PAULA BUTKERAITIS

Efeitos da fumonisina B₁ em codornas poedeiras
(*Coturnix coturnix japonica*)

Pirassununga

2003

PAULA BUTKERAITIS

Efeitos da fumonisina B₁ em codornas poedeiras
(*Coturnix coturnix japonica*)

Dissertação apresentada para obtenção do
Título de Mestre, em junho 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

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1244 Butkeraitis, Paula
FMVZ Efeitos da fumonisina B₁ em codornas poedeiras
(*Coturnix coturnix japonica*) / Paula Butkeraitis. –
Pirassununga : P. Butkeraitis, 2003.
108 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. Fumonisina. 2. Codornas. 3. Toxicidade em
animal. 4. Ovos (qualidade). I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: BUTKERAITIS, Paula

Título: Efeitos da fumonisina B₁ em codornas poedeiras (*Coturnix coturnix japonica*)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a 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: _____

*Aos meus pais, Hugo e Deise,
aos meus irmãos, Renata e Maurício
e aos meus avós*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, pela confiança, incentivo e orientação neste trabalho.

Ao Dr. David R. Ledoux pela atenção, sempre disposto a ajudar e a ensinar.

Aos Professores Ricardo de Albuquerque, Douglas Emygdio de Farias, Félix Ribeiro de Lima e Benedito Corrêa pelas valiosas contribuições.

Ao Dr. George E. Rottinghaus, que enviou o material de cultura de *Fusarium moniliforme*, contendo FB₁, importante para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. José Luiz Guerra pelo auxílio nas análises histopatológicas.

Aos meus pais, pelo incentivo, amor e dedicação. Muito obrigada por tudo o que fizeram para que eu chegasse até aqui. Eu amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Renata e Maurício, pela amizade, carinho e colaboração.

Aos meus amigos Ricardo Muta Hotta, Josué Fontes Rosmaninho, Rony Ogydo, Otaviano Carneiro da Cunha Neto e Amaury Camilo Valinote pela amizade, carinho e por toda colaboração durante a execução desse projeto. Sem vocês essa pesquisa não estaria completa.

Aos meus amigos Ricardo Yuji Sado, Ricardo Pimenta Bertolla, Fernanda Altieri Ferreira, Ingrid Eder, Leandro S. Blasques, Gustavo A. K. A. Nogueira, Fábio M. Kaneto, Nicole A. Pereira e Augusto M. Horiuti pela amizade e apoio.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP.

A Cristiane Rosa Bueno Lopes pela amizade e colaboração.

Aos funcionários do Setor de Avicultura, Cláudio, Edinho e China, por toda a colaboração durante o desenvolvimento do projeto.

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1.2 FUMONISINAS.....	21
1.2.1 Métodos Analíticos para Fumonisinas	24
1.2.2 Ocorrência das Fumonisinas	26
1.3 MECANISMO DE AÇÃO TÓXICA DAS FUMONISINAS	27
1.4 TOXIDEZ DAS FUMONISINAS	34
1.4.1 Eqüinos.....	34
1.4.2 Suínos.....	36
1.4.3 Animais de laboratório.....	37
1.4.4 Bovinos	39
1.4.5 Seres Humanos.....	40
1.4.6 Aves	41
2 OBJETIVOS	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES	50
3.2 PREPARO DA FB ₁	52
3.3 PREPARO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS	54
3.3.1 Extração	55

3.3.2 Purificação	56
3.3.3 Quantificação	56
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	58
3.5 VARIÁVEIS ESTUDADAS NO EXPERIMENTO	59
3.5.1 Índices de produtividade.....	59
3.5.2 Qualidade dos ovos.....	60
3.5.3 Análises séricas	62
3.5.4 Análises histopatológicas e pesos relativos de vísceras	63
3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 ÍNDICES DE PRODUTIVIDADE	65
4.2 ÍNDICES DE QUALIDADE DOS OVOS	73
4.3 PESO RELATIVO DE VÍSCERAS.....	77
4.4 ÍNDICES DO HEMOGRAMA.....	80
4.5 ÍNDICES DO LEUCOGRAMA	86
4.6 ÍNDICES DE BIOQUÍMICA SÉRICA	89
4.7 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	96
5 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química das principais fumonisinas.....	23
Figura 2 – Estrutura molecular das fumonisinas B ₁ e B ₂ , esfinganina e esfingosina.....	28
Figura 3 - Mecanismo proposto de inibição da biossíntese de esfingolípídeos pelas fumonisinas.	30
Figura 4 - Baterias metálicas utilizadas no experimento e recipientes para armazenamento de ração.....	52
Figura 5 - Material de cultura de <i>Fusarium moniliforme</i>	53
Figura 6 - Misturador horizontal/helicoidal.	55
Figura 7 - Bebedouro do tipo “nipple”.	58
Figura 8 - Mensuração do peso dos ovos.	59
Figura 9 - Avaliação do consumo semanal de ração.	60
Figura 10 - Mensuração da altura do albúmen.	61
Figura 11 - Método de flutuação para determinação da densidade relativa dos ovos.....	61
Figura 12 - Evolução da porcentagem de produção de ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração.	66
Figura 13 - Evolução do consumo de ração durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração.....	67
Figura 14 - Evolução dos valores de conversão alimentar (CA) durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração.....	69
Figura 15 - Evolução do peso corporal durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração.	70
Figura 16 - Evolução do peso dos ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração.	72
Figura 17 - Evolução dos valores de densidade relativa dos ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração.....	74

Figura 18 - Evolução dos valores de unidade Haugh durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração.....	75
Figura 19 - Evolução dos valores de peso de casca dos ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração.	76
Figura 20 - Evolução dos valores de percentual de casca dos ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração.....	76
Figura 21 – Aspecto externo das cascas dos ovos provenientes dos grupos controle, 10 mg/kg, 50 mg/kg e 250 mg/kg.....	77
Figura 22 - Efeitos da fumonisina B ₁ sobre o peso relativo de fígado.....	78
Figura 23 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre o número de hemácias.	82
Figura 24 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre a porcentagem do hematócrito.....	83
Figura 25 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre os valores de concentração hemoglobina.	84
Figura 26 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre o índice VCM.	85
Figura 27 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre o índice HCM.	86
Figura 28 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre o número de leucócitos.....	87
Figura 29 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre a porcentagem de linfócitos.....	88
Figura 30 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre a porcentagem de heterófilos.....	89
Figura 31 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre a concentração sérica de proteínas totais.	91
Figura 32 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre a atividade da enzima sérica AST.	93
Figura 33 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre a atividade da enzima sérica GGT.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da ração basal utilizada na preparação de todas as dietas experimentais.	51
Tabela 2 - Índices de produtividade obtidos nos diferentes tratamentos, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração fornecida às aves ¹ – Pirassununga – 2003.	65
Tabela 3 - Parâmetros de qualidade dos ovos obtidos nos diferentes tratamentos, de acordo com a concentração de FB ₁ na ração fornecida às aves ¹ – Pirassununga – 2003..	73
Tabela 4 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre o peso relativo do fígado, rim e coração de codornas ¹ – Pirassununga – 2003.	78
Tabela 5 - Efeitos da fumonisina B ₁ sobre o número de hemácias, hematócrito e hemoglobina de codornas ¹ – Pirassununga – 2003.....	81
Tabela 6 - Efeitos da fumonisina B ₁ sobre os índices VCM, HCM e CHCM de codornas ¹ – Pirassununga – 2003.....	81
Tabela 7 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre o número de leucócitos, a porcentagem de linfócitos, monócitos e heterófilos de codornas ¹ – Pirassununga – 2002.....	86
Tabela 8 - Efeitos tóxicos da fumonisina B ₁ sobre os valores de proteína total, albumina, AST, GGT e ácido úrico de codornas ¹ – Pirassununga – 2003.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aa	Atividade de água
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CCD	Cromatografia de camada delgada
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
FA	Fosfatase alcalina
FB ₁	Fumonisina B ₁
FB ₂	Fumonisina B ₂
FB ₃	Fumonisina B ₃
FCM	Material de cultura de <i>Fusarium</i> spp.
GC/MS	Cromatografia gasosa/espectrômetro de massa
GGT	Gama glutamil transferase
HCM	Hemoglobina corpuscular média
LDH	Lactato desidrogenase
LEME	Leucoencefalomalácia eqüina
NLW	Nicholas Large White
OPA	O-ftaldialdeído
PPE	Edema pulmonar suíno
SA	Esfinganina
SAX	Coluna de troca iônica forte
SO	Esfingosina
SPE	Extração em fase sólida
UH	Unidade Haugh
VCM	Volume corpuscular médio

RESUMO

BUTKERAITIS, P. **Efeitos da fumonisina B₁ em codornas poedeiras (*Coturnix coturnix japonica*)**. [Fumonisin B₁ effects on laying japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)]. 2003. 108 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da fumonisina B₁ (FB₁) sobre a produtividade e a qualidade dos ovos de codornas em início de postura. Para esse fim, 128 aves de 7 semanas de idade foram aleatoriamente distribuídas em quatro grupos experimentais (32 aves por grupo), tendo sido administrada ração contendo 0 (controle), 10, 50 e 250 mg de FB₁/kg, durante 28 dias. Cada tratamento esteve constituído por quatro replicatas de oito codornas. A produção e o peso dos ovos foram avaliados diariamente. O consumo de ração e a conversão alimentar foram mensurados semanalmente. Os ovos produzidos no último dia de cada período de 7 dias foram coletados e submetidos à análise individual de densidade, unidade Haugh e percentual de peso da casca em relação ao peso total do ovo. No vigésimo oitavo dia experimental, foram coletadas amostras de sangue para análise de perfil de função hepática (proteína total, albumina, AST, GGT e ácido úrico) e hemograma. Dezesseis aves de cada tratamento foram sacrificadas por deslocamento cervical, e os fígados, rins e coração foram removidos, pesados e submetidos à análise histopatológica. Comparado com os grupos controles, as codornas alimentadas com ração contendo concentração ≥ 50 mg de FB₁/kg reduziram ($p < 0,05$) o consumo de alimentos e apresentaram menor ($p < 0,05$) ganho de peso. Entretanto, a conversão alimentar foi aumentada ($p < 0,05$) apenas para as aves que receberam 250 mg de FB₁/kg na dieta. A produção média de ovos apresentou-se significativamente menor ($p < 0,05$) para o grupo exposto a 250 mg de FB₁/kg. O peso dos ovos diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para as aves alimentadas com ração contendo concentração de 250 mg de FB₁/kg. As médias de densidade e unidade Haugh não foram

afetadas ($p > 0,05$) pela FB₁. O peso das cascas dos ovos diminuiu ($p < 0,05$) nos grupos que receberam concentração ≥ 50 mg de FB₁/kg na dieta. Entretanto, o percentual de casca não foi afetado pela FB₁. Comparados com os grupos controle, os tratamentos que receberam concentração ≥ 50 mg de FB₁/kg na dieta apresentaram maior ($p < 0,05$) peso relativo de fígado. Os pesos relativos do rim e do coração não foram afetados ($p > 0,05$) pela FB₁. Comparando-se com o controle, as aves que receberam concentração de 250 mg de FB₁/kg na dieta apresentaram redução ($p < 0,05$) da porcentagem do hematócrito. Os demais parâmetros do hemograma avaliados não foram afetados ($p > 0,05$) pela FB₁. Com exceção do número de leucócitos aumentado no tratamento 10 mg de FB₁/kg de ração ($p < 0,05$), os parâmetros do leucograma avaliados não foram afetados pela FB₁ ($p > 0,05$). O valor de AST para o tratamento 250 mg de FB₁/kg de ração encontrou-se aumentado ($p < 0,05$) quando comparado ao controle. Os outros parâmetros de bioquímica sérica avaliados no presente estudo não foram afetados pela FB₁ ($p > 0,05$). Com relação aos achados histopatológicos, não houve diferença entre os tratamentos, em tecido hepático, renal e miocárdio, comparando-se com o grupo controle. Esses resultados sugerem que codornas são sensíveis aos efeitos tóxicos da FB₁, em níveis que foram descritos como sendo de ocorrência natural, em condições de campo. Os dados indicaram que a exposição a FB₁ em níveis ≥ 50 mg de FB₁/kg podem afetar adversamente o desempenho de codornas, o que enfatiza a importância do controle da contaminação por FB₁ nas rações de codornas.

Palavras-chave: Fumonisina. Codornas. Toxicidade em animal. Ovos (qualidade).

ABSTRACT

BUTKERAITIS, P. **Fumonisin B₁ effects on laying japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)**. [Efeitos da fumonisina B₁ em codornas poedeiras (*Coturnix coturnix japonica*)]. 2003. 108 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

A 28-d experiment was conducted to evaluate the effect of fumonisin B₁ (FB₁) on egg production and egg quality of young laying Japanese quail fed contaminated rations. To this end, 128 7-wk-old birds were randomly distributed into four experimental groups (32 birds per group) and given rations containing 0 (controls), 10, 50 and 250 mg FB₁/ kg feed. Each treatment consisted of four replicates of eight quail. Egg production and egg weights were checked daily. Feed consumption and feed use were determined weekly. Eggs laid in the last day of each 7-d period were collected and subjected to individual analysis for specific gravity, Haugh units and percentage eggshells. On day 28, 12 quail from each treatment (4 replicates of 3 birds each) were bled by cardiac puncture and samples used for serum chemistry analyses (total protein, albumin, AST, GGT, and uric acid). Sixteen quail from each treatment were sacrificed by cervical dislocation, and liver, kidney, and heart were removed, weighed and collected for histopathological examination. Compared with controls, quail fed $\geq$ 50 mg FB₁/ kg had reduced ($p < 0.05$) feed intake and lower ($p < 0.05$) body weight gain. However, feed use was only reduced ($p < 0.05$) for birds fed 250 mg FB₁/ kg. Average egg production was significantly lower ($p < 0.05$) for group exposed to 250 mg FB₁/ kg. Egg weight was significantly decreased ($p < 0.05$) for birds fed 250 mg FB₁/ kg. Average specific gravity and Haugh units were not affected ($p > 0.05$) by FB₁. Eggshell weight was reduced ($p < 0.05$) for birds fed $\geq$ 50 mg FB₁/ kg. However, percentage eggshell was not affected by FB₁. Compared with controls, quail fed $\geq$ 50 mg FB₁/ kg had increased ($p < 0.05$) relative liver

weight. Relative kidney weight and relative heart weight were not affected ($p > 0.05$) by FB₁. Compared with controls, birds fed 250 mg FB₁/ kg diet had reduced ($p < 0.05$) hematocrits. FB₁ had no effect on hematological values evaluated ($p > 0.05$) but on hematocrits. Despite the increase ($p < 0.05$) on total white blood cell count for quail fed 10 mg FB₁/ kg diet, FB₁ had no effect on heterophil, lymphocyte and monocyte counts ($p > 0.05$). Compared with controls, AST concentrations were higher ($p < 0.05$) in quail fed 250 mg FB₁/ kg diet. It was not observed any histopathological change in liver, kidney and heart samples from any treatment group, compared with controls. These results suggest that quail are sensitive to the toxic effects of FB₁ at levels that have been reported to occur in feedstuff under field conditions. Data indicated that exposure to FB₁ at levels ≥ 50 mg/ kg could adversely affect quail performance, emphasizing the importance of controlling fumonisin contamination in quail rations.

Key words: Fumonisin B₁. Quail. Toxicity. Eggs. Quality.

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são compostos orgânicos de baixo peso molecular, produzidos como metabólitos secundários tóxicos por várias espécies de diferentes gêneros fúngicos, com estruturas químicas variadas e que ocorrem em uma variedade de substratos, incluindo produtos agrícolas (DIAZ et al., 1994). Os fungos produtores de micotoxinas são capazes de contaminar esses produtos agrícolas durante a produção, processamento, armazenamento ou estocagem.

São caracterizadas como compostos relacionados a alimentos ou rações, não sendo contagiosos, nem infecciosos. Não estão relacionadas a outro tipo de microrganismo, que não seja fungo. Os sintomas clínicos são geralmente revertidos após a remoção do alimento ou da ração contaminada (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

1.1 Considerações Gerais

As principais classes de micotoxinas incluem as aflatoxinas, os tricotecenos, as fumonisinas, a zearalenona, a ocratoxina A e os alcalóides do ergot. A maioria das micotoxinas incluída nesse grupo é produzida por três gêneros fúngicos, denominados *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os principais fungos produtores de micotoxinas não são patógenos vegetais agressivos; entretanto, as micotoxinas são produzidas nas plantas durante seu crescimento, quando portas de entrada são providas e as condições ambientais são apropriadas (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

As micotoxinas passaram a ter importância como contaminante tóxico de alimentos e rações a partir da severa ocorrência da “Turkey X disease” na Inglaterra, em 1960, que foi responsável pela morte de mais de 100.000 perus. Compostos fluorescentes, observados em um dos componentes da ração, foram relacionados com a causa da misteriosa doença. Essas substâncias fluorescentes foram mais tarde identificadas quimicamente e denominadas “aflatoxinas”, uma palavra derivada do principal fungo que as sintetizam, *Aspergillus flavus*. A descoberta das aflatoxinas levou a estudos mais intensivos das micotoxinas e permitiu a identificação de uma variedade desses compostos, associados com efeitos adversos na saúde de seres humanos e animais. Embora existam mais de 200 compostos tóxicos produzidos por fungos reconhecidos, o significado toxicológico da maioria deles não é compreendido (DIAZ et al., 1994).

Ainda não se conhecem as causas dos altos níveis de crescimento fúngico, que ocorrem nos grãos antes da colheita. Certamente, tais fungos aeróbicos são mais prevalentes em condições quentes e úmidas e, danos ocasionados por insetos em produtos agrícolas parecem favorecer a contaminação por fungos. Infelizmente, a inspeção visual dos grãos colhidos pode causar engano na estimativa do conteúdo de micotoxinas. Isso quer dizer que, só porque os grãos parecem estar contaminados por fungos, não significa que haja a presença de toxinas prejudiciais. No armazenamento, os principais fatores que afetam o crescimento fúngico são também temperatura e umidade. Quanto maior a temperatura, maior a chance para o crescimento fúngico. Porém, o crescimento desses organismos não ocorre se os grãos apresentarem menos de 14-15% de umidade. Infelizmente em muitos casos de armazenamento dos grãos, cria-se um microclima ideal para o crescimento de cepas de fungos, o que pode ocasionar a produção de micotoxinas, contaminando os produtos agrícolas (LEESON et al., 1997).

Existem diferenças geográficas e climáticas na produção e na ocorrência de micotoxinas. Por exemplo, em climas tropicais e subtropicais, aflatoxinas são de maior importância, enquanto que em climas temperados, toxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, tais como zearalenona, tricotecenos e ocratoxinas são de maior importância, com os distúrbios correlacionados com aflatoxinas ocorrendo apenas pela importação de alimentos ou rações contendo aflatoxinas, tais como amendoim, farelo de amendoim, farelo de algodão e milho (KUIPER-GOODMAN, 1991).

As micotoxinas podem estar presentes em alimentos processados a partir de produtos contaminados, podendo também ser metabolizadas pelo animal, e ocorrer na carne, em ovos e no leite. As micotoxinas podem estar presentes no alimento processado, na forma do composto inicial, ou podem ter sido previamente transformada em outro metabólito tóxico no organismo animal (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

Micotoxicose é uma doença tóxica causada pela exposição às micotoxinas, podendo ser manifestada de maneira aguda ou crônica, e variando de morte súbita à formação tumoral. Os fungos toxigênicos não estão diretamente envolvidos com a doença no hospedeiro e podem nem ter estado presente no grão contaminado. São de difícil diagnóstico e, na maioria das vezes, induzem síndromes leves e facilmente confundidas com outras doenças provocadas por microrganismos. Neste caso, o diagnóstico deve estar fundamentado na detecção e quantificação da toxina no alimento, nas alterações clínicas e patológicas, na constatação de resíduos do metabolismo nos tecidos afetados e nas evidências epidemiológicas (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003; PIER, 1973; WILSON et al., 1981). O resultado da maioria das intoxicações nos animais é a diminuição da produção, a qual é dependente da susceptibilidade das espécies às micotoxinas individualmente. A maioria das micotoxinas tem efeitos específicos sobre um dado sistema no organismo animal, como

por exemplo a aflatoxina, que é primariamente uma hepatotoxina; entretanto, muitas micotoxinas afetam vários sistemas simultaneamente. Alguns métodos que visam a diminuição ou a eliminação de micotoxinas estão sendo estudados e várias metodologias, tais como métodos físicos de separação e detoxificação, inativação biológica e química, além da diminuição da biodisponibilidade para os animais hospedeiros estão sendo utilizados e/ou investigados (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

Os fatores que afetam o potencial de toxidez em seres humanos ou animais que consomem alimentos ou rações contaminados por micotoxinas, respectivamente, incluem espécie, mecanismos/modos de ação, metabolismo e mecanismos de defesa (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A facilidade e a freqüência com que as micotoxinas contaminam os produtos agrícolas, de maneira concomitante à exposição crônica dos animais a esses químicos, via contaminação de rações animais, podem significar a diferença entre lucro e perdas na indústria avícola (KUBENA et al., 1999). Foi estimado que o custo anual, relacionado com a contaminação de grãos por micotoxinas, para a indústria agropecuária, está em torno de centenas de milhões de dólares (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 1989). O Brasil, devido ao seu clima, propicia condições ideais para a proliferação de fungos responsáveis pela produção de aflatoxinas (SABINO et al., 1988), e fumonisinas.

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

Um dos mais recentes grupos de micotoxinas reconhecido é o das fumonisinas, produzidas principalmente pelo *Fusarium moniliforme*. Estão associadas a leucoencefalomalácia eqüina, ao edema pulmonar suíno, além de apresentar atividade promotora de câncer em alguns testes laboratoriais. Embora o *F. moniliforme* seja considerado uma das espécies toxigênicas mais potentes, a detecção tardia das fumonisinas se justifica por suas propriedades hidrossolúveis, e por ter como grande obstáculo a indisponibilidade de um método analítico para monitorar a presença de seus princípios tóxicos durante o seu isolamento (GELDERBLOM et al., 1992; MOSS, 1998).

1.2 Fumonisinas

As fumonisinas são produzidas principalmente por *Fusarium moniliforme*, sendo a fumonisina B₁ (FB₁) a forma molecular predominante (LEESON et al., 1995). Os fungos do gênero *Fusarium* são comumente encontrados no solo, capazes de contaminar grãos, que podem ser usados em rações destinadas à nutrição de aves domésticas (KUBENA et al., 1999). Esse gênero fúngico apresenta distribuição mundial e muitas espécies são consideradas importantes patógenos vegetais. Os fungos filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, fitotoxinas, além de compostos tóxicos, denominados de micotoxinas. Embora existam dezenas de espécies de *Fusarium*, apenas um número limitado é responsável pela maior parte da contaminação de produtos agrícolas e alimentos por micotoxinas. Quando produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e pelos animais, provocando as micotoxicoses (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003; Moss, 1991).

Sabe-se que cepas de *Fusarium moniliforme* são capazes de produzir várias micotoxinas na natureza, tais como a moniliformina, fumonisinas, fusarinas, ácido fusárico, fusariocinas e zearalenona (HENRY et al., 2000). Outras espécies de fungos do gênero *Fusarium* também são capazes de produzir fumonisinas, tais como *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. subglutinans*, *F. polyphialidicum* e *F. oxysporum* (POZZI et al., 2002). Em 1992, foi demonstrado por Chen et al. que, fungos *Alternaria spp* também são capazes de produzir FB₁.

As fumonisinas são moléculas estruturalmente relacionadas e, até o momento, dezesseis foram isoladas e caracterizadas: fumonisinas B₁ (FB₁), B₂, B₃, B₄, A₁, A₂, A₃, AK₁, C₁, C₃, C₄, P₁, P₂, P₃, PH_{1a}, PH_{1b} (AH-SEO; WON LEE, 1999; MUSSER; PLATTNER, 1997). As fumonisinas da série A são amidas (Figura 1), enquanto que as da série B têm uma amina livre (LEESON et al., 1995). As estruturas da FB₁, FB₂, FA₁, FA₂ foram reportadas pela primeira vez por Bezuidenhout et al. (1988), sendo que as fumonisinas B₃ e B₄ foram isoladas de culturas de fungos *F. moniliforme* tendo suas estruturas elucidadas por Cawood et al. (1991).

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

As fumonisinas são compostos fortemente polares. São solúveis em água, apresentando maior solubilidade em acetonitrila-água ou metanol e insolúveis em solventes orgânicos (LEESON et al., 1995). Quimicamente, as fumonisinas são aminopolióis com a cadeia longa (20

carbonos) esterificada no C14 e C15 com dois grupos de ácido tricarboxílico (CASADO et al., 2001).

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 1 – Estrutura química das principais fumonisinas.

Fonte: Diaz e Boermans, 1994.

A maioria dos estudos para determinar os efeitos deletérios da fumonisina foi realizada a partir da incorporação de material de cultura de *Fusarium moniliforme* (FCM), com concentrações conhecidas de FB₁ em dietas de aves. Os resultados desses experimentos demonstram que as dietas contaminadas por *F. moniliforme*, contendo FB₁, afetam adversamente o desempenho e outras funções fisiológicas de aves. Porém, sabe-se que várias micotoxinas diferentes podem ser produzidas por *F. moniliforme*. Assim sendo, Henry et al. (2000) conduziram um estudo para determinar os efeitos da FB₁ purificada em frangos de

corte, visando comparar os achados, com os resultados verificados em estudos em que FCM foi utilizado. Esse experimento foi justificado pelo fato de que não se deve associar todos os efeitos relacionados ao consumo de FMC na dieta, exclusivamente à FB₁. A partir dos achados desse estudo, os autores concluíram que, aparentemente o uso de FCM em estudos com FB₁ é apropriado.

1.2.1 Métodos Analíticos para Fumonisinas

Os problemas e os riscos associados com a contaminação de ração animal e alimentos humanos pela fumonisina resultou no desenvolvimento de metodologias precisas, confiáveis e sensíveis para a determinação dessa micotoxina no milho e em alimentos e rações derivados desse produto (SHEPHARD, 1998).

Os métodos analíticos utilizados para determinação e quantificação das fumonisinas incluem as técnicas de cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa / espectrômetro de massa (GC/MS) (DIAZ et al., 1994).

O primeiro método empregado para a determinação de fumonisinas foi desenvolvido durante o isolamento original dessa micotoxina, a partir de culturas de *F. moniliforme* MRC 826. Utilizou-se CCD de fase reversa sobre placa de sílica modificada C₁₈, empregando metanol:água (3 : 1), como sistema de solvente. Placas com sílica gel G₆₀ e sistema de solventes contendo clorofórmio:metanol:água:ácido acético também foram utilizadas. A visualização foi conseguida através da aspensão de solução de ninhidrina ou p-anisaldeído (GELDERBLOM et al., 1988). Esse método apresenta como desvantagem um alto limite de

detecção (0,5 mg/g), o que não o torna ideal para a análise de alimentos contaminados (SHEPHARD, 1998).

As fumonisinas são moléculas polares solúveis em águas e em solventes polares, sendo apropriadas para a determinação por CLAE em fase reversa. Muitas metodologias de cromatografia gasosa/espectrômetro de massa (GC/MS) foram usadas como métodos confirmatórios na análise de fumonisinas. Entretanto, a maior parte dos dados sobre a ocorrência natural tem sido gerada através do emprego da CLAE, visto que esse tipo de cromatografia é mais fácil de se aplicar e requer equipamentos menos sofisticados (SHEPHARD, 1998).

As análises de fumonisina por CLAE requerem uma etapa de purificação, com o intuito de remover os contaminantes e concentrar as fumonisinas. Essa etapa pode ser feita através de extração em fase sólida (SPE) sobre fase reversa (C₁₈), ou através de coluna de troca aniônica forte (SAX), ou mesmo por colunas de imunoafinidade. As colunas SAX proporcionam superior purificação, quando comparadas às colunas de fase reversa. Entretanto, deve haver monitoramento do pH do extrato e controle cuidadoso da eluição (SHEPHARD, 1998).

O reagente oftaldialdeído (OPA) mostrou-se sensível para ser utilizado na derivação pré-coluna, na separação por CLAE fase reversa com detector de fluorescência (SHEPHARD et al., 1990). A reação de derivação com OPA e 2-mercaptoetanol é rápida e reproduzível, em temperatura ambiente, com tampão borato (pH 9 – 10); entretanto apresenta como desvantagem, limitada estabilidade da reação de fluorescência dos produtos (SHEPHARD, 1998).

1.2.2 Ocorrência das Fumonisinas

Com distribuição mundial, espécies de *Fusarium* são importantes patógenos de cereais, em todos os estágios de seu desenvolvimento (DIAZ et al., 1994). A estabilidade da fumonisina ao calor garante a sua permanência na maioria dos alimentos, mesmo após diferentes formas de processamentos (MOSS, 1998). Pelo fato do *Fusarium moniliforme* ser encontrado em praticamente todas as amostras de milho, contaminação em baixos níveis (menores do que 1 mg/kg) por fumonisinas é extremamente comum (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

A contaminação de alimentos e rações geralmente reflete a incidência de infestação fúngica do produto agrícola original, que foi afetado por fatores como: origem, estresse após período de seca e danos por insetos. A fumonisina B₁ é sempre a mais abundante e a mais tóxica de seu grupo de micotoxinas, representando cerca de 70% da contaminação total dos alimentos e rações naturalmente contaminados, seguida pelas fumonisinas B₂ e B₃. (MALLMANN et al., 2001).

Apenas as fumonisinas B₁, B₂ e B₃ foram detectadas em milhos naturalmente contaminados (HENRY; WYATT, 1993). Foi demonstrado que rações à base de milho, em diferentes países, continham níveis de FB₁, variando de 0,055 a 5,0 µg/g (ppm), e que geralmente menos de um terço das amostras testadas eram positivas para a presença de fumonisinas (LEESON et al., 1995).

O *Fusarium moniliforme* está incluído entre os fungos de campo, que encontram condições mais favoráveis para crescimento antes da colheita (umidade relativa acima de 80% e umidade do grão acima de 22%), mas pode permanecer viável no substrato por alguns meses

após a colheita. É uma espécie hidrofílica que requer uma alta atividade de água (Aa) para o seu crescimento, e ainda maior para a produção de fumonisinas (CÔRTEZ et al., 2002).

A ocorrência de fumonisina B₁, em rações brasileiras já foi demonstrada em vários estudos. Em relação à sua ocorrência natural em milho, no Brasil, Hirooka et al. (1996) detectaram FB₁ e FB₂ em 97,4% e 94,8%, respectivamente, de 48 amostras analisadas (39 do Estado do Paraná e 9 de Mato Grosso). Orsi et al. (2000) observaram a ocorrência natural de fumonisinas em amostras de milho do Estado de São Paulo, verificando níveis médios de 9,72 mg/kg (FB₁) e 7,67 mg/kg (FB₂).

Em 2001, Mallmann et al. (2001) avaliaram a ocorrência de fumonisina B₁ em cereais e rações do sul do Brasil, analisando 407 amostras provenientes de diferentes granjas e indústrias agropecuárias. As amostras foram coletadas entre os meses de janeiro de 1996 e junho de 1998. Dentre elas, 32% eram positivas, sendo que as concentrações variaram de 0,086 até 78,92 mg/kg de FB₁.

1.3 Mecanismo de Ação Tóxica das Fumonisinas

As fumonisinas são citotóxicas e carcinogênicas para os animais. O mecanismo molecular de ação das fumonisinas não é completamente conhecido. Sabe-se, porém, que esses compostos apresentam considerável similaridade estrutural com a esfingosina, que contém uma cadeia longa (esfingóide), servindo de estrutura básica para muitos esfingolipídeos, como, por exemplo, a esfingomielina (Figura 2). A cadeia esfingóide une-se através de uma ligação éster a uma cadeia de ácido graxo.

Figura 2 – Estrutura molecular das fumonisinas B₁ e B₂, esfinganina e esfingosina.

Fonte: Diaz e Boermans, 1994.

As bases esfingóides estão presentes em baixas concentrações nas células, porque a esfinganina biossintetizada é rapidamente N-acetilada com ácido graxo de cadeia longa para formar N-acilesfinganina (dihidroceramida). Outros esfingolipídeos complexos são formados quando grupos polares são adicionados na posição 1 da ceramida (esfingomielina, gangliosídeo). Assim, a presença de esfingosina na célula é derivada primariamente, do *turnover* do complexo de esfingolipídeos, ou de fontes dietéticas (MERRILL JR. et al., 1997a). Os esfingolipídeos constituem uma classe de lipídeos de membrana, presentes em todos os organismos eucariontes e em alguns procariontes. São lipídeos estruturais e funcionais (MERRILL JR. et al., 1997b). Acredita-se que os esfingolipídeos estejam envolvidos na regulação do crescimento celular, diferenciação e transformação neoplástica,

através da participação na comunicação célula a célula, na interação entre célula e substrato, além de possíveis interações entre receptores celulares e sistemas sinalizadores (WANG et al., 1991).

Wang et al. (1991) hipotetizaram que a interrupção no metabolismo dos esfingolípídeos poderia ser um ponto chave do mecanismo de ação das fumonisinas. Então, demonstraram que as fumonisinas inibem a biossíntese *de novo* de esfingolípídeos pelos hepatócitos de ratos, e identificaram um importante sítio de inibição, como da reação catalisada pela esfingosina N-aciltransferase (Figura 3). Essas enzimas são chamadas coletivamente de ceramida sintases (RILEY et al., 1993a).

Para testar a hipótese que as fumonisinas agem alterando a biossíntese dos esfingolípídeos, Wang et al. (1991) examinaram o efeito da FB₁ na habilidade dos hepatócitos de ratos em converter [¹⁴C] serina até esfingolípídeos marcados. A incorporação do marcador foi inibida pela FB₁, com uma IC₅₀ de 0,1 mM. Um similar grau de inibição foi obtido pela FB₂. Por isso, as fumonisinas parecem ter uma potente ação contra a biossíntese de esfingolípídeos em níveis que poderiam ser alcançados ou excedidos pelo consumo de milho naturalmente contaminado. O específico sítio de ação da FB₁ parece ser as enzimas esfinganina- e esfingosina-N-aciltransferase, que catalisam a formação de uma ligação amida entre a cadeia longa (tipicamente saturada) do ácido graxo e o grupo amina da base esfingóide (SMITH; MERRILL JR., 2002). Foi postulado que a similaridade entre as fumonisinas e bases de longas cadeias (esfingóides) as permitem ser reconhecidas como substrato (estado de transição ou produtos análogos) da esfingosina- ou esfinganina-N-aciltransferase.

Os esfingolípídeos bioativos são formados pelo *turnover* de esfingolípídeos complexos e como intermediários da biossíntese do metabolismo dos esfingolípídeos. Geralmente essas quantidades são altamente reguladas. Entretanto, com o bloqueio (inibição) da ceramida

sintase, as fumonisinas bloqueiam a biossíntese dos esfingolípídeos complexos e causam o acúmulo de esfinganina e algumas vezes, esfingosina (MERRILL JR. et al., 2001).

Figura 3 - Mecanismo proposto de inibição da biossíntese de esfingolípídeos pelas fumonisinas.

Assim sendo, torna-se imprescindível conhecer as vias metabólicas que poderiam ser afetadas pela inibição da enzima ceramida sintase, a atividade biológica da esfinganina e a função dos esfingolípídeos nas células (MERRILL JR. et al., 1997a). A interrupção dessa via poderia explicar, pelo menos em parte, os efeitos patológicos das fumonisinas. Essas micotoxinas bloqueiam a biossíntese de esfingolípídeos complexos e causam o acúmulo de esfinganina, sendo que esse composto é tóxico para muitas células (MERRILL JR. et al., 1997b). A

degeneração das células neuronais percebidas na LEME podem ser devido à inibição da biossíntese de esfingolípídeos por causa da sua alta concentração no cérebro.

O acúmulo de esfinganina nas células expostas às fumonisinas pode levar à morte celular, visto que em determinados tipos celulares as bases de cadeia longa exercem efeitos citotóxicos, ou à proliferação celular, desde que para tais tipos celulares esses compostos sejam mitogênicos (WANG et al., 1991).

A depleção de esfingolípídeos complexos prejudica o funcionamento de muitas proteínas de membrana, como, por exemplo, os transportadores de folato, podendo contribuir com a doença do tubo neural (MERRILL JR., 2002). Stevens e Tang (1997) demonstraram que o transporte nos receptores folato foi quase que completamente bloqueado nas células que tiveram a concentração de esfingolípídeos reduzida, pela exposição à fumonisina B₁. Verificou-se uma perda na capacidade de ligação ao folato nas células, à medida que diminuía o nível de esfingolípídeos, notando-se uma relação causal entre os números de receptores de folato e a absorção vitamínica. Esses achados sugerem que a exposição dietética à FB₁ pode afetar adversamente a absorção pelos receptores folatos e comprometer os processos celulares dependentes dessa vitamina.

A fumonisina B₁ causa também apoptose em fígado e rins de ratos, além de haver evidências de que essa toxina promove necrose oncótica, especialmente em fígado. A indução da apoptose pode ser conseqüente à inibição da ceramida sintase e à interrupção do metabolismo dos esfingolípídeos pela FB₁ (DRAGAN et al., 2001). Kim *et al.* (2001) demonstraram que a FB₁ causa morte em células renais LLC-PK1 pela indução da apoptose. A fumonisina promove alterações morfológicas e o aumento dependente do tempo na fragmentação do DNA, o que demonstra que essa toxina induz à morte celular programada.

Gelderblom et al. (1996) avaliaram os efeitos da fumonisina B₁ sobre a síntese protéica e lipídica em hepatócitos primários de ratos. A síntese protéica não foi afetada. Entretanto, a FB₁ inibiu a incorporação de [14C] ácido palmítico em culturas de hepatócitos de maneira significativa. Essa inibição resultou em um aumento da relação fosfatidilcolina:colesterol, o que sugere uma estrutura de membrana mais rígida. As alterações induzidas pela FB₁ na membrana celular, especialmente aquelas relacionadas às mudanças nos ácidos graxos na membrana fosfolipídica, e a alteração do conteúdo de ácidos graxos das células hepáticas são provavelmente os eventos chaves, que explicam a citotoxicidade e a indução de uma resposta de crescimento alterada nos hepatócitos primários, pelas fumonisinas.

Ramasamy et al. (1995) usaram monocamadas de células endoteliais de artérias pulmonares suínas para investigar os efeitos da FB₁ sobre o endotélio vascular. Verificaram que a toxina causou uma elevação na esfinganina livre e aumentou a transferência de albumina através da monocamada endotelial. Essas observações permitiram concluir que a FB₁, além de interromper o metabolismo dos esfingolipídeos, alterou a função de barreira das células endoteliais.

A fumonisina B₁ impede a função de barreira das células endoteliais *in vitro*. Os efeitos adversos sobre essas células poderiam indiretamente contribuir com a neurotoxicidade e o edema pulmonar, causados pela FB₁. Sugere-se que a indução de mudanças na composição dos esfingolipídeos nos tecidos alvos pela fumonisina pode, direta ou indiretamente, contribuir com todas as doenças associadas ao *Fusarium moniliforme* (RILEY et al., 1996).

Visto que os esfingolipídeos exercem papel crítico na regulação do crescimento, diferenciação e transformação celular, a interrupção do metabolismo dessas moléculas altamente bioativas pelas fumonisinas, pode ser o mecanismo de carcinogenicidade dessas micotoxinas. Em certos tipos celulares, como, por exemplo, os fibroblastos Swiss 3T3, a FB₁ apresenta ação

mitogênica devido ao acúmulo de bases esfingóides e não pela inibição da biossíntese de esfingolipídeos complexos. Entretanto, para outros tipos celulares, essa mesma micotoxina exerce ação mitoinibitória (SCHROEDER et al., 1994).

O metabolismo dos esfingolipídeos nas células imunes resulta na formação de um segundo mensageiro, como ceramida, esfingosina, ceramida-1-fosfato e esfingosina-1-fosfato. Eles estão envolvidos em processos de sinalização que controlam os principais estágios de desenvolvimento linfocitário, diferenciação, ativação e proliferação na resposta a estímulos mitogênicos e antigênicos, e na iniciação da morte celular programada. Demonstrou-se que os inibidores da ceramida – FB₁ – afetam o CD3, CD4, CD8, CD45 e outros antígenos de superfície de linfócitos T, além de interromper o balanço da subpopulação linfocitária, inibir a síntese de DNA em linfócitos normais e suprimir a resposta imune dependente de antígenos T *in vivo* (MARTINOVA, 1998).

Sugerem-se alguns processos para explicar o mecanismo molecular da atividade promotora de câncer das fumonisinas. Nos animais, esse processo deve envolver a formação de bases esfingóides ou sua produção por outro tecido e seu transporte via sangue. As bases esfingóides livres são tóxicas para grande parte das células e os esfingolipídeos complexos são essenciais para o crescimento celular normal. A maioria dos tecidos (se não todos) tem a capacidade de sintetizar *de novo* bases de cadeia longa; entretanto, os níveis de bases esfingóides livres estão aumentadas no soro dos animais alimentados com fumonisina. Logo, essas moléculas podem ter acesso a outros tecidos sensíveis (ou células) através do organismo (RILEY et al., 1996; SCHROEDER et al., 1994).

A inibição da enzima N-aciltransferase pelas fumonisinas, causa o acúmulo da esfinganina em tecidos, soro e urina, o que é amplamente usado como marcador de exposição às fumonisinas (MERRILL JR., 2002). Wang et al. (1992) mensuraram esses parâmetros em pôneis,

recebendo dieta contendo 44 ppm de FB₁. Os resultados indicaram que ambos, esfinganina, esfingosina e especificamente sua relação aumentaram após a exposição a fumonisina, enquanto que os níveis séricos de esfingolípídeos diminuíram. Foi observado também que, a elevação desses parâmetros ocorre antes da elevação nos níveis séricos das enzimas hepáticas, tendo sido proposto o uso da relação esfinganina: esfingosina como um indicador precoce da toxidez da fumonisina.

1.4 Toxidez das Fumonisinas

Nos itens subseqüentes será abordada a toxidez da fumonisina sobre os animais de produção, animais de laboratório e também seus efeitos sobre a saúde humana.

1.4.1 Eqüinos

A leucoencefalomalácia eqüina (LEME) é uma doença não infecciosa, esporádica e altamente fatal, que afeta o sistema nervoso central de cavalos e outros eqüídeos. Duas diferentes síndromes de LEME foram relatadas. A manifestação clínica comumente reportada está relacionada com a sintomatologia neurológica, constituindo a forma neurotóxica da LEME. Essa forma é geralmente fatal, e pode ser precedida por um curto período de letargia e anorexia, embora morte aguda sem sintomatologia clínica prévia possa ocorrer. Os sintomas neurotóxicos – que incluem diminuição do consumo de alimento, laminite, ataxia, paralisia facial e recumbência podem ter início dias após a exposição à fumonisina B₁. A morbidade

pode ocorrer horas após o início dos sinais clínicos. Malácia focal e liquefação da massa branca cerebral com hemorragia periférica são os achados patognomônicos durante a necrópsia. Os animais sobreviventes em geral apresentam lesões neurológicas permanentes. O termo “leucoencefalomalácia” descreve as lesões primárias associadas com a doença: necrose da massa branca cerebral (DIAZ et al., 1994).

A LEME hepatotóxica é a outra maneira pela qual a doença pode se manifestar. Como a forma neurotóxica, ela é inicialmente caracterizada por inapetência e depressão, entretanto é seguida por edema facial e marcante icterícia, o que indica dano hepático severo. As lesões macroscópicas são verificadas primariamente em fígado, embora malácia em cérebro e em cerebelo possam estar presentes. Outros sinais de intoxicação incluem elevados valores de enzimas séricas, indicando lesão hepática; e alteração na relação sérica esfingosina: esfinganina, que geralmente é o sinal precoce de intoxicação pela fumonisina (DIAZ et al., 1994; NORRED; VOSS, 1994).

O exato mecanismo pelo qual as fumonisinas promovem essa doença não é conhecido, mas aparentemente está relacionado com sua habilidade de inibir a síntese de esfingolipídeos. Níveis associados com a leucoencefalomalácia equina variam de 1 µg/g a 126 µg/g de FB₁ (ROSS et al., 1991). Ross et al. (1992) sugeriram que, concentrações ≥ 10 µg/g de FB₁ em cavalos, estavam associadas a LEME.

Ross et al. (1993) estudaram os efeitos da intoxicação experimental de pôneis por fumonisina, a partir da administração de milho naturalmente contaminado. Para tanto, utilizaram 6 animais, sendo dois controles e quatro intoxicados. A ração contaminada foi administrada em três fases: (1) 44 mg de FB₁/kg de dieta; (2) menos do que 1 mg de FB₁/kg de dieta; (3) 88 mg de FB₁/kg de dieta. Após sete dias do início do tratamento da primeira fase, os quatro animais intoxicados apresentaram redução do consumo e os parâmetros bioquímicos estavam

elevados. Após 9 dias do início do experimento, um pônei morreu, apresentando moderada encefalopatia e necrose hepática. Outro animal morreu no dia 45, apresentando a mesma sintomatologia. Os dois animais sobreviventes continuaram recebendo a dieta contaminada com 44 mg de FB₁/kg por 98 dias. A fase dois do estudo teve duração de 120 dias. Nesse período, os parâmetros bioquímicos retornaram aos valores normais. Depois de 75 dias da terceira fase experimental, mais um animal morreu, apresentando sintomatologia de leucoencefalomalácia neurotóxica, com moderada necrose hepática. Depois de 78 dias, o único animal sobrevivente foi sacrificado e apresentava as mesmas lesões do animal morto aos 75 dias de experimentação.

1.4.2 Suínos

O edema pulmonar suíno (PPE) é uma condição subaguda letal dos suínos, caracterizada por edema pulmonar e hidrotórax. Os sinais clínicos observados consistem em início agudo de dispnéia, seguida de fraqueza, cianose e morte. As alterações macroscópicas normalmente verificadas incluem edema pulmonar característico e extenso hidrotórax. Necrose de pâncreas e danos em fígado também foram relatados como lesões de ocorrência em suínos intoxicados por fumonisina, a partir de ração naturalmente contaminada. Dentre as lesões hepáticas são citadas vacuolização hepatocelular periacinar, hipertrofia hepatocelular, desarranjo hepatocitário, necrose hepatocitária e moderada inflamação (DIAZ et al., 1994).

Os níveis associados a toxicose em suínos variam de 1 µg/g a 330 µg/g (ROSS *et al.*, 1991). Alterações em parâmetros de bioquímica sérica foram observados em suínos expostos à fumonisina. Riley et al. (1993b) relataram um aumento significativo nos níveis de ALT, AST,

fosfatase alcalina, GGT, bilirrubina e colesterol de suínos recebendo dietas contendo 101 e 175 mg de fumonisina total/kg de ração. A mensuração desses parâmetros pode ser usada como um indicador não específico de intoxicação por fumonisina (DIAZ et al., 1994).

Uma explicação patofisiológica para o edema pulmonar severo observado nos casos de PPE foi proposto por Haschek et al. (1992). De acordo com essa teoria, a alteração do metabolismo dos esfingolipídeos causa necrose hepatocelular, o que resulta na liberação de material membranoso na circulação. Esse material é fagocitado pelos macrófagos pulmonares intravasculares, que estão presentes em grande número nos pulmões suínos e desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios, que finalmente resultam no edema pulmonar. Em baixas doses, distúrbio hepático lento e progressivo é a característica predominante, enquanto que em altas doses, edema pulmonar agudo se sobrepõe à injúria hepática e pode causar morte.

1.4.3 Animais de laboratório

Os estudos iniciais estabeleceram que o fígado é o órgão alvo do *F. moniliforme* em muitas espécies, incluindo os ratos (NORRED; VOSS, 1994). Kriek; Kellerman e Marasas (1981) foram os primeiros pesquisadores a descrever nefrose em ratos submetidos a intoxicação subcrônica por fumonisina, a partir da adição de FCM à dieta desses animais. As lesões apareciam antes do estabelecimento da hepatotoxicidade, sendo aparentemente reversíveis (geralmente com 6 semanas), apesar da contínua exposição ao material de cultura. Entretanto os autores consideraram essas lesões como tendo poucas consequências toxicológicas.

Gelderblom et al. (1992) demonstraram que o fígado é o principal órgão afetado durante uma intoxicação crônica de ratos, por um período de 26 meses, com 50 mg de FB₁/kg de dieta. As principais lesões patológicas descritas incluem cirrose micro- e macro-nodular e colangiofibrose. Carcinoma hepatocelular também foi verificado. A FB₁ também apresenta atividade promotora de câncer, quando administrada em ratos (GELDERBLOM et al., 1988). Porém, Norred e Voss (1994) questionam a validade das conclusões desse estudo baseado nos seguintes motivos: foi usado apenas um nível dietético de fumonisina no estudo experimental; apenas animais machos foram utilizados; o número de animais era limitado; a dieta experimental administrada era deficiente em colina e metionina, uma condição que facilita a formação tumoral.

Em um outro estudo, Riley et al. (1994) demonstraram que o rim foi o órgão mais sensível aos efeitos tóxicos da fumonisina. Nesse experimento, ratos machos Sprague-Dawley receberam FB₁ sob níveis de 15, 50 e 150 µg/g, durante 4 semanas. O rim foi mais vulnerável à indução da interrupção do metabolismo dos esfingolipídeos pela toxina do que o fígado, com significativa elevação da esfingosina livre, esfinganina livre e da relação esfinganina livre: esfingosina livre.

Casado et al. (2001) estudaram os efeitos da exposição dietética de camundongos à fumonisina B₁ e à aflatoxina B₁ durante 30, 60 e 90 dias. Verificaram que a fumonisina B₁ promoveu o aumento no consumo diário e diminuiu os níveis de triglicerídeos, colesterol e cálcio séricos. Com relação aos achados histopatológicos, após 60 dias de intoxicação, as lesões verificadas em fígado e em intestino delgado foram infiltração de células inflamatórias e necrose. Após 90 dias de tratamento experimental, as lesões verificadas em fígado apresentavam-se mais intensas, enquanto que o baço apresentava-se congesto e com presença de hemólise.

1.4.4 Bovinos

Os ruminantes, de uma maneira geral, são mais resistentes aos efeitos adversos das micotoxinas. Isso ocorre devido a capacidade da microbiota ruminal em degradar as micotoxinas (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Entretanto, deve-se notar que a função ruminal é negativamente afetada pela presença de micotoxinas, sugerindo o papel significativo do rúmen no controle da exposição às micotoxinas, biotransformação das toxinas e excreção dos metabólitos.

Osweiller et al. (1993) estudaram os efeitos da administração de milho contaminado por fumonisina sobre o crescimento e a sanidade de bezerros. Dezoito animais foram alimentados com dieta contendo fumonisina em níveis de 15, 31 ou 148 mg/kg por 31 dias. Não foi verificada alteração de consumo, nem de ganho de peso; entretanto, notou-se aumento significativo nos níveis séricos de AST, GGT, lactato desidrogenase (LDH), bilirrubina e colesterol, o que ocorreu a partir do décimo dia experimental, até o término do estudo. Os autores relataram achados histopatológicos caracterizados por degeneração e inchaço de hepatócitos em região periacinar, em dois bezerros recebendo as maiores doses de fumonisina. Concluiu-se que a intoxicação de bezerros por fumonisina, em níveis sabidamente tóxicos para suínos e eqüinos causou moderada alteração hepática nesses animais.

1.4.5 Seres Humanos

A ocorrência de *Fusarium moniliforme* em milho parece estar correlacionada com altas taxas de câncer esofágico em seres humanos, em Transkei, África do Sul e na China, mas a relação exata de causa-e-efeito não foi estabelecida. Embora outros fatores, tais como consumo de álcool, além de outros componentes dietéticos e ambientais, possam estar envolvidos na etiologia da doença, vários estudos recentes sustentam a hipótese de que as fumonisinas podem ser ao menos parcialmente responsáveis. Evidências epidemiológicas indicam que, as espécies de *Fusarium*, produtoras de fumonisina no milho, estejam envolvidas.

FB₁ e FB₂ foram encontradas em amostras de milho produzidas localmente, que eram consumidas por habitantes de áreas rurais de Transkei (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003; YOSHIZAWA et al., 1994). Foi realizado um estudo retrospectivo a partir de amostras de milho coletadas durante o período de 1976 até 1989 em áreas da região de Transkei. Os resultados revelaram maiores níveis de contaminação por fumonisina no milho proveniente das áreas de maior incidência de câncer esofágico, em comparação às amostras vindas de áreas com baixa incidência da doença (RHEEDER et al., 1992).

Em um estudo em que material de cultura de *F. moniliforme* contendo fumonisinas foi administrado para macacos Vervet, durante vários anos, levantou a possibilidade de que essas micotoxinas poderiam estar envolvidas em outras doenças humanas. Foi verificada uma resposta aterogênica e, também, uma hipercolesterolemia relacionada com a incorporação de 0,5% de FCM adicionado à dieta dos animais. A dose de fumonisinas administradas aos

animais, sob esse nível de inclusão de FCM era de 209 a 547 µg/kg de peso vivo/dia. Também pôde ser observada, nos macacos, evidência de dano hepático (elevada atividade de AST), sendo que os autores sugeriram que a resposta aterogênica seria secundária aos efeitos hepatotóxicos ocasionados pelo fungo (FINCHAM et al., 1992). Esses achados são interessantes, visto que na China foi verificada uma alta incidência de aterosclerose dentre os indivíduos vindos do norte do país, sendo que essa parcela população tem a dieta baseada no consumo de milho, enquanto que a população vinda do sul tem a dieta baseada no consumo de arroz (CHANG et al., 1991).

1.4.6 Aves

A fumonisina B₁ apresenta toxidez relativamente baixa para aves domésticas, tendo sido demonstrado em pesquisa recente que a FB₁ pura, em níveis maiores que 80 mg/kg, não causou efeito adverso no desempenho de frangos de corte em crescimento (LEESON et al., 1995). Embora haja a necessidade de níveis consideravelmente mais altos de FB₁ para produzir sintomas em frangos de corte e em perus, efeitos tóxicos foram descritos, o que vem contradizer a idéia de que essa não é uma micotoxina de importância para a indústria avícola (KUBENA et al., 1999).

Material de cultura de *Fusarium moniliforme* e de *Fusarium proliferatum* contendo FB₁, tem sido associado com baixo desempenho, aumento do peso relativo de vísceras e hepatite em frangos de corte. Baixo desempenho, aumento do peso relativo de vísceras, alteração de constituintes séricos e atividade enzimática, hiperplasia hepatocelular e alterações de miocárdio também foram relatados para perus (WEIBKING et al., 1993).

Kubena et al. (1999) estudaram os efeitos da intoxicação crônica de galinhas poedeiras por fumonisina, suplementada através de material de cultura de *Fusarium moniliforme*, em níveis de 100 ou 200 mg de FB₁/ kg de ração. Os resultados indicaram que as galinhas poedeiras podem ser capazes de tolerar concentrações relativamente altas de FB₁ por longos períodos de tempo, sem afetar de maneira adversa a saúde e o desempenho desses animais.

Bermudez et al. (1995) avaliaram os efeitos da intoxicação de patos brancos Pekin de 1 dia por FB₁ a partir da inclusão de FCM na dieta, o que forneceu níveis de 0, 100, 200 e 400 mg de FB₁/kg de ração, durante 21 dias. As aves recebendo ração intoxicada apresentaram redução no consumo e no ganho de peso, numa relação dose-dependente. Os níveis dietéticos crescentes de FB₁ foram associados com o aumento de peso absoluto de fígado, coração, rim, pâncreas e pró-ventrículo. A relação hepática esfinganina:esfingosina aumentou significativamente nos patos que receberam FB₁. Foi verificada hiperplasia hepatocelular em todas as aves que receberam ração contaminada pela micotoxina. Entretanto, hiperplasia biliar só foi observada nas aves intoxicadas com 400 mg de FB₁/ kg de ração. Os autores concluíram que os patos são relativamente resistentes aos efeitos tóxicos da FB₁.

Henry et al. (2000) investigaram a toxidez da FB₁ em frangos de corte, a partir da incorporação da toxina purificada (98,1% pura) sob níveis de 0, 20, 40 e 80 mg/kg de ração, sendo que as aves foram alimentadas do dia 0 até os 21 dias de idade. Os resultados indicaram que a concentração hepática de esfinganina e a relação esfinganina:esfingosina estavam aumentadas em todos os grupos tratados.

Espada et al. (1994) estudaram os efeitos da micotoxicose por fumonisina em frangos de corte, avaliando parâmetros de desempenho e de bioquímica sérica. Para tanto, três experimentos foram realizados, sendo que, no primeiro deles, frangos de dois dias receberam dieta contendo 10 mg de FB₁/kg de ração purificada por 6 dias. Algumas aves foram

necropsiadas nesse momento; outras se recuperaram por 5 semanas antes da necrópsia. Nos experimentos 2 e 3, frangos de 2 dias receberam dieta em que foi incluído FCM que suplementava níveis de FB₁ em 30 e 300 mg/kg. Os 30 mg/kg foram administrados por 2 semanas e os 300 mg/kg, durante 8 dias. Comparadas com o grupo controle, as aves intoxicadas apresentaram diarreia (no terceiro dia de intoxicação para as aves que receberam 10 e 300 mg/kg e no sexto dia de intoxicação para as aves que receberam 30 mg/kg). As aves intoxicadas apresentaram diminuição do ganho de peso, do peso absoluto de fígado, baço e bursa. Ocorreu aumento do peso relativo de fígado e diminuição do peso relativo de baço. Os autores sugeriram alguma relação entre a intoxicação por FB₁ e a redução do peso relativo do órgão linfóide, observada pela supressão da imunidade humoral e da função fagocitária dos macrófagos. Esse fato contribui com o aumento da susceptibilidade das aves às infecções bacterianas durante intoxicações. A fumonisina também causou diminuição dos níveis séricos de triglicérides, ácidos úrico e da atividade de fosfatase alcalina. Além disso, aumentou os níveis de GGT, AST, LDH, creatinina quinase e colesterol. Os autores relataram que o aumento no nível de colesterol, acompanhado pela diminuição dos níveis séricos de triglicérides pode ser secundária aos danos hepáticos induzidos pela fumonisina. E, a diminuição do ácido úrico pode estar relacionada com uma alteração no catabolismo protéico, devido aos danos hepáticos. Já o aumento da AST, LDH e GGT poderiam refletir em dano hepático. O significativo aumento na atividade da AST indica dano do órgão e proporciona evidência de toxicose. Os autores concluíram que, mesmo baixas doses de fumonisina são tóxicas para frangos de corte jovens.

Em outro estudo similar, apresentando o mesmo desenho experimental, Espada et al. (1997) avaliaram os efeitos da intoxicação por fumonisina em frangos de corte, sobre as proteínas plasmáticas e os fatores de coagulação. Comparado-se com o controle, as aves intoxicadas exibiram menor tempo de pró-trombina e maior concentração de fibrinogênio plasmático

(com exceção do grupo que recebeu 30 mg de FB₁/kg de ração). Simultaneamente houve diminuição da concentração sérica de albumina e aumento da concentração de globulinas, nos grupos intoxicados a partir das rações nas quais foi incluído o FCM, contendo a FB₁. Os animais que se recuperaram por 5 semanas não exibiram modificações na hemostasia, nem nos níveis de proteínas séricas, quando comparado aos animais controle. Os autores concluíram que as baixas doses de fumonisina purificada (10 mg/kg) e proveniente do FCM (30 mg/kg) podem alterar a hemostasia e os níveis de proteínas séricas de frangos em fase de crescimento.

Piramanayagam et al. (2001) avaliaram os efeitos da intoxicação por fumonisina B₁ sobre os parâmetros bioquímicos de frangos de corte. Os animais de um dia de idade foram alimentados com ração contendo 80, 160 e 320 mg de FB₁/ kg por um período de 28 dias. As análises séricas em intervalos semanais revelaram elevação dose-dependente e progressiva nos valores de proteína total e nos níveis de albumina. Os valores de creatinina sérica das aves intoxicadas aumentaram no decorrer do experimento. Verificou-se ainda aumento significativo dos níveis de AST, ALT e fosfatase alcalina em todas as aves intoxicadas.

Javed et al. (1995) estudaram os efeitos da administração de FB₁ purificada sob níveis de 125 e 274 mg/kg, para frangos de corte, do primeiro aos 14 dias de idade. Foram observados redução da glicose sérica e aumento significativo dos níveis de colesterol, sódio, fosfatase alcalina, AST, ALT, LDH e GGT. Com relação aos parâmetros hematológicos, ocorreu diminuição na contagem de células vermelhas, hemoglobina e no número de leucócitos. Houve diminuição das globulinas séricas totais e aumento da relação albumina:globulina. As alterações foram notadas em todos os grupos, quando comparados com o controle.

Material de cultura de *Fusarium moniliforme* foi adicionado à dieta basal de perus, em um estudo conduzido por Weibking et al. (1994), propiciando a intoxicação dessas aves por FB₁ sob nível de 75 mg/kg de ração. Os resultados indicaram aumento do peso relativo de fígado e

hiperplasia hepatocelular. Também foi verificado aumento da relação dos níveis séricos de esfinganina:esfingosina (SA: SO).

Em outro estudo com perus, Ledoux et al. (1996) verificaram os efeitos da fumonisina adicionada à dieta a partir da inclusão de material de cultura de *Fusarium moniliforme*, o que propiciou níveis de intoxicação de 0, 25, 50, 75, 100, 175, 250, 325, 400 e 425 mg de FB₁/ kg de ração. Foi verificada diminuição no consumo e no ganho de peso para os tratamentos 325 a 425 mg/kg. Aumento de peso relativo de fígado foi observado para os tratamentos 25, 50 e 175 a 475 mg/kg, enquanto que o aumento de peso relativo de pâncreas foi verificado para as aves que receberam dietas contendo FCM suprimindo níveis de fumonisina ≥ 175 mg FB₁/ kg de ração. Os perus submetidos aos tratamentos 400 e 475 mg/kg de ração apresentaram aumento no número de hemácias, e também aumento da concentração sérica de GGT e AST. O aumento nos valores séricos de AST são indicativos de alteração na integridade da membrana hepatocitária com extravazamento dessa enzima ou necrose hepática. Apresentaram aumento da relação hepática esfinganina:esfingosina, os animais submetidos aos tratamentos 25 e 75 a 475 mg/kg. Com relação aos achados histopatológicos, os autores descreveram hiperplasia hepatocelular branda para os animais submetidos à intoxicação de 75 e 100 mg/kg; moderada a severa para as aves que receberam 250 mg/kg e severa para os perus que tiveram níveis de 325 a 475 mg/kg. Os animais que foram submetidos à intoxicação com 475 mg/kg apresentaram perda generalizada das estriações transversais, estando os cardiomiócitos mais delgados. Os autores concluíram que as dietas contendo FCM que suplementavam níveis ≥ 75 mg/kg são tóxicas para perus jovens.

Bermudez et al. (1997) verificaram o efeito da intoxicação de perus por FB₁ sob nível de 200 mg/kg de ração, a partir do primeiro dia até os 21 dias de idade. Os autores verificaram aumento do peso relativo de fígado e moderada hiperplasia hepatocelular. Foi observado

aumento no nível sérico de AST e da enzima lactato desidrogenase. Entretanto, os autores não observaram diferença significativa nos valores de proteína total, albumina, ácido úrico e na atividade sérica da enzima GGT.

Em outro estudo, Bermudez et al. (1996) avaliaram os efeitos da intoxicação crônica por FB₁, a partir da inclusão de FCM na dieta de perus, fornecendo nível de 75 mg de toxina/ kg de dieta. Os animais foram tratados durante 18 semanas, tendo sido verificado diminuição do ganho de peso nas semanas 4, 10 e 12 do experimento. Foi verificado aumento de peso absoluto de fígado, aumento do número de leucócitos, do número absoluto de heterófilos e de linfócitos, e na relação heterófilo:linfócito. Os autores concluíram que os perus são relativamente resistentes à exposição crônica à FB₁.

Kubena et al. (1995b) estudaram os efeitos da administração de 200 mg de FB₁/ kg de ração em perus fêmeas Nicholas Large White (NLW), desde o nascimento, até os 21 dias de idade. Verificaram 10% de redução no ganho de peso e aumento do peso relativo de fígado e pâncreas. Não foi verificada alteração em coração. Ocorreu também diminuição na concentração sérica de colesterol e aumento da atividade de AST, para as aves que receberam FB₁. A atividade sérica de GGT não foi alterada pela micotoxina.

Ainda estudando os efeitos da fumonisina em perus fêmeas NLW, Kubena et al. (1995a) administraram 300 mg de FB₁/ kg de ração às aves, desde o nascimento, até os 21 dias de idade. Verificaram redução em 21% do ganho de peso e aumento da conversão alimentar. Notaram aumento do peso relativo de fígado, moela e pâncreas. Ocorreu diminuição do nível sérico de colesterol e da concentração de ácido úrico, sendo que essa última observação pode ser um indicativo de leve dano renal. A diminuição do nível de colesterol foi justificada pelos autores pela inibição da biossíntese de colesterol. Notaram ainda um aumento na atividade de LDH. Não foi observada alteração significativa na atividade de GGT.

Em um outro estudo, Kubena et al. (1997) estudaram os efeitos da administração de 300 mg de FB₁/ kg de ração a perus fêmeas NLW, desde o nascimento, até a terceira semana de idade. Verificaram que o consumo de alimento foi reduzido e a conversão alimentar aumentou pela inclusão da toxina à dieta. Os autores justificaram que o decréscimo no ganho de peso corporal e a diminuição da eficiência da utilização do alimento podem estar associados com a inibição da síntese protéica pela toxina e possivelmente pela interrupção da biossíntese dos esfingolipídeos pela FB₁. Observaram ainda aumento no peso relativo de fígado, moela e pâncreas, ocorrendo por outro lado redução do peso relativo do baço e do coração. Os autores relatam que o aumento no peso relativo de fígado poderia ser associado com alterações no metabolismo lipídico, primariamente como resultante do transporte prejudicado dos lipídeos. Houve diminuição da concentração sérica de colesterol, e aumento da concentração de ácido úrico, da atividade de AST, LDH, da contagem de eritrócitos e de hemoglobina.

Li et al. (1999) estudaram os efeitos da fumonisina B₁ sobre a resposta imune de frangos de corte. Para isso, as aves de um dia foram submetidas a três experimentos diferentes, recebendo tratamento dietético, com níveis de toxinas iguais a 0, 50, 100 ou 200 mg de FB₁/ kg de ração. As aves que receberam 200 mg/kg tiveram aumento significativo do número de colônias no sangue, baço e fígado, comparado ao grupo controle. A FB₁ dietética prejudica a fagocitose pelos heterófilos e macrófagos, acarretando em uma redução do clearance bacteriano durante processos infecciosos. Esses achados sugerem que as aves expostas às toxinas de *Fusarium* são mais susceptíveis a doenças infecciosas, resultantes de disfunção do sistema mononuclear fagocitário. A resposta secundária de anticorpos e a proliferação linfocitária nas aves que tiveram níveis de 200 mg/kg foram significativamente menores do que nas aves do grupo controle. Os autores concluíram que a FB₁ é imunossupressora para frangos de corte, quando presente na ração em níveis de 200 mg/kg.

Em um estudo subsequente, Li et al. (2000) administraram 200 mg de FB₁/ kg de ração a dietas de perus de um dia, visando avaliar os efeitos dessa toxina e também em associação a moniliformina, sobre o desempenho e o sistema imunológico de perus em crescimento. Três experimentos foram realizados, sendo que no primeiro deles, as aves injetadas com 0,25ml de vacina contendo vírus de doença de Newcastle, na segunda e terceira semanas de experimento. Os anticorpos foram mensurados 7 dias após a administração. No experimento 2, o tratamento dietético foi administrado durante três semanas e no dia 21, 2×10^6 linfócitos periféricos foram incubados com mitógenos. No experimento 3, as aves foram submetidas ao tratamento dietético durante três semanas, sendo então injetadas com $4,4 \times 10^7$ *E. coli*/ kg de peso corporal no dia 21. O consumo e o ganho de peso não foram afetados pela FB₁. Comparadas com o grupo controle, as aves que receberam FB₁ tiveram resposta secundária de anticorpos significativamente menor. Foi verificada redução do peso relativo de timo para as aves que receberam FB₁. Os autores sugeriram que a redução no peso de um órgão linfóide pode ser devido a uma alteração na função imune, por uma redução da produção de anticorpos. As aves que receberam FB₁ na dieta apresentaram resposta proliferativa significativamente menor aos mitógenos, em comparação ao controle. Os autores concluíram que a fumonisina B₁ é imunossupressora para perus.

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 progredia 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.

2 OBJETIVOS

Os objetivos pretendidos para a realização desse experimento foram:

- Verificar os efeitos da exposição de codornas em início de postura à FB₁ administrada na dieta, nos níveis de 0 (controle), 10 mg/kg, 50 mg/kg e 250 mg/kg sobre os índices de produtividade (conversão alimentar, curva de produção e viabilidade);
- Avaliar a qualidade dos ovos produzidos através da adoção dos seguintes parâmetros: peso dos ovos, relação entre a altura do albúmen e o peso dos ovos (unidade Haugh), gravidade específica e porcentagem de peso da casca em relação ao peso total do ovo;
- Avaliar o peso relativo e as possíveis alterações histopatológicas presentes em fígado, rins e coração das aves submetidas à intoxicação;
- Avaliar as possíveis alterações nos níveis séricos de albumina, globulina, proteína total, GGT, AST e ácido úrico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e instalações

Foram utilizadas 128 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) de linhagem comercial, adquiridas com 5 semanas de idade e já vacinadas. Os animais foram separados em 4 grupos experimentais de 32 aves cada (4 replicatas de 8 aves). As codornas foram observadas por 2 semanas, para a verificação do início da postura, tendo sido alimentadas com ração convencional à base de milho e farelo de soja, isenta de FB₁ durante esse período. As dietas basais foram formuladas para estar de acordo ou exceder os requerimentos nutricionais para codornas em início de postura, como recomendado pelo NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1994). A composição da dieta basal encontra-se na tabela 1.

Ao atingirem 7 semanas de idade, as codornas foram designadas aleatoriamente a um dos 4 grupos experimentais, tendo sido iniciado o estudo. As aves foram pesadas na chegada e ao final de cada período de 7 dias, no decorrer do experimento.

Os animais foram alojados em uma mesmo galpão do Setor de Avicultura do *Campus* Administrativo da Universidade de São Paulo, em Pirassununga/SP, em baterias metálicas comerciais, constituídas de 4 andares, contendo duas gaiolas, sendo cada uma delas subdivididas em 2 compartimentos, possuindo comedouros lineares individuais, de chapa galvanizada (localizados na extensão frontal da gaiola) e bebedouros do tipo “nipple” (Figura 4). A disposição das aves nas gaiolas foi definida através de sorteio entre os diferentes tratamentos.

Tabela 1 - Composição da ração basal utilizada na preparação de todas as dietas experimentais.

INGREDIENTES	PERCENTUAL
Milho	54,760
Farelo de soja	28,130
Sal	0,400
Calcário 38%	4,710
Fosfato bicálcico	2,500
DL – metionina 99%	0,190
Premix vitamínico (*)	0,250
Premix mineral (**)	0,250
Óleo vegetal	2,130
L-lisina	0,280
Caulim	6,380
ANÁLISE CALCULADA	
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,700
Proteína (%)	18,000
Metionina + cisteína (%)	0,760
Cálcio (%)	2,500
Fósforo disponível (%)	0,550

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

(**) Premix mineral fornece (por kg de dieta) : ferro, 65 mg; cobre, 13 mg; zinco, 65 mg; manganês, 104 mg; iodo, 1,3 mg; cobalto, 1,3 mg; selênio, 0,220 mg.

(***) Composto por quantidades variáveis de calcário, fosfato e amido.

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 lâmpadas incandescentes (100 W) controladas por *timer* adotando-se como critério, o acréscimo ou o decréscimo de 60 minutos de luz artificial por semana, até atingir o nível necessário.

Figura 4 - Baterias metálicas utilizadas no experimento e recipientes para armazenamento de ração.

3.2 Preparo da FB₁

A fumonisina B₁ foi produzida a partir do cultivo de cepa toxigênica de *Fusarium moniliforme* em milho, conforme os procedimentos descritos por Weibking et al. (1993a). A toxina estava contida em material de cultivo preparado e enviado pelo Veterinary Medical Diagnostic Laboratory – University of Missouri-Columbia (USA). O material de cultura de *Fusarium moniliforme* (Figura 5) continha 6.500 mg de FB₁/kg, 2.100 mg de FB₂/kg e 680 mg de FB₃/kg. O material foi também certificado quanto à ausência de níveis detectáveis de outras fusariotoxinas (moniliformina, vomitoxina, zearalenona), bem como de aflatoxinas e ocratoxina A.

Figura 5 - Material de cultura de *Fusarium moniliforme*.

O preparo do material foi realizado em recipientes de 1 L para crescimento, cujas tampas foram modificadas, realizando-se três perfurações (0,635cm), a fim de permitir maior troca de ar. Essas perfurações foram cobertas com fitas para autoclave durante o processo de autoclavagem.

Grãos inteiros de milho (100g) e 100ml de água destilada foram adicionados em cada recipiente, autoclavados por 30 minutos a uma temperatura de 121°C e pressão de 1,4 kg/cm², e resfriados em temperatura ambiente. Fragmentos da cultura de *Fusarium moniliforme* (M-1325) foram adicionados à água destilada esterilizada e 2 ml da suspensão foi adicionada a cada recipiente autoclavado. Um filtro de fibra de vidro esterilizado foi colocado na parte interna da tampa e as fitas para autoclave foram removidas do lado exterior. Os recipientes foram agitados e as tampas afrouxadas, para permitir respiração adicional. Após 24 horas de incubação a uma temperatura de 27°C no escuro, os recipientes foram agitados novamente, para garantir completa dispersão do micélio fúngico. Os recipientes foram incubados no escuro, por um período total de 5 semanas, a uma temperatura de 27°C.

Uma mistura (400 ml) de acetona:clorofórmio (75:25) foi adicionada diretamente em cada cultura com 5 semanas de incubação, permanecendo pelo período de uma noite. O conteúdo

de cada recipiente foi colocado em um agitador por 30 segundos. Foi posteriormente filtrado a vácuo através de um funil de Büchner grande, contendo papel de filtro (Whatman International Ltd., Maidstone, England) que permitia passagem rápida. O resíduo de cultura sólido foi reextraído com acetona:clorofórmio (75:25), refiltrado, permanecendo durante o período de uma noite em capela, para secar ao ar. O material de cultura foi colocado em estufa a 40°C por 48 horas e moído até se tornar um pó fino, em moinho (Fitzpatrick Co., Elmhurst, IL 60126). O material de cultura foi analisado, para a quantificação de FB₁, FB₂ e FB₃ através de CLAE, de acordo com os procedimentos descritos por Wilson et al. (1990).

3.3 Preparo das rações experimentais

O material de cultivo contendo FB₁ foi adicionado à ração basal, em lotes de 30 kg, em proporções adequadas, de maneira a obter, na ração final, os seguintes níveis:

- Tratamento A: dieta basal, sem adição de fumonisina (controle);
- Tratamento B: dieta basal suplementada com 10 mg de FB₁/kg de ração;
- Tratamento C: dieta basal suplementada com 50 mg de FB₁/kg de ração;
- Tratamento D: dieta basal suplementada com 250 mg de FB₁/kg de ração.

As rações preparadas foram homogeneizadas por cerca de 15 minutos em misturador horizontal/helicoidal (Figura 6), e armazenadas em local apropriado até a sua utilização. Os níveis de FB₁ das rações prontas foram comprovados, retirando-se uma amostra de 1 kg de cada ração preparada contendo a toxina. A determinação dos níveis de FB₁ foi realizada

através de CLAE com detecção por fluorescência, segundo Shephard et al. (1990), conforme descrito nos itens subseqüentes.

Figura 6 - Misturador horizontal/helicoidal.

3.3.1 Extração

A extração das fumonisinas em alimentos e rações requer o uso de solventes polares. Para tanto, 50g da amostra foi triturada em um erlenmeyer de 250ml, sendo então adicionado 100 ml de metanol:água (3:1). A mistura foi então homogeneizada em um agitador de alta velocidade por 5 minutos.

O conteúdo foi filtrado através de papel filtro Whatman n°. 4. O pH foi corrigido para 5,8 a 6,5. Essa correção foi feita a partir da adição de 2 a 3 gotas de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M.

3.3.2 Purificação

Antes da análise por CLAE, os extratos devem ser purificados, com o intuito de remover os contaminantes e concentrar as fumonisinas. A purificação foi efetuada em colunas SAX (Bond Elut, 500 mg/6 ml, Varian®), previamente condicionadas com 5ml de metanol, seguida por 5ml de metanol:água (3:1).

Uma alíquota de 10ml de amostra foi aplicada à coluna SAX pré-condicionada. Posteriormente, a coluna foi lavada com 5ml de metanol:água (3:1) e 3ml de metanol. Em seguida, a toxina foi eluída em 10ml de metanol:ácido acético (99:1). O extrato recolhido foi evaporado em banho-maria.

3.3.3 Quantificação

A quantificação foi feita em sistema de CLAE com detecção por fluorescência, e coluna de fase reversa C₁₈, mantida em forno a temperatura constante de 30°C, segundo Shephard et al. (1990).

O resíduo foi ressuspenso em 200µl de acetonitrila:água (1:1), tendo sido filtrado em membrana GC (durapore) com 0,22µm de poro. Uma alíquota de 100µl dessa solução foi usada para a derivação. Esse volume foi repassado para um tubo de ensaio, onde foi acrescentado 200µl de reagente OPA (constituído de 1ml de metanol, 40mg de oftaldialdeído, 5ml de tetraborato de sódio 0,1M e 50µl de 2-mercaptoetanol). A solução OPA foi preparada

sob proteção da luz, sendo que após 2 minutos ao preparo, 20µl foram aplicados no sistema para a quantificação das toxinas.

A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila:água:ácido acético (50:50:1), sendo a vazão de 1ml/minuto. O tempo médio de retenção foi de 8,55 e 16,48 minutos para FB₁ e FB₂ respectivamente. Os resultados foram expressos em µg/kg, sendo a quantidade das fumonisinas presente no extrato obtida através da seguinte fórmula:

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

- F = área do pico correspondente a FB₁ ou FB₂ da amostra;
- G = concentração da solução padrão de FB₁ ou FB₂ (µg/ml);
- H = diluição final da solução teste;
- I = área do pico de FB₁ ou FB₂ da solução padrão;
- J = peso final da amostra utilizada para a quantificação (g).

Ao final da análise das rações experimentais, os níveis encontrados para a fumonisinas foram:

- Tratamento A: 1,21 mg de FB₁/kg e 0,18 mg de FB₂/kg;
- Tratamento B: 8,6 mg de FB₁/kg (86%) e 0,65 mg de FB₂/kg;
- Tratamento C: 53,5 mg de FB₁/kg (107%) e 4,18 mg de FB₂/kg;
- Tratamento D: 204,2 mg de FB₁/kg (81,68%) e 9,39 mg de FB₂/kg.

Os valores em parênteses indicam o percentual de recuperação da toxina nas amostras, os quais podem ser considerados como satisfatórios para as concentrações obtidas nas análises, de acordo com Sydenham et al. (1996).

A ração basal foi também analisada para a possível presença de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), de acordo com Soares e Rodriguez-Amaya (1989), revelando-se negativa para as 4 frações.

3.4 Delineamento experimental

O experimento esteve constituído de 4 tratamentos com 4 repetições, de acordo com a quadro 1. A unidade experimental foi representada por uma gaiola, servida de comedouro individual e bebedouro do tipo “nipple” (Figura 7), e alojou 8 aves (4 codornas em cada subdivisão da gaiola). Portanto, foram designadas 32 aves para cada tratamento, totalizando 128 codornas. O estudo teve duração de 28 dias (4 semanas), sendo que água e ração foram fornecidas às aves, para consumo *ad libitum*.

Figura 7 - Bebedouro do tipo “nipple”.

Quadro 1 - Grupos experimentais e respectivos teores de FB₁ nas rações.

GRUPO EXPERIMENTAL *	FB₁ na ração (mg/kg)
A	Ausente
B	10
C	50
D	250

*Cada grupo experimental foi constituído por 4 repetições, compostas cada uma, por 4 gaiolas contendo 8 aves.

3.5 Variáveis estudadas no experimento

3.5.1 Índices de produtividade

A produção de ovos foi avaliada diariamente, pelo recolhimento e contagem dos ovos de cada gaiola, no período da manhã. Foi realizada também a mensuração do peso da produção diária total de ovos (Figura 8), de cada unidade experimental. O consumo de ração foi avaliado semanalmente (Figura 9). A partir desses índices, foram estabelecidas as seguintes variáveis:

- Índice de conversão alimentar, mediante a divisão da quantidade de ração consumida (kg) pela massa de ovos produzidos (kg) durante o período;
- Curva de produção, obtida através do percentual de postura semanal (número de ovos dividido pelo número de aves alojadas).

Figura 8 - Mensuração do peso dos ovos.

Foi determinada também, a viabilidade dos animais, expressa em porcentagem, das aves sobreviventes ao término do experimento, em relação ao total. As aves que vieram a óbito no decorrer do estudo foram necropsiadas para a pesquisa de possíveis alterações anátomo-

patológicas. Além disso, foi realizada a mensuração do peso das aves, no início do experimento e ao final de cada período de 7 dias.

Figura 9 - Avaliação do consumo semanal de ração.

3.5.2 Qualidade dos ovos

A qualidade dos ovos foi avaliada ao final de cada período de 7 dias, com toda a produção diária, através da adoção dos seguintes parâmetros:

- Unidade Haugh: relação entre a altura do albúmen (A) (Figura 10), medida através de aparelho próprio para esta finalidade (Ames[®], S-6428), e o peso dos ovos, sendo o resultado final obtido através da fórmula:

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

- Densidade, determinada pelo método de flutuação (Figura 11), utilizando-se soluções salinas, com densidades variando entre 1,065 a 1,095 (HAMILTON, 1982);

- Porcentagem de peso de casca em relação ao peso total do ovo. Para essa finalidade, o peso da casca foi mensurado após a lavagem com água potável, para a retirada do excesso de albúmen, e secagem em temperatura ambiente por 48 horas.

Figura 10 - Mensuração da altura do albúmen.

Figura 11 - Método de flutuação para determinação da densidade relativa dos ovos.

3.5.3 Análises séricas

Ao final do experimento, foram coletadas amostras de sangue, por punção cardíaca, de 12 codornas (4 replicatas de 3 aves cada) de cada tratamento, que foram destinadas a análises de perfil de função hepática (proteína total, albumina, AST, GGT e ácido úrico) e hemograma.

A contagem total de hemácias e leucócitos foi realizada utilizando-se a técnica hematológica de Natt; Herrik (1952). A hemoglobina foi quantificada por colorimetria através da técnica hematológica convencional da transformação em cianometahemoglobina. Utilizou-se kit comercial Labtest, número de catálogo 43, confrontando ao padrão comercial Labtest de concentração 10,0 g/dl, número de catálogo 47, por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (espectrofotômetro Celm modelo E-225 D). Decorridos os 10 minutos de repouso a temperatura ambiente após a adição dos 20 µl de amostra de sangue e 5,0 ml de reagente, conforme preconizado pela técnica, teve-se a precaução de se centrifugar a amostra a 3000 rpm por 10 minutos, para retirar os resquícios nucleares eventualmente presentes.

O volume globular foi determinado por centrifugação por 5 minutos, em centrífuga para microhematócrito (marca Heraeus, modelo Biofuge haemo), e o valor lido em tabela apropriada.

A contagem diferencial foi feita após coloração da lâmina por corante de Rosenfeld e devido ao número de células presentes na amostra, foram diferenciadas apenas 50 lâminas de cada amostra, multiplicando-se posteriormente o resultado por 2, para se obter a porcentagem (valor relativo) de cada tipo celular.

A quantificação de proteínas totais foi realizada utilizando-se o método do biureto (GORNALL et al., 1949). A quantificação de albumina foi realizada pela técnica do verde de

bromocresol, utilizando-se o método de Doumas-Biggs modificado. A atividade de AST foi quantificada utilizando-se kit comercial marca BioSystem (número de catálogo 11531), segundo a IFCC (International Federation of Clinical Chemistry). Entretanto, a temperatura utilizada foi de 37°C. Para converter para 30°C, o valor foi multiplicado por 0,72. A atividade de GGT foi quantificada utilizando-se kit comercial marca BioSystem (número de catálogo 11520), segundo a IFCC. A temperatura de reação foi de 37°C, e para converter para 30°C, o resultado foi multiplicado por 0,76. O ácido úrico foi quantificado utilizando-se o kit comercial BioSystem (número de catálogo 11521) e a metodologia utilizada foi a enzimática.

O controle de qualidade das provas bioquímicas foi realizado com a utilização de soros controle comerciais (Precinorm U e Precipath Roche). As dosagens bioquímicas referidas foram realizadas em analisador bioquímico automático marca MAS, modelo Liasys.

3.5.4 Análises histopatológicas e pesos relativos de vísceras

Dezesseis aves por tratamento foram sacrificadas por deslocamento cervical, e o fígado, rins e coração foram removidos e pesados. A partir desses dados, foram calculados os pesos relativos das respectivas vísceras. Amostras dessas vísceras de 5 aves por tratamento foram coletadas para pesquisa de possíveis alterações histopatológicas. Essa análise foi realizada no laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da FMVZ - USP. As aves foram examinadas para a verificação de possíveis alterações macroscópicas.

3.6 *Análise dos resultados*

Os resultados do experimento foram submetidos à análise de variância, de acordo com os procedimentos estabelecidos no General Linear Model do SAS[®] (SAS INSTITUTE, 1992) para a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre as médias das variáveis estudadas nos diferentes tratamentos. Para a comparação entre as médias, quando aplicável, empregou-se o teste de Tukey, adotando-se como nível de rejeição, alfa igual a 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental não foram detectadas modificações visíveis no estado geral das aves, com exceção de quatro que vieram a óbito. A mortalidade observada foi: 0/32 (0 mg de FB₁/kg de ração); 1/32 (10 mg de FB₁/kg de ração); 0/32 (50 mg de FB₁/kg de ração); 3/32 (250 mg de FB₁/kg de ração).

4.1 Índices de Produtividade

A tabela 2 apresenta os valores médios de produção de ovos, peso dos ovos, consumo de ração, conversão alimentar e ganho de peso, obtido nos diferentes tratamentos durante o período experimental.

Tabela 2 - Índices de produtividade obtidos nos diferentes tratamentos, de acordo com a concentração de FB₁ na ração fornecida às aves¹ – Pirassununga – 2003.

FB ₁ (mg/kg)	Produção dos ovos (%)	Consumo de ração (g/ave/sem)	Conversão alimentar (g/g)	Ganho de peso ² (g)	Peso dos Ovos (g)
0	87,05 ± 11,56 ^a	194 ± 21,66 ^a	2,88 ± 0,30 ^a	5,63 ± 3,68 ^a	11,16 ± 0,23 ^a
10	87,05 ± 10,70 ^a	197 ± 20,11 ^a	3,03 ± 0,42 ^a	0,29 ± 3,01 ^{ab}	10,82 ± 0,38 ^a
50	84,60 ± 7,52 ^a	172 ± 7,98 ^b	2,89 ± 0,29 ^a	-3,75 ± 0,88 ^{bc}	10,18 ± 0,30 ^b
250	44,29 ± 15,18 ^b	140 ± 14,83 ^c	4,86 ± 1,17 ^b	-7,78 ± 5,84 ^c	9,44 ± 0,60 ^c

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

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 8 aves cada.

² Ganho de peso entre os dias 1 e 28 do período de intoxicação.

O desempenho das codornas foi afetado negativamente pelos níveis crescentes de fumonisina B₁ adicionados à dieta basal. A produção de ovos foi ligeiramente menor (84,60%) para o grupo que recebeu 50 mg de FB₁/kg de ração, em relação ao grupo controle, cujo valor médio foi de 87,05%. Entretanto, redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi verificada apenas para o grupo que recebeu 250 mg/kg, cujo valor médio de produção foi de 44,29%. A evolução da produção de ovos durante o período experimental encontra-se na figura 12. Pode-se verificar que a produção, para os grupos 50 e 250 mg/kg, estava menor desde a primeira semana de intoxicação.

Figura 12 - Evolução da porcentagem de produção de ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB₁ na ração.

Resultados semelhantes foram verificados por Kubena et al. (1999) num estudo em que foi realizada administração crônica de FB₁ em galinhas poedeiras, sob níveis de 100 e 200 mg/kg de ração. Ao final de ciclos de 28 dias a média da produção diária era avaliada. Esse parâmetro esteve significativamente reduzido para o tratamento 100 mg/kg ao final do nono e do décimo quinto ciclo; já para o tratamento 200 mg/kg, ao final dos ciclos um e três. Quando

comparado ao grupo controle, a porcentagem de produção diária para os quinze períodos de 28 dias esteve significativamente reduzida para as aves que receberam 100 mg/kg.

Entretanto, deve-se notar que no estudo realizado por Kubena e colaboradores, as aves foram submetidas à intoxicação crônica. E também, é importante observar que a redução da produção promovida pela intoxicação por 200 mg de FB₁/kg de ração em galinhas poedeiras foi inferior, à verificada no corrente trabalho. No estudo de 1999, ao final do primeiro ciclo, a produção do grupo submetido ao maior nível de intoxicação foi de 92,8%, enquanto que a produção do grupo controle foi de 98,5%. Nota-se então uma maior sensibilidade para codornas em fase de postura aos efeitos tóxicos da fumonisina.

A evolução do consumo de ração durante o período experimental encontra-se na figura 13. Foi verificada redução no consumo ($p < 0,05$) para os grupos 50 mg/kg (172 g/ave/semana) e 250 mg/kg (140 g/ave/semana), quando comparado ao grupo controle (194 g/ave/semana).

Figura 13 - Evolução do consumo de ração durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB₁ na ração.

Ledoux et al. (1996) observaram menor consumo de ração para perus que receberam ração contendo FCM, que fornecia 325 a 425 mg de FB₁/kg de ração. Esses resultados são condizentes com os achados do presente estudo; entretanto foram necessários níveis de intoxicação consideravelmente superiores para causar redução de consumo em perus, comparando-se com codornas.

Em um outro estudo, Henry et al. (2000) alimentaram frangos de corte com FB₁ purificada sob níveis de até 80 mg/kg e não verificaram efeitos adversos no peso corporal, nem na conversão alimentar.

Já em 1995, Bermudez et al. avaliaram os efeitos da intoxicação de patos Pekin por FB₁ a partir da inclusão de FCM na dieta, o que forneceu níveis de intoxicação de 100, 200 e 400 mg de FB₁/kg de ração. As aves apresentaram redução no consumo, numa relação dose-dependente.

Stevens e Tang (1997) demonstraram que a concentração reduzida de esfingolipídeos, ocasionada pela exposição à FB₁ promoveu o bloqueio quase completo do transporte nos receptores folato. Consequentemente, os processos celulares dependentes dessa vitamina poderiam ficar comprometidos. Em aves, a anemia é um sinal precoce de deficiência de ácido fólico, e nesses casos é seguida por redução no consumo de alimentos (COMBS JR., 1998). Dessa forma, a redução na ingestão de alimento poderia ser justificada também pelo quadro anêmico estabelecido por uma deficiência de folato, promovida pela intoxicação pela fumonisina.

A evolução dos resultados de conversão alimentar encontra-se na figura 14. Verificou-se que o aumento no valor da conversão alimentar foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para o grupo que recebeu nível de intoxicação de 250 mg/kg (4,86 g/g) incluído na dieta, quando comparado ao grupo controle (2,88 g/g).

Figura 14 - Evolução dos valores de conversão alimentar (CA) durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB₁ na ração.

Resultados similares foram verificados por Kubena et al. (1997), que estudaram os efeitos da administração de 300 mg de FB₁/kg de ração a perus fêmeas. A inclusão da fumonisina à dieta causou o aumento da conversão alimentar. Os autores associaram o achado com a inibição protéica promovida pela toxina, e também com a interrupção da biossíntese dos esfingolipídeos.

Entretanto, Gelderblom et al. (1996) avaliaram os efeitos da FB₁ de ração sobre a síntese protéica e lipídica em hepatócitos de ratos. A síntese protéica não foi afetada. Ocorreu aumento na relação fosfatidilcolina:colesterol, o que sugere uma estrutura de membrana mais rígida. Os autores explicam que as alterações induzidas pela FB₁ na membrana celular, especialmente aquelas relacionadas às mudanças nos ácidos graxos na membrana fosfolipídica, e à alteração do conteúdo de ácidos graxos das células hepáticas são provavelmente os eventos chaves, que explicam a citotoxicidade e a indução de uma resposta de crescimento alterado nos hepatócitos primários. Dessa forma, os achados desse estudo

contradizem as conclusões de Kubena et al. (1997), no que diz respeito à inibição da síntese protéica pela fumonisina, causando aumento da conversão alimentar.

A figura 15 ilustra a evolução do peso corporal ao longo do experimento. Considerando a diferença entre o peso inicial (avaliado no dia anterior ao início do experimento) e o peso final (medido no 28º dia), verificou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) para os grupos 50 mg/kg (-3,75g) e 250 mg/kg (-7,78g), quando comparado ao tratamento controle (+5,63g). Já para o tratamento 10 mg/kg (+0,29g), pôde ser verificada redução do ganho de peso corporal, embora não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 15 - Evolução do peso corporal durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB₁ na ração.

Resultados semelhantes foram verificados por Bermudez et al. (1995), que avaliaram os efeitos da intoxicação de patos Pekin por FB₁ a partir da inclusão de FCM na dieta, o que forneceu níveis de intoxicação de 100, 200 e 400 mg de FB₁/kg de ração. As aves apresentaram redução no ganho de peso, numa relação dose-dependente.

Em um estudo com perus, Ledoux et al. (1996) verificaram os efeitos da fumonisina adicionada à dieta a partir da inclusão de material de cultura de *Fusarium moniliforme*, o que

propiciou níveis de intoxicação de 0, 25, 50, 75, 100, 175, 250, 325, 400 e 425 mg de FB₁/kg de ração, verificando diminuição no ganho de peso para os tratamentos 325 a 425 mg/kg.

Bermudez et al. (1996) avaliaram os efeitos da intoxicação crônica por FB₁ a partir da inclusão de FCM na dieta de perus, fornecendo nível de 75 mg de toxina/kg de dieta. Os animais foram tratados durante 18 semanas, tendo sido verificado diminuição do ganho de peso nas semanas 4, 10 e 12 do experimento.

Kubena et al. (1995b) estudaram os efeitos da administração de 200 mg de FB₁/kg de ração a perus, desde o nascimento até os 21 dias de idade. Os autores verificaram 10% de redução no ganho de peso.

Ainda estudando os efeitos da fumonisina em perus fêmeas NLW, Kubena et al. (1995a) administraram 300 mg de FB₁/kg de ração às aves, desde o nascimento até os 21 dias de idade. Os autores verificaram redução em 21% do ganho de peso.

Entretanto, nota-se que codornas são mais sensíveis aos efeitos deletérios das fumonisinas e requerem um menor nível de intoxicação para apresentar redução no ganho de peso, quando comparada a outras espécies.

A figura 16 ilustra a evolução do peso dos ovos. Verificou-se que a diminuição no peso dos ovos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos 50 mg/kg (10,18g) e 250 mg/kg (9,44g), quando comparado ao tratamento controle (11,16g). O grupo submetido a 10 mg/kg apresentou tendência a redução no peso dos ovos (10,82g), embora não tenha diferido estatisticamente ($p > 0,05$).

Kubena et al. (1999) avaliaram os efeitos da administração crônica de fumonisina B₁ em galinhas poedeiras, sob níveis de 100 e 200 mg/kg de ração. Os resultados encontrados pelos autores se diferenciaram dos encontrados no presente estudo. Ao final do nono, décimo

segundo e décimo quinto períodos de 28 dias de intoxicação, houve aumento do peso dos ovos das aves que receberam 100 mg de FB₁/kg de dieta.

Figura 16 - Evolução do peso dos ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB₁ na ração.

Com relação à mortalidade, quatro aves vieram a óbito durante o período experimental. A primeira delas pertencia ao tratamento 250 mg/kg e não apresentou alteração macroscópica durante a necropsia. A segunda codorna, submetida ao mesmo nível de intoxicação, apresentou fígado amarelado, com leve aumento de volume. O terceiro animal, também intoxicado com 250 mg/kg, apresentou fígado e coração hemorrágicos, sendo que o fígado não apresentava alteração de coloração e tinha leve aumento de volume. A última codorna que veio a óbito no decorrer do experimento foi submetida ao tratamento 10 mg/kg. O animal apresentava fígado e coração hemorrágicos à necropsia, sendo que o fígado não apresentava alteração de coloração e o coração tinha os vasos repletos. Não foi verificada nenhuma alteração histopatológica em tecidos hepático, renal e miocárdio dessas quatro aves.

4.2 Índices de Qualidade dos Ovos

A tabela 3 apresenta os valores médios de densidade relativa, unidade Haugh, peso de casca e percentual de casca, obtidos nos diferentes tratamentos durante o período experimental.

Tabela 3 - Parâmetros de qualidade dos ovos obtidos nos diferentes tratamentos, de acordo com a concentração de FB₁ na ração fornecida às aves¹ – Pirassununga – 2003.

FB ₁ (mg/kg)	Densidade relativa	Unidade Haugh	Peso da casca (g)	Percentual de casca (%)
0	702 ± 13,82 ^a	89,99 ± 2,63 ^a	0,88 ± 0,04 ^a	7,93 ± 0,34 ^a
10	692 ± 19,35 ^a	88,12 ± 2,49 ^a	0,85 ± 0,04 ^{ab}	7,92 ± 0,25 ^a
50	692 ± 19,41 ^a	90,72 ± 2,59 ^a	0,78 ± 0,02 ^{bc}	7,79 ± 0,24 ^a
250	699 ± 41,24 ^a	90,74 ± 2,83 ^a	0,73 ± 0,64 ^c	7,85 ± 0,64 ^a

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

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 8 aves cada.

Os valores de densidade relativa não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) nos grupos submetidos à intoxicação, quando comparados ao grupo controle. A figura 17 ilustra a evolução dos valores de densidade relativa dos ovos durante o período experimental nos diferentes tratamentos, de acordo com a concentração de FB₁ na ração fornecida às aves.

A densidade relativa é bastante utilizada na avaliação da qualidade de ovos, pelo fato de ser obtida através de método rápido, prático e barato. Essa característica está diretamente relacionada com a porcentagem de casca (HAMILTON, 1982), visto que quanto maior for a espessura da casca, maior será a densidade relativa. Consequentemente, a resistência da casca estará aumentada, sendo melhor a qualidade do ovo.

Figura 17 - Evolução dos valores de densidade relativa dos ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB₁ na ração.

A técnica utilizada neste experimento para a determinação da característica citada, foi a da flutuação. Assim, grupos de ovos são imersos sequencialmente, numa série de soluções salinas, com densidades relativas ascendentes, variando de 1,065 a 1,095, com aumentos de 0,0025. A densidade relativa da solução salina na qual o ovo flutua primeiro é igual à densidade relativa do ovo. O valor da densidade relativa da solução salina é calibrado com um densímetro, e o ajuste é feito pelo acréscimo de sal ou de água (HAMILTON, 1982).

A figura 18 ilustra a evolução dos valores de unidade Haugh, no decorrer do período experimental. Comparando-se com o grupo controle, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os animais submetidos à intoxicação.

Sabe-se que os valores de unidade Haugh são utilizados na avaliação dos níveis protéicos e da integridade da proteína do albúmen. Dessa forma, os achados do presente estudo são compatíveis com as descrições citadas por Gelderblom et al. (1996), que não verificaram inibição de síntese protéica em hepatócitos primários de ratos. Entretanto, é importante ressaltar que a avaliação da qualidade foi realizada com os ovos recém postos. E, como pode

ser observado na tabela 3, os ovos das aves submetidas aos níveis de intoxicação maiores do que 50 mg FB₁/ kg de ração apresentaram redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o peso da casca, estando as mesmas menos espessas. Dessa forma, as trocas com o meio externo seriam mais favorecidas nos ovos submetidos a esses níveis de intoxicação. Esse fato poderia sugerir uma menor viabilidade para os ovos de aves submetidas à intoxicação ≥ 50 mg de FB₁/kg de ração.

Figura 18 - Evolução dos valores de unidade Haugh durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB₁ na ração.

A evolução do peso da casca pode ser observada na figura 19. Verificou-se que a diminuição no peso da casca dos ovos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos 50 mg/kg (0,78g) e 250 mg/kg (0,73g), quando comparado ao tratamento controle (0,88g). Na figura 20, pode ser observada a evolução da porcentagem de casca. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos, o que pode ser justificado pelo fato de ter ocorrido redução concomitante do peso dos ovos.

Figura 19 - Evolução dos valores de peso de casca dos ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB₁ na ração.

Figura 20 - Evolução dos valores de percentual de casca dos ovos durante o período experimental, de acordo com a concentração de FB₁ na ração.

No decorrer do experimento foi observada alteração na pigmentação da casca dos ovos, numa relação dose-dependente. Os ovos das aves submetidas aos maiores níveis de intoxicação apresentaram as cascas mais despigmentadas, quando comparado aos ovos das aves controle. Essas observações podem ser verificadas na figura 21.

Figura 21 – Aspecto externo das cascas dos ovos provenientes dos grupos controle, 10 mg/ kg, 50 mg/kg e 250 mg/kg.

4.3 **Peso Relativo de Vísceras**

A tabela 4 apresenta os valores médios de peso relativo de fígado, rim e coração, obtidos nos diferentes tratamentos durante o período experimental.

O peso relativo de fígado das codornas foi afetado negativamente pelos níveis crescentes de FB₁ adicionados à dieta basal. Pode ser verificado aumento desse parâmetro, estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para as aves que receberam 50 mg/kg (3,34g/100g peso vivo) e 250 mg/kg (3,55g/100g peso vivo), quando comparado às codornas do grupo controle (2,68g/100g

de peso vivo). O grupo submetido a 10 mg/kg apresentou tendência ao aumento do peso relativo do fígado (2,98g/100g peso vivo), embora não tenha diferido estatisticamente ($p > 0,05$). Os efeitos da FB₁ sobre o peso relativo de fígado podem ser observados na figura 22.

Tabela 4 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre o peso relativo do fígado, rim e coração de codornas¹ – Pirassununga – 2003.

FB ₁ (mg/kg)	Peso relativo (g/100g peso vivo)		
	Fígado	Rim	Coração
0	2,68 ± 0,35 ^a	0,66 ± 0,14 ^a	1,00 ± 0,16 ^a
10	2,98 ± 0,46 ^{ab}	0,71 ± 0,17 ^a	1,00 ± 0,16 ^a
50	3,34 ± 0,39 ^{bc}	0,81 ± 0,19 ^a	1,04 ± 0,38 ^a
250	3,55 ± 0,52 ^c	0,74 ± 0,19 ^a	1,02 ± 0,16 ^a

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

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

Figura 22 - Efeitos da fumonisina B₁ sobre o peso relativo de fígado.

Os achados do presente estudo estão de acordo com as citações de Espada et al. (1994), que estudaram os efeitos da micotoxicose por fumonisina em frangos de corte, sob níveis de 10 mg/kg (a partir da toxina purificada), 30 e 300 mg de FB₁/kg de ração (a partir da inclusão de

FCM à dieta). Os autores relataram aumento de peso relativo de fígado nas aves submetidas à intoxicação, quando comparado aos animais controle.

Weibking et al. (1994) adicionou material de cultura de *Fusarium moniliforme* à dieta basal de perus, propiciando a intoxicação dessas aves por FB₁ sob nível de 75 mg/kg de ração. Os resultados indicaram aumento do peso relativo de fígado.

Em outro estudo com perus, Ledoux et al. (1996) verificaram os efeitos da fumonisina adicionada à dieta a partir da inclusão de material de cultura de *Fusarium moniliforme*, o que propiciou níveis de intoxicação de 0, 25, 50, 75, 100, 175, 250, 325, 400 e 425 mg de FB₁/kg de ração. Os autores verificaram aumento de peso relativo de fígado ($p < 0,05$) para os tratamentos de 25, 50 e 175 a 475 mg/kg.

Bermudez et al. (1997) verificaram aumento do peso relativo de fígado de perus intoxicados com FB₁ sob nível de 200 mg/kg, a partir do primeiro dia até os 21 dias de idade.

Kubena et al. (1995b) e Kubena et al. (1995a) estudaram os efeitos da administração de 200 e de 300 mg FB₁/ kg de ração respectivamente, à perus fêmeas NLW, desde o nascimento, até os 21 dias de idade. Em ambos os estudos, verificaram aumento do peso relativo de fígado.

Nota-se que, até mesmo baixos níveis de intoxicação por FB₁ causa aumento do peso relativo de fígado em diversas espécies de aves. Kubena et al. (1997) relataram que o aumento no peso relativo do fígado poderia estar associado com as alterações no metabolismo lipídico promovidas pela fumonisina, primariamente como resultante do transporte prejudicado dos lipídeos.

No presente estudo, pode ser verificado que a FB₁ não causou alteração estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no peso relativo do rim das aves submetidas à intoxicação, quando comparado aos animais controle. Esses resultados estão de acordo com as observações de

Kubena et al. (1995a), que estudaram os efeitos da administração de 300 mg de FB₁/kg de ração a perus fêmeas NLW, desde o nascimento até os 21 dias de idade.

Entretanto, Weibking et al. (1993) observaram aumento no peso relativo de rim em frangos de corte recebendo dieta contendo FCM que supria níveis de 375, 450 e 525 mg de FB₁/kg de ração. Deve-se ressaltar, porém, que no trabalho citado o nível de intoxicação a que foram submetidas as aves foi bastante superior ao do presente estudo.

Com relação ao peso relativo de coração, não foi verificada nenhuma alteração estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nas aves submetidas aos tratamentos experimentais, quando comparado aos animais controle.

Entretanto, Kubena et al. (1997) estudando os efeitos da administração de 300 mg de FB₁/kg de ração a perus fêmeas NLW por 21 dias, verificaram redução no peso relativo de coração.

Em outro estudo, utilizando a mesma espécie animal, Kubena et al. (1995b) administraram o nível de 200 mg/kg por 21 dias e não verificaram alteração em peso relativo dessa víscera.

Weibking et al. (1993) alimentaram frangos de corte a partir de dietas contendo FCM, que supria níveis FB₁ variando de 75 a 525 mg/kg de ração, e não verificaram alteração em peso relativo de coração, influenciado por qualquer tratamento dietético.

4.4 Índices do Hemograma

As tabelas 5 e 6 apresentam os valores médios de número de hemácias, hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM, obtidos nos diferentes tratamentos durante o período experimental.

Tabela 5 - Efeitos da fumonisina B₁ sobre o número de hemácias, hematócrito e hemoglobina de codornas¹ – Pirassununga – 2003.

FB₁ (mg/kg)	Número de hemácias	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dl)
0	7,16 ± 0,73 ^a	41,5 ± 1,29 ^a	7,20 ± 0,71 ^a
10	7,41 ± 0,75 ^a	40,2 ± 2,63 ^a	6,95 ± 0,95 ^a
50	6,37 ± 1,60 ^a	37,0 ± 1,83 ^{ab}	6,40 ± 0,42 ^a
250	5,36 ± 0,79 ^a	35,0 ± 2,94 ^b	6,65 ± 0,90 ^a

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

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 3 aves cada.Tabela 6 - Efeitos da fumonisina B₁ sobre os índices VCM, HCM e CHCM de codornas¹ – Pirassununga – 2003.

FB₁ (mg/kg)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)
0	58,50 ± 7,08 ^a	10,25 ± 2,15 ^a	17,35 ± 1,73 ^a
10	54,53 ± 3,79 ^a	9,40 ± 1,03 ^a	17,23 ± 1,22 ^a
50	60,38 ± 12,39 ^a	10,53 ± 2,69 ^a	17,33 ± 1,44 ^a
250	66,03 ± 7,69 ^a	12,55 ± 1,97 ^a	19,03 ± 1,89 ^a

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

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 3 aves cada.

Os efeitos tóxicos da FB₁ sobre o número de hemácias podem ser observados na figura 23. Embora não tenha sido estatisticamente significativa (p > 0,05), pode ser verificada tendência à redução desse parâmetro.

Stevens e Tang (1997) demonstraram que a concentração reduzida de esfingolipídeos, ocasionada pela exposição à FB₁ promoveu o bloqueio quase completo do transporte nos receptores folato. Assim, os processos celulares dependentes dessa vitamina poderiam ficar comprometidos. A deficiência de ácido fólico resulta na biossíntese prejudicada de DNA, RNA e conseqüentemente numa redução da divisão celular. Em aves, severa anemia é um dos

sinais precoces de deficiência. A anemia é macrocítica, refletindo a diminuição da síntese de material genético e o atraso da maturação celular na medula óssea. Esse é um sinal precoce da deficiência vitamínica em aves. A anemia é seguida por leucopenia, empenamento prejudicado, perose, letargia e redução do consumo de alimento (COMBS JR., 1998).

Figura 23 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre o número de hemácias.

Os dados do presente estudo estão de acordo com os achados de Javed et al. (1995) que avaliaram os efeitos da administração de FB₁ purificada sob níveis de 125 e 274 mg/kg, para frangos de corte, do primeiro aos 14 dias de idade. Os autores observaram diminuição na contagem de eritrócitos.

Por outro lado, Ledoux et al. (1996) alimentaram perus com ração contendo FCM que fornecia níveis de FB₁ de 400 e 475 mg/kg de dieta e observaram aumento ($p < 0,05$) no número de hemácias.

Kubena et al. (1997) avaliaram os efeitos da administração de 300 mg de FB₁/kg de ração a perus fêmeas e verificaram aumento da contagem de eritrócitos, o que discorda dos achados do presente estudo.

A figura 24 ilustra os efeitos tóxicos da FB₁ sobre a porcentagem do hematócrito das codornas. Nota-se tendência à redução para os tratamentos 10 mg/kg (40,2%) e 50 mg/kg (37%) em relação ao grupo controle (41,5%). Redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) pode ser verificada para o tratamento 250 mg/kg (35%).

Figura 24 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre a porcentagem do hematócrito.

O valor do hematócrito corresponde ao conteúdo de eritrócitos, no volume total de sangue. Dessa forma, a redução nesse parâmetro é compatível, visto que houve redução no número de hemácias.

Os efeitos tóxicos da FB₁ sobre a concentração hemoglobina podem ser observados na figura 25. Foi observada tendência à redução desse parâmetro para os tratamentos 10 mg/kg (6,95g/dl), 50 mg/kg (6,40g/dl) e 250 mg/kg (6,65g/dl), quando comparado aos valores verificados para os animais do grupo controle (7,20g/dl).

Resultados similares foram verificados por Javed et al. (1995) que estudaram os efeitos da administração de FB₁ purificada sob níveis de 125 e 274 mg/kg para frangos de corte. Os autores puderam constatar diminuição na concentração de hemoglobina.

Por outro lado, Kubena et al. (1997) avaliaram os efeitos da administração de 300 mg de FB₁/kg de ração a perus fêmeas e verificaram aumento da concentração de hemoglobina, o que discorda dos achados do presente estudo.

Figura 25 - Efeitos tóxicos da fumonissina B₁ sobre os valores de concentração hemoglobina.

Os efeitos tóxicos da FB₁ sobre o índice volume corpuscular médio (VCM) podem ser observados na figura 26. Esse índice é a expressão do valor médio do volume das hemácias. Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), pode ser notado uma tendência ao aumento desse parâmetro para os tratamentos 50 mg/kg (60,38fl) e 250 mg/kg (66,03fl), quando comparado aos animais do tratamento controle (58,50fl).

Esses achados são compatíveis com as descrições de Combs Jr. (1998), que diz que a anemia nas aves pode ser ocasionada pela deficiência de ácido fólico. Essa anemia é caracteristicamente macrocítica, devido à carência desse fator de multiplicação celular na medula óssea.

Figura 26 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre o índice VCM.

A figura 27 ilustra os efeitos da FB₁ sobre o índice hemoglobina corpuscular média (HCM). Esse índice é a expressão da hemoglobina contida na hemácia. Não foi observado aumento estatisticamente significativo ($p > 0,05$) para esse parâmetro; entretanto pode-se notar tendência ao aumento para o tratamento 250 mg/kg (12,55pg), quando comparado ao grupo controle (10,25pg).

Os valores da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) não apresentaram variação estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O CHCM expressa a proporção de hemoglobina existente na hemácia. O tratamento 250 mg/kg apresentou aumento numérico (19,03%) desse parâmetro, quando comparado ao grupo controle (17,35%).

Pôde ser constatado também no presente estudo que, duas amostras provenientes do tratamento 250 mg/kg e uma amostra do tratamento 50 mg/kg, apresentaram-se lipêmicas.

Figura 27 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre o índice HCM.

4.5 Índices do Leucograma

A tabela 7 apresenta os valores médios de número de leucócitos, porcentagem de linfócitos, monócitos e heterófilos, obtidos nos diferentes tratamentos durante o período experimental.

Tabela 7 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre o número de leucócitos, a porcentagem de linfócitos, monócitos e heterófilos de codornas¹ – Pirassununga – 2002.

FB ₁ (mg/kg)	Nº de leucócitos (/ mm ³)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Heterófilos (%)
0	3,64 ± 0,27 ^{ab}	62,5 ± 14,46 ^a	4,0 ± 2,83 ^a	34,0 ± 11,20 ^a
10	4,04 ± 0,28 ^b	58,0 ± 27,57 ^a	5,0 ± 2,58 ^a	36,0 ± 29,71 ^a
50	3,35 ± 0,32 ^a	41,0 ± 28,5 ^a	1,5 ± 1,91 ^a	56,5 ± 28,77 ^a
250	3,36 ± 0,31 ^a	24,6 ± 15,14 ^a	4,0 ± 5,29 ^a	71,3 ± 15,01 ^a

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

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 3 aves cada.

Com relação ao número de leucócitos, pode ser verificado um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para o tratamento 10 mg/kg (4,04 leucócitos/mm³), quando comparado aos grupos 50 mg/kg (3,35 leucócitos/mm³) e 250 mg/kg (3,36 leucócitos/mm³). E, tendência à redução desse parâmetro foi verificada para os animais submetidos a 50 mg/kg (3,35 leucócitos/mm³) e 250 mg/kg (3,36 leucócitos/mm³), quando comparado ao controle (3,64 leucócitos/mm³). A figura 28 ilustra os efeitos da FB₁ sobre o número de leucócitos.

Figura 28 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre o número de leucócitos.

A redução do número de leucócitos verificada para os dois maiores níveis de intoxicação no presente estudo está de acordo com as citações de Combs Jr. (1998). O autor descreve leucopenia em consequência a quadros de anemia macrocítica, em casos de deficiência de ácido fólico. E, Stevens e Tang (1997) demonstraram que a concentração reduzida de esfingolípídeos, ocasionada pela exposição à FB₁ promoveu o bloqueio quase completo do transporte nos receptores folato. Consequentemente, os processos celulares dependentes dessa vitamina poderiam ficar comprometidos.

Por outro lado, Bermudez et al. (1996) avaliaram os efeitos da intoxicação crônica por FB₁, a partir da inclusão de FCM na dieta de perus fornecendo nível de 75 mg de toxina/ kg de dieta. Os animais apresentaram aumento no número de leucócitos.

Os efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre a porcentagem de linfócitos podem ser observados na figura 29. Mesmo não tendo sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$), pode ser verificada redução para esse parâmetro para os tratamentos 10 mg/kg (58,0%), 50 mg/kg (41,0%) e 250 mg/kg (24,6%), quando comparado às aves do grupo controle (62,5%).

Figura 29 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre a porcentagem de linfócitos.

Os dados do presente estudo não estão de acordo com os achados de Bermudez et al. (1996). Os autores avaliaram os efeitos crônicos da FB₁, sob nível de 75 mg/kg de dieta para perus e verificaram aumento no número absoluto de linfócitos.

Os valores da porcentagem de monócitos não apresentaram variação estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O tratamento 50 mg/kg apresentou tendência à redução (1,5%) desse parâmetro, quando comparado ao grupo controle (4,0%).

Os efeitos tóxicos da FB₁ sobre a porcentagem de heterófilos podem ser observados na figura 30. Verificou-se tendência ao aumento desse parâmetro para os tratamentos 50 mg/kg (56,5%) e 250 mg/kg (71,3%), quando comparado ao grupo controle (34,0%).

Esses achados são compatíveis com as observações de Bermudez et al. (1996), que relataram aumento do número absoluto de heterófilos, para perus submetidos à intoxicação crônica por FB₁ sob nível de 75 mg/kg.

Figura 30 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre a porcentagem de heterófilos.

4.6 Índices de bioquímica sérica

A tabela 8 apresenta os valores médios de proteínas totais, albumina, AST, GGT e ácido úrico, obtidos nos diferentes tratamentos durante o período experimental.

Tabela 8 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre os valores de proteína total, albumina, AST, GGT e ácido úrico de codornas¹ – Pirassununga – 2003.

FB₁ (mg/kg)	Proteína total (g/dl)	Albumina (g/dl)	AST (U/l)	GGT (U/l)	Ácido úrico (mg/dl)
0	4,15 ± 0,29 ^a	2,58 ± 0,17 ^a	69,50 ± 55,93 ^a	4,25 ± 3,88 ^a	4,03 ± 0,60 ^a
10	4,60 ± 0,43 ^a	2,50 ± 0,22 ^a	168,8 ± 209,8 ^{ab}	3,40 ± 1,10 ^a	2,98 ± 0,25 ^a
50	5,03 ± 0,67 ^a	2,58 ± 0,17 ^a	184,7 ± 188,7 ^{ab}	2,40 ± 0,27 ^a	4,10 ± 1,24 ^a
250	5,00 ± 0,24 ^a	2,58 ± 0,29 ^a	503,7 ± 176,0 ^b	3,28 ± 2,85 ^a	4,20 ± 0,58 ^a

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

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão, para 4 repetições com 3 aves cada.

Os testes bioquímicos foram utilizados com a finalidade de avaliar a multiplicidade de funções metabólicas desempenhadas pelos órgãos, envolvendo os processos relacionados à síntese, secreção e excreção de determinadas substâncias. Assim, em alterações da permeabilidade de células hepáticas e/ou de sua morte, certas enzimas podem ser detectadas no soro sanguíneo. A elevação da atividade enzimática sérica está relacionada com o grau de lesão nos hepatócitos. Na maioria das intoxicações, que causam lesão hepática de moderada a alta intensidade, observam-se alterações nos resultados das provas de função hepática, caracterizadas pelos aumentos séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT) e nas concentrações de bilirrubina e proteína total. Alterações na atividade dos principais grupos de enzimas hepáticas indicam diferentes tipos de lesão hepática.

A enzima aspartato aminotransferase (AST) é indicadora de lesão na célula hepática e reflete lesão citotóxica inespecífica. Deve-se ressaltar que a AST não é específica para tecido hepático. Essa enzima pode aparecer elevada em enfermidades de outros órgãos, como o

coração e o tecido muscular. O gama glutamil transferase (GGT) é indicador de obstrução do sistema biliar (indica colestase).

Os efeitos tóxicos da FB₁ sobre os valores de proteína total podem ser observados na figura 31. Observou-se apenas uma tendência ao aumento na concentração da proteína sérica total, nas aves submetidas à intoxicação.

Figura 31 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre a concentração sérica de proteínas totais.

Piramanayagam et al. (2001) avaliaram os efeitos da intoxicação por FB₁, sob níveis de 80, 160 e 320 mg/kg, sobre os parâmetros bioquímicos de frangos de corte. As análises séricas em intervalos semanais revelaram elevação dose-dependente e progressiva nos valores de proteína total, o que está de acordo com os achados do presente estudo.

Entretanto, Bermudez et al. (1997) verificaram o efeito da intoxicação de perus por FB₁ sob nível de 200 mg/kg de ração, a partir do primeiro dia até os 21 dias de idade. Os autores não observaram diferença significativa nos valores de proteína total.

Em 1995, Ramasamy e colaboradores utilizaram monocamadas de células endoteliais de artérias pulmonares suínas para investigar os efeitos da FB₁ sobre o endotélio vascular. Os

autores verificaram que ocorreu um aumento na transferência de albumina através da monocamada endotelial. Essas observações permitiram concluir que, a fumonisina é capaz de alterar a função de barreira das células endoteliais. Dessa maneira, poderia justificar a tendência ao aumento na concentração da proteína sérica total, nas aves submetidas à intoxicação no presente estudo.

A concentração sérica de albumina não apresentou variação estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Esse achado não está de acordo com as descrições de Piramanayagam et al. (2001), que avaliaram os efeitos da intoxicação por FB₁, sob níveis de 80, 160 e 320 mg/kg, sobre os parâmetros bioquímicos de frangos de corte. As análises séricas em intervalos semanais revelaram elevação dose-dependente e progressiva nos valores de albumina.

Entretanto, Bermudez et al. (1997) estudando os efeitos da intoxicação de perus por FB₁ sob nível de 200 mg/kg de ração, a partir do primeiro dia até os 21 dias de idade, não observaram diferença significativa na concentração sérica de albumina.

A atividade sérica da enzima AST foi afetada negativamente pelos níveis crescentes de FB₁ adicionados à dieta basal. Pode ser verificado aumento desse parâmetro, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), nas aves que receberam 250 mg/kg (503,7 U/l), quando comparado às codornas do grupo controle (69,5 U/l). Os grupos submetidos a 10 mg/kg (168,8 U/l) e 50 mg/kg (184,7 U/l) apresentaram tendência ao aumento na atividade da enzima AST, embora não tenha diferido estatisticamente ($p > 0,05$). A figura 32 ilustra os efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre a atividade da enzima sérica AST.

Resultados similares foram verificados por Piramanayagam et al. (2001), que descreveram aumento significativo nos níveis de AST em frangos de corte recebendo níveis de 80, 160 e 320 mg de FB₁/kg de ração.

Figura 32 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre a atividade da enzima sérica AST.

Javed et al. (1995) estudaram os efeitos da administração de FB₁ purificada sob níveis de 125 e 274 mg/kg, para frangos de corte, do primeiro aos 14 dias de idade. Os autores observaram aumento significativo dos níveis da atividade sérica da enzima AST.

Em um estudo com perus, Ledoux et al. (1996) avaliaram os efeitos da fumonisina adicionada à dieta a partir da inclusão de material de cultura de *Fusarium moniliforme*. Verificaram para os níveis de intoxicação 400 e 475 mg de FB₁/kg de ração aumento ($p < 0,05$) da concentração sérica de AST. Os autores justificaram que esse aumento é indicativo de alteração na integridade da membrana hepatocitária com extravazamento da enzima ou necrose hepática.

Kubena et al. (1995b) estudaram os efeitos da administração de 200 mg de FB₁/kg de ração, a perus fêmeas NLW, e verificaram aumento da atividade sérica da enzima AST. Em contrapartida, Kubena et al. (1995a) administraram 300 mg de FB₁/kg de ração a mesma espécie animal, pelo mesmo período de intoxicação, e não verificaram aumento nos níveis séricos de AST.

Entretanto, em outro estudo Kubena et al. (1997) estudaram os efeitos da administração de 300 mg de FB₁/kg de ração a perus fêmeas NLW, desde o nascimento, até a terceira semana de idade. Nessa ocasião, verificaram aumento da atividade de AST.

Bermudez et al. (1997) estudaram os efeitos da intoxicação de perus por fumonisina B₁ sob nível de 200 mg/kg de ração, a partir do primeiro dia até os 21 dias de idade e observaram diferença significativa na atividade sérica da enzima AST.

Os efeitos tóxicos da FB₁ sobre a atividade da enzima sérica GGT podem ser observados na figura 33. A concentração sérica dessa enzima não sofreu alteração estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 33 - Efeitos tóxicos da fumonisina B₁ sobre a atividade da enzima sérica GGT.

Esses achados estão de acordo com as descrições de Bermudez et al. (1997), que avaliaram os efeitos da intoxicação de perus por FB₁ sob nível de 200 mg/kg de ração. Os autores não observaram diferença significativa na atividade sérica da enzima GGT.

Também estão de acordo com os achados do presente estudo as citações de Kubena et al. (1995b) e Kubena et al. (1995a) que estudaram os efeitos da administração de 200 e de 300

mg FB₁/kg de ração respectivamente, a perus fêmeas NLW. Em ambos os estudos, os autores não observaram alteração significativa da atividade da enzima sérica GGT.

Por outro lado, Javed et al. (1995) estudaram os efeitos da administração de FB₁ purificada sob níveis de 125 e 274 mg/kg, para frangos de corte, e observaram aumento significativo dos níveis séricos de GGT.

E em um estudo com perus, Ledoux et al. (1996) avaliaram os efeitos da fumonisina adicionada à dieta a partir da inclusão de material de cultura de *Fusarium moniliforme*. Os animais submetidos aos tratamentos 400 e 475 mg de FB₁/kg de ração apresentaram aumento ($p < 0,05$) da concentração sérica de GGT. Entretanto, deve-se notar que o nível de intoxicação a que foram submetidos esses animais foi consideravelmente superior ao do presente estudo.

A concentração sérica de ácido úrico não apresentou variação estatisticamente significativa ($p > 0,05$), para os tratamentos submetidos à intoxicação pela fumonisina B₁. Esses dados estão de acordo com as observações de Bermudez et al. (1997) que avaliaram os efeitos da intoxicação de perus pela FB₁ sob nível de 200 mg/kg e não notaram diferença significativa nos níveis séricos da concentração de ácido úrico.

Entretanto, Espada et al. (1994) estudaram os efeitos da micotoxicose por fumonisina em frangos de corte, sob níveis de 10, 30 e 300 mg/kg. Os autores descreveram que a toxina causou diminuição dos níveis séricos de ácido úrico e justificaram que essa redução poderia estar relacionada com uma alteração no catabolismo protéico, devido aos danos hepáticos promovidos pela fumonisina.

De acordo com esses achados, Kubena et al. (1995a) também descreveram diminuição da concentração sérica de ácido úrico, para perus fêmeas submetidas a intoxicação por

fumonisina B₁, sob nível de 300 mg/kg. Os autores justificaram que essa diminuição poderia ser um indicativo de leve dano renal.

Por outro lado, Kubena et al. (1997) avaliaram os efeitos da administração de 300 mg de FB₁/kg de ração a perus fêmeas, e verificaram aumento da concentração sérica de ácido úrico, o que vem a contradizer os achados dos estudos anteriores.

4.7 Análises Histopatológicas

Com relação aos achados histopatológicos, não foram observadas alterações significativas nas amostras dos tecidos hepático, renal e do miocárdio, comparando-se com o grupo controle. Alterações histopatológicas em tecido hepático são descritas em vários estudos, com diversas espécies de aves, submetidas a diferentes níveis de intoxicação. A principal alteração encontrada é a hiperplasia hepatocelular (WEIBKING et al., 1993; BERMUDEZ et al., 1995; WEIBKING et al., 1994; LEDOUX et al., 1996; BERMUDEZ et al., 1997), tendo sido descrita também hiperplasia biliar (BERMUDEZ et al., 1995).

5 CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente trabalho, e considerando os objetivos propostos, pode-se concluir que:

- As codornas alimentadas com ração contendo concentração ≥ 50 mg de FB₁/kg reduziram ($p < 0,05$) o consumo de alimentos e apresentaram menor ($p < 0,05$) ganho de peso;
- A conversão alimentar foi aumentada ($p < 0,05$) apenas para as aves que receberam 250 mg de FB₁/kg na dieta;
- A produção média de ovos apresentou-se significativamente menor ($p < 0,05$) para o grupo exposto a 250 mg de FB₁/kg;
- O peso dos ovos diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para as aves alimentadas com ração contendo concentração de 250 mg de FB₁/kg;
- As médias de densidade e unidade Haugh não foram afetadas ($p > 0,05$) pela FB₁;
- O peso das cascas dos ovos diminuiu ($p < 0,05$) nos grupos que receberam concentração ≥ 50 mg de FB₁/kg na dieta. Entretanto, o percentual de peso da casca em relação ao peso total do ovo não foi afetado pela FB₁;
- As aves dos tratamentos que receberam concentração ≥ 50 mg de FB₁/kg na dieta apresentaram maior ($p < 0,05$) peso relativo de fígado. O peso relativo de rim e o peso relativo de coração não foram afetados ($p > 0,05$) pela FB₁;
- As aves que receberam 250 mg de FB₁/kg na dieta apresentaram redução ($p < 0,05$) da porcentagem do hematócrito. Os outros parâmetros do hemograma que foram avaliados no presente estudo não foram afetados ($p > 0,05$) pela FB₁;
- Com exceção do número de leucócitos aumentado no tratamento 10 mg/kg ($p < 0,05$), os outros parâmetros do leucograma avaliados não foram afetados pela FB₁ ($p > 0,05$);
- o valor de AST para o tratamento 250 mg de FB₁/kg de ração encontrou-se aumentado ($p < 0,05$) quando comparado ao controle. Os outros parâmetros de bioquímica sérica avaliados no presente estudo não foram afetados pela FB₁ ($p > 0,05$);
- Com relação aos achados histopatológicos, não houve diferença entre os tratamentos, em tecido hepático, renal e miocárdio, comparando-se com o grupo controle.

Os resultados obtidos no experimento demonstraram que as codornas de postura apresentam elevada sensibilidade aos efeitos tóxicos da FB₁, em níveis que foram descritos como sendo de ocorrência natural em produtos alimentícios, em condições de campo. Os dados indicaram que a exposição à FB₁ em níveis ≥ 50 mg/kg, durante 28 dias, podem afetar adversamente o desempenho de codornas, o que enfatiza a importância do controle da contaminação por fumonisinas nas rações de codornas.

REFERÊNCIAS

AH-SEO, J.; WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 65, p. 1331-1334, 1999.

BERMUDEZ, A. J.; LEDOUX, D. R.; ROTTHINGHAUS, G. E. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ in ducklings. **Avian Dis.**, v. 39, n. 4, p. 879-886, 1995.

BERMUDEZ, A. J.; LEDOUX, D. R.; ROTTHINGHAUS, G. E.; BENNETT, G. A. The individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin and fumonisin B₁ in turkeys. **Avian Dis.**, v. 41, p. 304-311, 1997.

BERMUDEZ, A. J.; LEDOUX, D. R.; TURK, J. R.; ROTTHINGHAUS, G. E. The chronic effects of *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁ in turkeys. **Avian Dis.**, v. 40, n. 1, p. 231-235, 1996.

BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLOM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisin mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **J. Chem. Soc. Commun.**, p. 743-745, 1988.

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

CAWOOD, M. E.; GELDERBLOM, W. C. A.; VLEGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 1958-1962, 1991.

CHANG, Y. S.; ZHANG, C. L.; ZHAO, P. Z.; DENG, Z. L. Human aortic proteoglycans of subjects from districts of high and low prevalence of atherosclerosis in China. **Atherosclerosis**, v. 31, p. 9-15, 1991.

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

COMBS Jr., G. F. Folate. In: _____. **The vitamins**. Fundamental aspects in nutrition and health. 2 nd ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 377-401.

CÔRTEZ, N. A.; CORRÊA, B.; CÔRTEZ, J. A.; SOUZA, V. N.; SILVA, R. R. P. Ocorrência natural de fumonisinas no milho produzido pelo sistema tradicional de cultivo, em comunidades de agricultura familiar do estado de Mato Grosso. **Higiene Alimentar**, v.16, p. 72-81, 2002.

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

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

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

DRAGAN, Y. P.; BIDLACK, W. K.; COHEN, S. M.; GOLDSWORTHY, R. T.; VOSS, K. A. Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and risk assessment: fumonisin B₁ as an example. **Toxicol. Sci.**, v. 61, n. 1, p. 6-17, 2001.

ESPADA, Y.; GOPEGUI, R. R.; CUADRADAS, C.; CABAÑES, F. J. Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. **Avian Dis.**, v. 38, p. 454-460, 1994.

ESPADA, Y.; GOPEGUI, R. R.; CUADRADAS, C.; CABAÑES, F. J. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: plasma proteins and coagulation modifications. **Avian Dis.**, v. 41, n. 1, p. 73-79, 1997.

FINCHAM, J. E.; MARASAS, W. F. O.; TALJAARD, J. J. F.; KRIEK, N. P. J.; BADENHORST, C. J.; GELDERBLUM, W. C. A.; SEIER, J. V.; SMUTS, C. M.; FABER, M.; WEIGHT, M. J.; SLAZUS, W.; WOODROOF, C. W.; van WYK, M. J.; KRUGER, M.;

THIEL, P. G. Atherogenic effects in non-human primate of *Fusarium moniliforme* cultures added to a carbohydrate diet. **Atherosclerosis**, v. 94, p. 13-25, 1992.

GELDERBLOM, W. C. A.; JESKIEWICZ, C. K.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N. P. J. Novel-mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 54, p. 1806-1811, 1988.

GELDERBLOM, W. C. A.; MARASAS, W. F. O.; VLEGGAAR, R.; THIEL, P. G.; CAWOOD, M. E. Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. **Mycopathologia**, v. 117, p. 11-16, 1992.

GELDERBLOM, W. C. A.; SMUTS, C. M.; ABEL, S.; SNYMAN, S. D.; CAWOOD, M. E.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; SWANEVELDER, S. Effects of Fumonisin B₁ on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes. **Food Chem. Toxicol.**, v. 34, n. 4, p. 361-369, 1996.

GORNALL, G. A.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 177, p. 751-766, 1949.

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

HAMILTON, R. M. G. Methods and factors that affect the measurement of eggshell quality. **Poult. Sci.**, v. 61, p. 2022-2039, 1982.

HASCHEK, W. M.; MOTELIN, G.; NESS, D. K.; HARLIN, K. S.; HALL, W. F.; VESONDER, R. F.; PETERSON, R. E.; BEASLEY, V. R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. **Mycopathologia**, v. 117, p. 83-96, 1992.

HENRY, M. H.; WYATT, R. D. A review of fumonisin production by *Fusarium moniliforme* and fumonisin toxicosis in animals. **Appl. Poult. Res.**, v. 2, p. 188-192, 1993.

HENRY, M. H.; WYATT, R. D.; FLETCHER, O. J. The toxicity of purified fumonisin B₁ in broiler chicks. **Poult. Sci.**, 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 Addit. Contam.**, v. 13, p. 173-183, 1996.

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

JAVED, T.; DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; RICHARD J. L.; BENNET, G. A.; COTE, L. M.; BUCK, W. B. Serohematologic alterations in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or fumonisin B₁ and moniliformin. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 7, n. 4, p. 520-526, 1995.

KIM, M. S.; LEE, D. Y.; WANG, T.; SCHROEDER, J. J. Fumonisin B₁ induces apoptosis in LLC-PK1 renal epithelial cells via sphinganine- and calmodulin- dependent pathway. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 176, n. 2, p. 118-126, 2001.

KRIEK, N. P. J.; KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F. O. A comparative study of the toxicity of *Fusarium moniliforme* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. Onderstepoort. **J. Vet. Res.**, v. 48, p. 129-131, 1981.

KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; SARR, A. B.; ROTTINGHAUS, G. E. Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and diacetoxyscirpenol or ochratoxin A in turkey polts. **Poult. Sci.**, v. 76, n. 2, p. 256-264, 1997.

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. **Poult. Sci.**, v. 74, p. 306-313, 1995a.

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

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; BUCKLEY, S. A.; BAILEY, R. H.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of long-term feeding of diets containing moniliformin, supplied by *Fusarium fujikuroi* culture material, and fumonisin, supplied by *Fusarium moniliforme* culture material, to laying hens. **Poult. Sci.**, v. 78, n. 11, p. 1499-1505, 1999.

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 33, n. 4, p. 325-333, 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. **Poult. Sci.**, v. 75, p. 1472-1478, 1996.

LEESON, D. R.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. In: _____. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995.

LEESON, D. R.; SUMMERS, J. D. In: _____. **Commercial poultry nutrition**. 2 ed. Guelph: University Books, 1997.

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. **Poult. Sci.**, v. 78, n. 9, p. 1275-1282, 1999.

LI, Y. C.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; FRITSCHKE, K. L.; ROTTINGHAUS, G. E. Individual and combined effects of fumonisin B₁ and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poults. **Poult. Sci.**, v. 79, n. 6, p. 871-878, 2000.

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

MARTINOVA, E. A. Influence of sphingolipids on T lymphocyte activation. **Biochemistry**, Mosc, v. 63, n. 1, p. 102-110, 1998.

MERRILL Jr., A. H. *De Novo* Sphingolipid Biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 29, p. 25843-25846, 2002.

MERRILL Jr., A. H.; SCHMELZ, E. M.; DILLEHAY, D. L.; SPIEGEL, S.; SHAYMAN, J. A.; SCHROEDER, J. J.; RILEY, R. T.; VOSS, K. A.; WANG, E. Sphingolipids – The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 142, p. 208-225, 1997a.

MERRILL Jr., A. H.; SCHMELZ, E. M.; WANG, E.; DILLEHAY, D. L.; RICE, L. G.; MEREDITH, F.; RILEY, R. T. Importance of sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism as components of animal diets. **J. Nutr.**, v. 127, n. 5, p. 830-833, 1997b.

MERRILL Jr., A. H.; SULLARDS, C. M.; WANG E.; VOSS K. A.; RILEY, R. T. Sphingolipids metabolism: roles in signals transduction and disruption by fumonisins. **Environm.Health Perspect.**, v. 109, n. 2, p. 283-289, 2001.

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

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, p. 62S-76S, 1998. Symposium Suppement.

MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in culture of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*. **J. Agri. Food Chem.**, v. 45, p. 1169-1173, 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry**. 9. ed. Washington D.C.: National Academy of Sciences, 1994.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poult. Sci.**, v. 31, p. 735-738, 1952.

NORRED, W. P.; VOSS, K. A. Toxicity and role of fumonisin in animal diseases and human esophageal cancer. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 522-527, 1994.

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

OSWEILER, G. D.; KEHRLI, M. E.; STABEL, J. R.; THURSTON, J. R.; ROSS, P. F.; WILSON, T. M. Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeders calves. **J. Anim. Sci.**, v. 71, n. 2, p. 459-466, 1993.

PIER, A. C. An overview of the mycotoxicosis of domestic animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 163, p. 1259-1261, 1973.

PIRAMANAYAGAM, S.; GEORGE, V. T. Subacute toxicity of “fumonisin” in broiler chicks – changes in some biochemical parameters. **Indian Vet. J.**, v. 78, n. 12, p. 1095-1097, 2001.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO Jr., I.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

RAMASAMY, S.; WANG, E.; HENNING B.; MERRILL Jr, H. A. Fumonisin B₁ alters sphingolipids metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 133, n. 2, p. 343-348, 1995.

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

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; VANSCHALKWYK, D. J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn and in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopath.**, v. 82, p. 353-357, 1992.

RILEY, R. T.; AN, N. H.; SWOWKER, J. L.; YOO, H. S.; NORRED, W. P.; CHAMBERLAIN, W. J.; WANG, E.; MERRILL Jr, A. H.; MOTELIN, G.; BEASLEY, V. R.; HASCHEK, W. M. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. **Tox. Appl. Pharmacol.**, v. 118, n. 1, p. 105-112, 1993.

RILEY, R. T.; HINTON, D. M.; CHAMBERLAIN, W. J.; BACON, C. W.; WANG, E.; MERRILL Jr, H. A.; VOSS, K. A. Dietary fumonisin B₁ induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. **J. Nutr.**, v. 124, n. 4, p. 594-603, 1994.

RILEY, R. T.; NORRED, W. P.; BACON, C. W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 13, p. 167-169, 1993a.

RILEY, R. T.; WANG, E.; SCHROEDER, J. J.; SMITH, E. R.; PLATTNER, R. D.; ABBAS, H.; YOO, H. S.; MERRILL Jr, A. H. Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. **Natural toxins**, v. 4, n. 1, p. 3-15, 1996.

ROSS, P. F.; LEDET, A. E.; OWENS, D. L.; RICE, L. G.; NELSON, H. A.; OSWEILER, G. D.; WILSON, T. M. Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and

encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 5, n. 1, p. 69-74, 1993.

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. *Appl. Env. Microbiol.*, v. 56, p. 3225-6, 1990.

ROSS, P. F.; RICE L. D.; OSWEILLER, G. D.; NELSON, H. A.; RICHARD, J. L.; WILSON, T. M. A review and update of animal toxicosis associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. *Mycopathologia*, v. 117, p. 109-114, 1992.

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

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. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 48, p. 81-85, 1988.

SAS Institute. **SAS[®] user's guide:** statistics. Cary, NC., 1992.

SCHROEDER, J. J.; CRANE, H. M.; XIA, J.; LIOTTA, D. C.; MERRILL Jr., A. H. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B₁. Molecular mechanism for carcinogenesis associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 5, p. 3475-3481, 1994.

SHEPHARD, G. S. Chromatography determination of the fumonisin mycotoxins. Review. *J. Chromatogr. A*, v. 815, p. 31-39, 1998.

SHEPHARD, 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. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 13, p. 2077-87, 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.

SMITH, W. L.; MERRILL Jr., A. H. Sphingolipid metabolism and signaling minireview series. **The J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 29, p. 25841-25842, 2002.

STEVENS, V. L.; TANG, J. Fumonisin B₁ – induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via glycosylphosphatidylinositol-achored folate receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 29, p. 18020-18025, 1997.

WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; MERRILL Jr., A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 22, p. 14486-14490, 1991.

WANG, E.; ROSS, P. F.; WILSON, T. M.; RILEY, R. T.; MERRILL, A. H. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **J. Nutrit.**, v. 122, n. 8, p. 1706-1716, 1992.

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. **Poult. Sci.**, v. 73, n. 10, p. 1517-1525, 1994.

WEIBKING, T. S.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; TURK, J. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; WANG, E.; MERRILL Jr, A. H. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels on the young broiler chick. **Poult. Sci.**, v. 72, n. 3, p. 456-466, 1993a.

WEIBKING, T. S.; LEDOUX, D. R.; BROWN, T. P.; ROTTINGHAUS, G. E. Fumonisin toxicity in turkeys. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 5, p. 75-83, 1993.

WILSON, T. M.; NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. The *Fusarium* Research Center proposed diagnostic animals. **Proc. Ann. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Inv.**, v. 24, p. 261-276, 1981.

WILSON, T. M.; ROSS, P. F.; RICE, L. G.; OSWEILER, G. D.; NELSON, H. A.; OWENS, D. L.; PLATTNER, R. D.; REGGIARDO, C.; NOON, T. H.; PICKRELL, J. W. Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 2, p. 213-216, 1990.

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