 1,0m cada) dispostas em uma mesma parede, e as outras 3 (aproximadamente 1,6m X 3,0m cada) na parede oposta. A única porta de acesso ao galpão das aves também era telada e ficava permanentemente trancada, restringido o acesso ao local do experimento. O período de iluminação diária fornecida às aves durante o experimento foi de 18 horas (REVISTA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA, 1999), providas através de luz natural, bem como de lâmpadas fluorescentes eletrônicas (25 W – o equivalente a 1 lâmpada incandescente de 75W), controladas por “timer”. As horas de luz necessárias foram atingidas com o

acréscimo de 60 minutos de luz artificial por semana. A temperatura do galpão era controlada com o uso de cortinas plásticas nas janelas e seu funcionamento era manual.

3.2 DIETA BÁSICA

Na primeira semana de observação, as aves receberam ração comercial para codornas em crescimento, produzida pela empresa SOCIL Guyomarc'h Ind. e Com. Ltda. Com o início da postura, aos 44 dias de vida, as aves passaram a receber a ração Codornil[®], da mesma empresa, cuja composição básica aproximou-se daquela definida no projeto, conforme se observa pelos níveis de garantia (tabela 4).

Tabela 4 – Níveis de garantia da ração matriz* utilizada na preparação de todas as dietas experimentais, de acordo com a empresa fabricante – Pirassununga – 2002

INGREDIENTES	Percentual
Cálcio (máximo)	4,00
Extrato Etéreo (mínimo)	2,00
Fósforo (mínimo)	0,60
Matéria Fibrosa (máximo)	6,00
Matéria Mineral (máximo)	15,00
Proteína Bruta (mínimo)	20,00
Umidade (máximo)	13,00

*MA n ° : SP-05055 00433.

*Composição básica do produto: Carbonato de Cálcio, Farelo de Soja, Farelo de Trigo, Farinha de Carne e Ossos, Milho Integral Moído, Cloreto de Sódio (sal comum), Premix Vitamínico Mineral, Farinha de Peixe.

Enriquecimento por kg do produto: Ácido Fólico 1,25 miligramas (mg); Cobre 7,50 mg; Ferro 77,00 mg, Manganês 78,00 mg; Vitamina A 16250 UI/kg; Vitamina B12 18,00 mcg; Vitamina D3 3750 UI/kg; Vitamina E 25,00 mg; Vitamina PP 49,75 mg; Biotina 0,20 mg; Ácido Pantotênico 24,50 mg; Cobalto 0,10 mg; Iodo 1,40 mg; Selênio 0,25 mg, Vitamina B1 2,50 mg; Vitamina B2 12,50 mg; Vitamina B6 4,90 mg; Vitamina K3 1,25 mg; Zinco 75,00 mg; Cloreto de Colina 1500,00mg.

Os níveis apresentados pelo fabricante estão de acordo com as recomendações do National Research Council (1994). Ao longo do experimento foram adquiridos 1.200 kg da ração citada, divididos em 4 lotes.

3.3 REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

a) Reagentes:

- 2-mercaptoetanol, o-ftaldialdeído, padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, (preparados e calibrados de acordo com Scott, 1990), FB₁ e FB₂ (Sigma[®]);
- acetona, acetato de etila, ácido acético glacial, álcool metílico, celite, cloreto de potássio, clorofórmio, éter etílico, hidróxido de sódio, sulfato de amônio e sulfato de sódio anidro (Synth[®]);
- acetonitrila e placa de sílica gel G 60 (Merck[®]);
- água ultra-pura “Milli-Q” e membranas filtrantes 0,22 µm (Millipore[®]);
- tetraborato de sódio (Mallinckrodt[®]).

b) Equipamentos:

- coluna de sílica SAX – *strong-anion-exchange* – Bond Elut SAX - 500 mg/ 10 mL – AHO-1211-3043 (Varian Sample Preparation Products[®]);
- cromatógrafo com fase móvel líquida (Shimadzu[®]) composto por: bombas A e B – LC 10AD; coluna de fase reversa C₁₈ – Ultracarg 5 ODS – 150 x 4,40 mm 5 µm (Labtron/Phenomenex[®]); detectores RF – 10AXL – fluorométrico e SPD – 10AD – UV; módulo controlador CBM – 10;

- espectrodensitômetro CS-9000 (Shimadzu®);
- evaporador rotativo, mesa agitadora horizontal e misturador horizontal (Marconi®).

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE AFB₁

A AFB₁ utilizada no projeto foi produzida no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP, a partir do cultivo de cepa toxigênica de *A. flavus*. O cultivo do fungo e a metodologia de extração da toxina adotadas foram as técnicas descritas por Lin e Dianese (1976). Essa metodologia emprega o uso de ágar côco em placas de *Petri*, composto por leite de côco, ágar bacteriológico (OXOID®) e água destilada. O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C/15 minutos. Foi aplicado no centro de cada placa, um inóculo do fungo *A. flavus*, IMI-190 (uma cepa bastante toxigênica), anteriormente inoculado em meio Czapek e mantido à 27 °C por exatos 11 dias. As placas foram então incubadas a 27 °C por 7 dias. Na extração, para cada 10 g do conteúdo de cada placa de *Petri* eram adicionados 30 mililitros (ml) de clorofórmio, em um erlenmeyer. Após uma agitação de 30 minutos a 160 rotações por minuto (rpm) no agitador horizontal, o conteúdo era filtrado em papel de filtro qualitativo com terra diatomácea e sulfato de sódio anidro. O filtrado contendo a toxina era colocado em banho a 60 °C para evaporação completa do solvente.

A identificação e a quantificação da AFB₁ era realizada pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), através de comparação visual das amostras com padrões de concentração conhecida, sendo a leitura feita em câmara

de luz ultra-violeta (UV) com comprimento de onda (λ) = 365nm. Entretanto, a quantificação do extrato final foi realizado por leitura das placas por fotodensitometria, com maior precisão, de acordo com Scott (1990). Essa quantificação final foi realizada no Instituto Biológico de São Paulo, a quantidade de AFB₁ obtida no extrato final foi de aproximadamente 130,9 mg, enquanto que o nível de AFB₂ encontrado foi de 5,36mg.

Após a sua quantificação, a AFB₁ obtida na extração foi ressuspensa em clorofórmio e mantida em *freezer* a uma temperatura menor que -10° C. Para o preparo das rações, uma determinada fração da solução contendo a AFB₁ era aquecida em banho-maria a 60 °C, até a completa evaporação do solvente. Após este procedimento, os extratos foram ressuspensos em óleo de milho previamente submetido à análise de aflatoxinas, com a finalidade de facilitar o preparo das rações contaminadas (ALMEIDA et al., 1996). A quantidade de óleo utilizado para ressuspender a AFB₁ era mínima (o equivalente a 1,0% do total de ração), não alterando o balanço nutricional da ração fornecida às aves.

3.5 PREPARO DO MATERIAL COM FB₁

A FB₁ utilizada no experimento já se encontrava disponível na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP. A toxina estava contida em material de cultivo preparado e enviado pelo Veterinary Medical Diagnostic Laboratory / University of Missouri-Columbia (USA), tendo sido produzida a partir do cultivo de cepa toxigênica de *Fusarium moniliforme* em milho. Após análise laboratorial, o material em apreço, mantido refrigerado a 4°C, apresentou os

seguintes níveis de fumonisinas: B₁: 6.500 mg/kg; B₂: 2.100 mg/kg; B₃: 680 mg/kg.

A metodologia empregada na produção da FB₁, foi a descrita por Weibking et al. (1993). O meio de cultivo era preparado em jarras de 1 L, onde 100g de grãos de milho e 100 mL de água destilada eram autoclavados a 120°C/30 minutos. Posteriormente, 2 mL de água destilada esterilizada, contendo a cepa de *Fusarium moniliforme* M-1325, eram adicionados ao meio de cultura. As jarras eram então agitadas manualmente, colocadas no escuro para incubação a 27°C, e após 24 horas, as jarras eram agitadas novamente para garantir que o micélio do fungo se espalhasse bem por todo o meio. As jarras permaneciam incubadas a 27°C, por 5 semanas.

Após a incubação, uma mistura de 400 mL de acetona:clorofórmio (75:25) era adicionada diretamente sobre o meio de cultura, deixada assim durante uma noite. Todo o material era então processado por 30 segundos em um homogeneizador de alta velocidade, filtrado, e o resíduo sólido filtrado era novamente misturado à acetona:clorofórmio e refiltrado. Esse material sólido era seco por 48 horas, em um ambiente a 40°C com ventilação forçada, sendo depois triturado até formar um pó fino.

Por se tratar de um meio de cultivo à base de milho moído, esse material foi utilizado diretamente no preparo das rações. A quantidade de material adicionado à ração foi mínima (equivalente a 0,156% do total de ração), não afetando o seu balanço nutricional.

3.6 PREPARO E ANÁLISE DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS

A contaminação das rações foi realizada num total de 4 batidas de ração, no decorrer do período experimental, totalizando 1.200 kg de ração. As datas de preparo das rações, bem como os respectivos resultados obtidos na análise laboratorial, encontram-se descritos na tabela 5. Para todas as análises, foram utilizadas soluções padrão quantitativos produzidas pela SIGMA®.

Tabela 5 – Níveis de AFB₁ e FB₁ encontrados na análise das rações utilizadas no experimento, de acordo com suas datas de preparo – Pirassununga – 2002

Nível Esperado na Ração	Datas de Preparo							
	04/07/2002		09/08/2002		17/09/2002		22/10/2002	
	AFB ₁ (µg/kg)	F ¹ (µg/g)	AFB ₁ (µg/kg)	F (µg/g)	AFB ₁ (µg/kg)	F (µg/g)	AFB ₁ (µg/kg)	F (µg/g)
0 (controle)	Nd*	... ²	Nd	...	Nd	FB ₁ : 0,82 FB ₂ : Nd	Nd	FB ₁ : 0,81 FB ₂ : Nd
10 ppm FB₁	Nd	...	Nd	...	Nd	FB ₁ : 10,15 FB ₂ : 0,81	Nd	FB ₁ : 10,28 FB ₂ : 0,90
50 ppb AFB₁	53,3	Nd	53,3	Nd	51,0	Nd	51,0	Nd
200 ppb AFB₁	170,1	Nd	226,7	Nd	218,2	Nd	198,4	Nd

¹ Fumonisin.

² Dado não disponível.

* Nd – não detectado. Limites de determinação dos métodos de análise: AFB₁: ~ 2,0 µg/kg; FB₁: ~ 0,05 µg/g; FB₂: ~ 0,10 µg/g.

Os níveis de AFB₁ na ração foram atingidos satisfatoriamente em todas as ocasiões de preparo, uma vez que os resultados analíticos apresentaram uma variabilidade inferior a 20% dos níveis esperados. Esta variação pode ser considerada aceitável em análises efetuadas ao nível de µg/kg, ou partes por bilhão

(ppb), de acordo com Horwitz (1982). Em nenhuma das amostras de ração foi detectada a presença de AFB₂, AFG₁ e AFG₂, a ração controle também não apresentava níveis detectáveis de AFB₁. Para a FB₁, os valores encontrados na ração apresentaram uma variabilidade inferior a 5%, confirmando assim os níveis esperados. Esta variação também é considerada aceitável em análises efetuadas ao nível de mg/kg, ou partes por milhão (ppm), de acordo com Horwitz (1982).

As rações também foram analisadas no Veterinary Medical Diagnostic Laboratory / University of Missouri-Columbia (USA), para a detecção da possível presença de vomitoxina, zearalenona e ocratoxina nas amostras. Nenhuma dessas micotoxinas foi detectada. Segundo a metodologia empregada (ROTTINGHAUS et al., 1982), os limites de detecção dos métodos de análise foram de 500 µg/g para a vomitoxina, 500 µg/kg para a zearalenona e 50 µg/kg para a ocratoxina.

Como citado anteriormente, a FB₁ utilizada no experimento foi adicionada à ração diretamente de seu material de cultivo, enquanto que a AFB₁ foi ressuspensa em óleo de milho para facilitar e garantir uma homogeneização das rações. Adotou-se como limite máximo de óleo de milho o nível de 1% em relação ao peso da ração a ser preparada, com a finalidade de evitar, o máximo possível, o desbalanceamento dos níveis energéticos das rações.

A adição das 2 micotoxinas à ração foi realizada em um misturador horizontal/helicoidal, da marca Marconi[®], com capacidade para 30 quilos de ração (figura 9). As rações foram preparadas em lotes de 50 kg por tratamento, portanto, para cada tratamento houve 2 batidas de 25 kg de ração. Para garantir uma boa homogeneização das rações, cada batida de ração durou 15 minutos, sendo depois armazenadas na área de serviço do galpão até o momento de sua utilização. Após o

preparo da ração de cada tratamento, eram coletadas amostras de 1 kg para as análises de comprovação dos níveis de micotoxinas.

Figura 9 – Misturador horizontal/helicoidal utilizado no preparo das rações.

No momento do preparo das rações, os manipuladores vestiam aventais, luvas de borracha e máscaras descartáveis, evitando um possível contato direto com as micotoxinas. Após o preparo, todos os materiais e equipamentos foram submetidos à descontaminação com solução de hidróxido de sódio à 10%, para posterior lavagem com detergente alcalino, enxágüe em água destilada e secagem em ambiente coberto e arejado, por no mínimo 24 horas.

3.6.1 Marcha Analítica para Determinação de AFB₁ na Ração

A extração e a análise dos níveis de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram feitas por CCD (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989), no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia da FZEA/USP. Em um erlenmyer, pesava-se 50g da amostra de

ração, com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% . Após a mistura passar por um agitador horizontal a 160 rpm por 30 minutos, filtrava-se a mistura em papel de filtro qualitativo, e então 50 mL de celite e 150 mL de sulfato de amônio 30% eram adicionados. Novamente o meio era filtrado e repassado para um funil de separação, com 150 mL de água destilada. Adicionava-se 20 mL de clorofórmio e o funil era agitado, até o meio se tornar homogêneo. A parte clorofórmica formada no funil era coletada e colocada em banho a 60°C até a total evaporação do solvente.

Utilizou-se a CCD para a identificação e quantificação das aflatoxinas nas rações. Após a ressuspensão dos resíduos em clorofórmio, as amostras e a solução padrão eram aplicadas, com a ajuda de uma microseringa, em placas de sílica gel Merck® - G 60 (figura 10). A migração das toxinas foi realizada em cuba de vidro, utilizou-se como sistema de solvente, a solução de clorofórmio:acetona na proporção de 9:1, respectivamente. Após esse processo, os cromatogramas eram colocados em outra cuba contendo éter etílico, para a remoção de interferentes cromatográficos, confirmando assim a presença de AFB₁.

Figura 10 – Aplicação das soluções das amostras de ração, em placa de sílica gel, para a quantificação de aflatoxinas.

Os cromatogramas obtidos eram examinados numa câmara sob luz ultravioleta, à $\lambda = 365\text{nm}$, onde era feita a comparação visual das amostras com os padrões de concentração conhecida. Observa-se a presença da mancha fluorescente azul-violeta de AFB₁ na placa, na mesma altura da mancha do padrão. A quantificação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{AFB}_1, \text{AFB}_2, \text{AFG}_1, \text{AFG}_2 (\mu\text{g/kg}) = (A \times B \times C) / (D \times E)$$

Onde: A = volume do padrão aplicado à placa, correspondente à amostra (μL);

B = concentração da solução padrão ($\mu\text{g/mL}$);

C = diluição final do extrato (μL);

D = volume da amostra aplicada à placa, correspondente ao padrão (μL);

E = peso final da amostra utilizada na quantificação (g).

3.6.2 Marcha Analítica para Determinação de FB₁ na Ração

A extração e análise quantitativa dos níveis de FB₁ e FB₂ foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas do ICB/USP. A técnica utilizada para a extração e *clean-up* de fumonisinas foi a preconizada por Sydenham et al. (1996). Em um erlenmeyer, 10g da amostra de ração era misturada com 100 mL de metanol:água (3:1). Após essa mistura passar por um agitador horizontal a 160 rpm por 45 minutos, filtrava-se o material em papel de filtro qualitativo e a solução tinha o seu pH ajustado entre os valores de 5,8 a 6,5, com solução de NaOH 1 molar.

O condicionamento da coluna SAX (Strong Anion-Exchange) era feito com 5

mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1). Após o condicionamento, 10 mL da amostra eram passados pela coluna, e a lavagem da coluna era feita com 5 mL de metanol:água (3:1) seguidos de 3 mL de metanol. A eluição da toxina era feita com 10 mL de metanol: ácido acético (99:1) e o extrato coletado era evaporado em banho a 60°C, até a evaporação total do solvente.

A quantificação foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência, e coluna de fase reversa C₁₈, mantida em forno a temperatura de 30°C constante, segundo Shepard et al. (1990). O extrato era rediluído em 200 µL de acetonitrila:água (1:1) e filtrava-se a solução com membrana GC (durapore) de 0,22 µm de poro. Uma alíquota de 100 µL era repassada para um tubo de ensaio, onde adicionava-se 200 µL de OPA (constituído por 1 mL de metanol, 40 mg de o-phthaldialdehydo, 5 mL tetraborato de sódio 0,1 molar e 50 µL de 2-mercatohetanol). Essa solução era misturada sob a proteção da luz e após 2 minutos, 20 µL eram aplicados ao sistema para a quantificação das toxinas.

A fluorescência utilizada na detecção das fumonisinas derivadas tinha o comprimento de onda (λ) de 335 e 440 nm para excitação e emissão, respectivamente. A fase móvel era composta por acetonitrila:água:ácido acético (50:50:1), e sua vazão foi de 1 mL/minuto.

O tempo médio de retenção foi de 8,55 minutos para a FB₁ e 16,48 minutos para a FB₂. A quantificação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$FB_1 \text{ ou } FB_2 (\mu\text{g/kg}) = (F \times G \times H) / (I \times J)$$

Onde: F = área do pico correspondente à FB₁ ou FB₂ da amostra;

G = concentração da solução padrão de FB₁ ou FB₂ (µg/mL);

H = volume final da solução teste (μL);

I = área do pico de FB_1 ou FB_2 da solução padrão;

J = peso final da amostra utilizada para a quantificação (g).

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com 4 repetições (ou gaiolas) por tratamento, num total de 6 tratamentos, de acordo com o tabela 6. Cada unidade experimental foi representada por uma gaiola provida de comedouro tipo calha e foram alojadas 12 aves por gaiola, totalizando 288 aves. O estudo teve a duração de 5 ciclos de 28 dias (20 semanas ao todo), sendo que as aves receberam ração 2 vezes ao dia e água *ad libitum*.

Tabela 6 – Grupos experimentais e respectivos teores de AFB_1 e FB_1 nas rações – Pirassununga – 2002

GRUPO EXPERIMENTAL*	AFB_1 na Ração ($\mu\text{g/kg}$)	FB_1 na Ração (mg/kg)
A (controle)	Ausente	Ausente
B	Ausente	10
C	50	Ausente
D	50	10
E	200	Ausente
F	200	10

*Cada grupo experimental foi constituído por 4 repetições (gaiolas) contendo, cada uma, 12 aves.

Os tratamentos aplicados a cada gaiola foram definidos através de sorteio entre as gaiolas de um mesmo andar, considerando as 3 baterias (6 gaiolas), de maneira que cada um apresentasse 1 tipo de tratamento, resultando no esquema reproduzido na figura 11. Este procedimento visou evitar a repetição de um ou mais tratamentos em cada andar da bateria.

Bateria 1		Bateria 2		Bateria 3	
C*	D	E	F	A	B
B	C	D	E	F	A
D	E	F	A	B	C
E	F	A	B	C	D

Figura 11 – Representação esquemática das baterias (vista lateral), mostrando a disposição das gaiolas de acordo com os *tratamentos.

O experimento teve início em 10/07/2002, quando as aves estavam com 68 dias de idade e seu término ocorreu em 27/11/2002, quando as aves estavam com 208 dias de vida, ao término do 5º ciclo de postura.

3.7.1 Índices de Produtividade Avaliados

- a- Peso dos ovos: medido diariamente em cada unidade experimental (gaiola);
- b- Produção de ovos: obtida através do percentual de postura semanal (número de ovos dividido pelo número de aves alojadas);

- c- Consumo de ração/ave/dia: esta variável foi obtida semanalmente em cada unidade experimental, dividindo-se a quantidade total de ração pelo número de aves alojadas e pelo número de dias;
- d- Índice de conversão alimentar: este valor foi obtido semanalmente mediante a divisão da quantidade de ração consumida (kg) pela massa de ovos produzidos (kg) durante o período.

3.7.2 Qualidade dos Ovos

A qualidade dos ovos produzidos foi avaliada em 5 ocasiões (28º, 56º, 84º, 112º e 140º dias), com toda a produção do dia, através da adoção dos seguintes parâmetros:

- a- Relação entre a altura do albúmen (A) medida através de aparelho próprio para esta finalidade (Ames®, S – 6428 – figuras 12 e 13), e o peso dos ovos (unidade Haugh), sendo o resultado final obtido através da fórmula:

$$UH = 100 \times \log (A + 7,57 - [1,7 \times \text{peso do ovo}^{0,37}])$$

- b- Gravidade específica, determinada pelo método de flutuação (figura 14), utilizando-se soluções salinas com densidade entre 1,065 a 1,095 (HAMILTON, 1982);
- c- Porcentagem do peso da casca em relação ao peso total do ovo; para isto, o peso da casca foi medido após lavagem com água potável, para retirada do

excesso de albúmen, e secagem ao ambiente por cerca de 48 horas.

Figura 12 – Aparelho Ames[®], S – 6428, utilizado para medir a altura de albúmen.

Figura 13 – Detalhe do aparelho Ames[®], utilizado para medir a altura de albúmen.

Figura 14 – Método de flutuação em solução salina, para determinação da densidade dos ovos.

3.7.3 Outras Variáveis Estudadas

- a- Peso das aves: as aves de cada gaiola foram pesadas no dia anterior ao início do período de intoxicação e depois ao final de cada ciclo de postura (28 dias). As aves eram pesadas em grupos, sendo que cada grupo pesado era constituído pelas aves de cada unidade experimental (gaiola);
- b- Viabilidade das aves: foi registrado o número de aves que vieram a óbito, durante todo o período experimental. No decorrer do experimento, 2 aves vieram a óbito, sendo 1 do grupo alimentado com ração contendo 50 $\mu\text{g/kg}$ AFB₁+10 mg/kg FB₁ (morta no 85 ° dia do experimento) e a outra do tratamento 200 $\mu\text{g/kg}$ AFB₁+0 FB₁ (morta no 112 ° dia do experimento).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise fatorial (2 X 3), de acordo com os procedimentos estabelecidos no *General Linear Model* do SAS® (SAS Institute, 1992). As médias dos tratamentos que foram estatisticamente diferentes na análise de variância foram analisadas pelo teste de LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher, adotando-se, como nível de rejeição, $\alpha = 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os 5 ciclos do experimento, não foram detectadas modificações visíveis no estado geral das aves, com exceção das 2 que vieram a óbito. A mortalidade observada foi: 0/48 (controle), 0/48 (0 de AFB₁ + 10 mg/kg de FB₁), 0/48 (50 µg/kg de AFB₁ + 0 de FB₁), 1/48 (50 µg/kg de AFB₁ + 10 mg/kg de FB₁), 1/48 (200 µg/kg de AFB₁ + 0 de FB₁), 0/48 (200 µg/kg de AFB₁ + 10 mg/kg de FB₁).

4.1 ÍNDICES DE PRODUTIVIDADE

A tabela 7 apresenta as médias de consumo médio de ração, durante os cinco períodos experimentais, de acordo com os tratamentos. Ao final do primeiro ciclo de postura, podemos observar que o consumo médio de ração (g/aves/dia) mostrou-se significativamente menor ($p < 0,05$), para o tratamento 10 mg/kg de FB₁ + 50 µg/kg de AFB₁. A diferença foi significativa em relação a todos os outros tratamentos, exceto ao grupo controle e ao tratamento 200 µg/kg de AFB₁. Já no segundo ciclo, esta diferença passa a ser significativa a todos os tratamentos. Lembremos que as aves passaram por um período de observação de aproximadamente 30 dias, antes do início do experimento, diminuindo ao máximo as diferenças originais entre os grupos experimentais. Weibking et al. (1994) não observaram uma diminuição significativa no consumo de ração, em perus que receberam a associação de 75 mg/kg de FB₁ + 200 µg/kg de AFB₁ em sua dieta. Em

um experimento realizado por Kubena et al. (1995a), perus fêmeas receberam 200 mg/kg de FB₁ + 0,75 mg/kg de AFB₁ em sua alimentação, e também não foi detectada uma diminuição no consumo de ração.

As médias de consumo dos tratamentos 10 mg de FB₁/kg (27,04 g/aves/dia) e 50 µg de AFB₁/kg (27,57 g/aves/dia) encontram-se bem próximas à média de consumo do grupo controle (26,83 g/aves/dia). Isso demonstra que isoladamente a FB₁ e a AFB₁, nesse segundo ciclo de postura, não causaram efeitos deletérios às aves, mas quando associadas nessas doses, a FB₁ e a AFB₁ (25,57 g/aves/dia) passaram a causar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no consumo de ração. Não há disponível na literatura estudos de interação entre a FB₁ e a AFB₁ em codornas.

Tabela 7 – Consumo médio de ração (g/aves/dia) de acordo com os diferentes tratamentos ¹ – Pirassununga - 2002

Níveis dos Tratamentos		Ciclos				
AFB ₁	FB ₁	1	2	3	4	5
0	0	25,06 ± 0,71* ^{ab}	26,83 ± 0,35 ^a	28,56 ± 0,87 ^a	27,44 ± 1,01 ^a	29,03 ± 0,41 ^a
0	10	25,25 ± 1,03 ^a	27,04 ± 1,27 ^a	27,81 ± 1,53 ^a	26,57 ± 1,15 ^b	26,98 ± 1,05 ^b
50	0	26,14 ± 0,50 ^a	27,57 ± 0,40 ^a	28,80 ± 0,40 ^a	27,81 ± 0,72 ^a	28,27 ± 1,03 ^c
50	10	24,58 ± 0,63 ^b	25,57 ± 0,61 ^b	27,49 ± 0,87 ^a	26,30 ± 1,02 ^{ab}	24,40 ± 0,28 ^d
200	0	25,01 ± 0,80 ^{ab}	26,59 ± 0,73 ^a	28,21 ± 0,57 ^a	26,51 ± 0,94 ^{ab}	25,37 ± 0,64 ^d
200	10	25,74 ± 1,16 ^a	26,85 ± 1,49 ^a	27,97 ± 1,29 ^a	26,22 ± 0,74 ^{ab}	25,27 ± 0,42 ^d

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$);

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 12 aves cada.

Houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no consumo médio de ração das aves tratadas com 10 mg de FB_1/kg (média de 26,57 g/aves/dia), ao final do quarto ciclo. Essa diminuição foi significativa em relação ao grupo controle (média de 27,44 g/aves/dia) e ao tratamento de 50 μg de AFB_1/kg (média de 27,81 g/aves/dia). Henry e Wyatt (2001) não observaram alterações no consumo de ração em frangos que receberam 20 ou 40 mg de FB_1/kg em sua alimentação. As doses de 25 ou 50 mg de FB_1/kg fornecidas a frangos não causaram uma diminuição no consumo de ração, entretanto a dose de 50 mg de FB_1/kg resultou numa diminuição significativa no consumo de ração de perus (BROOMHEAD et al., 2002).

Ao final do quinto e último ciclo, todos os tratamentos apresentaram um consumo médio de ração significativamente menor, em relação ao tratamento controle (figura 15). O tratamento 10 mg de FB_1/kg manteve a sua tendência de um consumo menor em relação ao grupo controle, assim como no final do quarto ciclo. O consumo de ração do tratamento 50 μg de AFB_1/kg (média de 28,27 g/aves/dia) e do tratamento 200 μg de AFB_1/kg (média de 25,37 g/aves/dia) também foram significativamente menores ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (média de 29,03 g/aves/dia) e entre si, conforme o esperado, evidenciando o efeito dose-dependente da AFB_1 (COULOMBE, 1991). O efeito da AFB_1 sobre o consumo de ração também foi observado por Oliveira et al. (2002), que detectaram a diminuição no consumo de ração em codornas tratadas com 50 ou 100 μg de AFB_1/kg , ao final de 168 dias de intoxicação. Johri et al. (1990) e Sawhney et al. (1973) também demonstraram que doses a partir de 300 $\mu g/kg$ de aflatoxinas ($AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$) diminuem o consumo de ração em codornas.

Figura 15 – Evolução dos valores de consumo médio de ração (g/ave/dia) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos.

Os tratamentos de associação entre a FB₁ e a AFB₁ também apresentaram diminuição significativa de consumo de alimento ($p < 0,05$) ao final do 5 ° ciclo. O consumo do tratamento 10 mg de FB₁/kg + 50 µg de AFB₁/kg (média de 24,40 g/aves/dia) foi estatisticamente menor do que os tratamentos controle (média de 29,03 g/aves/dia), tratamento 10 mg de FB₁/kg (média de 26,98 g/aves/dia) e do tratamento 50 µg de AFB₁/kg (média de 28,27 g/aves/dia), demonstrando um efeito aditivo entre as duas micotoxinas, nesses níveis. O consumo do tratamento 10 mg de FB₁/kg + 200 µg de AFB₁/kg (média de 25,27 g/aves/dia) foi significativamente menor em relação ao grupo controle, mas não mostrou diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao tratamento 200 µg de AFB₁/kg (média de 25,37 g/aves/dia), portanto, não demonstrando efeito de associação entre FB₁ e AFB₁ nesses níveis de associação. Não há relatos de estudos de associação dos efeitos da FB₁ e AFB₁ em codornas, sendo estes resultados inéditos.

Na tabela 8 podemos observar os resultados de conversão alimentar (g/g) obtidos nos diferentes tratamentos. A figura 16 demonstra que as médias de conversão alimentar variaram quase que paralelamente entre si. As diferenças entre as médias não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$), o que está de acordo com os dados obtidos por Oliveira et al. (2002), para os níveis de 25, 50 ou 100 μg de AFB_1/kg em codornas.

Tabela 8 – Conversão alimentar (g/g) de acordo com os diferentes tratamentos
¹ – Pirassununga – 2002

Níveis dos Tratamentos		Ciclos				
AFB_1	FB_1	1	2	3	4	5
0	0	$2,34 \pm 0,04^{*a}$	$2,53 \pm 0,14^a$	$2,62 \pm 0,08^a$	$2,61 \pm 0,06^a$	$2,69 \pm 0,03^a$
0	10	$2,37 \pm 0,08^a$	$2,56 \pm 0,17^a$	$2,64 \pm 0,17^a$	$2,69 \pm 0,08^a$	$2,80 \pm 0,19^a$
50	0	$2,34 \pm 0,06^a$	$2,49 \pm 0,06^a$	$2,56 \pm 0,07^a$	$2,60 \pm 0,08^a$	$2,67 \pm 0,07^a$
50	10	$2,33 \pm 0,06^a$	$2,53 \pm 0,08^a$	$2,66 \pm 0,12^a$	$2,75 \pm 0,20^a$	$2,67 \pm 0,11^a$
200	0	$2,33 \pm 0,09^a$	$2,45 \pm 0,04^a$	$2,59 \pm 0,07^a$	$2,58 \pm 0,16^a$	$2,65 \pm 0,11^a$
200	10	$2,35 \pm 0,07^a$	$2,53 \pm 0,09^a$	$2,62 \pm 0,07^a$	$2,59 \pm 0,08^a$	$2,65 \pm 0,05^a$

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$);

¹ Resultados expressos em médias $\pm$ desvio padrão, para 4 repetições com 12 aves cada.

Broomhead et al. (2002) não observaram alterações significativas na conversão alimentar de frangos e perus com os níveis de 25 ou 50 mg de FB_1/kg na ração, enquanto que em um outro experimento, a dose de 300 mg de FB_1/kg foi suficiente para aumentar significativamente a conversão alimentar de perus (KUBENA et al., 1995b). A associação dos níveis de 75 mg/kg de FB_1 + 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 em perus (WEIBKING et al., 1994) aumentaram significativamente a sua

conversão alimentar, em relação ao grupo controle, mas não em relação ao grupo tratado com apenas 200 $\mu\text{g/kg}$ de AFB₁. No experimento realizado por Kubena et al. (1995a), em que perus fêmeas receberam 200 mg/kg de FB₁ + 0,75 mg/kg de AFB₁ em sua alimentação, também não foi detectada nenhuma alteração significativa na conversão alimentar.

Figura 16 – Evolução dos valores de conversão alimentar (g/g) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos.

A tabela 9 apresenta a produção de ovos (em porcentagem) obtidos durante os 5 ciclos. Nota-se que apenas o tratamento controle apresentou uma produção de tendência mais constante, enquanto que os outros tratamentos apresentaram uma queda de produção mais acentuada a partir do 4º ciclo de postura. Porém, apenas o tratamento 10 mg FB₁/kg causou uma diminuição significativa ($p < 0,05$). Oliveira et

al. (2002) também não observaram uma queda significativa na produção de ovos de codornas tratadas com 25, 50 ou 100 µg de AFB₁/kg.

Tabela 9 – Produção de ovos (%) de acordo com os diferentes tratamentos ¹ – Pirassununga – 2002

Níveis dos Tratamentos		Ciclos				
AFB ₁	FB ₁	1	2	3	4	5
0	0	93,30 ± 3,68 ^a	93,35 ± 5,81 ^a	93,23 ± 1,27 ^a	93,86 ± 1,16 ^a	92,73 ± 3,06 ^a
0	10	93,30 ± 2,01 ^a	93,25 ± 4,33 ^a	91,22 ± 5,72 ^b	88,17 ± 3,21 ^b	84,74 ± 3,21 ^b
50	0	96,50 ± 1,06 ^a	95,93 ± 2,15 ^a	95,60 ± 2,14 ^a	94,28 ± 4,66 ^a	92,44 ± 4,15 ^a
50	10	93,97 ± 3,19 ^a	91,76 ± 6,06 ^a	90,45 ± 4,30 ^{ab}	87,56 ± 6,47 ^{ab}	85,59 ± 2,49 ^{ab}
200	0	95,46 ± 3,76 ^a	96,43 ± 1,25 ^a	94,21 ± 1,66 ^a	94,00 ± 4,01 ^a	88,87 ± 3,88 ^a
200	10	95,98 ± 0,92 ^a	94,74 ± 1,60 ^a	92,63 ± 1,59 ^{ab}	92,04 ± 1,52 ^a	87,42 ± 1,31 ^a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$);

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 12 aves cada.

De acordo com a literatura disponível, os relatos dos efeitos da AFB₁ na diminuição da produção de ovos de codornas começam a ser citados a partir dos níveis entre 500 – 750 µg/kg (JOHRI et al., 1990) e 2.000 – 6.000 µg/kg (SAWHNEY et al., 1973) de aflatoxinas (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂). Doerr e Ottinger (1980) observaram que codornas tratadas com 5.000 ou 10.000 µg/kg de aflatoxinas (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂), durante 3 semanas, apresentaram um atraso significativo no seu desenvolvimento ovariano, comprometendo o desenvolvimento sexual das aves. Em galinhas poedeiras, Oliveira et al. (2001) não observaram uma queda de produção de ovos significativa, com as doses de 100, 300 ou 500 µg de AFB₁/kg.

O tratamento 10 mg de FB₁/kg causou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na produção de ovos a partir do 3^o ciclo de produção, e essa queda foi se acentuando até o 5^o e último ciclo de produção. Esse resultado nos mostra de maneira clássica, a ação crônica de um agente sobre um organismo. A figura 17 mostra a evolução da produção de ovos durante o período de intoxicação.

Figura 17: Evolução dos valores de produção de ovos (%) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos.

Kubena et al. (1999) detectaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na produção de ovos de galinhas poedeiras, que receberam em sua dieta 100 mg de FB₁/kg, durante 420 dias (15 ciclos de postura). Essas aves apresentaram uma menor produção significativa de ovos a partir do 9^o ciclo, enquanto que as aves que receberam 200 mg de FB₁/kg passaram a produzir menos ovos já a partir do 1^o ciclo experimental.

Os dados de peso médio dos ovos (g) encontram-se na tabela 10. No final do primeiro ciclo, o peso dos ovos do tratamento 10 mg de FB₁/kg + 50 µg de AFB₁/kg

(média de 11,20 g) foi significativamente menor em relação a todos os tratamentos ($p < 0,05$), com exceção ao tratamento 200 μg de AFB_1/kg (média de 24,40 g). As médias dos tratamentos 10 mg de FB_1/kg (média de 11,42 g) e 50 μg de AFB_1/kg (média de 11,55 g) não apresentaram diferença estatística em relação ao tratamento controle (média de 11,43 g), mas quando associadas, o peso dos ovos foi significativamente menor. Esses dados demonstram um efeito de associação da FB_1 e AFB_1 no peso de ovos de codornas, para os níveis citados anteriormente.

No 5º ciclo todos os tratamentos causaram uma diminuição significativa no peso dos ovos. O tratamento 10 mg de FB_1/kg + 50 μg de AFB_1/kg (média de 10,71 g) foi significativamente menor em relação ao grupo controle (média de 11,62 g), e também em relação aos tratamentos 10 mg de FB_1/kg (média de 11,36 g) e 50 μg de AFB_1/kg (média de 11,45 g). Nota-se que isoladamente, tanto a FB_1 como a AFB_1 diminuíram significativamente o peso dos ovos, mas quando associadas, a diminuição no peso foi maior, demonstrando um efeito aditivo entre as duas micotoxinas. O peso dos ovos do tratamento 10 mg de FB_1/kg + 200 μg de AFB_1/kg (média de 10,90 g) também foi significativamente menor em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), porém ele não apresentou diferença estatística em relação aos tratamentos 10 mg de FB_1/kg + 50 μg de AFB_1/kg e 200 μg de AFB_1/kg (média de 10,76 g). Esses dados indicam que o efeito aditivo entre a FB_1 e a AFB_1 , na diminuição no peso de ovos de codornas, é observado nos níveis de 10 mg de FB_1/kg + 50 μg de AFB_1/kg , mas não nos níveis de 10 mg de FB_1/kg + 200 μg de AFB_1/kg . A evolução dos valores de peso médio dos ovos encontra-se na figura 18.

Tabela 10 – Peso médio dos ovos (g) de acordo com os diferentes tratamentos
¹ – Pirassununga - 2002

Níveis dos Tratamentos		Ciclos				
AFB ₁	FB ₁	1	2	3	4	5
0	0	11,43 ± 0,11* ^a	11,36 ± 0,16 ^a	11,68 ± 0,19 ^a	11,20 ± 0,13 ^a	11,62 ± 0,08 ^a
0	10	11,42 ± 0,33 ^a	11,36 ± 0,33 ^a	11,55 ± 0,33 ^a	11,17 ± 0,46 ^a	11,36 ± 0,06 ^b
50	0	11,55 ± 0,05 ^a	11,51 ± 0,13 ^a	11,75 ± 0,12 ^a	11,33 ± 0,16 ^a	11,45 ± 0,04 ^b
50	10	11,20 ± 0,13 ^b	11,02 ± 0,24 ^a	11,41 ± 0,22 ^a	10,97 ± 0,28 ^a	10,71 ± 0,14 ^c
200	0	11,23 ± 0,17 ^{ab}	11,25 ± 0,21 ^a	11,58 ± 0,18 ^a	10,94 ± 0,24 ^a	10,76 ± 0,10 ^c
200	10	11,38 ± 0,14 ^a	11,18 ± 0,24 ^a	11,51 ± 0,29 ^a	10,99 ± 0,24 ^a	10,90 ± 0,21 ^c

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$);

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 12 aves cada.

Estudos anteriores demonstraram que os níveis de 2.000 a 6.000 µg/kg (SAWHNEY et al., 1973) e 5.000 µg/kg (WASHBURN et al., 1985) de aflatoxinas (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂) foram suficientes para causar a diminuição significativa ($p < 0,05$) no peso médio de ovos de codornas e galinhas poedeiras, respectivamente. Entretanto, Johri et al. (1990) relatam não terem detectado uma diminuição significativa no peso dos ovos de codornas tratadas com níveis de 200 a 750 µg/kg de aflatoxinas (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂). Oliveira et al. (2001) também não observaram perdas significativas nos pesos dos ovos de galinhas poedeiras, com os níveis de 100 a 500 µg de AFB₁/kg. Mais recentemente, Oliveira et al. (2002) demonstraram que os níveis de 50 ou 100 µg de AFB₁/kg provocaram a diminuição significativa no peso dos ovos de codornas, tratadas durante 6 ciclos de produção.

Figura 18 – Evolução dos valores de peso médio dos ovos (g) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos.

4.2 QUALIDADE DOS OVOS

A tabela 11 apresenta os valores médios de gravidade específica dos ovos (m/v) obtidos nos diferentes tratamentos durante os 5 ciclos de produção. Os valores médios encontrados sofreram uma variação muito próxima entre os diferentes tratamentos durante os 5 ciclos experimentais. Somente o tratamento 10 mg de FB_1/kg + 200 μg de AFB_1/kg apresentou uma média (1,0692 m/v) significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (média de 1,0705 m/v), ao final do 5º ciclo. As médias dos tratamentos 10 mg de FB_1/kg (média de 1,0687 m/v) e 200 μg de AFB_1/kg (média de 1,0697 m/v) não diferiram significativamente do grupo controle, indicando um efeito de interação entre elas quando associadas nesses

níveis, em relação à gravidade específica dos ovos de codornas. Não há dados disponíveis na literatura, sobre o estudo de interação entre a FB₁ e a AFB₁, sobre os índices de qualidade de ovos de codornas.

Oliveira et al. (2002) indicam que os níveis de AFB₁ estudados (25, 50 ou 100 µg de AFB₁/kg) não alteraram significativamente os parâmetros de gravidade específica dos ovos de codornas, concordando com Washburn et al. (1985), que também relatam a ausência de alterações nos ovos de galinhas poedeiras tratadas com 5.000 µg/kg de aflatoxinas (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂).

A evolução dos parâmetros de gravidade específica dos ovos pode ser observada na figura 19.

Tabela 11 – Gravidade específica dos ovos (m/v) de acordo com os diferentes tratamentos ¹ – Pirassununga – 2002

Níveis dos Tratamentos		Ciclos				
AFB ₁	FB ₁	1	2	3	4	5
0	0	1,0717 ± 0,0010 ^{*a}	1,0698 ± 0,0005 ^a	1,0684 ± 0,0010 ^a	1,0696 ± 0,0009 ^a	1,0705 ± 0,0008 ^a
0	10	1,0708 ± 0,0010 ^a	1,0695 ± 0,0007 ^a	1,0676 ± 0,0011 ^a	1,0685 ± 0,0007 ^a	1,0687 ± 0,0005 ^{ab}
50	0	1,0712 ± 0,0006 ^a	1,0687 ± 0,0009 ^a	1,0684 ± 0,0011 ^a	1,0690 ± 0,0008 ^a	1,0677 ± 0,0004 ^{ab}
50	10	1,0722 ± 0,0010 ^a	1,0698 ± 0,0011 ^a	1,0680 ± 0,0012 ^a	1,0690 ± 0,0021 ^a	1,0700 ± 0,0025 ^{ab}
200	0	1,0723 ± 0,0014 ^a	1,0698 ± 0,0010 ^a	1,0672 ± 0,0010 ^a	1,0691 ± 0,0009 ^a	1,0697 ± 0,0014 ^{ab}
200	10	1,0707 ± 0,0010 ^a	1,0692 ± 0,0008 ^a	1,0676 ± 0,0001 ^a	1,0684 ± 0,0004 ^a	1,0692 ± 0,0015 ^b

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (p < 0,05);

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 12 aves cada.

Figura 19 – Evolução dos valores de gravidade específica dos ovos (m/v) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos.

A tabela 12 apresenta os parâmetros de percentual do peso de casca dos ovos (%) obtidos nos diferentes tratamentos. Observamos que ao final do primeiro ciclo houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de casca dos tratamentos 10 mg de FB_1/kg + 50 μg de AFB_1/kg (média de 8,13 %) e 200 μg de AFB_1/kg (média de 8,18 %), em relação ao tratamento 10 mg de FB_1/kg (média 7,88 %), mas não em relação ao tratamento controle (média 8,07 %). Ao final do 2º ciclo, o tratamento 10 mg de FB_1/kg + 50 μg de AFB_1/kg atinge a média mais alta (média de 8,60 %) durante todo o experimento, mas sem apresentar diferença estatística ($p > 0,05$).

Washburn et al. (1985) observaram que a dose de 5.000 $\mu g/kg$ de aflatoxinas (AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2) causou um aumento significativo na porcentagem do peso de casca de ovos de galinhas poedeiras, por outro lado, as doses de 100 a 500 μg de AFB_1/kg não causaram efeito de tratamento nessas aves (OLIVEIRA et al.,

2001). Huff et al. (1975) também não detectaram alterações significativas na porcentagem do peso de casca de ovos de galinhas poedeiras tratadas com doses de 1.250 a 10.000 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas ($\text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$).

Tabela 12 – Percentual de casca dos ovos (%) de acordo com os diferentes tratamentos ¹ – Pirassununga – 2002

Níveis dos Tratamentos		Ciclos				
AFB_1	FB_1	1	2	3	4	5
0	0	$8,07 \pm 0,11^{*ab}$	$8,19 \pm 0,22^a$	$8,08 \pm 0,21^a$	$8,27 \pm 0,19^a$	$8,28 \pm 0,22^{ab}$
0	10	$7,88 \pm 0,10^a$	$8,28 \pm 0,24^a$	$7,93 \pm 0,14^a$	$7,98 \pm 0,16^b$	$7,87 \pm 0,16^{ab}$
50	0	$7,98 \pm 0,04^{ab}$	$8,17 \pm 0,08^a$	$7,99 \pm 0,24^a$	$8,06 \pm 0,07^{ab}$	$7,77 \pm 0,22^a$
50	10	$8,13 \pm 0,09^b$	$8,60 \pm 0,71^a$	$7,89 \pm 0,14^a$	$8,02 \pm 0,27^{ab}$	$8,07 \pm 0,30^{ab}$
200	0	$8,18 \pm 0,12^b$	$8,24 \pm 0,11^a$	$7,87 \pm 0,17^a$	$8,10 \pm 0,11^{ab}$	$8,17 \pm 0,19^{ab}$
200	10	$8,06 \pm 0,07^{ab}$	$8,03 \pm 0,08^a$	$7,95 \pm 0,11^a$	$7,95 \pm 0,05^{ab}$	$8,16 \pm 0,21^b$

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$);

¹ Resultados expressos em médias $\pm$ desvio padrão, para 4 repetições com 12 aves cada.

No final do 4^o ciclo observamos que o tratamento 10 mg de FB_1/kg (média de 7,98%) apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na porcentagem do peso de casca, em relação ao grupo controle (média 8,27 de %). Essa tendência manteve-se ao final do 5^o ciclo de produção, mas sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

A figura 20 apresenta a evolução dos valores de porcentagem de peso de casca (%) nos 5 ciclos experimentais.

Figura 20 – Evolução dos valores de porcentagem de casca (%) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos.

Ao final do 5º ciclo, o tratamento 10 mg de FB₁/kg + 200 µg de AFB₁/kg (média de 8,16 %) apresentou uma porcentagem de peso de casca significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao tratamento 50 µg de AFB₁/kg (média de 7,77 %), mas não em relação ao grupo controle (média de 8,28%). Estes dados não estão de acordo com o experimento realizado por Oliveira et al. (2002). Ao fornecerem as doses de 50 ou 100 µg de AFB₁/kg para codornas, durante 6 ciclos, foi constatado que o percentual de peso de casa dos ovos dessas aves aumentou significativamente ao final do período experimental, sendo que apenas a dose de 25 µg de AFB₁/kg não foi suficiente para causar efeito de tratamento.

Segundo Leeson et al. (1995) e Washburn et al. (1985), a AFB₁ interfere diretamente na síntese de proteínas, principalmente nas células hepáticas, e por consequência isso poderia provocar a diminuição da formação de precursores da gema, levando a uma maior proporção de casca nos ovos.

Podemos observar na tabela 13 os valores de Unidades Haugh obtidos durante o período experimental. Nota-se que os valores médios encontrados oscilaram de uma maneira muito próxima entre os 5 ciclos, não apresentando nenhum resultado estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Todos os tratamentos sofreram uma queda brusca em seus valores entre o 2° e o 3° ciclo experimental. Podemos visualizar melhor a evolução dos valores de Unidades Haugh na figura 21.

Tabela 13 – Unidades Haugh de acordo com os diferentes tratamentos ¹ – Pirassununga – 2002

Níveis dos Tratamentos		Ciclos				
AFB ₁	FB ₁	1	2	3	4	5
0	0	89,24 ± 1,74 ^{*a}	88,00 ± 1,29 ^a	83,47 ± 1,81 ^a	89,28 ± 1,57 ^a	88,79 ± 2,02 ^a
0	10	90,42 ± 1,45 ^a	88,94 ± 3,43 ^a	82,07 ± 1,94 ^a	88,75 ± 2,02 ^a	84,92 ± 2,21 ^a
50	0	90,93 ± 1,63 ^a	87,45 ± 2,24 ^a	81,64 ± 1,16 ^a	89,10 ± 2,19 ^a	85,36 ± 2,50 ^a
50	10	89,98 ± 2,01 ^a	88,92 ± 1,40 ^a	82,88 ± 2,09 ^a	89,05 ± 0,99 ^a	85,86 ± 2,66 ^a
200	0	89,49 ± 1,43 ^a	88,22 ± 0,96 ^a	82,47 ± 2,37 ^a	88,66 ± 1,59 ^a	85,02 ± 1,97 ^a
200	10	89,35 ± 2,74 ^a	86,91 ± 0,94 ^a	85,54 ± 2,79 ^a	88,87 ± 1,00 ^a	85,08 ± 1,27 ^a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$);

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 12 aves cada.

Somente no final do 5° ciclo percebe-se que o tratamento controle manteve-se mais alto em relação a todos os outros tratamentos, mas sem diferença significativa ($p > 0,05$). Os dados apresentados nesse trabalho indicam que os níveis de FB₁ e AFB₁ utilizados não alteraram significativamente os valores de Unidades Haugh, o que está de acordo com Oliveira et al. (2002), que utilizaram as doses de 25, 50 ou 100 µg de AFB₁/kg em codornas.

Segundo Willians (1992), com a exceção de algumas doenças aviárias, os fatores mais importantes que podem causar alterações nos valores de Unidades Haugh, são a idade das aves em postura e a relação tempo X temperatura de armazenamento dos ovos.

Figura 21 – Evolução dos valores de Unidades Haugh nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos.

4.3 PESO DAS AVES

O peso médio das aves durante os 5 ciclos de experimento pode ser observado na tabela 14. O grupo controle foi o único a ganhar peso continuamente, até o último ciclo de postura. Pode-se observar que houve um decréscimo no peso médio de todos os tratamentos no ciclo 3, com exceção do grupo controle, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). A figura 22 mostra a

evolução dos valores dos pesos das aves nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos.

Tabela 14 – Peso das aves (g) de acordo com os diferentes tratamentos ¹ – Pirassununga – 2002

Níveis dos Tratamentos		Ciclos					
AFB ₁	FB ₁	0*	1	2	3	4	5
0	0	166,35 ± 7,06 ^{a**}	172,5 ± 4,75 ^a	173,85 ± 4,34 ^a	173,26 ± 6,92 ^a	173,22 ± 8,49 ^a	182,9 ± 6,27 ^a
0	10	166,56 ± 5,69 ^a	171,45 ± 5,64 ^a	171,66 ± 6,66 ^a	169,79 ± 6,65 ^a	172,91 ± 5,83 ^a	176,35 ± 4,91 ^b
50	0	165 ± 2,57 ^a	168,64 ± 3,54 ^a	173,25 ± 3,01 ^a	171,82 ± 3,63 ^a	174,58 ± 5,13 ^a	179,13 ± 3,32 ^{ab}
50	10	164,37 ± 1,38 ^a	166,77 ± 2,02 ^a	168,85 ± 2,16 ^a	166,07 ± 4,82 ^a	168,63 ± 0,85 ^a	168,25 ± 6,08 ^{ac}
200	0	162,29 ± 2,49 ^a	166,77 ± 2,46 ^a	169,76 ± 6,51 ^a	168,44 ± 6,82 ^a	167,37 ± 4,03 ^a	170,39 ± 5,51 ^c
200	10	163,95 ± 4,12 ^a	165,41 ± 7,36 ^a	170,31 ± 5,22 ^a	166,56 ± 4,57 ^a	169,68 ± 6,44 ^a	172,18 ± 8,31 ^{ac}

* Dia anterior ao início do período de intoxicação;

** Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$);

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 12 aves cada.

No 5^o ciclo de postura houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo que recebeu em sua dieta 10 mg/kg de FB₁, e também no grupo de 200 µg/kg de AFB₁ ($p < 0,05$). Codornas alimentadas com 1.600 µg de AFB₁/kg em sua ração por 5 semanas, tiveram diminuição de peso significativa (PARLAT et al., 1999). Johri et al. (1990), Doerr e Ottinger (1980) e Chang e Hamilton (1982) também observaram a diminuição significativa no peso de codornas, que receberam em sua alimentação doses de 500 a 10.000 µg/kg de aflatoxinas (sem a especificação das frações de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂). Entretanto, o resultado do efeito de 200 µg de AFB₁/kg não está de acordo com os resultados obtidos por Bintvihok et al.

(1993), onde os níveis entre 50 e 200 $\mu\text{g/kg}$ de AFB_1 não foram suficientes para causar uma diminuição significativa no peso das aves. Oliveira et al. (2002) também não observaram diminuição significativa no peso das aves que receberam em sua alimentação as doses de 25, 50 ou 100 $\mu\text{g/kg}$ de AFB_1 por 168 dias.

Figura 22 – Evolução dos valores dos pesos das aves (g) nos 5 ciclos de postura, de acordo com os tratamentos.

O efeito da dose de 10 mg de FB_1/kg ($p < 0,05$), na diminuição do peso das aves ao final do 5º ciclo, está de acordo com os resultados obtidos por Espada et al. (1994), que utilizou a FB_1 na mesma dose, por um período de 35 dias em frangos. Bailly et al. (2001) observaram uma diminuição significativa no peso de patos que receberam oralmente as doses de 5 a 45 mg/kg de FB_1 durante 12 dias. Ledoux et al. (1996) também observaram a diminuição significativa de peso em perus que receberam em sua alimentação as doses de 325 ou 475 mg de FB_1/kg . Henry e Wyatt (2001) e Li et al. (1999) forneceram doses que variavam de 20 a 200 mg de

FB₁/kg para frangos durante 21 dias, não foi constatada uma diminuição significativa no peso das aves ($p > 0,05$). É importante lembrar que os efeitos das micotoxinas, inclusive das fumonisinas, são na maioria das vezes dependentes de sua dose, duração de exposição à micotoxina, idade e susceptibilidade da espécie animal (D'MELLO et al., 1999).

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos de associação entre a AFB₁ e a FB₁ foram detectados nos parâmetros de consumo de ração, peso dos ovos, gravidade específica dos ovos e na porcentagem do peso de casca. Em alguns casos, os tratamentos de interação foram significativos ($p < 0,05$), mas não foi possível detectar diferença significativa em relação aos tratamentos das micotoxinas, quando administradas isoladamente.

A toxigenicidade das aflatoxinas é consideravelmente maior em relação às fumonisinas, conforme observamos a classificação adotada pela WHO-IARC (1993). Devido a esse maior efeito toxigênico, as perdas ocasionadas pela FB₁ poderiam estar encobertas pela ação da AFB₁, não permitindo uma visualização tão evidente de seus efeitos nas aves.

Sabe-se que as fumonisinas são muito pouco absorvidas e rapidamente excretadas *in vivo* (ENONGENE et al., 2000). As aflatoxinas levam um maior tempo para serem eliminadas do organismo, o fato das aflatoxinas e seus metabólitos se acumularem em alguns tecidos, como o tecido hepático, renal e tecido adiposo, contribuem para que a sua eliminação seja mais lenta (HARLAND; CARDEILHAC, 1975). Devido a esse maior tempo para a sua eliminação, podemos supor que as

aflatoxinas, por permanecerem um maior tempo presentes no organismo, causariam efeitos mais acentuados em relação às fumonisinas, encobrendo os efeitos dessas substâncias que são mais rapidamente eliminadas do organismo.

De acordo com a literatura disponível, os fungos do gênero *Aspergillus spp* e *Fusarium spp* são facilmente encontrados em nosso país, devido às condições propícias para a sua proliferação. As técnicas inadequadas de colheita, secagem, transporte e armazenamento de nossos produtos agrícolas agravam mais ainda o problema da proliferação desses fungos e a sua produção de micotoxinas.

Com os resultados obtidos nesse estudo, podemos afirmar que o limite máximo de 50 µg/kg de AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂ estabelecido pelo o Ministério da Agricultura (BRASIL, 1988), não pode ser considerado seguro na criação de codornas, uma vez que esse nível acarretou alterações significativas nos parâmetros de desempenho e qualidade dos ovos das codornas. Deve-se destacar os efeitos de associação entre a AFB₁ e a FB₁ detectados em alguns parâmetros analisados nesse trabalho, o que demonstra a necessidade de se adotar limites máximos rigorosos dessas substâncias, com o intuito de evitar um efeito associativo entre elas.

Não há legislação disponível regulamentando um limite máximo de fumonisinas na alimentação humana ou animal em nosso país, ou qualquer outro lugar do mundo. O Food and Drug Administration (2001), estabeleceu, a título de recomendação, o nível máximo de 50 mg/kg de fumonisinas totais na alimentação das aves. Os dados obtidos nesse trabalho indicam que a FB₁ (10 mg FB₁/kg) também causa perdas para os criadores de codornas, portanto, é preciso regulamentar um nível máximo seguro dessa toxina, na alimentação das aves.

A adoção de técnicas agrícolas adequadas e a aquisição de rações de boa procedência são duas maneiras que o criador de codornas pode adotar, com a finalidade de evitar perdas econômicas geradas pela queda de produtividade das aves, causadas pela presença de micotoxinas em sua alimentação.

5 CONCLUSÕES

- 1) As codornas alimentadas com 10 mg de FB₁/kg apresentaram uma diminuição significativa na produção de ovos ($p < 0,05$), ao final do 3^o, 4^o e 5^o ciclos, e uma diminuição no consumo de ração ($p < 0,05$), ao final do 4^o e 5^o ciclos experimentais;
- 2) O peso médio dos ovos foi significativamente menor ($p < 0,05$), nas aves alimentadas com 10 mg de FB₁/kg, ao final do 5^o período experimental;
- 3) As codornas alimentadas com 10 mg de FB₁/kg, ou com 200 µg/kg de AFB₁, apresentaram uma diminuição de peso vivo significativo ($p < 0,05$) ao final do 5^o ciclo de produção;
- 4) Os níveis de 50 ou 200 µg/kg de AFB₁ provocaram uma diminuição significativa de consumo de ração e no peso médio dos ovos ($p < 0,05$), ao final do 5^o período experimental;
- 5) A associação de 10 mg de FB₁/kg com 50 µg/kg de AFB₁ provocou um efeito de interação significativo ($p < 0,05$), ao diminuir o consumo de ração de codornas, ao final do 1^o, 2^o e 5^o ciclos experimentais;
- 6) Do mesmo modo, o peso médio dos ovos foi menor ($p < 0,05$) ao final do 5^o ciclo, devido à interação dos níveis de 10 mg de FB₁/kg com 50 µg/kg de AFB₁;
- 7) Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os valores de conversão alimentar, e também nos valores de Unidades Haugh;

- 8) A gravidade específica dos ovos foi menor ($p < 0,05$) ao final do 5º ciclo, devido ao efeito de interação dos níveis de 10 mg de FB_1 /kg com 200 μ g/kg de AFB_1 ;
- 9) Houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na porcentagem do peso de casca, nos ovos das codornas tratadas com 10 mg de FB_1 /kg ao final do 4º ciclo;
- 10) Por outro lado, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem do peso de casca, nos ovos das codornas tratadas com 200 μ g/kg de AFB_1 e 10 mg/kg de FB_1 + 50 μ g/kg de AFB_1 ao final do 1º ciclo, e ao final do 5º ciclo o aumento na porcentagem de peso de casca ($p < 0,05$) ocorreu nas aves tratadas com 10 mg/kg de FB_1 + 200 μ g/kg de AFB_1 ;
- 11) Os resultados obtidos no trabalho demonstram que as codornas são bastante susceptíveis aos efeitos da FB_1 , mesmo nos níveis que em que a FB_1 é encontrada em condições de campo (em torno de 10,0 mg/kg), o que evidencia a necessidade da adoção de limites de tolerância para rações desta espécie;
- 12) Fica evidente que os efeitos da FB_1 e AFB_1 , isoladas ou associadas, nos níveis testados nesse experimento, podem causar prejuízos aos produtores de ovos de codornas, indicando que o limite estabelecido pelo Ministério da Agricultura para aflatoxinas totais (50 μ g/kg) em rações de consumo animal não deve ser considerado seguro para a alimentação de codornas em postura.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L. M. V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 2000.
- ALMEIDA, R. M. A.; CORRÊA, B.; XAVIER, J. G.; MALLOZZI, M. A. B.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Acute effect of aflatoxin B₁ on different inbred mouse strains II. **Mycopathologia**, v. 133, n. 1, p. 23-29, 1996.
- ASPLIN, F. D.; CARNAGHAN, R. B. A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with especial reference to their effect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**, v. 73, p. 1215-1219, 1961.
- BAILLY, J. D.; BENARD, G.; JOUGLAR, J. Y.; DURAND, S.; GUERRE, P. Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ in ducks. **Toxicology**, v. 163, n. 1, p. 11-22, 2001.
- BERMUDEZ, A. J.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, 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.; VLEGGAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society - Chemical Communications**, 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.
- BINTVIHOK, A.; THIENGININ, S.; PATCHIMASIRI, T.; THUMMABOOD, S.; SHOYA, S.; OGURA, Y.; KUMAGAI, S.; DOI, K.; INKANINUN, P.; POOMVISES, P. Toxic effects of dietary aflatoxin and its residue in tissues and eggs in laying quails. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE WORLD ASSOCIATION OF VETERINARY FOOD HYGIENISTS, 11., 1993, Bangkok. **Proceedings**...p. 299-307.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA n °7 de 9 de Nov. de 1988. **Diário Oficial da União**, 9 nov. 1988. Sec. I, p. 21.968.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n ° 274, da ANVISA, de 15 de out. 2002. **Diário Oficial da União**, 16 de out. 2002.

BROOMHEAD, J. N.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; ROTTINGHAUS, G. E. Chronic effects of fumonisin B₁ in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. **Poultry Science**, v. 81, n. 1, p. 56-61, 2002.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. A. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CARLSON, D. B.; WILLIAMS, D. E.; SPITSBERGEN, J. M.; ROSS, P. F.; BACON, C. W.; MEREDITH, F. I.; RILEY, R. T. Fumonisin B₁ promotes aflatoxin B₁ and N-metil-nitro-nitrosoguanidina-initiated liver tumors in Rainbow Trout. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 172, n. 1, p. 29-36, 2001.

CARNAGHAN, R. B. A.; HARTLEY, R. D.; O'KELLY, J. Toxicity and fluorescence properties of aflatoxins. **Nature**, v. 200, n. 4911, p. 1101-1102, 1963.

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

CHANG, C. F.; HAMILTON, P. B. Experimental aflatoxicosis in young japanese quail. **Poultry Science**, v. 61, n. 5, p. 869-874, 1982.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, v. 259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 103-143.

D'MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Aniaml Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3-4, p. 183-205, 1999.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Vet. Human Toxicology**, v. 36, n. 6, p. 548-555, 1994.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; ALMEIDA, C. A. A.; STEFANON, E. B.; FONTANA, F. Z.; MILBRADT, E. L. Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 111-118, 2002.

DOERR, J. A.; OTTINGER, M. A. Delayed reproductive development resulting from aflatoxicosis in juvenile Japanese quail. **Poultry Science**, v. 59, n. 9, p. 1995-2001, 1980.

DUPUY, J.; BARS, P. LE; BOUDRA, H.; BARS, J. LE. Thermostability of Fumonisin B₁, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2864-2867, 1993.

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.

ENONGENE, E. N.; SHARMA, R. P.; BHANDARI, K. A.; RILEY, R. T. Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 8, p. 793-799, 2000.

ESPADA, Y.; GOPEGUI, R. R.; CUADRADAS, C.; CABAÑES, F. J. Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. **Avian Diseases**, v. 38, n. 3, 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.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Center for Veterinary Medicine. **Guidance for industry: fumonisin levels in human foods and animal feeds**. FDA, Washington D.C.: FDA, 2001.

FONSECA, H. Legislação sobre micotoxinas. Piracicaba, 2003. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>>. Acesso em: 30 mar. 2003.

GELDERBLOM, W. C. A.; LEBEPE-MAZUR, S.; SNIJMAN, P. W.; ABEL, S.; SWANEVELDER, S.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O. Toxicological effects in rats chronically fed low dietary levels of fumonisin B₁. **Toxicology**, v. 161, n. 1-2, p. 39-51, 2001.

GELDERBLOM, W. C. A.; SMUTS, C. M.; ABEL, S.; SNYMAN, S. D.; CAWOOD, M. E.; WESTHUIZEM, L.; SWANEVELDER, S. Effect of fumonisin B₁ on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 361-369, 1996.

GQALENI, N.; SMITH, J. E.; LACEY, J.; GETTINBY, G. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1048-1053, 1997.

GRIMES, J. L.; ELEAZER, T. H.; HILL, J. E. Paralysis of undetermined origin in Bobwhite quail. **Avian Diseases**, v. 37, n. 2, p. 582-584, 1993.

HAMILTON, R. M. G. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. **Poultry Science**, v. 61, n. 10, p. 2022-2039, 1982.

HARLAND, E. C.; CARDEILHAC, P. T. Excretion of carbon-14-labeled aflatoxin B₁ via bile, urine, and intestinal contents of the chicken. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 909-912, 1975.

HARVEY, R. B.; KUBENA, L. F.; ROTTINGHAUS, G. E.; TURK, J. R.; CASPER, H. H.; BUCKLEY, T. S. Moniliformin from *Fusarium fujikuroi* culture material and deoxynivalenol from naturally contaminated wheat incorporated into diets of broiler chicks. **Avian Diseases**, v. 41, n. 3, p. 957-963, 1997.

HENRY, M. H.; WYATT, R. D. The toxicity of fumonisin B₁, B₂ and B₃, individually and in combination, in chicken embryos. **Poultry Science**, v. 80, n. 4, p. 401-407, 2001.

HENRY, M. H.; WYATT, R. D.; FLETCHER, O. J. The toxicity of purified fumonisin B₁ in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, n. 10, p. 1378-1384, 2000.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food and Additives Contaminants**, v. 13, n. 2, p. 173-183, 1996.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 67A-76A, 1982.

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.

HUFF, W. E.; WYATT, R. D.; HAMILTON, P. B. Effects of dietary aflatoxin on certain egg yolk parameters. **Poultry Science**, v. 54, n. 6, p. 2014-2018, 1975.

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

JOHRI, T. S.; AGRAWAL, R.; SADAGOPAN, V. R. Effect of low dietary levels of aflatoxin on laying quails (*Coturnix coturnix japonica*) and their response to dietary modifications. **Indian Journal of Animal Science**, v. 60, n. 3, p. 355-359, 1990.

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.

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.

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 a.

KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; KAMPS-HOLTZAPPLE, C.; HARVEY, R. B.; ELISSALDE, M. H.; ROTTINGHAUS, G. E. Influence of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material, and T-2 toxin on turkey poults. **Poultry Science**, v. 74, n. 2, p. 306-313, 1995b.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; BUCKLEY, T. S.; BAILEY, R. H.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of long-term feeding of diets containing monififormin, 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.

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. **Poultry Science**, v. 76, n. 2, p. 265-270, 1997.

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 poults during aflatoxicosis. **Poultry Science**, v. 70, n. 8, p. 1823-1830, 1991.

LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, in the young turkey poult. **Poultry Science**, v. 75, n. 12, p. 1472-1478, 1996.

LEDOUX, D. R.; BROWN, T. P.; WEIBKING, T. S.; ROTTINGHAUS, G. E. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. 3, p. 330-333, 1992.

LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995. p. 352.

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

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.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut production by *Aspergillus spp.* **Phytopatology**, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

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.

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. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium**, v. 84, n. 27, p. 62S-76S, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of poultry**. 9 ed. Washington D.C.: National Academy of Sciences , 1994. p. 44-45.

NORRED, W. P.; VOSS, K. A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 522-527, 1994.

NORRED, W. P.; WANG, E.; YOO, H.; RILEY, R. T.; MERRIL JR., A. H. *In vitro* toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. **Mycopathologia**, v. 117, n. 1-2, p. 73-78, 1992.

OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, R.; CORRÊA, B.; KOBASHIGAWA, E.; REIS, T. A.; FAGUNDES, A. C. A.; LIMA, F. R. Produção e qualidade dos 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, C. A. F.; REIS, T. A.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J. L.; CORRÊA, B. Lesões hepáticas em galinhas poedeiras cronicamente expostas às rações contendo diferentes níveis de aflatoxina B₁. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 66, n. 2, p. 39-43, 1999.

OLIVEIRA, C. A. F.; ROSMANINHO, J. F.; BUTKERAITIS, P.; CORRÊA, B.; REIS, T. A.; GUERRA, J. L.; ALBUQUERQUE, R.; MORO, M. E. G. Effect of low levels of dietary Aflatoxin B₁ on laying japanese quail. **Poultry Science**, v. 81, n. 7, p. 976-980, 2002.

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

OPAS. **Micotoxinas**. Criterios de Salud Ambiental, 11. Whashington, 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 fumonisins in freshly harvested and stored hybrid mayze. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 1, p. 75-87, 2000.

OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1, p. 89-94, 1990.

PARLAT, S. S.; YILDIZ, A. Ö.; OGUZ, H. Effect of clinoptilolite on performance of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during experimental aflatoxicosis. **British Poultry Science**, v. 40, n. 4, p. 495-500, 1999.

PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 3964-3967, 1992.

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. 1-37, 1999.

POZZI, C. R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CHACON-RECHE, N. O.; MEIRELLES, M. C. A. Postharvest and stores corn in Brasil: 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.

QURESHI, M. A.; BRAKE, J.; HAMILTON, P. B.; HAGLER JR, W. M.; NESHEIM, S. Dietary exposure of broiler breeders to aflatoxin results in immune dysfunction in progeny chicks. **Poultry Science**, v. 77, n. 6, p. 812-819, 1998.

QURESHI, M. A.; GARLICH, J. D.; HAGLER, W. M.; Fusarium toxins in chickens alter several performance and immunologic parameters. **Poultry Science**, v. 72, p. 120, 1993. Supplement. 1.

REVISTA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA. São Paulo: Editora Escala, ano 1, n. 4, p. 6-33, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of mycotoxins and mycotoxin-producing fungi in Latin America. In: KOE, W. J.; SAMSON, R. A.; VAN EGMOND, H. P.; GILBERT, J.; SABINO, M. (Ed.). **Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium**. Wageningen, The Netherlands: W.J. de Koe, 2001. p. 309-320.

ROSS, P. F.; NELSON, P. E.; RICHARD, I. D.; OSWEILLER, G. D.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; WILSON, T. M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 10; p. 3225-3226, 1990.

ROSS, P. F.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; OSWEILER, G. D.; WILSON, T. M.; OWENS, D. L.; NELSON, H. A.; RICHARD, J. L. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, v. 114, n. 3, p. 129-135, 1991.

ROTTINGHAUS, G. E.; OLSEN, B.; OSWEILER, G. D. Rapid screening method for aflatoxin B₁, zearalenone, ochratoxin A, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and vomitoxin. In: PROCEEDINGS OF THE 25TH ANIMAL AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS. Nashville: TN, 1982. p. 477-484.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation, and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

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, n. 1-2, p. 81-85, 1988.

SAS Institute. **SAS® User's Guide**: statistics. Cary, NC., 1992.

SAWHNEY, D. S.; VADEHRA, D. V.; BAKER, R. C. Aflatoxicosis in the laying japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Poultry Science**, v. 52, n. 2; p. 465-473, 1973.

SCHMELZ, E. M.; DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; ROBERTS, P. C.; KOZUTSUMI, Y.; KAWASAKI, T.; MERRIL, A. H. Induction of apoptosis by fumonisin B₁ in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 148, n. 2, p. 252-260, 1998.

SCOTT, P. M. Natural poisons. In: HELRICH, K. **Official methods of analysis of the association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. v. 2, p. 1184-1213.

SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisin in mouldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1331-1334, 1999.

SHEPARD, G. S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 185, n. 1, p. 31-39, 1998.

SHEPARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. G. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, 1990.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxins, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

SYDENHAM, E. W.; SHEPARD, G. S.; STOCKENSTROÖM, S.; SNIJAM, P. W. Liquid collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 79, p. 688-696, 1996.

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.

TROPICAL DEVELOPMENT AND RESEARCH INSTITUTE. **Mycotoxin training manual**. London: TDRI, 1984.

TERAO, K.; UENO, Y. Morphological and functional damage to cells and tissues. In: URAGUCHI, K.; YAMAZAKI, M. **Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins**. New York: Wiley, 1978. p. 189-210.

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.

VIQUEZ, O. M.; PERES, M. E. C.; SHELBY, R. A.; BROWN, G. Aflatoxin contamination in corn samples due to environmental conditions, aflatoxin-producing strains, and nutrients in grain grown in Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 2551-2555, 1994.

WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; MERRILL, A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 22, p. 14486-14490, 1991.

WASHBURN, K. W.; WYATT, R. D.; POTTS, P. L.; LANZA, G. M. Effects and mechanism of aflatoxin on variation in shell strength. **Poultry Science**, v. 64, n. 7, p. 1302-1305, 1985.

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.

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, n. 3, p. 456-466, 1993.

WILLIAMS, K. C. Some factors affecting albumen quality with particular reference to Haugh unit score. **World's Poultry Science Journal**, v. 48, n. 1, p. 5-16, 1992.

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.

WHO-IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, 1993. v. 56, p. 245; 445.

YEUNG, J. M.; WANG, H. Y.; PRELUSKY, D. A. Fumonisin induces protein kinase C translocation via direct interaction with diacylglycerol binding site. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 178-184, 1996.

YOO, H. S.; NORRED, W. P.; SHOWKER, J.; RILEY, R. T. Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factor in fumonisin-induced cytotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 138, n. 2, p. 211-218, 1996.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1626-1629, 1994.