UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTELA KOBASHIGAWA

**Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em
sistema de produção de frangos de corte no
Estado de São Paulo**

Pirassununga
2010

ESTELA KOBASHIGAWA

**Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em
sistema de produção de frangos de corte no
Estado de São Paulo**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da Universidade de São
Paulo, para fins de Defesa para obtenção do Título
de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de
Oliveira

Pirassununga

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

K75o

Kobashigawa, Estela

Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em sistema de produção de frangos de corte no Estado de São Paulo / Estela Kobashigawa. -- Pirassununga, 2010.

114 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

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

1. AFM1 2. FB1 3. Índices de produção 4. Fungos toxigênicos 5. Micotoxinas 6. Resíduos. I. Título.

*Dedico esta à Sadako e Paulo, meus pais,
por todas as dificuldades que tiveram
que ultrapassar.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade.

Ao Prof. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação e paciência.

Ao Cnpq pela bolsa concedida.

À Natali K. Valadão, Roice E. Rosim, Monique, Taíse e Natália pela ajuda no laboratório e amizade.

Ao Professor Benedito Corrêa e a Tatiana Reis pela coloboração na realização das análises.

Carlos Corassin pela ajuda na revisão do trabalho.

Às amigas e colegas de trabalho Carolina, Jaqueline, Juliana, Fernanda, Giovana, Areadne, Bruna, Andrezza, Diane, Keliane e Sarah.

Às amigas do Instituto de Ciências Biológicas–USP: Liliana, Gabriela e Mônica.

À Eliana Tessari e Ana Lúcia Cardoso do Instituto Biológico de Descalvado-SP.

André, Raquel e Júlia pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos Professores César, Ricardo e Lúcio pelo auxílio na qualificação.

Aos funcionários da empresa integradora e “granjeiros” onde foram realizadas as coletas.

Aos amigos Dr. David R. Ledoux, Dr. George E. Rottinghaus, Lindsay, Rafael, Benjamim e Roxanne.

À Conceição e Layla da seção de pós-graduação.

A todos que fizeram parte deste trabalho de doutorado, direta ou indiretamente.

À minha família e aos amigos.

*“... esse é um problema fácil de evitar,
mas difícil de resolver, motivo pelo qual não se
deve economizar esforços em sua prevenção.”*

(FIORENTIN, 1993)

RESUMO

KOBASHIGAWA, E. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em sistema de produção de frangos de corte no Estado de São Paulo, 2010.** 114 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de aflatoxina e fumonisina no sistema de produção de frango de corte e o impacto destas micotoxinas nos índices produtivos em uma empresa integradora localizada no Estado de São Paulo. Adicionalmente, foram identificados os principais fatores para a produção de micotoxinas em rações e a ocorrência de resíduos de aflatoxinas e fumonisinas em tecidos comestíveis de frango (músculo peitoral, fígado e moela). Foram realizadas as contagens de fungos e leveduras totais, de fungos dos gêneros *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp. e quantificação de aflatoxina e fumonisina nas principais matérias-primas da ração (milho e farelo de soja), na ração de abate e na cama de frango. O isolamento de fungos nas amostras de milho, farelo de soja e ração foi realizado em ágar DG18, enquanto que, para as amostras de cama de frango, utilizou-se o ágar PDA. Para a extração de aflatoxinas e fumonisinas, foram utilizadas colunas de imunoafinidade (Neogen®) e colunas SAX de troca iônica, respectivamente. A quantificação das aflatoxinas e fumonisinas foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O milho foi o alimento onde foi observada a maior frequência de *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp., e também maior positividade para aflatoxinas e fumonisinas, sendo que uma das amostras ultrapassou o limite de aflatoxinas recomendado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). As quantidades de aflatoxinas e fumonisinas encontradas na ração não influenciaram significativamente os índices produtivos. Não foram encontrados níveis detectáveis de resíduos de aflatoxinas e fumonisinas nos tecidos analisados. Embora não tenham sido observadas lesões macroscópicas no fígado e bursa das aves, foram constatadas alterações histopatológicas nessas vísceras, as quais são compatíveis com lesões causadas pela ingestão de aflatoxinas e fumonisinas.

Palavras-chave: AFM1, FB1, índices de produção, fungos toxigênicos, micotoxinas, resíduos.

ABSTRACT

KOBASHIGAWA, E. **Occurrence of aflatoxin and fumonisin in a poultry productive system in the state of São Paulo, 2010.** 114 f. Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

The objective of this study was to verify the occurrence of aflatoxin and fumonisin in poultry feed and their influence on poultry productivity at company located in São Paulo State. Supplementary, were identified the main factors that cause mycotoxin production in poultry feed and determine the occurrence of aflatoxins and fumonisins residues in edible parts of poultry (breast, liver and gizzard). The total mold and yeast counting of *Aspergillus* ssp. and *Fusarium* ssp. genus and quantification of aflatoxin and fumonisin were determined in the main feed ingredients (corn and soybean meal), in finishing diets and bedding. The fungi from corn, soybean meal and feed were isolated in DG18 agar, whereas, the fungi from bedding was used PDA agar. Aflatoxins and fumonisins, were extracted using an immunoaffinity column (Neogen®) and a SAX column, respectively. Aflatoxins and fumonisins were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The corn showed the highest frequency of *Aspergillus* ssp. and *Fusarium* ssp. and also the highest positivity for aflatoxins and fumonisins, there was one corn sample that exceeded the recommendations of the Brazilian Ministry of Agriculture. The levels of aflatoxins and fumonisins in the feed did not significantly influence productivity. There were not detectable levels of aflatoxins and fumonisins on analysed tissues. Although macroscopic lesions were not observed in liver and bursa, histopathological changes were observed in these organs, which are consistent with injuries caused by the aflatoxin and fumonisin consumption.

Keywords: AFM1, FB1, mycotoxins, productions indices, residues, toxigenic fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo per capita de carnes (kg) no Brasil.....	20
Figura 2. Participação da demanda de ração por espécie em 2009 no Brasil.	21
Figura 3. Consumo de milho por segmento em 2009.....	23
Figura 4. Distribuição mundial das micotoxinas.	31
Figura 5. Crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> e produção de AFB1 em ágar extrato malte e glicerina, em vários níveis de atividade de água e temperaturas.....	33
Figura 6. Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 e M2.....	34
Figura 7. Biotransformação da aflatoxina B1 no fígado de aves.	37
Figura 8. Efeito da atividade de água e temperatura na produção de fumonisinas por <i>Fusarium verticillioides</i> em 2 semanas de incubação.....	40
Figura 9. Estrutura química das fumonisinas.	41
Figura 10. Mecanismo de ação das fumonisinas.	42
Figura 11. Fluxograma de coleta.....	47
Figura 12. Técnica de plaqueamento direto	49
Figura 13. Procedimento para determinação da matéria seca a 105°C.....	50
Figura 14. Procedimento para determinação da matéria mineral	51
Figura 15. Procedimento para determinação da proteína bruta.....	52
Figura 16. Procedimento para determinação da fibra bruta.....	53
Figura 17. Procedimento para determinação do extrato etéreo.....	55
Figura 18. Procedimento para preparo da amostra para injeção em CLAE para aflatoxinas	56
Figura 19. Procedimento para preparo da amostra para injeção em CLAE para fumonisinas	57
Figura 20. Procedimento para cromatografia em camada delgada	58
Figura 21. Sequência da metodologia para análise de resíduos de aflatoxinas, AOAC (SCOTT, 1990) modificado.....	61
Figura 22. Metodologia para análise de resíduos de fumonisinas segundo manual, com modificações, da coluna de imunoafinidade FumoniTest (VICAM®).	62
Figura 23. Distribuição dos níveis médios de aflatoxinas totais (µg/kg) encontrados por período de coleta.	70

Figura 24. Distribuição dos níveis médios de fumonisinas totais ($\mu\text{g/g}$) encontrados por período de coleta.	76
Figura 25. Frequência de alterações em exame histopatológico.....	86
Figura 26. Esteatose aumento 40x	89
Figura 27. Fígado normal aumento 40x	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Evolução dos coeficientes de produção de carne de frango de corte.	19
Tabela 2. Exportações de carnes brasileiras em 2009 (incluindo carnes industrializadas).....	19
Tabela 3. Consumo mundial de carne de frango em 2009 (milhões de toneladas).....	20
Tabela 4. Exigências nutricionais de frangos de corte machos de desempenho superior.....	22
Tabela 5. Especificações técnicas do farelo de soja.....	25
Tabela 6. Atividade de água e temperatura para crescimento de fungos e para produção de micotoxinas.	29
Tabela 7. Ocorrência de algumas micotoxinas e seus efeitos tóxicos.	29
Tabela 8. DL50 de micotoxinas	31
Tabela 9. Propriedades físico-químicas das principais aflatoxinas.	34
Tabela 10. Toxicidade aguda da AFB1.	37
Tabela 11. Taxa de transferência de AFB1 em tecidos comestíveis.	38
Tabela 12. Espécies de <i>Fusarium</i> ssp. toxigênicas e suas micotoxinas	39
Tabela 13. Número de pontos para a constituição de uma amostra conforme o tamanho do lote.....	48
Tabela 14. Quantidade de material que determinará uma amostra	48
Tabela 15. Ocorrência de fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> ssp. e <i>Fusarium</i> ssp. nas amostras.....	65
Tabela 16. Médias e desvio padrão de contagem de fungos totais, <i>Aspergillus</i> ssp. e <i>Fusarium</i> ssp. e P-valor da diferença entre ração coletada na fábrica e nas granjas. .	65
Tabela 17. Médias de atividade de água e desvio padrão em amostras <i>Aspergillus</i> ssp. positivas e negativas.	66
Tabela 18. Médias de atividade de água e desvio padrão em amostras <i>Fusarium</i> ssp. positivas e negativas ¹	67
Tabela 19. Correlação de atividade de água, contagem de fungos totais, <i>Aspergillus</i> ssp. <i>Fusarium</i> ssp. nas rações.	68
Tabela 20. Médias e desvio padrão da composição bromatológica de rações coletadas na fábrica e na granja.	69
Tabela 21. Ocorrência de aflatoxinas nas amostras positivas ¹	71

Tabela 22. P-valores do Teste Qui-Quadrado para ocorrência de amostras positivas para aflatoxinas do milho e farelo de soja.	72
Tabela 23. Médias e desvio padrão de atividade de água de amostras de rações positivas e negativas na análise de aflatoxinas ¹	72
Tabela 24. Atividade água e níveis de aflatoxinas em amostras postivas ¹	74
Tabela 25. P-valores pelo Teste-t de Student para médias de atividade de água e aflatoxinas entre rações coletadas na fábrica e nas granjas.	75
Tabela 26. Frequência de fumonisinas nas amostras.....	77
Tabela 27. P-valores do Teste Qui-Quadrado para frequência de amostras positivas ¹ para fumonisinas do milho e farelo de soja.	77
Tabela 28. Médias e desvio padrão de atividade de água de amostras de rações fumonisina negativa e positiva ¹	77
Tabela 29. Atividade água e níveis de fumonisinas em amostras positivas ¹	80
Tabela 30. P-valores pelo Teste-t de Student para médias de fumonisinas entre rações coletadas na fábrica e nas granjas.....	81
Tabela 31. Avaliação de potencial toxigênico para <i>Aspergillus</i> ssp. cepas positivas para a produção de aflatoxinas.....	82
Tabela 32. Avaliação de potencial toxigênico para <i>Fusarium</i> ssp. cepas positivas para a produção de fumonisinas.....	82
Tabela 33. Médias dos índices de produtividade e desvio padrão nos lotes aflatoxina negativos e positivos ¹	83
Tabela 34. Correlação entre os níveis de aflatoxinas e os fatores de produção	83
Tabela 35. Médias dos índices de produtividade e desvio padrão nos lotes fumonisinas >1 µg/g e <1 µg/g.	84
Tabela 36. Médias dos índices de produtividade e desvio padrão nos lotes de acordo com a negatividade ou positividade para aflatoxinas (>0,5ug/kg) e/ou fumonisinas (> 1,0ug/g).	85
Tabela 37. Ocorrência de alterações em órgãos de acordo com lotes aflatoxina positivos e negativos ¹	87
Tabela 38 Ocorrência de alterações em órgãos de acordo com lotes fumonisinas >1 µg/g e <1 µg/g.	88
Tabela 39. Médias dos títulos de anticorpos contra o vírus da Doença de Gumboro e desvio padrão nos lotes de acordo com a negatividade ou positividade para aflatoxinas (>0,5 µg/kg) e/ou fumonisinas (> 1,0 µg/g).	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
a.C.	antes de Cristo
abiMilho	Associação Brasileira das Indústrias do Milho
AF	aflatoxina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Aw	Atividade de água
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
d.C.	depois de Cristo
DG18	Dichloran glycerol agar base
DL50	dose letal mediana
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAS	Foreign Agriculture Service
FB	fumonisina
HPLC	high performance liquid cromatografy
IBD	Infectious bursal disease ou Doença de Gumboro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPCS	International Programme on Chemical Safety
ISO	International Organization for Standartization
kcal	quilocaloria
kg	quilograma
KOH	hidróxido de potássio
L	Litros
Log10	número logarítmico na base 10
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mm	Milímetro
PB	proteína bruta
PDA	água batata dextrose
ppb	parte por bilhão
R ²	coeficiente de determinação
Sindirações	Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal
t	toneladas
UBA	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidades formadoras de colônias
USDA	United States Department of Agriculture
λ	comprimento de onda
μg	micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Aspectos históricos e situação atual da produção de frango de corte	18
2.2. Alimentação de frango de corte.....	21
2.2.1. Milho	22
2.2.2. Farelo de soja	24
2.3. Fungos toxigênicos	25
2.4. Aspectos históricos das micotoxicoses	26
2.5. Micotoxinas.....	28
2.5.1. Aflatoxinas	32
2.5.2. Fumonisinhas	39
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. Objetivos gerais	44
3.2. Objetivos específicos	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. Empresa integradora	45
4.2. Período de amostragem.....	46
4.3. Pontos de amostragem	47
4.4. Determinação do número de pontos de amostragem e quantidade de material.....	47
4.5. Amostragem da cama	48
4.6. Amostragem dos grãos e rações prontas	48

4.7. Análise de microbiota fúngica das amostras de milho	49
4.8. Análise de microbiota fúngica do farelo de soja, ração e cama de frango	49
4.9. Análises bromatológicas	50
4.9.1. Determinação de matéria seca 105°C.....	50
4.9.2. Determinação de matéria mineral	50
4.9.3. Determinação da proteína bruta (Micro-Kjedahl).....	51
4.9.4. Determinação de fibra bruta.....	53
4.9.5. Determinação do extrato etéreo.....	54
4.9.6. Determinação do extrato não nitrogenado	56
4.10. Análises micotoxicológicas de grãos e rações prontas.....	56
4.11. Avaliação do potencial toxigênico de cepas de <i>Aspergillus</i> ssp.	57
4.12. Avaliação do potencial toxigênico da cepas de <i>Fusarium</i> ssp.	58
4.13. Análise histopatológica em vísceras.....	58
4.14. Pesquisa de anticorpos contra vírus da Doença de Gumboro.....	59
4.15. Análises micotoxicológicas de resíduos em músculo e vísceras	60
4.16. Análise dos Resultados.....	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1. Ocorrência e contagem fúngica	64
5.2. Análises bromatológicas	68
5.3. Aflatoxinas	69
5.4. Fumonisinias	75

5.5. Avaliação do potencial toxigênico de cepas de <i>Aspergillus</i> ssp. e <i>Fusarium</i> ssp.	81
5.6. Índices de produtividade	82
5.7. Histopatologia	86
5.8. Pesquisa de anticorpos contra vírus da Doença de Gumboro.....	89
5.9. Análises micotoxicológicas de resíduos em músculo e vísceras	91
5.9.1. Análises de resíduos de aflatoxinas em músculo e vísceras	91
5.9.2. Análises de resíduos de fumonisinas em músculo e vísceras	91
6. CONCLUSÕES.....	93
7. REFERÊNCIAS	94
8. ANEXOS.....	113
8.1. Dados meteorológicos no período de janeiro de 2008 a março de 2009.....	113
8.2. Preparo do reativo OPA	114
8.3. Cromatograma de padrão para aflatoxinas (AFG1: 21,95 ng/mL; AFB1: 29,25 ng/mL; AFG2: 31,25 ng/mL; AFB2: 21,55 ng/mL)	114

1. INTRODUÇÃO

A produção de frango tanto no Brasil quanto no mundo, desenvolveu-se consideravelmente a partir da década de 60. O aprimoramento genético das aves, associado ao desenvolvimento tecnológico do manejo, sanidade e nutrição, áreas primordiais na avicultura de corte, possibilitaram a redução no preço da carne, tornando-a mais acessível à população. Além do desenvolvimento na criação, o aumento no consumo da carne de frango, deveu-se à substituição da carne vermelha pela carne branca, associada à uma alimentação mais saudável.

O preço, relativamente baixo, aliado ao valor nutritivo fazem com que carne de frango se torne uma importante fonte de proteína animal, principalmente no Brasil, onde é expressiva a parcela da população com baixo poder aquisitivo. A carne de frango é a carne mais consumida no Brasil, o consumo per capita em 2009 foi de 38,1 kg, e o segundo lugar em consumo ficou para carne bovina (UBA, 2009). O fornecimento de proteína a baixo custo é um fator importante, mas o setor produtivo também deve garantir a qualidade deste alimento.

A alimentação dos animais representa 70% dos custos da criação e destes 65 a 80% é decorrente do milho, em 2005, o setor de aves e suínos foi responsável por 90% da demanda interna deste grão (ZANOTTO & BRUM, 2005).

O clima brasileiro favorece o tanto cultivo de grãos como o milho e a soja, base da dieta de frango no Brasil, quanto a proliferação de fungos e a presença de fungos nas matérias-primas e ração pode acarretar a produção de micotoxinas.

A palavra micotoxina é originada do grego *Mikes* = fungo, e do latim *Toxicum* = veneno (GOLDBLATT, 1972) e a importância do estudo destas substâncias se dá pelos prejuízos econômicos e pela questão de Saúde Pública, já que animais que consomem rações contaminadas com micotoxinas podem excretar os resíduos em ovos e leite, ou acumulá-los na carne (AKANDE et al., 2006).

A literatura científica mundial tem demonstrado elevada frequência de alimentos contaminados por micotoxinas destinados tanto para consumo humano quanto para consumo por animais (ROSMANINHO et al., 2001).

Diminuição no ganho de peso, recusa do alimento, imunossupressão, aumento na conversão alimentar, diminuição na produção de ovos e aumento na mortalidade (RICHARD, 2007) são alguns dos sinais que fazem das micotoxinas um dos maiores responsáveis por perdas econômicas na produção animal. Existem estimativas que os prejuízos causados pelas micotoxinas cheguem na ordem de US\$0,20 por frango (MENEGAZZO, 2008).

O consumo de alimentos contaminados com micotoxinas por seres humanos está associado a problemas de saúde pública, com a maior ocorrência de casos de câncer (BHAT et al., 2010) e com a ocorrência de mal formações em recém nascidos (REDDY et al., 1996).

A exposição humana às micotoxinas carcinogênicas pode ocorrer diretamente pelo consumo de grãos contaminados ou, indiretamente pelo consumo de alimentos de origem animal contaminados com resíduos de micotoxinas. Adicionalmente, as micotoxinas podem apresentar efeitos de interação com outras doenças, tais como a hepatite viral, considerando-se que o consumo de aflatoxinas por pessoas infectadas pelo vírus da hepatite B aumenta a probabilidade do desenvolvimento de carcinoma hepático primário (MCMAHON, 2009).

Existem vários estudos experimentais que relacionam problemas com a saúde de aves de produção e as intoxicações decorrentes da ingestão de aflatoxinas (RAWAL et al., 2010) e fumonisinas (DIAZ & BOERMANS 1994). Embora tais estudos sejam de relevante importância para a micotoxicologia, tem-se a necessidade da realização de trabalhos que avaliem os efeitos dessas micotoxinas sob condições de ocorrência natural no campo, com a finalidade de interpretar as inúmeras variáveis que estão envolvidas com a ocorrência destas toxinas e seus efeitos tóxicos em unidades de produção avícola comercial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos históricos e situação atual da produção de frango de corte

Acredita-se que todas as raças de galinha doméstica moderna (*Gallus gallus domesticus*) tenham sido originadas do *Gallus bankiva* (em latim) cujo nome científico é *Gallus gallus* ou comumente chamada de Galinha Vermelha das Selvas (Red Jungle Fowl), esta espécie até os dias de hoje habita as selvas da Índia (ENGLERT, 1998).

Além do *Gallus bankiva*, outras espécies também teriam influenciado a formação da galinha doméstica: *Gallus lafayetti* (Ceilão), *Gallus varius* (Java) e *Gallus sonneratti* (Índia) (SALES, 2010), sendo que sua domesticação ocorreu por volta de 3.000 anos a.C. na Índia, ou no Vale Hindu no Paquistão (COELHO et al., 2008). O conhecimento desta ave é tão antiga que na Suméria, considerada a civilização mais antiga da humanidade, a palavra galo significava “rei das aves” (SALES, 2010).

Da Mesopotâmia a galinha doméstica foi levada, provavelmente, para o Egito pelas rotas de comércio terrestres (COLTHERD, 1966) e em meados do ano 1 d.C. as galinhas domesticadas podiam ser encontradas na Ásia Ocidental e Europa Oriental, destas regiões foram levadas para a África do Sul, Austrália, Japão, Rússia, Sibéria e Escandinávia (MORENG & AVENS, 1990).

Em 1500 as primeiras aves foram trazidas ao Brasil por Pedro Álvares Cabral, como suprimento aos tripulantes das caravelas (ARASIVO, 1989), mas foi por volta de 1930 que começou-se a formar um esboço da indústria avícola, onde pequenos agricultores agregaram-se formando grandes unidades comerciais integradas de galinhas e perus, possibilitando maior disponibilidade de alimentos e maior consumo de produtos industrializados e ingredientes de rações (MORENG & AVENS, 1990).

Em dezembro de 1927, foi criado o Instituto Biológico, possibilitando o preparo de vacinas contra boubas e cólera, também foi neste período que o Governo Federal permitiu a importação de incubadoras automáticas. Foi nesta época que as fábricas de ração começaram a atender a procura por dietas balanceadas e que houve a introdução de diferentes linhagens, contribuindo com a evolução da avicultura brasileira (MALAVAZZI, 1983).

Em 20 anos de evolução, o frango que era vendido em 1940 com 16 semanas, passou a ser vendido, com 8 semanas pesando 1,5 a 2 kg (MORENG & AVENS, 1990) (Tabela 1), em 2009 foi possível obter um frango de 2,4 kg com 41 dias e 1,76 de conversão alimentar (UBA, 2009).

Tabela 1. Evolução dos coeficientes de produção de carne de frango de corte.

ano	peso do frango vivo (g)	conversão alimentar(g/g)	idade de abate
1930	1.500	3,50	15 semanas
1940	1.550	3,00	14 semanas
1950	1.580	2,50	10 semanas
1960	1.600	2,25	8 semanas
1970	1.700	2,15	7 semanas
1980	1.800	2,05	8 semanas
1984	1.860	2,00	47 dias
1988	1.940	2,00	47 dias
1994	2.050	1,98	45 dias
1998	2.150	1,95	45 dias
2000	2.250	1,88	43 dias
2001	2.300	1,89	42 dias
2002	2.300	1,80	42 dias
2003	2.350	1,88	43 dias
2004	2.390	1,83	43 dias
2005	2.300	1,82	42 dias
2006	2.340	1,85	43 dias
2007	2.450	1,85	44 dias
2008	2.250	1,75	41 dias
2009	2.440	1,76	41 dias

Fonte: UBA (2009)

Desde 1960, o aumento na taxa de produção de carne de frango foi maior do que qualquer outra carne, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (CHANG, 2007). Em 2003 o Brasil tornou-se o maior exportador de carne de frango do mundo (MAPA, 2010), em 2009 as exportações de carne de frango brasileira atingiram a ordem de 5,8 bilhões de dólares (Tabela 2).

Tabela 2. Exportações de carnes brasileiras em 2009 (incluindo carnes industrializadas).

Espécie	Em mil ton	%	US\$ milhões	%
Frango	3.634	57,40	5.814	50,4
Bovino	1.924	30,40	4.118	35,7
Suíno	607	9,60	1.226	10,6
Peru	163	2,60	381	3,3
Total	6.328	100	11.539	100

Fonte: UBA (2009).

A tendência de aumento no consumo de carne de frango é observado mundialmente (Tabela 3).

Tabela 3. Consumo mundial de carne de frango em 2009 (milhões de toneladas).

Países	2005	2006	2007	2008	2009	2010*
EUA	13.430	13.671	13.581	13.427	13.058	13.402
China	10.087	10.371	11.415	11.954	12.220	12.606
União Européia	8.082	7.655	8.358	8.504	8.610	8.640
Brasil	6.612	6.853	7.384	7.792	7.831	8.076
México	2.868	3.016	3.067	3.289	3.290	3.377
Rússia	2.139	2.373	2.578	2.744	2.665	2.795
Índia	1.899	2.000	2.239	2.489	2.549	2.649
Japão	1.880	1.970	1.945	1.926	1.960	1.960
Irã	1.223	1.326	1.464	1.460	1.539	1.640
África do Sul	1.069	1.202	1.239	1.340	1.382	1.424
Argentina	0.941	1.109	1.200	1.270	1.331	1.400
Outros	12.260	12.649	13.607	14.537	14.737	15.211
Total	62.490	64.195	68.077	70.732	71.172	73.180

Fonte: USDA (2009)/ 2010* projeção.

Em 2009 o consumo de frango, no Brasil, ultrapassou o consumo de carne bovina (Figura 1), o consumo per capita de carne de frango, bovino e suíno foram respectivamente de 38,1 kg, 37,4 kg e 14,0 kg, respectivamente (UBA, 2009).

Figura 1. Consumo per capita de carnes (kg) no Brasil.

Fonte UBA (2009).

2.2. Alimentação de frango de corte

A indústria do frango é uma das grandes responsáveis pela movimentação de rações no Brasil (Figura 2). A alimentação representa cerca de 70% dos custos da produção do frango, sendo que 65 a 80% é devido ao milho, ou seja, 40% dos custos de produção são relativos ao milho (ZANOTTO & BRUM, 2005).

O consumo pela avicultura de corte, em 2009, foi de 17,5 milhões de toneladas de milho e 6,7 milhões de toneladas de farelo de soja 46% PB (SINDIRAÇÕES, 2010). A disponibilidade de matérias-primas mais baratas é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento da indústria avícola, como exemplo temos o Brasil e Estados Unidos que além de serem os mais eficientes na produção avícola, são também os maiores produtores de grãos (CHANG, 2007).

Figura 2. Participação da demanda de ração por espécie em 2009 no Brasil.
Fonte: Sindirações (2010).

Na criação de frango de corte é comum formular as dietas por fases, visando melhor adequação das necessidades do animal e dos nutrientes que esta dieta fornece. Conforme o conhecimento sobre as exigências dos animais aumenta, também aumentam os tipos de ração formuladas, em referências mais antigas pode-se encontrar recomendações de 2 dietas (ANDRIGUETTO et al., 1982) e nas mais recentes, até 5 dietas diferentes durante o período de criação (ROSTAGNO et al., 2005) (Tabela 4).

Tabela 4. Exigências nutricionais de frangos de corte machos de desempenho superior.

	Idade (dias)				
	1-7	8-21	22-33	34-42	43-46
ganho (g/dia)	21,0	48,3	82,4	94,0	93,0
energia metabolizável (kcal/kg)	2.960	3.050	3.150	3.200	3.250
proteína (%)	22,11	21,14	19,73	18,31	17,51
cálcio (%)	0,942	0,899	0,837	0,775	0,740
fósforo disponível (%)	0,471	0,449	0,418	0,386	0,368
potássio (%)	0,595	0,598	0,599	0,593	0,593
sódio (%)	0,224	0,218	0,208	0,198	0,192
cloro (%)	0,200	0,193	0,183	0,172	0,166
ácido linoléico (%)	1,085	1,075	1,056	1,027	1,015
lisina digestível (%)	1,363	1,189	1,099	1,048	1,015

Fonte: Rostagno et al. (2005).

2.2.1. Milho

Com origem nas Américas, o milho (*Zea mays*) é uma gramínea que teve o início do seu cultivo entre 7.000 e 10.000 anos atrás, na região onde atualmente se localiza o México (PATERNIANI, 1993). A introdução do milho na Europa ocorreu quando Colombo retornou do Novo Mundo em 1493, levando consigo grãos à Espanha (GOODMAN, 1980).

De maneira geral o milho não tem grande participação na alimentação humana, mas existem algumas regiões, principalmente as de baixa renda, como o Nordeste brasileiro, onde o milho constitui parte importante da dieta diária das pessoas que vivem no semi-árido (EMBRAPA, 2010a). No México, por razões culturais, os derivados de milho também são uma importante fonte de alimento.

Em 2009 a produção mundial de milho alcançou 794,8 milhões de toneladas, os Estados Unidos foram responsáveis por 307,1 milhões de toneladas e a China por 165,9 milhões de toneladas (USDA/FAS, 2010).

No Brasil a cultura de milho é a segunda maior cultura de grãos, ficando atrás somente da cultura de soja. A safra 2008/2009 brasileira foi de 51 milhões de toneladas, o setor de avicultura de corte foi responsável pelo consumo de 21,6 milhões de toneladas, ao redor de 42% do consumo brasileiro de milho (ABIMILHO, 2010) (Figura 3), a safra 2009/2010 foi estimada em 54 milhões de toneladas (CONAB, 2010).

Figura 3. Consumo de milho por segmento em 2009.
Fonte:AbiMilho(2010).

O milho possui cerca de 8,26% de PB, 3,61% de gordura, 62,48% de amido e 3.381 kcal/kg de energia metabolizável para aves (ROSTAGNO et al., 2005). Ele entra na formulação das dietas, principalmente, como fonte energética (ANDRIGUETTO et al., 1982). Este grão é responsável em média por 65% da energia, 22% da proteína, 10% da lisina e 25% da metionina+cistina da dieta de frango de corte (SILVA, 2009).

O milho pode ser classificado em três tipos, de acordo com a Portaria Ministerial nº 845 de 08 de novembro de 1976, em observância ao disposto no artigo 39, item VIII, do Decreto-lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1976 (BRASIL, 1976) e tendo em visto o disposto no artigo 1º do decreto nº 69.502, de 05 de novembro de 1971 :

Tipo1: constituído de milho seco, sadio, de grãos regulares e com umidade máxima igual a 14,5% na base úmida. Tolerância máxima de 1,5% de matérias estranhas, impurezas e fragmentos; 11% de grãos avariados, máximo de 3% de grãos ardidos e brotados (porcentagem em peso);

Tipo 2: constituído de milho seco, sadio, de grãos regulares e com umidade máxima igual a 14,5% na base úmida. Tolerância máxima de 2,0% de matérias estranhas, impurezas e fragmentos; 18% de grãos avariados, máximo de 6% de grãos ardidos e brotados (porcentagem em peso);

Tipo 3: constituído de milho seco, sadio, de grãos regulares e com umidade máxima igual a 14,5% na base úmida. Tolerância máxima de 3,0% de matérias

estranhas, impurezas e fragmentos; 27% de grãos avariados, máximo de 10% de grãos ardidos e brotados (porcentagem em peso).

O milho ardido é o grão ou pedaços dele que perderam a coloração ou a cor característica, por ação do calor, umidade ou fermentação. Grãos brotados são os grãos que apresentarem germinação visível. Grãos carunchados são os grãos ou os pedaços furados ou infestados por insetos vivos ou mortos. Chochos são os grãos enrugados por deficiências de desenvolvimento. Grãos quebrados são caracterizados por pedaços de grãos saudáveis, que fiquem retidos na peneira de crivos circulares com diâmetro igual a 5 mm. As impurezas são materiais do próprio produto, grãos ou fragmentos de grãos que vazarem numa peneira de crivos circulares com diâmetro igual a 5 mm e a matéria estranha, sementes de outras espécies, ou detritos vegetais, ou corpos estranhos de qualquer natureza não oriundos do produto (BRASIL, 1976).

2.2.2. Farelo de soja

Originária da Ásia, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma herbácea anual, de altura entre 30 cm e 2 m pertencente à subordem das leguminosas e, como todas as leguminosas, desenvolvem-se em simbiose com bactérias (*Rhizobium* spp.). Essas bactérias são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, dispensando a aplicação suplementar de adubo nitrogenado químico durante a cultura da soja (BERTRAND et al., 1987).

Os primeiros relatos sobre a soja aparecem no período entre 2.883 e 2.838 a.C., mas até o término da Guerra entre a China e o Japão (1894) a produção permaneceu restrita à China.

A produção mundial de soja em 2009 foi de 211,77 milhões de toneladas, e os Estados Unidos foram responsáveis pela produção de 80,75 milhões de toneladas (USDA/FAS, 2010). A soja é a maior cultura de grãos do Brasil, a safra de 2008/2009 ficou em 57,17 milhões de toneladas, para a safra 2009/2010 estimou-se a produção em 67,86 milhões de toneladas (CONAB, 2010).

Os primeiros dados sobre a utilização de soja para obtenção de óleo datam de 2.800 a.C. (RORH, 1971). À partir de 1920, os seus teores de proteína e óleo, começaram a despertar os interesses das indústrias pela cultura da soja (EMBRAPA, 2010b).

Farelo de soja é o produto resultante da extração do óleo dos grãos de soja, previamente limpos e descascados, por processo mecânico e/ou químico (BERTRAND;LAURENT;LECLERCQ, 1987).

No entanto, para que o farelo de soja seja utilizado na alimentação animal é preciso tratamento térmico para desativação dos fatores antinutricionais

(ANDRIGUETTO et al., 1982), que se encontram naturalmente na soja são: inibidor de tripsina, saponinas, isoflavonas (HASSE, 1996), hemaglutinina e lipoxidases (ANDRIGUETTO et al., 1982).

As películas que foram retiradas antes da trituração podem ou não ser reincorporadas ao farelo; dependendo do grau de reincorporação as taxas de celulose e de proteínas brutas serão alteradas, obtendo-se as diferentes categorias de farelo de soja (BERTRAND;LAURENT;LECLERCQ, 1987).

Falhas na cocção do farelo de soja, seja por sub ou super aquecimento, e a adição excessiva de película podem prejudicar a qualidade do farelo de soja, então foi estabelecido a Portaria nº 7, de 09 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988) especificando padrões mínimos de diversas matérias-primas empregadas na alimentação animal, incluindo-se padrões para o farelo de soja (Tabela 5).

Tabela 5. Especificações técnicas do farelo de soja.

		Farelo de soja Tipo		
		44	46	48
Umidade (máximo)	%	12,00	12,00	12,00
Proteína bruta (mínimo)	%	44,00	46,00	48,00
Solubilidade em KOH 0,2%	%	80,00	80,00	80,00
Atividade ureática (mínimo)	-	0,05	0,05	0,05
Atividade ureática (máximo)	-	0,30	0,30	0,30
Fibra bruta (máximo)	%	7,00	6,00	5,00
Matéria mineral (máximo)	%	7,00	6,50	6,00
Aflatoxinas (máximo)	µg/kg	50	50	50

Fonte: MAPA(BRASIL, 1988).

2.3. Fungos toxigênicos

Durante muitos anos os fungos foram considerados como vegetais, mas foi a partir de 1969, que estes seres passaram a ser classificados em um reino à parte, o reino Fungi (GOMPertz et al., 2008).

Fungos são seres eucariontes que não produzem clorofila. Alguns formam um micélio com células diferenciadas e são capazes de produzir micotoxinas, podendo dispersar esporos ou existir como células simples, chamadas de leveduras (FORSYTHE, 2002). São seres aeróbios, apesar de existir diferenças na exigência de oxigênio entre as diferentes espécies de fungos (HASCHEK et al., 2002), são encontrados em quase todos os lugares do planeta, podem ser saprófitas ou parasitas, viver em matéria orgânica, na água, no solo, na superfície ou no interior de animais e vegetais (BURTON & ENGELKIRK, 2005).

A contaminação fúngica pode ocorrer na formação, desenvolvimento, colheita e no armazenamento dos grãos. Lesões na superfície dos grãos e

armazenamento em locais inadequados, com alta umidade e pouca ventilação, são fatores que favorecem a contaminação e desenvolvimento de fungos toxigênicos (CHU, 1991). Os fungos tem sido historicamente divididos em 2 grupos, os fungos de campo e os fungos de armazenamento, embora a contaminação inicial em ambos grupos ocorra no campo (MILLER, 1995):

_ Fungos de campo. São aqueles que atacam os grãos antes da colheita, como fungos do gênero *Fusarium* ssp., necessitam de umidade acima de 20% para se multiplicarem (SANTOS, 2008), e seu tempo de sobrevivência depende das condições de ambiente e armazenagem.

_ Fungos de armazenamento, como fungos do gênero *Aspergillus* ssp. e *Penicillium* ssp. (SANTOS, 2008), podem estar presentes nas sementes recém-colhidas em quantidades relativamente baixas, mas são capazes de sobreviver em ambientes com baixa umidade (BERJAK, 1984; WETZEL, 1987; CARVALHO & NAKAGAWA, 1988).

O crescimento fúngico pode diminuir a energia metabolizável em até 5% nos grãos (BARTOV et al., 1982). Em rações experimentalmente contaminadas com *A.flavus* ocorre diminuição da fibra bruta, proteína bruta e extrato etéreo (OGUNDERO, 1987) e farelos de soja inoculados com fungos apresentam menores níveis de lisina e treonina (RICHARDSON et al., 1962).

Os fungos do gênero *Aspergillus* ssp. e *Penicillium* ssp. são amplamente encontrados em todo o mundo, mas em geral *Aspergillus* ssp. são fungos mais comum nas áreas tropicais, enquanto *Penicillium* ssp. são fungos de áreas temperadas (KOZAKIEWICZ & SMITH, 1994). Os três gêneros de fungos mais isolados no milho a campo são: *Fusarium* ssp., *Penicillium* ssp. e *Aspergillus* ssp. (BUSH et al., 2004).

O crescimento de algumas espécies de *Fusarium* é inibido na presença de *A.niger* e *A. flavus* no meio (MARIN et al., 1998), mas em meios com atividade de água alta (0,98) e temperaturas próximas de 15°C as espécies de *Fusarium* são mais competitivas e conseguem se sobressair sobre *A. niger* (SANCHIS et al., 2006).

2.4. Aspectos históricos das micotoxicoses

Decorrente do crescimento fúngico pode-se ter a produção de toxinas, denominadas micotoxinas, e micotoxicose é a doença provocada pela ingestão de micotoxina.

Devido às sintomatologias apresentadas, supõem-se que alguns fatos históricos estariam relacionados com a ingestão de micotoxinas, como por exemplo: As Dez Pragas do Egito, o Fogo de Santo Antônio, Bruxas de Salém e a Aleucia Tóxica Alimentar.

A última das Dez Pragas do Egito, contida no Velho Testamento teria sido um caso de ergotismo devido ao consumo de grãos contaminados por fungos (MILLER, 1995). Fatores como a escassez de alimentos causada pela morte dos animais, a má conservação dos cereais aliadas ao costume de no Egito os primogênitos terem preferência na alimentação, fizeram com que os filhos mais velhos das famílias recebessem a primeira porção e provavelmente a mais contaminada com micotoxinas, causando assim, sua intoxicação.

Na Idade Média o ergotismo era conhecido como “Fogo de Santo Antônio”, (RICHARD, 2007). Os membros enegrecidos pela gangrena eram comparados com carvão e a relação com “fogo” era explicada pela dor violenta nos membros, como se eles estivessem “queimando” (CAMERON & FRENCH, 1960). A vida de Santo Antônio não foi ligada diretamente ao ergotismo, no entanto seu nome foi relacionado com a “Ordem dos Hospitalários” fundada na França por volta de 1100. Os monges desta Ordem creditavam a cura da doença a Santo Antônio, mas é mais plausível que a cura tenha sido decorrente do fornecimento de alimento livre da toxina durante a peregrinação dos doentes em busca de cura (DE COSTA, 2002).

O episódio conhecido como “As Bruxas de Salém” no ano de 1692 em Massachusetts-Estados Unidos (RICHARD, 2007) é atribuído às colheitas fracassadas aliadas com eventos climáticos favoráveis à proliferação fúngica, que obrigaram os moradores de Salém a utilizar o centeio que dispunham naquele momento para fazer o pão. No outono de 1692, cinco a seis meninas entre 9 e 17 anos e mais duas criadas de origem caribenha, conversaram sobre histórias de magia e vodu, as amigas começaram a ser contorcer de dor, convulsionar e tiveram pesadelos durante a noite. Após acusação de bruxaria, vinte pessoas foram condenadas a morte, dezenove por enforcamento e uma foi enterrada sobre pedras, esta levou 3 dias para morrer (WOOLF, 2000), condenações indevidas, decorrentes do desconhecimento dos efeitos das micotoxinas.

A Aleucia Tóxica Alimentar (ATA) ocorreu na Rússia no início do século XIX (MILLER, 1995) e no leste europeu e Rússia durante a Primeira e Segunda Guerras Mundiais (POHLAND, 1993). Os sintomas da ATA incluíam leucopenia extrema, hemorragia grave (POHLAND, 1993), causados pela ingestão de alimento contaminado por tricotecenos, produzidos por fungos do gênero *Fusarium* ssp. (PERAICA et al., 1999).

Em 1960, 100 mil perus morreram na Inglaterra decorrente do consumo de ração produzida com torta de amendoim de origem brasileira e esta doença foi chamada “Turkey - X disease”. A comprovação do envolvimento de um metabólito fúngico na “Turkey – X disease” foi realizada por Sargeant et al. (1961), que

conseguiram reproduzir a doença, através da administração de extrato de cultura de *Aspergillus flavus*.

2.5. Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, de baixo peso molecular e não antigênicos (QUIN et al., 2005) produzidos por algumas espécies de fungos, sobretudo dos gêneros *Aspergillus* ssp., *Fusarium* ssp. e *Penicillium* ssp.. Estes fungos estão associados à produção de aflatoxinas, ocratoxinas, esterigmatocistina, patulina, rubratoxina B, ácido penicílico, citrina, zearalenona e tricotecenos, e todas estas micotoxinas são comprovadamente tóxicas em alimentos (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Metabólitos secundários não são substâncias essenciais ao crescimento ou manutenção dos fungos, e sua síntese se dá no final da fase log de crescimento (DEMAIN et al., 2005). A produção de micotoxina está diretamente relacionada com o crescimento do fungo, entretanto a presença de fungo não indica necessariamente que haja a presença de micotoxina (GONÇALEZ et al., 2001), pois muitas micotoxinas são termoestáveis e não são destruídas nos processos de moagem e peletização da ração (BACK, 2004).

Estima-se que existam entre 100 mil e 250 mil espécies fúngicas, destas, cerca de 200 são capazes de produzir micotoxinas, mas somente 30 são efetivamente responsáveis por casos de micotoxicoses (GOMPERTZ et al., 2008). Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, assim como, uma única espécie pode produzir mais de um tipo de toxina (BACK, 2004), atualmente já foram identificadas pelo menos 300 micotoxinas (BORGES et al., 2004).

Existem algumas condições que predispõem a produção de micotoxinas pelos fungos: umidade, temperatura, aeração, tipo e disponibilidade de substrato (PITT & HOCKING, 2009). Para que os fungos se desenvolvam adequadamente no substrato é necessário que haja água disponível para o desenvolvimento, alguns substratos retêm fortemente a água, dificultando sua disponibilidade para o fungo, a água disponível pode ser medida, e esta é denominada atividade de água (MALLOZZI & CORRÊA, 1998).

A determinação de atividade de água é dada pela equação: P/P_0 , onde P é a pressão de vapor de água no alimento e P_0 é a pressão de vapor da água pura (KAREL & LUND, 2003).

A atividade de água e a temperatura para crescimento ótimo podem ser diferentes das atividade de água e temperatura para produção de micotoxina (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade de água e temperatura para crescimento de fungos e para produção de micotoxinas.

fungo	temperatura(°C)		atividade de água (aw)		micotoxina produzida
	amplitude	ótima	crescimento	produção de micotoxinas	
<i>A. flavus</i>	6-45	35	0,78-0,80	0,83-0,87	aflatoxina
<i>A. ochraceus</i>	10-35	25	0,76-0,83	0,83-0,87	ocratoxina
<i>A. parasiticus</i>	6-45	35-37	0,78-0,82	0,87	aflatoxinas
<i>A. clavatus</i>	10-37	25	0,85	0,99	patulina
<i>P. verrucosum</i>	0-31	20	0,80	0,86	ocratoxina
<i>F. verticillioides</i>	2-37	22,5-27,5	0,87	0,92	fumonisina

Fonte: (LEITÃO, 1988; LACEY et al., 1991; PITT et al., 2000).

Além de fatores relativos às condições ambientais necessárias para a produção de micotoxinas pelos fungos, existem também fatores relativos ao próprio fungo, como as diferentes espécies e cepas (KOZAKIEWICZ & SMITH, 1994). Estudos relativos à produção de micotoxinas em diferentes substratos mostraram que de 74 a 100% das cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* isoladas de amendoim e caroço de algodão foram produtoras de aflatoxinas, enquanto a produção de aflatoxinas foi verificada em apenas 20 a 55% das cepas isoladas de arroz (MOSS, 1991).

A competição entre os microorganismos pode interferir na produção das micotoxinas. A síntese de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus* é inibida em meios de cultivo na presença de *Penicillium rubrum* (FABBRI et al., 1984) e a produção de FB1 por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* é aumentada na presença de *A. niger* em grãos de milho com atividade de água de 0,98 (KOZAKIEWICZ & SMITH, 1994).

A International Agency for Research on Cancer (1993) classifica as substâncias de acordo com seu potencial carcinogênico. A aflatoxina foi classificada por esta agência como carcinogênica para humanos (Grupo 1), ocratoxina e fumonisina como possíveis carcinogênicos (Grupo 2B), e zearalenona, deoxinivalenol (DON) e toxina T2 como substâncias não classificadas (Grupo 3).

Os efeitos das micotoxinas são muito variáveis, e a sintomatologia decorrente das micotoxicoses envolve: esteatose hepática, cirrose, diarreia, convulsões, descoordenação motora, tumores, diminuição da imunidade (Tabela 7). A sintomatologia pode variar devido a fatores relativos ao animal (espécie, idade e sexo) ou à própria toxina (tipo, concentração no alimento e presença de uma ou mais micotoxinas (QUIN et al., 2005).

Tabela 7. Ocorrência de algumas micotoxinas e seus efeitos tóxicos.

Micotoxina	Ocorrência em alimentos	Fungo produtor	Atividade biológica
------------	-------------------------	----------------	---------------------

Aflatoxinas	Milho, amendoim, figos, nozes (Aflatoxina M1 secretada no leite e encontrada em produtos lácteos)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	hepatotóxico e carcinogênico
Ácido ciclopiazônico	Queijo, milho, nozes	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Penicillium aurantiogriseum</i>	convulsões
Deoxinivalenol	Cereais	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	recusa do alimento, emese
Toxina T-2	Cereais	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	aleucia tóxica alimentar (ATA)
Ergotamina	Centeio	<i>Claviceps purpurea</i>	neurotóxico
Fumonisinina	Milho	<i>Fusarium verticillioides</i>	leucoencefalomalácia equina, edema pulmonar, carcinoma esofágico em porcos
Ocratoxina	Milho, cereais, café	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	nefrotóxico
Patulina	Suco de maçã, frutos danificados	<i>Penicillium expansum</i>	edema, hemorragia, possivelmente carcinogênico
Esterigmatocistina	Cereais, café, queijo	<i>Aspergillus versicolor</i>	hepatotóxico, carcinogênico
Zearalenona	Milho, cevada, trigo	<i>Fusarium graminearum</i>	estrogênico

Fonte: Adams e Motarjemi (1999).

A classificação toxicológica dos produtos químicos, em termos de toxicidade aguda, é baseada no valor da DL50. A determinação da DL50 é dada pela dose, administrada em níveis crescentes a grupos de animais, capaz de causar a morte de 50% dos animais tratados em um determinado período (WALUM, 1998).

Existem vários estudos que são conduzidos para avaliar a susceptibilidade das espécies, do sexo e da idade às micotoxinas (Tabela 8), mas nem todas as micotoxinas foram avaliadas, por exemplo, ainda se desconhece a DL50 para fumonisinina (IARC, 2002).

Os efeitos tóxicos das fumonisinas estão relacionados com a intoxicação crônica, em um estudo com equino, o animal que recebeu dose de FB1 de 0,4 mg/kg de peso corpóreo por via endovenosa, veio a óbito no 5º dia após a administração, apresentando lesões típicas de edema pulmonar causado por intoxicação por fumonisinina (HARRISON et al., 1990).

Estudos mostram que locais onde ocorrem as maiores contaminações de alimentos por fumonisina estão relacionados aos maiores índices de câncer de esôfago em humanos (SYDENHAM et al., 1990).

Tabela 8. DL50 de micotoxinas

Micotoxina	Espécie	DL50	referência
Aflatoxina B1	Macaco macho (<i>Macaca irus</i>)	2,2 mg/kg	Rao e Gehring (1971)
Toxina T-2	Codorna macho	14,7 mg/kg	Grizzle et al. (2004)
Ocratoxina	Rato macho	28 mg/kg	Kanisawa et al. (1977)
Esterigmatocistina	Rato fêmea	120 mg/kg	Purchase e Van der Watt (1969)
Deoxinivalenol	Frango	140 mg/kg	Huff et al. (1981)

Em um ambiente de criação comercial, vários aspectos podem influenciar na maior susceptibilidade dos animais às micotoxinas. A ingestão de cama contaminada com inseticidas, o estresse térmico, matéria-prima contaminada com agrotóxicos (MENEGAZZO, 2008), animais imunossuprimidos e a presença de mais de uma micotoxina numa mesma ração (BACK, 2004) são fatores que podem exacerbar os sintomas nos animais.

As micotoxinas são um problema mundial, conforme pode ser observado na Figura 4. A Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas (FAO) estimou que mais de 25% da produção mundial de alimentos encontra-se contaminada com algum tipo de micotoxina (BENÍTEZ, 2002).

Figura 4. Distribuição mundial das micotoxinas.

Fonte: Adaptado de AllAboutFeed.net (2010)

O fenômeno conhecido como biomagnificação, refere-se ao acúmulo progressivo de substâncias persistentes considerando os níveis da cadeia alimentar, ou seja, ocorre maior concentração destas substâncias nos tecidos de espécies predadoras em relação às concentrações observadas nos tecidos de espécies que estão no nível abaixo da cadeia alimentar (LEXTEC, 2010).

Resíduos de micotoxinas podem se acumular nos tecidos de animais, ser excretados no leite (QUIN et al., 2005) ou nos ovos (OLIVEIRA et al., 2000) de animais que consumiram ração contendo micotoxinas. Os alimentos de origem animal contaminados com resíduos constituem fontes de exposição aos humanos que consomem estes produtos.

2.5.1. Aflatoxinas

Aflatoxinas podem ser produzidas por 3 espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e raramente por *A. nomius* (WHO, 2002), foram descobertas em 1960, e foram responsáveis por provocarem a "Turkey - X disease" (SARGEANT et al., 1961).

Variações de umidade e temperatura afetam a velocidade de crescimento *Aspergillus* ssp. e também os tipos e quantidades de toxinas produzidas (HASCHEK et al., 2002) (Figura 5). As exigências de atividade de água diferem entre as espécies de *Aspergillus* ssp., as atividades ótimas para crescimento são 0,82 a 0,93 para *Aspergillus restrictus*, 0,94 a 0,96 para *Aspergillus nidulans* e 0,97 para *Aspergillus fumigatus* (LACEY & MAGAN, 1991).

Figura 5. Crescimento de *Aspergillus parasiticus* e produção de AFB1 em ágar extrato malte e glicerina, em vários níveis de atividade de água e temperaturas.
Fonte: Adaptado de Jay (2005).

Existem 18 compostos designados pelo termo aflatoxina (JAY, 2005), no entanto, os tipos de maior interesse são as aflatoxinas: B1, B2, G1 e G2 (Figura 6), sendo que estas podem ser encontradas, associadas, em vários alimentos e em diferentes proporções, entretanto a aflatoxina B1 é, geralmente, a mais predominante e a mais tóxica para a maioria das espécies animais (LEESON & SUMMERS, 1995), as toxicidades de AFG1, AFB2 e AFG2 são 50, 20 e 10% da AFB1, respectivamente, quando calculadas em relação a suas DL50 (SMITH & ROSS, 1991).

Figura 6. Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 e M2.
Fonte: Hussein (2001).

As denominações B e G originam-se das fluorescências emitidas, “blue” e “green”, quando estas aflatoxinas são expostas à luz ultravioleta (GOMPERTZ et al., 2008) (Tabela 9). A aflatoxina M é um dos principais metabólicos da AFB1, em animais, e é usualmente excretada no leite e na urina de animais que consumiram alimento contaminado com aflatoxina (GALVANO et al., 1996).

São estáveis no ambiente, mas são sensíveis à oxidação por produtos como o hipoclorito de sódio, amônia (BACK, 2004), o ponto de fusão da AFB1 é ao redor de 270°C (NESBITT et al., 1962).

Tabela 9. Propriedades físico-químicas das principais aflatoxinas.

Aflatoxina	Fórmula química	massa molecular	ponto de fusão (°C)	emissão de fluorescência (nm) e cor sob luz UV
AFB1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	425-azul
AFB2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425-azul
AFG1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	450-verde
AFG2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	425-verde
AFM1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	425-violeta azulada
AFM2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	314	293	425-violeta

Fonte:OPAS (1983).

Aflatoxinas produzem necrose aguda, cirrose e carcinoma no fígado e nenhuma espécie animal é resistente aos efeitos agudos das aflatoxinas. A DL50 varia de 0,5 a 10 mg/kg dependendo da espécie, a toxicidade pode ser influenciada por

fatores ambientais, nível e duração da exposição, idade, status imunológico e nutricional (FORSYTHE, 2002).

O efeito imunossupressor decorrente da aflatoxicose se dá em nível celular com diminuição de fagocitose pelos macrófagos e inibição da proliferação de células do sistema imune, e em nível humoral, reduzindo a quantidade de imunoglobulinas (IgA e IgG) (OSWALD et al., 2005)

As aflatoxinas são as únicas micotoxinas, no Brasil, que possuem níveis máximos em alimentos para consumo humano previstos em legislação, sendo de 0,5 µg/L no leite e de 20 µg/kg para milho e amendoim (ANVISA), e o Ministério da Agricultura (1988) estabelece o limite máximo de 50 µg/kg de aflatoxinas totais (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2) para matéria-prima utilizada diretamente ou como componente de ração.

As aves são particularmente sensíveis às aflatoxinas devido à sua rápida absorção pelo trato gastrintestinal, e seus efeitos são mais evidentes a nível hepático (LEESON & SUMMERS, 1997). Estima-se que, para cada 1.000 µg/kg de aflatoxina na ração haja uma diminuição de 5% na taxa de crescimento de frangos de corte (DERSJANT-LI; VERSTEGEN; GERRITS, 2003).

A toxicidade das aflatoxinas é aumentada pela presença de outras toxinas, a combinação de ocratoxina e aflatoxina na dieta causa maiores perdas nos índices de desempenho quando comparada com dietas que contenham somente aflatoxinas ou ocratoxina (VERMA et al., 2004).

O quadro de aflatoxicose pode ser agravado se os animais estiverem acometidos por doenças como a Aspergilose, também ocorre interação com os nutrientes da dieta, baixa proteína bruta ou metionina, e níveis marginais de riboflavina, ácido fólico ou vitamina D3 podem agravar o quadro de aflatoxicose (LEESON & SUMMERS, 1997).

As aflatoxinas possuem efeito imunossupressor em frango de corte, elas provocam queda no número de linfócitos na Bursa de Fabrícus (BORNE & COMTE, 2003).

Após a absorção, a AFB1 liga-se imediatamente à albumina, espalhando-se pelos tecidos, especialmente fígado, onde são biotransformadas pelo sistema microssomal hepático. Os derivados biotransformados podem ligar-se com constituintes intracelulares tais como DNA e RNA, alterando a síntese de proteínas (SANTURIO, 2000), apesar de as aflatoxinas serem carcinogênicas, raramente observa-se a formação de tumores em aves, possivelmente ao seu curto ciclo de vida (BACK, 2004).

As enzimas são proteínas responsáveis por uma série de reações bioquímicas, encontram-se em todos os tecidos do organismo (sangue, rins, pulmões, pele, tecido nervoso e fígado) (OSHIMA-FRANCO & FRANCO, 2003), mas mesmo distribuídas por todo organismo é no tecido hepático onde se encontra a maior concentração (WATKINS, 1992). Citocromo P450 é um conjunto de hemoproteínas localizado principalmente no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, auxilia na oxidação de várias substâncias como esteróides, fármacos, pesticidas, poluentes e substâncias cancerígenas (PARIKH et al., 1997).

As aflatoxinas por si não são tóxicas, a biotransformação da AFB1 constitui um complexo processo com múltiplas vias (Figura 7), a AFB1 necessita, porém, sofrer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (BIEHL & BUCK, 1987) e a principal via, ocorre através do citocromo P450, embora haja outras vias envolvidas (COULOMBE, 1993).

A AFB1 e AFG1 possuem uma dupla ligação no anel furano terminal, que quando oxidado pelas enzimas hepáticas a epóxido que pode se ligar com o DNA (EATON & GALLAGHER, 1994), por outro lado na AFB2 e AFG2 as ligações entre os carbonos C8 e C9 já são saturadas, e representam menor perigo se comparadas à AFB1 e AFG1 (MOLYNEUX et al., 2007).

A forma ativada da AFB1 é o composto identificado como AFB1-8,9-epóxido, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB1 (HARRIS et al., 1989). Além da epoxidação, a biotransformação primária da AFB1 inclui a hidroxilação, para formar aflatoxina M1 (AFM1), aflatoxina Q1 (AFQ1) e aflatoxina B2a (AFB2 a); e, O-demetilação, para formar aflatoxina P1 (AFP1). Todos estes compostos contêm o grupo hidroxila na molécula, o que permite a conjugação com ácido glicurônico ou sulfatos (MOSS, 1998). O aflatoxicol (R0) é originado através da redução do anel ciclopentanona da molécula de AFB1, por uma enzima citoplasmática NADPH-dependente (BIEHL & BUCK, 1987).

Não há tratamento para a aflatoxicose aguda, principalmente devido ao comprometimento do fígado, mas o fornecimento de antioxidantes e/ou selênio, parece retardar o aparecimento dos sintomas e acelerar a recuperação se o fornecimento de dieta contaminada for cessado (LEESON & SUMMERS, 1997).

Figura 7. Biotransformação da aflatoxina B1 no fígado de aves.
Fonte: Santurio (2000).

A toxicidade das aflatoxinas é dependente da espécie, sexo, idade, tempo de exposição e nível dentre outros fatores (Tabela 10).

Tabela 10. Toxicidade aguda da AFB1.

Espécie	DL50 (mg/kg de peso corporal)
coelho	0,30
pato 1 dia	0,33-0,59
truta	0,50-1,00
cão	0,50-1,00
gato	0,55
porco	0,62-2,00
ovelha	1,00-2,00
porco da índia	1,40-2,20
macaco	2,20
galinha	6,00-16,00
rato (macho)	7,00
rato (fêmea)	18,00

Fonte: Menegazzo(2008).

As aflatoxinas são substâncias solúveis em solventes levemente polares e insolúveis em solventes completamente apolares, normalmente são extraídas usando-se uma mistura de solventes orgânicos entre os quais acetona, clorofórmio ou metanol (BULLERMAN et al., 2008).

Durante muitos anos a quantificação das aflatoxinas foi realizada através de CCD (Cromatografia em Camada Delgada), mas atualmente, a técnica de eleição é a

CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). A CLAE além de apresentar maior acurácia em relação à CCD (ELLIS et al., 1991) tem a vantagem de ser um sistema automatizado (JAIMEZ et al., 2000) .

O maior problema dos métodos analíticos utilizados para detecção de AFB1 é a presença de substâncias interferentes que são co-extraídas da amostra nas etapas de extração e purificação, anteriores à quantificação (PAL et al., 2005). Para reduzir a quantidade destes interferentes pode-se utilizar colunas de imunoafinidade na purificação dos extratos.

Geralmente o sistema em fase reversa é mais utilizado do que o de fase normal, pela facilidade de manipulação e pela menor toxicidade da fase móvel (JAIMEZ et al., 2000). Segundo Jaimez et al. (2000) a utilização de solventes como metanol/água ou acetonitrila/água, diminui a fluorescência das aflatoxinas B1 e G1, assim, tem-se utilizado diferentes procedimentos para derivatização, entre eles o uso de ácidos fortes como o ácido trifluoroacético (TFA) e oxidantes como as cloraminas, iodo e bromo.

A detecção de pequenas quantidades de aflatoxinas em amostras por CLAE requer a derivatização das aflatoxinas B1 e G1 para aumentar a fluorescência natural sob luz UV e facilitar a sua detecção (SILVA, 2009.).

A transferência das aflatoxinas da ração para produtos de origem animal é assunto que vem sendo cada vez mais estudado (Tabela 11). Salle et al. (2001) encontraram níveis de até 2,41 µg/kg de aflatoxina em fígado de frangos oriundos de abatedouro comercial. Stamford et al. (2005) encontraram resíduos de aflatoxina em vários produtos avícolas entre eles: fígado, coxa, nugget e patê de fígado, onde as médias encontradas foram de 0,7 µg/kg na linguiça de frango até 1,9 µg/kg no fígado não condenado.

Tabela 11. Taxa de transferência de AFB1 em tecidos comestíveis.

Animal	tecido	Aflatoxina no tecido	taxa de transferência da ração para o tecido ¹
poedeiras	ovos	B1	2.200
vacas leiteiras	leite	M1	300
gado de corte	fígado	B1	14.000
suínos	fígado	B1	800
frangos de corte	fígado	M1	1.200

¹Concentração de aflatoxina na ração dividido pela concentração de aflatoxina residual no tecido.

Fonte: Semple et al. (1989)

2.5.2. Fumonisin

Tamames (2008) afirma que a importância que as aflatoxinas tinham no passado, como as micotoxinas com maior frequência e responsáveis pelos maiores problemas produtivos, tem atualmente menor importância se comparadas com as fusario toxinas, toxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* ssp..

Entre as fusario toxinas estão: toxina T-2, fumonisin, deoxynivalenol (DON), nivalenol e a zearalenona (SMITH, 2001) (Tabela 12). O estudo dos fungos do gênero *Fusarium* ssp. tem grande importância econômica por serem patogênicos para as plantas causando doenças em um grande número de espécies vegetais, podem sobreviver na matéria orgânica por longos períodos ou na forma endofítica, colonizando a planta hospedeira (MARTINS, 2005), estima-se que as perdas no campo devido à podridão do milho causada por *Fusarium* ssp. seja na ordem de 10 a 30% (LOGRIECO et al., 2002).

Tabela 12. Espécies de *Fusarium* ssp. toxigênicas e suas micotoxinas

Fungo	micotoxina
<i>F.acuminatum</i>	moniliformina, T2, beauvericina, diacetoxiscirpenol
<i>F. anthophilum</i>	beauvericina
<i>F. avenaceum</i>	moniliformina, beauvericina
<i>F. chlamydosporum</i>	moniliformina
<i>F. graminearum</i>	deoxinivalenol, zearalenona, nivalenol, fusarenona-X
<i>F.poa</i>	diacetoxiscirpenol, nivalenol, fusarenona-X, T2
<i>F. subglutinans</i>	beauvericina, Moniliformina, fusaproliferina
<i>F. verticillioides</i>	fumonisin (B1, B2, B3)

Fonte: Adaptado de Logrieco et al.(2002)

As fumonisin foram quimicamente caracterizadas por Bezuidenhout (1988), sendo produzidas por fungos do gênero *Fusarium* ssp., principal fungo contaminante do milho no campo (BUSH et al., 2004).

A principal espécie produtora de fumonisin é *F. verticillioides*, mas existem pelo menos outras 10 espécies de *Fusarium* ssp. que são capazes de produzir FB1 entre elas: *F. anthophilum*, *F. beomiforme*, *F. diamini*, *F. globosum*, *F. hapiforme*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. polyphialidicum*, *F. subglutinans* e *F. thapsinum* (WHO, 2000).

A temperatura para crescimento de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* está entre 5°C a 37°C em condições de atividade de água acima de 0,88, mas a fase lag de crescimento é menor em temperaturas de 25°C a 30°C e atividade de água de 0,94 a 0,98 (SANCHIS et al., 2006). Marín et al. (1999) observaram que as melhores condições de temperatura e atividade de água para a maior produção de fumonisin por *F. verticillioides* foi de 15°C com 0,92 de atividade de água (Figura 8).

Figura 8. Efeito da atividade de água e temperatura na produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* em 2 semanas de incubação.

Fonte: Adaptado de Marín et al.(1999)

As fumonisinas são micotoxinas estáveis nas temperaturas de processamento dos alimentos, à luz e solução de água/acetona (1:1) e instáveis em metanol (WHO, 2000). Alberts et al. (1990) estudando material de cultivo de *F. verticillioides*, verificaram que a FB1, após fervura por 30 minutos, continuava estável e sem diminuição nos níveis, mas em temperatura por volta de 200 °C por 15 minutos ocorre a inativação quase completa da FB1 (CASTELO et al., 1998).

Diésteres de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico (SHEPHARD, 1998), as fumonisinas apresentam-se sob as formas: A (A_1 - A_4), B (B_1 - B_4), C (C_1 - C_4) e P (SEO & LEE, 1999) sendo a mais predominante FB1 seguida da FB2 e FB3 (SHEPHARD et al., 1996) (Figura 9) e a FB1 é a que apresenta maior toxicidade (COULOMBE, 1993).

Fumonisina	R1	R2	R3
B1	OH	OH	H
B2	H	OH	H
B3	OH	H	H
B4	H	H	H
A1	OH	OH	CH ₂ CO
A2	H	OH	CH ₂ CO

Figura 9. Estrutura química das fumonisinas.

Fonte:Diaz e Boermans (1994).

As fumonisinas são citotóxicas, induzem a fragmentação do DNA e interrompem o ciclo celular (CREPPY et al., 2004). Para humanos recomenda-se que a ingestão diária de fumonisina não ultrapasse 2 µg/kg de peso corpóreo (WHO, 2002).

Voss et al. (2002) verificou os efeitos carcinogênicos da fumonisina em ratos e camundongos, através da administração de 50 mg/Kg de FB1 na dieta. Associadas ao câncer de esôfago em humanos, à leucoencefalomalácia equina e à síndrome de edema pulmonar em suínos, as fumonisinas interferem na síntese de esfingolipídios.

Os esfingolipídios são lipídeos que constituem parte da membrana celular e são encontrados em grandes quantidades no tecido nervoso e cérebro. As fumonisinas são análogas da esfinganina e inibem a síntese dos esfingolipídeos (TURNER et al., 1999; CIRILLO et al., 2003), impedem a ação da enzima ceramida sintetase (Figura 10), enzima que participa na biossíntese dos esfingolipídeos, levando ao acúmulo intracelular do precursor esfinganina (Sa) e diminuição da esfingosina (So) (TURNER;NIKIEMA;WILD, 1999).

Figura 10. Mecanismo de ação das fumonisinas.

Fonte: Adaptado de Minani et al. (2004).

Shephard et al. (1994) estudaram a toxicocinética da FB1, através da administração de FB1 radioativa, por sonda, em macaco na dose de 8 µg/g de peso corpóreo e observaram que de cerca de 72% foi recuperada nas fezes e conteúdo intestinal, sendo a maior parte, acima de 90%, sob a forma de FB1 não hidrolisada.

As fumonisinas são compostos fortemente polares, solúveis em água e solventes polares e insolúveis em solventes orgânicos (POZZI et al., 2002). Ao contrário da maioria das micotoxinas, as fumonisinas não apresentam fluorescência quando se incide luz ultravioleta (HENRY & WYATT, 1993).

Vários métodos analíticos tem sido descritos na análise das fumonisinas: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida, espectrometria de massa, cromatografia gasosa (após hidrólise da fumonisina) e métodos imunoquímicos (WHO, 2000). A técnica mais amplamente utilizada para detecção e

quantificação das fumonisinas é a CLAE com derivatização pré-coluna e detecção fluorimétrica (LINO et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar a ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas na cadeia de produção de frangos de corte.

3.2. Objetivos específicos:

Determinar e quantificar aflatoxinas e fumonisinas em matérias-primas (milho e farelo de soja) e rações prontas para frangos de corte produzidos em sistema de integração por uma empresa avícola localizada no Estado de São Paulo.

Determinar e quantificar os resíduos dessas micotoxinas no músculo e nas vísceras dos frangos produzidos pela empresa no período de um ano (abril/2008 a março/2009).

Verificar o impacto da ocorrência das micotoxinas em estudo sobre a produtividade da empresa.

Verificar eventuais alterações nas concentrações das micotoxinas nas diversas etapas da produção de frangos de corte e suas implicações para a saúde humana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Empresa integradora

A coleta de material foi realizada em uma empresa localizada na região Sudeste do Estado de São Paulo, especializada em abate de frangos para comercialização de inteiros e cortes congelados. Atualmente, a empresa apresenta uma produção mensal de 6.000 t de produtos acabados, utilizando o sistema de integração para a produção de carne de frango, possuindo cerca de 280 granjas integradas.

A empresa utiliza milho de origem, principalmente da região Centro-Oeste, o setor de controle de qualidade da empresa realiza amostragem de todos os caminhões antes da liberação de descarregamento, sendo que o descarregamento somente é liberado conforme os padrões mínimos estabelecidos pela empresa.

Para milho os padrões utilizados são: umidade mínima de 10% e máxima de 14,5%, proteína mínima de 7,5%, grãos ardidos no máximo 6%, quebrados no máximo 8%, impurezas no máximo 1,5% e grãos que apresentam fluorescência sob luz UV (máximo de 5 pontos de fluorescência em 9 kg de grãos de milho).

Para o farelo de soja os padrões utilizados são: umidade máxima de 12,5%, proteína mínima 45% e analisado atividade ureática de no máximo 0,1.

As exceções referentes ao descarregamento de matéria-prima fora dos padrões estabelecidos, são realizadas quando há escassez de matéria-prima disponível para a produção das rações.

Os materiais utilizados para cama de frango ficam a critério do integrado, dependendo da disponibilidade próximo ao alojamento dos animais. O material mais utilizado nas granjas analisadas foram a casca de arroz, e uma granja utilizou capim picado.

A criação é dividida em 4 fases: pré-inicial, inicial, crescimento e abate. A ração de interesse neste trabalho é a ração de abate, que é consumida entre 5 a 7 dias e é fornecida aos animais dos 41 aos 48 dias de idade, aproximadamente, dependendo da necessidade da empresa por animais maiores ou menores.

Conforme a disponibilidade de milho, este é segregado, segundo a qualidade, onde o milho de melhor qualidade destina-se à confecção de ração para matrizes e iniciais, e o de pior qualidade à confecção das rações de crescimento e abate.

Foram analisadas 7 granjas que possuíam capacidade de alojamento variando de 9.000 a 39.000 aves, 4 possuíam silo externo de metal e 3 silo tipo “caixa”, onde a ração ficava em contato direto com o piso. Os bebedouros eram do tipo pendular, 3

possuíam somente comedouros tubulares e 4 granjas utilizavam comedouros tubulares conjuntamente com comedouros tipo calha.

Os animais são vacinados no incubatório contra a Doença de Marek (Fort Dogde®) e aos 14 dias de idade contra a Doença de Gumboro (CEVAC® IBD L).

Os dados referentes aos lotes coletados foram passados pela empresa, os índices de produtividade avaliados foram: idade ao abate, mortalidade (%), fator de produção, fator de produção corrigida, ganho de peso médio diário, peso médio ao abate, conversão alimentar e conversão alimentar corrigida, os valores corrigidos (fator de produção e conversão alimentar) são ajustados para abate aos 45 dias utilizando-se uma tabela com fatores de correção, o cálculo dos outros índices de produção encontram-se abaixo:

Ganho de peso médio diário (g/dia) = (peso final – peso inicial) / período em dias

Mortalidade (%) = (número de aves inicial – número de aves final) x 100 / número de aves inicial

Viabilidade (%) = número inicial de aves final x 100 / número de aves inicial

Fator de produção = (viabilidade x ganho de peso médio diário) / (conversão alimentar x 10)

Conversão alimentar (g/g) = Consumo de ração (g) / ganho de peso (g)

Conversão alimentar corrigida para um peso padrão:

$$CA \text{ corrigida} = \frac{PP - PM}{3,2} + CA$$

onde PP= peso padrão estabelecido pela empresa de 2.250 g

PM= peso médio do lote

CA= conversão alimentar

3,2= fator de correção obtido pela divisão de 64 por 20, assumindo que para cada 64 gr de aumento de peso, há um aumento de consumo de 20 gr de ração/kg de peso vivo.

4.2. Período de amostragem

As coletas foram realizadas de abril de 2008 a março de 2009. As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP. Adicionalmente, foram registrados os dados relativos às condições meteorológicas durante o período experimental, fornecidos pela Estação de Meteorologia localizada na Academia da Força Aérea, referentes à região de Pirassununga. Os dados de

temperatura, umidade e pluviosidade no período de janeiro de 2008 a março de 2009 estão no Anexo 8.1.

4.3. Pontos de amostragem

As amostragens para determinação das micotoxinas foram realizadas em vários pontos da cadeia produtiva do frango de corte: matéria-prima (milho e farelo de soja), produção de ração de abate, nas granjas de produção e no frigorífico, segundo a Figura 11. Para análise da microbiota fúngica as amostras que foram analisadas são: matéria-prima, ração e cama de frango.

Figura 11. Fluxograma de coleta

4.4. Determinação do número de pontos de amostragem e quantidade de material

Para as amostras de matéria-prima, ração e cama o número de pontos de amostragem e a quantidade de material que determinaram uma amostra seguiram as recomendações ISO 6497, apresentadas na Tabela 13 e na Tabela 14.

Tabela 13. Número de pontos para a constituição de uma amostra conforme o tamanho do lote

Tamanho (t)	pontos
Até 2,5	7
Acima de 2,5	$\sqrt{20X_{massa}}$ até 100 no máximo

Tabela 14. Quantidade de material que determinará uma amostra

Tamanho do lote (t)	Amostra do lote (kg)	Amostra reduzida (para análise laboratorial) (kg)
1	4	2
1 a 5	8	2
5 a 50	16	2
50 a 100	32	2
100 a 500	64	2

4.5. Amostragem da cama

Frangos de corte possuem o hábito de ciscar, ingerindo, a cama sobre a qual são alojados. Salientando a importância do manejo da cama, principalmente em relação à umidade, na proliferação de fungos e consequentemente na produção de micotoxinas, supôs-se que a cama de frango também poderia influenciar nos resíduos de micotoxinas na carne, assim a amostragem da cama de frango foi realizada em dois momentos: no dia de alojamento dos animais (no presente estudo chamada de “cama antes”) e no dia anterior ao abate dos mesmos (nomeada de “cama depois”), para cada lote avaliado (40 no total). O número de pontos para constituição da amostra foi realizada conforme o tamanho da granja, seguindo as recomendações ISO 6497 (Tabela 13 e Tabela 14).

4.6. Amostragem dos grãos e rações prontas

Foram avaliados rações de terminação produzidas no período de 1 ano. A amostragem dos grãos (milho e farelo de soja) utilizados como matéria prima de cada lote foi coletado anteriormente a confecção da mesma. Amostras de ração pronta foram coletadas na fábrica logo após o preparo, bem como nas unidades de produção de frangos no dia anterior ao abate dos frangos, totalizando 94 amostras de ração (47 amostras coletadas na fábrica de ração e 47 amostras coletadas na granja), oriundas de 17 amostras de milho e 17 farelo de soja.

4.7. Análise de microbiota fúngica das amostras de milho

As análises de microbiota fúngica foram realizadas conforme metodologia de Berjak (1984). Foram coletadas 17 amostras de milho, de cada amostra foi retirado, aproximadamente, 30 g para desinfecção em solução de hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos, para eliminação dos contaminantes externos. Após a desinfecção, os grãos foram lavados com água destilada estéril por três vezes. Foram selecionados 33 grãos ao acaso e semeados diretamente em placa de petri contendo ágar DG18, acrescido de cloranfenicol (100 µg/mL), as contagens deram-se pela porcentagem de grãos positivos em relação ao total semeado (33 grãos). As placas foram incubadas à 25°C por 5 dias e os resultados expressos em porcentagem do total de grãos inoculados infectados por fungos em cada amostra (Figura 12). Em seguida, colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em ágar batata e submetidas a identificação, através da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950).

Figura 12. Técnica de plaqueamento direto

4.8. Análise de microbiota fúngica do farelo de soja, ração e cama de frango

A análise de microbiota fúngica foi realizada conforme metodologia descrita por Pitt e Hocking (2009). Dez gramas de cada amostra foram diluídas em 90 mL de água destilada estéril para obtenção da diluição de 10^{-1} . A partir desta, foram preparadas diluições seriadas até 10^{-5} , empregando-se o mesmo diluente. Aliquotas de 0,1mL, de cada diluição, foram plaqueadas em duplicatas em placas de Petri contendo ágar DG18 acrescido de cloranfenicol (100 µg/mL), o mesmo procedimento foi realizado para a cama de frango, no entanto, o meio utilizado foi o PDA. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C durante cinco dias, os resultados são dados em log (10) UFC/g de amostra. As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em ágar batata e submetidas à identificação, através da técnica de

microcultivo (RIDDELL, 1950). Os fungos serão classificados de acordo com o descrito nos seguinte compêndios: ARX (1974), RAPER e FENNEL (1965), NELSON et al. (1983) e NELSON (1992).

4.9. Análises bromatológicas

Para as análises bromatológicas foram utilizadas 18 amostras de ração, sendo 9 amostras da fábrica e as mesmas coletadas nas granjas.

As análises bromatológicas rações prontas foram realizados conforme recomendação da AOAC (1995) para matéria seca (105°C), matéria mineral, proteína bruta (método de Micro-Kjedahl), fibra bruta, extrato etéreo e atividade de água. A atividade de água (aw) foi determinada instrumentalmente pelo aparelho AQUALAB CX-2, da Decagon Devices Inc.

4.9.1. Determinação de matéria seca 105°C

A determinação da matéria seca a 105°C foi realizada conforme esquema da Figura 13.

Figura 13. Procedimento para determinação da matéria seca a 105°C

4.9.2. Determinação de matéria mineral

A determinação da matéria mineral foi realizada conforme esquema da Figura 14.

Figura 14. Procedimento para determinação da matéria mineral

4.9.3. Determinação da proteína bruta (Micro-Kjedahl)

A determinação da proteína bruta foi realizada conforme esquema da Figura 15.

Figura 15. Procedimento para determinação da proteína bruta

$$\text{Cálculo: } N\% = \frac{(VGA - VGB) \times N \times FC \times 14,007 \times 100}{\text{Peso da amostra}}$$

VGA= mL gasto de HCl na amostra

VGB= mL de HCl gasto no branco

N= normalidade do ácido

FC= fator de correção do ácido

14,007= Equivalente grama do nitrogênio

100= porcentagem

Cálculo de porcentagem de proteína na amostra: Multiplicar o valor porcentual de nitrogênio da amostra pela constante 6,25, pelo fato da proteína conter cerca de 16% de nitrogênio na sua composição.

4.9.4. Determinação de fibra bruta

A determinação da proteína bruta foi realizada conforme esquema da Figura 16.

Pesar 2 g de matéria seca previamente desengordurada e transportar para bécker de forma alta, 500 mL de capacidade

Cobrir a amostra com 200 mL de ácido sulfúrico a 1,25%

Levar ao aparelho de Sebelin e deixar em ebulição por 30 minutos

Filtrar em funil de Buckner e peneira com malha 200 mesh, a vácuo

Lavar com água destilada aquecida até reação neutra

Voltar o resíduo insolúvel ao bécker e juntar 200 mL de hidróxido de sódio a 1,25%

Levar ao aparelho Sebelin e deixar em ebulição por 30 minutos

Filtrar direto no cadinho de vidro com placa porosa (porosidade média ou fina)

Lavar com água destilada aquecida até reação neutra

Levar o cadinho de vidro à estufa 105°C por 4 horas

Transferir para dessecador e pesar

Levar à mufla a 550°C por 4 horas

Transferir para dessecador e pesar

Proceder os cálculos

Figura 16. Procedimento para determinação da fibra bruta

Para obter a quantidade da fibra bruta existente na amostra, subtrai-se o peso do cadinho de vidro proveniente da mufla 550°C (porção A), do peso obtido para este

mesmo cadinho após secagem em estufa 105°C por 4 horas (porção B). Na porção A tem-se as cinzas e na porção B tem-se as cinzas e a fibra bruta.

4.9.5. Determinação do extrato etéreo

A determinação do extrato etéreo foi realizada conforme esquema Figura 17.

Figura 17. Procedimento para determinação do extrato etéreo

4.9.6. Determinação do extrato não nitrogenado

A determinação do extrato não nitrogenado se faz pela subtração das outras variáveis da composição bromatológica:

Extrato não nitrogenado = matéria seca – (extrato etéreo + cinzas + proteína bruta + fibra bruta)

4.10. Análises micotoxicológicas de grãos e rações prontas

As análises de aflatoxinas foram realizadas através de CLAE de acordo com metodologia preconizada pela AOAC (SCOTT, 1990), com modificações incluindo a purificação dos extratos realizada em colunas de imunoafinidade (Neogen®) (Figura 18).

Figura 18. Procedimento para preparo da amostra para injeção em CLAE para aflatoxinas

A extração e quantificação de fumonisinas foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SHEPHARD et al., 1990), conforme Figura 19.

Figura 19. Procedimento para preparo da amostra para injeção em CLAE para fumonisinas

4.11. Avaliação do potencial toxigênico de cepas de *Aspergillus* ssp.

Um pequeno fragmento da colônia de *Aspergillus* ssp., obtido do cultivo da cepa em ágar Sabouraud Dextrose a 25°C, foi inoculado, com auxílio de um fio de

platina em “L”, no centro de uma placa de Petri contendo ágar coco (LIN & DIANESE, 1976). A placa foi incubada a 25 °C por 14 dias.

Após crescimento, a cultura, juntamente com o ágar, foi pesada, transferida para um frasco ao qual foi adicionado clorofórmio na proporção de 30 mL do solvente para cada 10 g do cultivo. Após agitação por 30 minutos, em agitador mecânico horizontal, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro e terra diatomácea. O filtrado foi evaporado até resíduo em banho-maria e armazenado a -4°C até o momento da realização da cromatografia em camada delgada (Figura 20).

Figura 20. Procedimento para cromatografia em camada delgada

4.12. Avaliação do potencial toxigênico das cepas de *Fusarium* ssp.

A avaliação do potencial toxigênico das cepas de *Fusarium* ssp. foi realizada conforme metodologia descrita por Weibking et al. (WEIBKING et al., 1993). Fragmento de colônia de *Fusarium* ssp., obtido a partir do cultivo da cepa em ágar batata incubado por 7 dias a 25°C, foi inoculado em um frasco de vidro onde foram colocados 100 g de grãos de milho moídos com 100 mL de água. O frasco com o milho e a água foi autoclavado anteriormente por 30 minutos à temperatura de 121°C. Após 24 horas de inoculação o frasco foi agitado, para a dispersão do micélio no meio e depois a incubação ocorreu pelo período de 5 semanas à temperatura de 27°C. Após as 5 semanas o frasco foi autoclavado novamente e a análise do material foi realizada conforme foi apresentado no item 4.10.

4.13. Análise histopatológica em vísceras

Foram coletadas amostras de 4 órgãos (fígado, coração, rim e bursa de Fabrício), totalizando 48 amostras de cada órgão (3 repetições x 4 coletas x 4 granjas). As amostras foram fixadas em formol 10% e analisadas no Departamento de Patologia Veterinária – UNESP Jaboticabal. A intensidade das alterações encontradas

no exame histopatológico foram classificadas em: sem alteração, alteração leve e alteração severa, conforme o laudo passado pelo patologista.

4.14. Pesquisa de anticorpos contra vírus da Doença de Gumboro

Foram coletadas 400 amostras de sangue, 20 aves por granja x 5 períodos de coleta x 4 granjas por período.

As amostras de sangue foram coletadas no dia anterior ao abate das aves por punção da veia ulnar. O sangue foi colocado em tubos sem anticoagulante, enviados e processados no Instituto Biológico de Descalvado-SP.

A pesquisa de anticorpos humorais contra o vírus da Doença de Gumboro foi realizada através de um kit comercial de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), produzido pela empresa Idexx Laboratórios.

O kit comercial é composto por placas revestidas com antígeno contra IBD, controle positivo (anticorpos contra IBD de galinha, diluído e preservado com azida sódica), controle negativo (soro de galinha não reativo anti-IBD, preservado com azida sódica), conjugado de peroxidase de raiz forte, antianticorpo (anticorpo de cabra anti IgG de galinha) marcado com enzima peroxidase e preservado com gentamicina, tampão de diluente de amostra preservado com azida sódica, substrato cromogênio tetrametilbenzidina (TMB) e solução de interrupção.

O teste foi realizado da seguinte maneira:

- Os reagentes contidos nos Kits foram deixados fora da geladeira até atingirem a temperatura ambiente, em média 25°C.
- As amostras foram diluídas em proporção de 1:500 com diluente de amostra (1 µL de amostra com 500 µL de diluente).
- Em cada placa contendo 96 pocinhos revestidos com o antígeno da IBD, foram distribuídos 100 µL de controle negativo, sem serem diluídos nas cavidades A1 e A2 e 100 µL de controle positivo, sem serem diluídos nas cavidades A3 e A4. Nas 92 cavidades restantes A5 até H12, distribuíram-se as amostras previamente diluídas. As placas foram deixadas em repouso, durante 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas cada uma das cavidades com aproximadamente 350 µL de água destilada repetindo-se as lavagens 3 a 4 vezes. Após a lavagem das cavidades, foram distribuídos 100 µL de conjugado em cada cavidade das placas e, decorridos 30 minutos de repouso à temperatura ambiente, repetiu-se novamente a lavagem das cavidades. Após, foram distribuídos 100 µL de substrato TMB em cada cavidade,

aguardou-se 15 minutos e foram colocados em cada uma das cavidades 100 µL de solução de interrupção, para parar a reação.

As reações nas placas foram lidas em leitora microplate – 610 com 650nm de absorbância. Os resultados foram expressos em densidade óptica de acordo com a intensidade de cor das placas.

4.15. Análises micotoxicológicas de resíduos em músculo e vísceras

Foram coletadas amostras de 20 lotes de frangos no abatedouro da empresa integradora, no período de 1 ano. Para cada lote, foram colhidas 3 amostras de vísceras (fígado e moela) e 3 amostras de músculos (peito), onde cada amostra, com peso mínimo de 100 gramas, originou-se de 10 aves. As amostras foram congeladas (-20°C) para posterior análise. Aflatoxinas residuais (AFB1, AFG1, AFB2, AFG2, AFB2a, AFM1 e aflatoxicol) foram determinadas através de CLAE, de acordo com metodologia preconizada pela AOAC (SCOTT, 1990), com modificações incluindo a purificação dos extratos realizada em colunas de imunoafinidade (Neogen®), conforme esquema da Figura 21.

A separação e a quantificação das aflatoxinas foram conduzidas em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®), equipado com detector de fluorescência (excitação: 360 nm e emissão: 440 nm) e coluna Shim-pack CLC-ODS (5 µm) 4,6 x 250 mm, precedida de pré-coluna Shim-pack (5 µm) 4 x 10 mm. Injetou-se 20 µL da amostra filtrada (membrana filtrante PTFE, 0,45 µm, Millex, Millipore), utilizando-se, como fase móvel, metanol:água (45:55), com fluxo de 0,8-1,0 mL/min. A quantificação das aflatoxinas nas amostras será realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, obtidos nas amostras, na equação de regressão da curva de calibração.

Os padrões de aflatoxinas (SIGMA-ALDRICH) foram dissolvidos em solução de benzeno:acetonitrila (98:2) ou metanol, conforme o tipo, devendo ser calibrado espectrofotometricamente (λ = 300-350 nm) através da técnica preconizada por SCOTT (1990), para obtenção da concentração exata das toxinas. Após a calibração, foram transferidos 200 µL de cada padrão para um frasco, evaporado até a secar sob fluxo de nitrogênio e ressuspenso em volume conveniente de metanol grau CLAE, de maneira a obter uma solução de trabalho contendo aproximadamente 1,0 µg AF/mL. Estas soluções foram utilizadas no preparo dos padrões da curva de calibração (concentrações aproximadas de 0,01 µg/mL, 0,02 µg/mL, 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL de cada toxina), a ser construída através da injeção de 20 µL de cada solução padrão.

Figura 21. Sequência da metodologia para análise de resíduos de aflatoxinas, AOAC (SCOTT, 1990) modificado.

Resíduos de fumonisinas foram analisados por CLAE utilizando os procedimentos descritos conforme manual da coluna de imunoafinidade utilizada (VICAM®) com algumas alterações, conforme esquema da Figura 22.

Figura 22. Metodologia para análise de resíduos de fumonisinas segundo manual, com modificações, da coluna de imunoafinidade FumoniTest (VICAM®).

4.16. Análise dos Resultados

As análises estatísticas foram realizadas através do pacote estatístico SAS 9.1 (SAS, 2004), as análises que utilizaram o Teste Qui-Quadrado foram realizadas através do procedimento FREQ, para as análises com Teste de Correlação empregou-se o procedimento CORR. Nas análises com o Test-t de Student e análise de equação de regressão utilizou-se o procedimento GLM.

As contagens de fungos dos gêneros *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp. nas amostras de ração, farelo de soja e cama de frango sofreram transformação

logarítmica na base 10 ($\log_{10}$). A contaminação das amostras de milho foi avaliada pela porcentagem de grãos contaminados por *Aspergillus* ssp. ou *Fusarium* ssp. em relação ao número de grãos semeados (33 grãos). As amostras de milho, farelo de soja e ração (na fábrica e nas granjas) foram classificadas pela presença de *Aspergillus* ssp. ou *Fusarium* ssp., a avaliação da diferença entre a ocorrência destes 2 fungos dentro de cada tipo de amostra (milho, farelo de soja, ração fábrica, ração granja) foi avaliada utilizando o Teste Qui-Quadrado.

A atividade de água foi avaliada sob 2 aspectos, a diferença entre as médias em amostras positivas e negativas para *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp. nos diferentes tipos de amostra foi avaliada pelo Teste-t de Student. A medida de atividade de água foi correlacionada com as contagens de fungos totais ($\log$), *Aspergillus* ssp. ($\log$) e *Fusarium* ssp. ($\log$) através do Teste de Correlação para a determinação do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). Quando a probabilidade da correlação foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$) optou-se por calcular a equação de regressão linear.

Em relação às aflatoxinas e fumonisinas, as amostras foram classificadas pela detecção positiva ou negativa ao nível de $0,5 \mu\text{g/kg}$ de aflatoxina e $0,03 \mu\text{g/g}$ de fumonisina. A diferença na ocorrência dos tipos de aflatoxinas e fumonisinas foi avaliada em relação aos tipos de amostra (milho x farelo de soja e ração fábrica x ração granja) pelo Teste Qui-Quadrado.

Foram estudados 20 lotes de frangos, estes classificados em aflatoxina positivos e negativos e fumonisina $< 1,0 \mu\text{g/g}$ e $> 1,0 \mu\text{g/g}$. Os lotes positivos foram aqueles onde encontrou-se aflatoxinas acima do nível de detecção de $0,5 \mu\text{g/kg}$ em qualquer uma das rações coletadas, dos 20 lotes 12 lotes não apresentaram aflatoxinas e 8 apresentaram aflatoxina, para fumonisina os lotes foram classificados em dois grupos, um grupo onde a média das fumonisinas nas rações foi maior que $1,0 \mu\text{g/g}$ e outro onde a média das fumonisinas foi abaixo de $1,0 \mu\text{g/g}$, dos 20 lotes avaliados, 10 tiveram a média de fumonisinas acima de $1,0 \mu\text{g/g}$ e 10 apresentaram média inferior a $1,0 \mu\text{g/g}$. Os índices de produtividade e títulos de anticorpos contra o vírus da Doença de Gumboro foram estudados conforme a classificação da granja: aflatoxina positiva ou negativa e fumonisina $< 1,0 \mu\text{g/g}$ e fumonisina $> 1,0 \mu\text{g/g}$ pelo Teste-t de Student. Na análise de alterações histopatológicas a ocorrência de alterações entre os lotes aflatoxina negativos e positivos (nível de detecção de $0,5 \mu\text{g/kg}$) e fumonisina $< 1,0 \mu\text{g/g}$ e $> 1,0 \mu\text{g/g}$ foram realizados através do Teste Qui-Quadrado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ocorrência e contagem fúngica

O número e o percentual de amostras contaminadas com fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* estão apresentadas na Tabela 15. As frequências de *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp. em milho, do presente estudo, são semelhantes aos encontrados em outros trabalhos (BAUDURET, 1990; ASEVEDO et al., 1994), onde a ocorrência de *Aspergillus* ssp. é maior em relação aos fungos *Fusarium* ssp. em grãos armazenados, diferentemente quando se observa a incidência destes fungos em grãos recém-colhidos, onde o quadro se inverte e ocorre maior incidência de *Fusarium* ssp. e menor de *Aspergillus* ssp. (DILKIN et al., 2000; ORSI et al., 2000), isto se deve ao fato de os *Aspergillus* ssp. serem considerados fungos de armazenamento e os *Fusarium* ssp. de campo.

Todas as amostras de milho analisadas, neste estudo, estavam contaminadas com *Aspergillus* ssp.. Kpodo (2000) analisaram 15 amostras de milho oriundas de mercados e plantas de processamento de Gana, e encontraram 76,4% delas contaminadas com *Aspergillus* ssp..

Hirooka et al.(1996) obteve contaminação por *Fusarium verticillioides* em 85% das amostras de milho brasileiro analisadas.

Análises de milho no Kenya obtiveram 85,62% das amostras contaminadas por fungos do gênero *Fusarium* ssp. e 60,13%, do total analisado, tinha a presença de *Fusarium verticillioides* (KEDERA et al., 1999). Em estudo na Espanha, Sanchis et al. (1995) encontraram 88% (de 17 amostras) de milho destinado à produção de ração para frangos e 94% (de 18) da ração de frango contaminadas com *Fusarium* ssp., estas ocorrências foram maiores se comparadas às ocorrências encontradas no presente estudo, que foram de 52,94% das amostras contaminadas com *Fusarium* ssp. para milho e 23,40% para ração .

Acuña et al. (2005) analisaram amostras de matérias-primas utilizadas para a fabricação de ração animal e verificaram contaminação por *Fusarium* ssp. em 100% do milho e farelo de algodão e 80% do sorgo e soja analisados.

De maneira geral, pôde-se observar que nas amostras analisadas há maior ocorrência ($P<0,0001$) de fungos *Aspergillus* ssp. (65,48%) em relação aos fungos do gênero *Fusarium* ssp. (29,17%), as únicas amostras em que não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre a contaminação por *Aspergillus* ssp.e *Fusarium* ssp. foram as amostras de cama.

Tabela 15. Ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp. nas amostras.

amostra	n amostras	<i>Aspergillus</i> ssp.	<i>Fusarium</i> ssp.	P-valor ¹
milho	17	17 (100,00%)	9 (52,94%)	0,0027
farelo de soja	17	13 (76,47%)	7 (41,17%)	0,025
ração fábrica	47	36 (76,59%)	13 (27,65%)	<0,0001
ração granja	47	33 (70,21%)	9 (19,15%)	<0,0001
cama antes	20	8 (40,00%)	6 (30,00%)	1,000
cama depois	20	7 (35,00%)	5 (25,00%)	1,000
total	168	110(65,48%)	49 (29,17%)	<0,0001

¹P-valor do Teste Qui-Quadrado

As contagens de fungos estão apresentadas na Tabela 16. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) nas contagens de fungos totais ($\log_{10}$ UFC/g) entre as rações coletadas na fábrica e coletadas na granja, indicando que o ambiente das granjas proporcionou condições adequadas para a proliferação de fungos em geral, no entanto, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na contagem de *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp. isoladamente.

Os valores para contagem de fungos totais na ração foi de 5,23 $\log_{10}$ UFC/g, estão abaixo dos encontrados por Tabib et al. (1981), que analisaram a micobiota em rações de frango e encontraram valores de 6,08 a 6,70 $\log_{10}$ UFC/g de fungos totais.

As contagens na ração para *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp. foram de 3,47 e 1,11 $\log_{10}$ UFC/g, respectivamente. Em estudos de ração para frango na Argentina foram encontrados valores de contaminação de 3,97 $\log_{10}$ UFC/g para *Aspergillus flavus* e 3,00 $\log_{10}$ UFC/g para *Aspergillus parasiticus*, sendo que a contaminação com o gênero *Aspergillus* ssp. variou de 3,00 a 4,98 $\log_{10}$ UFC/g (MAGNOLI et al., 1998) e para *Fusarium verticillioides* 5,08 $\log_{10}$ UFC/g de ração (MAGNOLI et al., 1999), e Sanchis et al. (1995) encontraram contaminação por *Fusarium* ssp. em ração de frango variando de 4,48 a 4,67 $\log_{10}$ UFC/g.

Tabela 16. Médias e desvio padrão de contagem de fungos totais, *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp. e P-valor da diferença entre ração coletada na fábrica e nas granjas.

fungo	ração fábrica (n=47)	ração granja (n=47)	P-valor ¹
fungos totais ($\log_{10}$ UFC/g)	4,70 $\pm$ 0,917	5,78 $\pm$ 3,260	0,035
<i>Aspergillus</i> ssp. ($\log_{10}$ UFC/g)	3,16 $\pm$ 1,995	3,78 $\pm$ 2,049	0,164
<i>Fusarium</i> ssp. ($\log_{10}$ UFC/g)	1,23 $\pm$ 1,938	0,99 $\pm$ 1,895	0,568

¹P-valor do Teste-t de Student

O controle da atividade de água pode ser um aspecto interessante quando observa-se a positividade para *Aspergillus* ssp. para farelo de soja e rações (Tabela 17), já que a presença do fungo já é um perigo em potencial para a produção de aflatoxinas.

Houve diferença estatística ($P < 0,05$) somente na atividade de água de amostras positivas e negativas, para a presença de *Aspergillus* ssp., nas amostras coletadas na fábrica, onde as amostras positivas apresentaram menor atividade de água comparadas às amostras onde não foi observada a presença de *Aspergillus* ssp.. Este dado contraria várias pesquisas que afirmam que a atividade de água proporciona condições adequadas para o crescimento de *Aspergillus* ssp. (MAGAN & LACEY, 1984; MONTANI et al., 1988).

Nos outros substratos analisados (milho, farelo de soja e cama) não foi possível observar diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as amostras positivas e negativas.

Tabela 17. Médias de atividade de água e desvio padrão em amostras *Aspergillus* ssp. positivas e negativas.

amostra	n	Negativas	n	Positivas	P-valor ¹
milho	0	- ¹	17	0,61 ± 0,055	-
farelo de soja	4	0,67 ± 0,010	13	0,63 ± 0,034	0,06
ração fábrica	11	0,70 ± 0,037	36	0,67 ± 0,042	0,03
ração granja	14	0,72 ± 0,048	33	0,70 ± 0,044	0,16
cama antes	12	0,61 ± 0,067	8	0,58 ± 0,066	0,52
cama depois	13	0,89 ± 0,037	7	0,89 ± 0,035	0,60
total	54	0,71 ± 0,042	114	0,67 ± 0,057	0,0003

¹P-valor do Teste-t de Student

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) para amostras positivas e negativas em relação ao *Fusarium* ssp. (Tabela 18).

As atividades de água encontradas nos substratos estudados estão abaixo das atividades de água encontradas em literatura tidas como ideais para a proliferação de *Fusarium* ssp., a atividade de água mínima para *Fusarium* ssp. é de 0,87 (SANCHIS et al., 2006).

Naim et al. (1974) estudando isoflavonas do farelo de soja, observou que a presença de isoflavonas no meio de cultura inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum*, e concluíram que esta inibição era diretamente proporcional à presença de isoflavona livre no meio de cultura.

Tabela 18. Médias de atividade de água e desvio padrão em amostras *Fusarium* spp. positivas e negativas¹.

amostra	n	Negativas	n	Positivas	P-valor ²
milho	8	0,65 ± 0,033	9	0,64 ± 0,036	0,70
farelo de soja	10	0,58 ± 0,035	7	0,63 ± 0,062	0,09
ração fábrica	34	0,69 ± 0,045	13	0,68 ± 0,034	0,47
ração granja	38	0,71 ± 0,045	9	0,71 ± 0,050	0,83
cama antes	14	0,59 ± 0,132	6	0,61 ± 0,087	0,72
cama depois	15	0,88 ± 0,039	5	0,91 ± 0,009	0,12
total	119	0,68 ± 0,056	49	0,66 ± 0,054	0,08

¹ Amostras positivas são amostras onde foi possível verificar presença de *Fusarium* spp.

² P-valor do Teste-t de Student

Como a atividade de água é um dos fatores determinantes no crescimento fúngico, fez-se análise de correlação entre os dados de atividade de água e as contagens fúngicas (log) (Tabela 19). Não houve correlação entre as contagens de fungos totais (log), *Aspergillus* spp.(log) e *Fusarium* spp. (log) ($P > 0,05$) com a atividade de água no farelo de soja.

A baixa atividade de água pode inibir o crescimento do fungo, mas não significa que há a destruição de seus esporos. Segundo Teitell (1958) esporos de *A. flavus* podem germinar a 0,75 de atividade de água e 29°C sem que haja crescimento e seus esporos em atividade de água menor que 0,75 podem ficar em estado de dormência, mas continuam viáveis.

Baixa atividade de água ocasiona aumento no tempo da fase lag de crescimento, podendo durar vários meses, enquanto que em condições de alta atividade de água, maior que 0,98, a fase lag pode ser de algumas horas ou alguns dias (KOZAKIEWICZ & SMITH, 1994).

Apesar da atividade de água ser um dos fatores principais que afetam o crescimento de fungos (LEITÃO, 1988), existem outros fatores que como o pH e temperatura (MOSS, 1991) que afetam sua proliferação. Alguns fungos tem predileção por determinados substratos, os fungos do gênero *Fusarium* spp. são encontrados principalmente em cereais como o milho, trigo e cevada (MILLER, 1995) e fungos do gênero *Aspergillus* spp. são mais adaptados a diferentes substratos podendo ser encontrados numa gama maior de grãos, cereais e em outros alimentos. Há relatos de *Aspergillus* spp. em ração de frango (ROSA et al., 2006), milho e fubá (RIBEIRO et al., 2003), farinha de peixe (DUTTA & DAS, 2000), arroz (SALES & YOSHIZAWA, 2005), amendoim, aveia e centeio (ABRAMSON, 1998).

Rosa et al. (2006) observaram no estudo de micoflora de ração de frango que fungos *Aspergillus* spp. eram os que apresentaram maior contagem, seguidos por *Penicillium* spp. e em terceiro *Fusarium* spp., Magnoli et al. (1998) em estudo

semelhante também com ração para frango observaram que dos *Aspergillus* ssp. isolados, a maioria eram das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, que são espécies potenciais produtoras de aflatoxinas.

A atividade de água foi um fator que estimulou ($P < 0,05$) a multiplicação dos fungos totais e *Aspergillus* ssp. (Tabela 19). As equações encontradas foram: contagem de fungos totais (log) UFC/g = $-2,81594042 + 11,56703112 \times$ atividade de água ($R^2 = 0,05$) e contagem *Aspergillus* ssp. (log) = $-0,196959549 + 6,522346075 \times$ atividade de água ($R^2 = 0,06$).

Segundo Mirocha e Christensen (1974) os valores mínimos para crescimento de *A. flavus* em cereais amiláceos como o milho, sorgo e arroz de ser de 18% a 18,5% de umidade.

Tabela 19. Correlação de atividade de água, contagem de fungos totais, *Aspergillus* ssp. *Fusarium* ssp. nas rações.

		Contagem de fungos totais (log10 UFC/g)	<i>Aspergillus</i> ssp. (log10 UFC/g)	<i>Fusarium</i> ssp. (log10 UFC/g)
atividade de água	r^1	0,21783	0,25393	0,11412
	P-valor ²	0,04	0,04	0,62

¹r = coeficiente de correlação de Pearson

²P-valor do Teste de para correlação de Pearson

Marín et al. (1999) avaliaram a interação entre atividade de água e temperatura de incubação no crescimento de *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, observaram que quanto maior a temperatura e atividade de água maior o crescimento de massa fúngica e maiores as produções de fumonisinas.

5.2. Análises bromatológicas

Para as análises bromatológicas foram selecionadas 9 rações em duplicata, 9 coletadas na fábrica e as mesmas 9 coletadas nas granjas, totalizando 18 análises para cada variável estudada (matéria seca, matéria mineral, proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo e extrato não nitrogenado). A matéria seca está em relação à matéria “natural” e matéria mineral, proteína bruta, proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo e extrato não nitrogenado estão em relação ao conteúdo de matéria seca.

As médias dos dados referentes à composição bromatológica estão apresentadas na Tabela 20.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) pelo Teste-t de Student, entre a composição bromatológica das rações coletadas na fábrica e as rações coletadas nas granjas em nenhuma das variáveis estudadas.

O período de permanência das rações nas granjas variou de 1 a até 8 dias, e a média foi de 3,8 dias.

Tabela 20. Médias e desvio padrão da composição bromatológica de rações coletadas na fábrica e na granja.

variável	Fábrica (n=47)	Granja (n=47)	P-valor ¹
Matéria seca (%)	88,53 ± 0,453	87,87 ± 0,498	0,21
Matéria mineral (%) ²	4,20 ± 0,299	4,57 ± 0,430	0,29
Proteína bruta (%) ²	20,20 ± 0,712	20,36 ± 0,620	0,65
Fibra bruta (%) ²	3,12 ± 0,623	3,29 ± 0,246	0,97
Extrato etéreo (%) ²	9,09 ± 0,745	8,64 ± 0,626	0,41
Extrato não nitrogenado (%) ²	63,40 ± 1,115	63,15 ± 0,844	0,98

¹P-valor do Teste-t de Student

²Valores em relação a matéria seca

Valores de matéria seca não diferiram ($P>0,05$) entre as rações coletadas na fábrica e coletadas na granja, no entanto as contagens fúngicas foram diferentes estatisticamente ($P<0,05$) conforme Tabela 16. Segundo Sauer (1988), sempre que há crescimento fúngico há perda de matéria seca devido ao metabolismo do fungo que converte os nutrientes do substrato em dióxido de carbono, água e calor, mas neste trabalho não foi possível obter resultados semelhantes.

Marín (1999) estudando as perdas calóricas em substratos a base de milho, verificou que em decorrência do crescimento de *Fusarium* ssp., houve perdas de 30 a 60% da energia, em períodos de incubação que variaram de 2 a 4 semanas.

5.3. Aflatoxinas

A unidade de medida presente nos resultados e discussão para aflatoxinas está em µg/kg, onde, 1 µg/kg equivale a 1 ppb. O método de análise utilizado no presente trabalho foi avaliado previamente, através de ensaios de recuperação com amostras fortificadas com 5 e 50 µg/kg de AFB1. Os percentuais de recuperação e desvio padrão relativo foram de 89-95% e 2,3-4,2% (n=5), respectivamente (OLIVEIRA et al., 2008).

A distribuição dos níveis médios observados durante o período de coleta está apresentado na Figura 23. Ressalte-se que a distribuição das médias de aflatoxinas nas coletas acompanhou a distribuição das variáveis meteorológicas (Anexo 8.1)

Figura 23. Distribuição dos níveis médios de aflatoxinas totais ($\mu\text{g/kg}$) encontrados por período de coleta.

A frequência de amostras positivas para aflatoxinas estão apresentadas na Tabela 21. A ocorrência de amostras de milho positivas (valor de aflatoxina $> 0,5 \mu\text{g/kg}$) foi menor que a encontrada por Bauduret (1990) que encontrou 100% das amostras de milho contaminadas, com aflatoxinas entre < 1 e $170 \mu\text{g/kg}$. O maior valor encontrado no presente estudo foi de $115,33 \mu\text{g/kg}$, nível muito acima do limite permitido de $50 \mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas totais em ingredientes destinados à elaboração de rações (BRASIL, 1988). Níveis baixos de aflatoxinas em alimentos não devem ser subestimados, pois segundo Pier (1992) a intoxicação crônica com baixos níveis é a de mais difícil diagnóstico, é a que causa as maiores perdas econômicas e é a forma de intoxicação mais comum.

Tabela 21. Ocorrência de aflatoxinas nas amostras positivas¹.

amostra	n	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Aflatoxinas totais
milho	17	10 (58,82%)	4 (23,52%)	1 (5,88%)	0	11 (64,70%)
farelo de soja	17	1 (5,88%)	0	1 (5,88%)	0	1 (5,88%)
ração fábrica	47	6 (12,76%)	0	5 (10,64%)	0	10 (21,28%)
ração granja	47	6 (12,76%)	0	3 (6,38%)	0	8 (17,02%)
cama antes	20	0	0	0	0	0
cama depois	20	3 (15,00%)	0	3 (15,00%)	2 (10,00%)	3 (15,00%)
total	168	23 (17,99%)	4 (3,12%)	10 (7,81%)	0	30 (23,44%)

Nível de detecção do método = 0,5 µg/kg

¹ Amostras positivas → amostras com valores de aflatoxina >0,5 µg/kg

Os P-valores para a diferença de ocorrência de amostras positivas e negativas para aflatoxinas no milho e farelo de soja estão na (Tabela 22). Muitas amostras de farelo de soja contaminadas com *Aspergillus* ssp. não apresentam o mesmo grau de positividade para aflatoxinas. As identificações realizadas foram referentes ao gênero e não às espécies de *Aspergillus*, as aflatoxinas são produzidas somente por algumas espécies (WHO, 1979).

A média de atividade de água para o milho foi de 0,61, este valor é considerado baixo para que haja produção de aflatoxinas. Montani et al. (1988) observaram que a maior produção de aflatoxinas em milho ocorreu em atividade de água 0,90, mas detectou-se a produção de aflatoxina em atividade de água 0,87 em períodos de incubação considerados longos (acima de 14 dias).

Amostras contaminadas com o fungo produtor podem não apresentar, necessariamente, suas respectivas micotoxinas. A produção de aflatoxina por *Aspergillus* ssp. é dependente de vários fatores como: atividade de água do substrato, temperatura, disponibilidade de oxigênio (ELLIS et al., 1993) e cepa fúngica (HESSELTINE et al., 1966).

A atividade de água no farelo de soja foi 0,65, valor inferior ao estabelecido para produção de aflatoxinas em grãos de soja que é de no mínimo 0,86 (PINTO et al., 1991).

Não houve diferença pelo Teste Qui-Quadrado ($P > 0,05$) na ocorrência de positividade de AFB1 e AFG1 nas amostras de ração na granja e na fábrica.

Tabela 22. P-valores do Teste Qui-Quadrado para ocorrência de amostras positivas para aflatoxinas do milho e farelo de soja.

variável	milho	farelo de soja	P-valor ¹
	amostras positivas (%)		
AFB1	58,82%	5,88%	0,002
AFB2	23,52%	0%	0,10
AFG1	5,88%	5,88%	1,00
AFG2	0%	0%	1,00
Aflatoxinas totais	64,70%	5,88%	0,001

¹P-valor do Teste Q-quadrado

As amostras de ração aflatoxina positiva e negativa não apresentaram diferença estatística na atividade de água (Tabela 23).

Tabela 23. Médias e desvio padrão de atividade de água de amostras de rações positivas e negativas na análise de aflatoxinas¹

	aflatoxinas <0,5 µg/kg	aflatoxinas >0,5 µg/kg	P-valor ²
atividade de água	0,70 ± 0,040	0,68 ± 0,050	0,11

¹ Nível de detecção do método = 0,5 µg/kg

²P-valor do Teste-t de Student

As médias de aflatoxinas e atividade de água nas amostras estão apresentadas na Tabela 24. Pode-se observar altos níveis no milho, no entanto os níveis nas rações são bem menores, existe a possibilidade de ter ocorrido a diluição das aflatoxinas do milho, já que o milho representa cerca de 65% da composição da ração, este efeito também foi observado por Allameh et al. (2005), que utilizando milho com 1.000 µg/kg de AFB1 encontraram na ração 650 µg/kg.

Abalaka (1984) analisou amostras em fábricas de ração para frangos de corte localizadas na Nigéria e obteve níveis de até 781 µg/kg em milho e 101 µg/kg de aflatoxinas totais em milho e ração, respectivamente. Em Marrocos foram encontrados níveis de até 11,2 µg/kg de AFB1 em milho e 5,38 µg/kg de AFB1 em ração de frango (ZINEDINE et al., 2007).

Os níveis encontrados na ração variaram de 0,69-9,05 µg/kg e 0,57-14,66 µg/kg de aflatoxinas totais para ração coletada na fábrica e granja, respectivamente.

Na cama coletada no alojamento dos animais não foi encontrados níveis de aflatoxinas acima do limite de detecção do método (>0,05 µg/kg). No presente estudo foram encontradas nas camas, coletadas no dia anterior ao abate dos animais, nível de até 17,09 µg/kg, 88,46 µg/kg e de 107,14 µg/kg para AFB1, AFG1 e aflatoxinas totais respectivamente.

Cortés et al. (2010) conseguiram recuperação de 44% e 52% de AFB1 nas excretas, quando contaminaram a ração com 30 e 500 µg/kg de AFB1, respectivamente.

Tabela 24. Atividade água e níveis de aflatoxinas em amostras positivas¹

amostra	n amostras positivas	Atividade de água	AFB1 (µg/kg)	AFB2 (µg/kg)	AFG1 (µg/kg)	AFG2 (µg/kg)	aflatoxinas totais (µg/kg)
milho	11	0,61 ± 0,055	31,86 ± 34,622	0,78 ± 0,185	1,01	.	29,09 ± 34,421
farelo de soja	1	0,59	0,62	.	0,91	.	1,53
ração fábrica	10	0,68 ± 0,042	1,97 ± 1,320	.	3,36 ± 3,396	.	2,94 ± 3,099
ração granja	8	0,71 ± 0,045	3,39 ± 5,544	.	3,41 ± 3,359	.	3,82 ± 4,855
cama antes	0	.	.	.	.	.	.
cama depois	3	0,90 ± 0,010	9,60 ± 6,712		50,33 ± 33,81	1,07 ± 0,721	60,65 ± 41,31
total	30	0,65 ± 0,061	32,12 ± 92,453	0,78 ± 0,185	3,81 ± 3,627	1,07 ± 0,721	12,51 ± 23,041

Nível de detecção do método = 0,5 µg/kg

¹ Amostra positiva → amostra com valor de aflatoxina >0,5 µg/kg

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) nas variáveis analisadas entre a ração coletada na fábrica e na granja (Tabela 25).

Embora haja aumento nos níveis de aflatoxinas nas rações coletadas na fábrica e estas mesmas rações coletadas nas granjas, não foi possível observar diferença estatística entre ambas ($P>0,05$).

Jones et al. analisaram a matéria prima, a ração produzida na fábrica e, posteriormente, a mesma ração armazenada nos aviários e encontraram médias de contaminação de 1,2, 6,0 e 8,8 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas, respectivamente. Os autores observaram diferença entre as rações coletadas na fábrica e granjas produtoras, cujos maiores níveis encontrados nas rações foram 14,66 $\mu\text{g/kg}$ (ração coletada na granja) e 9,06 $\mu\text{g/kg}$ (ração coletada na fábrica).

Tabela 25. P-valores pelo Teste-t de Student para médias de atividade de água e aflatoxinas entre rações coletadas na fábrica e nas granjas.

variável	ração fábrica (n=47)	ração granja (n=47)	P-valor ¹
atividade de água	0,68	0,71	0,11
AFB1	1,97	3,39	0,55
AFG1	3,36	3,41	0,98
aflatoxinas totais	2,94	3,82	0,64

¹P-valor do Teste-t de Student

5.4. Fumonisinias

A unidade de medida presente nos resultados e discussão para aflatoxinas está em $\mu\text{g/g}$, onde, 1 $\mu\text{g/g}$ equivale a 1 ppm. O método de análise utilizado no presente trabalho foi avaliado previamente, através de ensaios de recuperação com amostras fortificadas com 50 e 200 $\mu\text{g/g}$ de FB1. Os percentuais de recuperação e desvio padrão relativo foram de 99-109% e 3,2-12,6% (n=5), respectivamente (TESSARI, 2004).

A distribuição dos níveis médios observados durante o período de coleta está apresentado na Figura 24. Da mesma maneira que as aflatoxinas, as fumonisinas tenderam a acompanhar o mesmo comportamento das variáveis meteorológicas (Anexo 8.1).

Figura 24. Distribuição dos níveis médios de fumonisinas totais ($\mu\text{g/g}$) encontrados por período de coleta.

A frequência de amostras positivas nos substratos estudados estão apresentados na Tabela 26. Todas as amostras de milho (17) foram positivas (acima de $0,03 \mu\text{g/g}$ de fumonisina).

A ocorrência de fumonisinas em 100% das amostras de milho analisado é coerente com os dados obtidos por Hirooka et al. (1996), os quais verificaram percentuais de contaminações de 100% e 97,4% do milho analisado com FB1 e FB2, respectivamente.

Em grãos de milho no Kenya de 197 amostras, 47% apresentaram positividade para a presença de FB1, cujos níveis variaram de $0,11$ a $12 \mu\text{g/g}$, com média de $0,67 \mu\text{g/g}$ (KEDERA; PLATTNER; DESJARDINS, 1999). Um estudo em Gana verificou 1 amostra de milho visivelmente mofado contendo $52 \mu\text{g/g}$, outras amostras variaram de $0,7$ a $4,2 \mu\text{g/g}$ (KPODO et al., 2000). Em amostras de milho na Índia 91% (de 100) foram positivas níveis de $0,1$ a $87 \mu\text{g/g}$ e em amostras de ração para frangos de corte 84% (de 50 amostras) foram positivas com níveis variando de $0,02$ a $28 \mu\text{g/g}$ (JINDAL et al., 1999).

Tabela 26. Frequência de fumonisinas nas amostras.

substrato	n	FB1	FB2	fumonisinias totais
milho	17	17 (100%)	16 (94,11%)	17 (100%)
farelo de soja	17	7 (41,18%)	3 (17,65%)	10 (58,83%)
ração fábrica	47	38 (80,85%)	35 (74,47%)	41 (87,23%)
ração granja	47	35 (78,72%)	35 (74,47%)	42 (89,36%)
cama antes	20	12 (60,00%)	1 (5,00%)	12 (60,00%)
cama depois	20	14 (70,00%)	11 (55,00%)	14 (70,00%)
total	168	123 (73,21%)	101 (60,12,00%)	136 (80,95%)

Nível de detecção do método = 0,03 µg/g

Os percentuais de contaminação por fumonisinas nas matérias-primas estão apresentados na Tabela 27. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) na contaminação por fumonisinas entre milho e farelo de soja, verificando a preferência do *Fusarium* ssp. por determinados substratos.

Segundo Figueira et al. (2003) o crescimento de *Fusarium* ssp. e consequente produção de fumonisinas ocorre antes mesmo da colheita dos grãos, o *Fusarium* ssp. é um fungo endofítico e parasita a planta do milho já nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Tabela 27. P-valores do Teste Qui-Quadrado para frequência de amostras positivas¹ para fumonisinas do milho e farelo de soja.

variável	milho	farelo de soja	P-valor ²
FB1	100%	41,18%	<0,001
FB2	94,11%	17,65%	<0,001
fumonisinias totais	100%	58,83%	0,007

¹ Nível de detecção do método = 0,03 µg/g

² P-valor do Teste-t de Student

Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) na atividade de água entre as amostras de ração positivas e negativas para fumonisina (Tabela 28).

Tabela 28. Médias e desvio padrão de atividade de água de amostras de rações fumonisina negativa e positiva¹

	fumonisinias <0,03 µg/g	fumonisinias >0,03 µg/g	P-valor ²
atividade de água	0,66 ± 0,019	0,70 ± 0,046	0,24

¹ Nível de detecção do método = 0,03 µg/g

² P-valor do Teste-t de Student.

As médias de fumonisinas e atividade de água nas amostras estão apresentadas na Tabela 29.

No presente estudo os níveis de fumonisinas totais encontrados no milho variaram de 0,13 a 5,16 µg/g de, no farelo de soja os níveis foram de 0,03 a 0,14 µg/g e na ração de 0,07 a 3,95 µg/g.

Em Santa Catarina/Brasil foram encontrados em milho níveis de até 18,74 µg/g de fumonisinas totais e média de 3,21 µg/g (FB1+FB2+FB3) (VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003). Oruc et al. (2006) analisaram amostras de milho e obtiveram níveis de até 262 µg/g e 356 µg/g para amostras oriundas dos Estados Unidos e Turquia, respectivamente.

Alberts et al. (1990) estudaram o crescimento de *Fusarium verticillioides* e a produção de FB1 em diferentes temperaturas em grãos de milho e observaram que a fumonisina começou a ser produzida pelo fungo 2 semanas após o início da inoculação à 20°C.

As concentrações de fumonisina nos grãos de milho aumentam de acordo com a maturidade dos grãos, a colheita antecipada do milho, com os grãos com acima de 25% de umidade é uma estratégia que pode reduzir o nível de contaminação por fumonisinas (BUSH et al., 2004).

Etcheverry et al. (2002) verificaram que antioxidantes como o BHT e o propilparabeno foram capazes, de inibir a produção de fumonisina e o crescimento de *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* em meio “maize meal agar”.

De acordo com Ross et al. (1992) níveis acima de 10 µg/g de FB1 em ração de equinos, estariam envolvidos com quadros de leucoencefalomalácia.

Além do perigo de intoxicação, a quantidade de fumonisinas no milho tem correlação negativa com a germinação do grão (DANIELSEN & JENSEN, 1998).

Em ração para frango Sanchis et al. (1995) determinaram níveis de fumonisinas até 2,2 µg/g de FB1 e 0,6 µg/g de FB2 e médias de 0,53 µg/g e 0,31 µg/g de FB1 e FB2 respectivamente, onde 100% (de 18) foram positivas para fumonisinas totais (FB1+FB2).

Kubena et al. (1997) observaram diminuição de consumo, ganho de peso e piora na conversão alimentar em perus de 21 dias alimentados com ração com 300 µg/g de FB1.

Broomhead et al. (2002) administraram 50 µg/g de FB1 em frangos de 1 aos 49 dias e não observaram diferença em ganho de peso, consumo ou conversão alimentar, mas a mesma quantidade quando administrada em perús observou-se piora na conversão alimentar. Estes dados sugerem que perús são mais sensíveis à intoxicação por fumonisina do que frangos de corte.

A absorção da fumisinina pelo trato gastrointestinal de frangos de corte é baixa, cerca de 1% e maior parte da fumonisina ingerida sai nas excretas (DERSJANT-LI et

al., 2003). Este fato pode justificar a obtenção de níveis maiores de fumonisinas totais encontrados na cama de frango analisada no presente estudo, cujos valores variaram de 0,03 a 2,26 µg/g.

Vudathala et al. (1994) administraram 2 mg de fumonisina radioativa em galinhas oralmente, e após 24 horas conseguiram recuperação de 94% nas excretas. Del Bianchi et al. (2005) determinaram que a excreção de fumonisinas nas excretas foi de 14,2% quando a ração continha somente fumonisina, e quando na ração foi administrada fumonisina conjuntamente com aflatoxina a excreção foi de 27,9%. Em ratos, Shephard et al. (1995) obtiveram 82% de recuperação de FB1 nas fezes, durante 3 dias após administração oral.

Tabela 29. Atividade água e níveis de fumonisinas em amostras positivas¹

n amostras positivas		Aw	FB1	FB2	fumonisinias totais
milho	17	0,61 ± 0,055	1,46 ± 1,05	0,65 ± 0,511	2,07 ± 1,555
farelo de soja	10	0,64 ± 0,042	0,06 ± 0,023	0,09 ± 0,050	0,07 ± 0,034
ração fábrica	41	0,69 ± 0,043	0,88 ± 0,611	0,39 ± 0,315	1,26 ± 0,888
ração granja	42	0,71 ± 0,044	0,90 ± 0,659	0,41 ± 0,40	1,31 ± 1,046
cama antes	12	0,57 ± 0,099	0,15 ± 0,281	0,41	0,18 ± 0,399
cama depois	14	0,91 ± 0,012	0,40 ± 0,224	0,31 ± 0,571	0,65 ± 0,553
total	136	0,69 ± 0,099	0,81 ± 0,735	0,42 ± 0,410	1,14 ± 1,1

¹ Nível de detecção do método = 0,03 µg/g

As médias de fumonisinas e atividade de água nas amostras estão apresentadas na Tabela 30. Não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre os níveis de fumonisinas das rações coletadas na fábrica e nas granjas, como ocorreu com as aflatoxinas.

Tabela 30. P-valores pelo Teste-t de Student para médias de fumonisinas entre rações coletadas na fábrica e nas granjas.

variável	ração fábrica (n=47)	ração granja (n=47)	P-valor ¹
FB1	0,88	0,90	0,87
FB2	0,39	0,41	0,74
fumonisinias totais	1,26	1,31	0,79

¹P-valor do Teste-t de Student

Um estudo sobre a interação entre aflatoxinas e fumonisinas demonstrou que animais intoxicados com 200 µg/g de FB1 não apresentaram alterações em peso relativo de órgãos, mas quando em combinação com 2.000 µg/kg de AFB1, foi possível observar efeito deletério no tamanho dos órgãos (MIAZZO et al., 2005).

Tessari et al. (2006) observaram que a combinação de aflatoxina e fumonisina na dieta foi mais deletéria ao sistema imune se comparada à aflatoxina e fumonisina administradas separadamente.

Verificou-se neste estudo 44,68% de amostras de ração e 76,47% das amostras de milho positivas tanto para aflatoxinas quanto para fumonisinas, valor maior que os dados de Kpodo et al. (2000) que verificaram a co-ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em 53% de 15 amostras de milho analisadas.

5.5. Avaliação do potencial toxigênico de cepas de *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp.

Para a pesquisa de potencial toxigênico foram utilizadas cepas de *Aspergillus* ssp. e *Fusarium* ssp. isoladas de amostras de milho, devido à importância desta matéria-prima na composição das rações de frango de corte e por ser um dos principais substratos, onde naturalmente, crescem os fungos avaliados neste estudo.

As frequências de cepas positivas para a produção de aflatoxinas estão apresentadas na Tabela 31.

Observou-se que das 14 cepas avaliadas 21,43% foram capazes de produzir aflatoxinas. Farias et al. (2000) avaliaram 109 cepas de *A. flavus* e 11 cepas de *A. parasiticus* isoladas de milho, das quais 67% e 100% foram produtoras de aflatoxina.

Tabela 31. Avaliação de potencial toxigênico para *Aspergillus* ssp. cepas positivas para a produção de aflatoxinas

número de cepas avaliadas	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
14	3(21,43%)	1(7,14%)	1(7,14%)	0(0%)

As frequências de cepas positivas para a produção de fumoninas estão apresentadas na Tabela 32.

No presente estudo todas as cepas avaliadas de *Fusarium* ssp. foram capazes de produzir fumonisina.

Acuña et al. (2005) estudaram o potencial toxigênico de diferentes espécies de *Fusarium* isolados de milho, e observaram que de 34 cepas de *F. verticillioides*, 12 cepas de *F. proliferatum* e 2 cepas de *F. subglutinans*, 97,1%, 91,7% e 0% foram produtores de fumonisinas.

Tabela 32. Avaliação de potencial toxigênico para *Fusarium* ssp. cepas positivas para a produção de fumonisinas

número de cepas avaliadas	FB1	FB2
10	10 (100%)	10(100%)

5.6. Índices de produtividade

A classificação dos lotes positivos e negativos deu-se pela presença de pelo menos uma razão positiva no lote avaliado, utilizando-se o nível de detecção do método de 0,5 µg/kg para aflatoxinas. Para aflatoxinas, dos 20 lotes estudados, encontrou-se 8 lotes positivos e 12 negativos.

Optou-se pela utilização dos índices de produtividade corrigidos, pois os animais foram abatidos com idades diferentes.

Os dados referentes aos índices de produtividade e os lotes aflatoxina positivos estão apresentados na Tabela 33.

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) nos índices de produtividade entre os lotes positivos e negativos para a presença de aflatoxina.

Allameh et al. (2005) observaram diminuição no ganho de peso e consumo, e conversão alimentar de 2,32 aos 42 dias de idade em frangos com 1.280 µg/kg de AFB1 na ração.

Os prejuízos causados pelas aflatoxicoses não dependem somente da detecção positiva nas rações, outros fatores são importantes como os níveis encontrados, Giambone et al. (1985) fizeram experimentos com rações contaminadas

com aflatoxina e concluíram que o nível seguro de consumo seria de até 66 µg/kg de AFB1.

Tabela 33. Médias dos índices de produtividade e desvio padrão nos lotes aflatoxina negativos e positivos¹.

variável	negativos	positivos	P-valor ²
n amostral	12	8	0,34
fator de produção corrigida	296,75 ± 31,807	305,75 ± 22,474	0,63
mortalidade(%)	5,63 ± 2,524	5,06 ± 1,737	0,44
ganho de peso médio diário (g)	57,74 ± 3,003	58,28 ± 2,448	0,68
conversão alimentar corrigida (g/g)	1,85 ± 0,115	1,81 ± 0,063	0,62

Nível de detecção do método = 0,5 µg/kg

¹ Amostra positiva → amostra com valor de aflatoxina >0,5 µg/kg

² P-valor do Teste-t de Student

Não houve correlação ($P>0,05$) entre os índices de produtividade e os níveis de AFB1 e aflatoxinas totais (Tabela 34). O nível máximo encontrado de AFB1 e aflatoxinas totais neste estudo foi de 14,66 µg/kg, segundo Derjant-li et al. (2003) haveria uma redução nos índices produtivos de 5% quando os frangos fossem intoxicados com nível de aflatoxina de 1.000 µg/kg.

Tabela 34. Correlação entre os níveis de aflatoxinas e os fatores de produção

		conversão alimentar corrigida (g/g)	fator de produção corrigida	mortalidade (%)
AFB1	r^1	-0,12	-0,05	-0,05
	P-valor ²	0,63	0,83	0,85
aflatoxinas totais	r^1	-0,14	-0,02	-0,15
	P-valor ²	0,54	0,94	0,54

¹ r = coeficiente de correlação de Pearson

² P-valor do Teste de para correlação de Pearson

A classificação dos lotes em relação às fumonisinas deu-se pelo nível médio encontrado nos lotes avaliados, lotes com valores médios de fumonisinas acima de 1 µg/g (>1 µg/g) foram analisados como sendo de um único grupo e foram comparados ao grupo de lotes com níveis médios de fumonisina abaixo de 1 µg/g (<1 µg/g).

Os dados referentes aos índices de produtividade entre os lotes >1 µg/g e <1 µg/g de fumonisina estão apresentados na Tabela 35.

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) nas variáveis estudadas entre os lotes que apresentaram valores médios de fumonisina maiores que <1 µg/g e os lotes que apresentaram valores médios >1 µg/g.

Tabela 35. Médias dos índices de produtividade e desvio padrão nos lotes fumonisinas >1 µg/g e <1 µg/g.

variável	lotes <1 µg/g	lotes >1 µg/g	P-valor ¹
n amostral	10	10	1,00
fator de produção corrigida	291,10 ± 34,122	309,6 ± 17,833	0,27
mortalidade(%)	4,72 ± 2,013	6,07 ± 2,291	0,22
ganho de peso médio diário (g)	56,78 ± 2,656	59,13 ± 2,389	0,06
conversão alimentar corrigida (g/g)	1,87 ± 0,119	1,79 ± 0,048	0,15

Nível de detecção do método = 0,03 µg/g

¹P-valor do Teste-t de Student

Segundo Dersjant et al. (2003) suínos são mais sensíveis à intoxicação por fumonisinas, a dose necessária para que haja 5% de diminuição na taxa de crescimento é de 21 µg/g de FB1, enquanto que para aves a dose seria de 251 µg/g de FB1 na dieta. O nível máximo encontrado nas rações, neste presente estudo foi de 3,95 µg/g de fumonisinas totais.

Ledoux et al (1992) observaram uma diminuição no ganho de peso de 4%, em frangos de corte intoxicados experimentalmente com 100 µg/g de FB1 dos 1 aos 21 dias de idade.

Os dados referentes à interação dos grupos negativos e positivos para aflatoxinas e fumonisina com níveis acima e abaixo de 1,0 µg/g estão apresentados na Tabela 36.

Não houve efeito da interação entre os grupos de aflatoxinas e fumonisinas nos índices de produtividade.

Existem interações de aflatoxinas com outras micotoxinas, sobretudo com fumonisinas, tendo sido observado efeito aditivo entre essas micotoxinas em frangos de corte alimentados com ração contendo 50 a 2.450 µg/g de AFB1 e 10 ng/g de FB1 (BIANCHI et al., 2005).

Tabela 36. Médias dos índices de produtividade e desvio padrão nos lotes de acordo com a negatividade ou positividade para aflatoxinas (>0,5ug/kg) e/ou fumonisinas (> 1,0ug/g).

		n	conversão alimentar corrigida (g/g)	fator de produção corrigida	mortalidade (%)
aflatoxina negativo	fumonisina <1 µg/g	7	1,89 ± 0,133	285,86 ± 36,325	4,62 ± 2,395
aflatoxina negativo	fumonisina >1 µg/g	5	1,79 ± 0,053	312,00 ± 17,450	7,03 ± 2,168
aflatoxina positivo	fumonisina <1 µg/g	3	1,83 ± 0,090	303,33 ± 30,989	4,96 ± 0,957
aflatoxina positivo	fumonisina >1 µg/g	5	1,80 ± 0,049	307,20 ± 19,917	5,11 ± 2,194
P-valor ¹					
Efeito aflatoxina positivo			0,62	0,63	0,44
Efeito nível fumonisina			0,15	0,27	0,22
interação			0,47	0,41	0,27

¹P-valor do Teste F

5.7. Histopatologia

Foram analisadas 48 amostras de 4 órgãos (fígado, coração, rim e bursa de Fabrícus).

Foram encontradas alterações microscópicas em fígado e rim, a frequência das alterações podem ser observadas na Figura 25. Não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos coletados, assim sendo, os fígados poderiam ser destinados à comercialização para consumo humano.

As alterações hepáticas encontradas foram: esteatose, proliferação de células dos ductos biliares e infiltrado inflamatório periportal, em rim encontrou-se degeneração tubular e observou-se atrofia anormal.

Figura 25. Frequência de alterações em exame histopatológico

Dados sobre a distribuição das alterações observadas em relação aos lotes aflatoxina negativos e positivos estão apresentados na Tabela 37. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) na frequência, de alterações nos órgãos avaliados, entre os lotes que apresentaram ou não aflatoxinas nas suas rações.

O fígado é um dos órgãos mais afetados em casos de aflatoxicose, acarretando em hepatite aguda, icterícia hemorragias (OSWEILER, 1990), há diminuição dos níveis séricos de nitrogênio uréico e quedas nos valores de hematócrito (ARAVIND et al., 2003). As primeiras alterações na aflatoxicose se dão pelo aumento de órgãos internos, evidenciando-se aumento no tamanho do fígado, baço e rins e diminuição em bursa e timo, o fígado torna-se friável e amarelado com elevada infiltração gordurosa (SOUZA, 2007).

Allameh et al. (2005) observaram alterações macroscópicas e microscópicas em fígados de frangos alimentados com rações contendo 1.200 µg/kg de AFB1 na dieta, as alterações microscópicas foram hiperplasia de ducto biliar e degeneração gordurosa.

Çelik et al. (2000) na administração de 2.500 µg/kg de AFB1 na dieta observaram depleção de células linfóides, em cortes histológicos de timo.

Ortatatli et al. (2005) observaram que a ocorrência de alterações histopatológicas em bursa de Fabrícus e rim não diferiu estatisticamente entre os grupos com animais alimentados com 100 µg/kg, 50 µg/kg ou 0 µg/kg de AFB1, mas em fígado, a frequência de animais com proliferação de ducto biliar e alterações moderadas foi maior no grupo alimentado com 100 µg/kg na ração.

Dietas para frangos de corte com 100 µg/g de FB1 causam atrofia cortical em timo, necrose hepática multifocal e hiperplasia biliar (LEDOUX et al., 1992).

Tabela 37. Ocorrência de alterações em órgãos de acordo com lotes aflatoxina positivos e negativos¹.

órgãos	intensidade de alteração	lotes aflatoxina		P-valor ²
		negativos	positvos	
fígado	sem alteração	16	11	0,18
	alteração leve	8	11	
	alteração severa	0	2	
coração	sem alteração	24	23	1,00
	alteração leve	0	1	
	alteração severa	0	0	
rim	sem alteração	20	21	0,68
	alteração leve	4	3	
	alteração severa	0	0	
bursa	sem alteração	21	18	0,20
	alteração leve	3	3	
	alteração severa	0	3	
total		96	96	

¹ Nível de detecção do método = 0,5 µg/kg

² P-valor do Teste Q-quadrado

Dados sobre a distribuição das alterações observadas em relação aos lotes $<1 \mu\text{g/g}$ e $>1 \mu\text{g/g}$ de fumonisina total estão apresentados na Tabela 38. Não houve diferença estatística ($P>0,05$) na frequência, de alterações nos órgãos avaliados, entre os lotes que apresentaram níveis médios acima ou abaixo de $<1 \mu\text{g/g}$ de fumonisina total nas suas rações.

Tabela 38 Ocorrência de alterações em órgãos de acordo com lotes fumonisinas $>1 \mu\text{g/g}$ e $<1 \mu\text{g/g}$.

órgãos	intensidade de alteração	lotes $<1 \mu\text{g/g}$	lotes $>1 \mu\text{g/g}$	P-valor ¹
fígado	sem alteração	9	18	1,00
	alteração leve	9	10	
	alteração severa	0	2	
coração	sem alteração	18	29	0,61
	alteração leve	0	1	
	alteração severa	0	0	
rim	sem alteração	16	25	0,60
	alteração leve	2	5	
	alteração severa	0	0	
bursa	sem alteração	14	25	0,13
	alteração leve	4	2	
	alteração severa	0	3	
total		72	120	

Nível de detecção do método = $0,03 \mu\text{g/g}$

¹P-valor do Teste Q-quadrado

Nos achados histopatológicos pode-se encontrar as alterações (Figura 26) ocorridas a nível hepático em comparação a um fígado normal (Figura 27).

Figura 26. Esteatose aumento 40x

Figura 27. Fígado normal aumento 40x

5.8. Pesquisa de anticorpos contra vírus da Doença de Gumboro

Os animais foram vacinados contra a Doença de Gumboro aos 14 dias de idade.

Os dados referentes aos títulos de anticorpos contra o vírus da Doença de Gumboro estão apresentados na Tabela 39.

Todas as amostras foram consideradas positivas em relação à presença de anticorpos contra a o vírus da Doença de Newcastle, de acordo com a densidade ótica das amostras em comparação às densidades óticas do controle positivo e negativo, partes integrantes do kit de ELISA.

Não foi possível observar diferença estatística ($P < 0,05$) nos títulos de anticorpos entre os lotes aflatoxina positivos e negativos e nos lotes com fumonisinas $< 1,0 \mu\text{g/g}$ ou $> 1,0 \mu\text{g/g}$ e a interação entre eles.

Cheng et al. (2006) administraram $15 \mu\text{g/g}$ de FB1 na dieta de frangos de corte e observaram que embora este nível não tenha sido capaz de alterar os índices produtivos, ele foi capaz de alterar parâmetros bioquímicos no sangue, diminuir a produção de interleucinas, a capacidade de fagocitose dos macrófagos e também os níveis de anticorpos contra a Doença de Newcastle.

Um dos efeitos mais importantes relativo às aflatoxicoses é a imunossupressão causada por depressão celular e humoral (GIAMBRONE et al., 1978), a imunossupressão seria decorrente da inibição da síntese da RNA polimerase pelas aflatoxinas o que resultaria, conseqüentemente, na inibição da síntese da imunoglobulinas (GIAMBRONE et al., 1985).

Azzam e Gabal (1998) observaram que galinhas alimentadas com ração contaminada com $200 \mu\text{g/kg}$ de AFB1, quando expostas ao vírus da Doença de Gumboro apresentaram menor nível de anticorpos em relação às galinhas não expostas à aflatoxina, mesmo quando vacinadas contra esta doença.

Pasha et al. (2007) verificaram que frangos alimentados com rações contaminadas com $100 \mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas, tiveram aos 42 dias, títulos de anticorpos contra Doença de Newcastle 61% menor em relação aos animais do grupo controle.

Li et al. (1999) administraram $200 \mu\text{g/g}$ de FB1 na ração e observaram que neste nível a fumonisina não afetou os índices produtivos (consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar), mas foi capaz de diminuir a resposta vacinal contra a Doença de Newcastle. Utilizando o mesmo nível de FB1, Tessari et al. (2006) observaram diminuição na contagem de leucócitos e linfócitos, células envolvidas com a resposta imunológica.

Tabela 39. Médias dos títulos de anticorpos contra o vírus da Doença de Gumboro e desvio padrão nos lotes de acordo com a negatividade ou positividade para aflatoxinas ($>0,5 \mu\text{g/kg}$) e/ou fumonisinas ($> 1,0 \mu\text{g/g}$).

		n	títulos de anticorpos		
aflatoxina negativo	fumonisina $<1 \mu\text{g/g}$	7	4709	$\pm$	1246
aflatoxina negativo	fumonisina $>1 \mu\text{g/g}$	5	3611	$\pm$	862
aflatoxina positivo	fumonisina $<1 \mu\text{g/g}$	3	5335	$\pm$	1068
aflatoxina positivo	fumonisina $>1 \mu\text{g/g}$	5	4478	$\pm$	92
P-valor					
Efeito aflatoxina positivo			0,16		
Efeito nível fumonisina			0,07		
interação			0,81		

¹P-valor do Teste F

5.9. Análises micotoxicológicas de resíduos em músculo e vísceras

A seleção das amostras de tecidos, em que foram realizadas as análises de resíduos, deu-se pelos níveis de aflatoxinas e fumonisinas encontrados nas rações. Para cada micotoxina foram analisados os tecidos (fígado, moela e músculo de peito) dos 7 lotes que apresentaram os maiores níveis de aflatoxinas ou fumonisinas, totalizando 42 amostras, 21 amostras analisadas para resíduos de aflatoxinas e 21 amostras para resíduos de fumonisinas.

5.9.1. Análises de resíduos de aflatoxinas em músculo e vísceras

Todas as amostras foram negativas à presença de resíduo de aflatoxinas ao nível de detecção de $0,05 \mu\text{g/kg}$.

Hussain et al. (2010) verificaram que frangos de corte com 28 dias de idade, alimentados pelo período de 7 dias com ração contaminada com $6.400 \mu\text{g/kg}$ de AFB1 apresentaram níveis de $3,48 \mu\text{g/kg}$ e $1,90 \mu\text{g/kg}$ de AFB1 em fígado e músculo, respectivamente e após 8 dias alimentando-se com ração não contaminada os níveis de AFB1 em fígado e músculos estavam abaixo do nível de detecção.

Zaghini et al. (2005) administrando $2.500 \mu\text{g/kg}$ de AFB1 na dieta de galinhas obtiveram resíduo de $4,13 \mu\text{g/kg}$ de AFB1 em fígado e não encontraram resíduo nos ovos.

5.9.2. Análises de resíduos de fumonisinas em músculo e vísceras

Foram analisadas 7 amostras de cada órgão (fígado, moela e músculo do peito) para resíduo de fumonisina, e em nenhuma foi observado nível acima do limite de detecção ($0,03 \mu\text{g/g}$).

Oliveira et al. (2005) alimentando frangos de corte com dieta contaminada com 10 µg/g de FB1 na ração, obtiveram resíduos em fígado que variaram de 0,013 a µg/g 0,051 µg/g.

Tardieu et al. (2008) obtiveram resíduos em fígado e rim em concentrações de 0,119 µg/g e 0,022 µg/g, respectivamente, utilizando ração com 10 µg/g de FB1 em perús, no entanto no mesmo estudo não foi possível detectar resíduos em músculo. Em estudo com patos Tardieu et al. (2009) observou que a alimentação de animais com 20 µg/g de FB1 foi capaz de gerar 0,020 µg/g de resíduo em fígado.

6. CONCLUSÕES

- a. Todas as amostras de milho analisadas no presente estudo apresentaram-se contaminadas por *Aspergillus* spp., enquanto que 52,9% apresentaram *Fusarium* spp., das cepas avaliadas 30% dos *Aspergillus* spp. foram produtores de aflatoxinas, enquanto 100% dos *Fusarium* spp. foram produtores de fumonisinas.
- b. A ocorrência de *Aspergillus* spp. nas rações, na fábrica ou na granja, foi predominante em relação ao *Fusarium* spp..
- c. Comparativamente aos demais alimentos analisados, o milho apresentou maior frequência de aflatoxinas (64,7%) e fumonisinas (100%). Dentre os demais ingredientes da ração, o farelo de soja apresentou as menores frequências para aflatoxinas (5,9%) e fumonisinas (58,8%) para fumonisinas.
- d. Em relação às aflatoxinas, foram quantificadas concentrações médias de 29,09 µg/kg no milho, contudo foi obtido um valor máximo de 115,33 µg/kg (acima do limite máximo recomendado pelo MAPA).
- e. Houve efeito de diluição das concentrações de aflatoxinas no milho, pela adição dos demais componentes na fabricação de ração.
- f. Para as fumonisinas, foram obtidas concentrações médias de 2,07 µg/g no milho, tendo como valor máximo encontrado 5,16 µg/g.
- g. Não foram encontrados níveis detectáveis (acima do limite de detecção do método analítico) nas amostras de músculos e vísceras analisadas.
- h. Nas condições encontradas no presente estudo, não foram observados efeitos significativos sobre a produtividade dos lotes de frangos da empresa integradora avaliada.
- i. Não foram constatadas lesões macroscópicas nos fígados, músculos e moelas, porém observou-se alterações histopatológicas em vísceras, compatíveis com as lesões descritas na literatura ocasionadas por aflatoxinas e fumonisinas.

7. REFERÊNCIAS

- ABALAKA, J.A. Aflatoxin distribution in edible oil-extracting plants and in poultry feedmills. **Food and Chemical Toxicology**, v.22, n.6, p.461-463. 1984. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6P-474X3F7-15/2/bc8be06cca63c2448ede53771cd8ebe1>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.
- ABIMILHO. -Associação Brasileira das Indústrias do Milho- MILHO - BRASIL - ESTIMATIVA DE CONSUMO POR SEGMENTO. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatistica4.htm>> Acesso em: 31 de maio de 2010.
- ABRAMSON, D. Mycotoxin formation and environmental factors. In: K. K. Sinha e D.Bhatnagar. **Mycotxin in Agriculture and Food Safety**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998. p.511
- ACUÑA, A.;LOZANO, M.C.;DE.GARCÍA, M.C.;DIAZ, G.J. Prevalence of *Fusarium* species of the Liseola section on selected Colombian animal feedstuffs and their ability to produce fumonisins. **Mycopathologia**, v.160, p.63-66. 2005.
- ADAMS, M.;MOTARJEMI, Y. WHO Basic Food Safety for Health Workers. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_SDE_PHE_FOS_99.1.pdf> Acesso em: 14 de junho de 2010.
- AKANDE, K.E.;ABUBAKAR, M.M.;ADEGBOLA, T.A.;BOGORO, S.E. Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.5, n.5, p.398-403. 2006.
- ALBERTS, J.F.;GELDERBLOM, W.C.A.;THIEL, P.G.;MARASAS, W.F.;VAN SCHALKWYK, D.J.;BEHREND, Y. Effects of Temperature and Incubation Period on Production of Fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p.1729-1733. 1990.
- ALLABOUTFEED.NET. Mycotoxin contamination of feed: Current global status. Disponível em: <<http://www.allaboutfeed.net/article-database/mycotoxin-contamination-of-feed-current-global-status-id1459.html>> Acesso em 18 de março de 2010.
- ALLAMEH, A.;SAFAMEHR, A.;MIRHADI, S.A.;SHIVAZAD, M.;RAZZAGHI-ABYANEH, M.;AFSHAR-NADERI, A. Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. **Animal Feed Science and Technology**, v.122, p.289-301. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T42-4G2BG89-2-3&_cdi=4962&_user=5674931&_pii=S0377840105001124&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=09%2F01%2F2005&_sk=998779996&wchp=dGLzVtb-zSkzk&md5=25dc1647f3be8715413aa0283d1699fa&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em 15 de novembro de 2010.
- ANDRIGUETTO, J.M.;PERY, L.;MINARDI, I.;GEMAEL, A.;FLEMMING, J.S.;SOUZA, G.A.D.;FILHO, A.B. Nutrição Animal. São Paulo-SP: Nobel 1982. 395 p.
- ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA **Resolução - RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> . Acesso em: 01 de outubro de 2006.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16. ed. Washington: AOAC. 1995

ARASIVO, O. A história da avicultura do Brasil. São Paulo: Gessuli Editores Ltda. 1989. 301 p.

ARAVIND, K.L.;PATIL, V.S.;DEVEGOWDA, G.;UMAKANTHA, B.;GANPULE, S.P. Efficacy of Esterified Glucomannan to Counteract Mycotoxicosis in Naturally Contaminated Feed on Performance and Serum Biochemical and Hematological Parameters in Broilers. **Poultry Science**, v.82, p.571-576. 2003.

ARX, J.A.V. The Genera of Fungi Sporulating in pure culture: Vaduz. 1974. 351 p.

ASEVEDO, I.G.;GAMBALE, W.;CORRÊA, B.;PAULA, C.R.;ALMEIDA, R.M.A.;SOUZA, V.M. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp isolated from stored maize. **Revista de Microbiologia**, v.25, p.46-50. 1994.

AZZAM, A.H.;GABAL, M.A. Aflatoxin and immunity in layer hens. **Avian Pathology**, v.27, n.6, p.570-577. 1998. Disponível em:<http://pdfserve.informaworld.com/236955_731553366_784700422.pdf>. Acesso em 17 de novembro de 2010.

BACK, A. Manual de doenças de aves. Cascavel-PR: Editora Coluna do Saber. 2004. 222 p.

BARTOV, I.;PASTER, N.;LISKER, N. The nutritional value of moldy grains for broiler chicks. **Poultry Science**, v.61, n.11, p.2247-2254. 1982.

BAUDURET, P. A mycological and bacteriological survey on feed ingredients and mixed poultry feeds in Reunion Island. **Mycopathologia**, v.109, p.157-164. 1990.

BENÍTEZ, J. Manejo integrado de micotoxinas utilizando el concepto análisis de peligro y puntos de control críticos. **Revista Indústria Avícola**, v.2, p.24-30. 2002.

BERJAK, P. Report of seed storage committee working group on the effects of storage fungi on seed viability 1980-1983. **Seed Science and Technology**, v.12, p.233-253. 1984.

BERTRAND, J.P.;LAURENT, C.;LECLERCQ, V. O Mundo da Soja. São Paulo - SP: Editora da Universidade de São Paulo, Hucitec/Edusp. 1987. 139 p.

BEZUIDENHOUT, S.C.;GELDERBLOM, W.C.A.;GORST-ALLMAN, C.P.;HORAK, R.M.;MARASAS, W.F.;SPITELLER, G.;VLEGGAR, R. Structure Elucidation of the Fumonisin, Mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.**, n.11, p.743-745. 1988.
<http://www.rsc.org/Publishing/Journals/C3/article.asp?Journal=C369&VolumeYear=19880&Volume=0&JournalCode=C3&MasterJournalCode=C3&SubYear=1988&type=Issue&Issue=11&x=12&y=8>

BHAT, R.;RAI, R.V.;KARIM, A.A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, n.1, p.57-81. 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>>. Acesso em 17 de novembro de 2010.

BIANCHI, M.D.; OLIVEIRA, C.A.F.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J.L.; CORREA, B. Effects of Prolonged Oral Administration of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v.84, p.1835-1840. 2005.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v.50, p.1058-1073. 1987.

BORGES, L.R.; PIMENTEL, I.C.; BEUX, M.R.; TALAMINI, A. Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.20, n.1, p.103-110. 2004. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/viewFile/1139/940>> Acesso em: 09 de junho de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 845, DE 08 DE NOVEMBRO DE 1976 - Aprova as especificações para a padronização, classificação e comercialização interna do milho. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1133>> Acesso 31 de maio de 2010.

BRASIL- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n.07, de 9 de novembro de 1988. Baixa os padrões mínimos de matéria-prima destinada à alimentação animal. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/dfpa/html/port07.htm>>. Acesso em 03 de outubro de 2006.

BROOMHEAD, J.N.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS, G.E. Chronic Effects of Fumonisin B1 in Broilers and Turkeys Fed Dietary Treatments to Market Age. **Poultry Science**, v.81, p.56-61. 2002.

BULLERMAN, L.B.; BIANCHINI, A.; HANNA, M.A.; JACKSON, L.S.; JABLONSKI, J.; RYU, D. Reduction of Fumonisin B1 in Corn Grits by Single-Screw Extrusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.7, p.2400-2405. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf0729513>>. Acesso em 15 de outubro de 2009.

BURTON, G.R.W.; ENGELKIRK, P.G. Microbiologia: para as ciências da saúde. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan. 2005. 426 p.

BUSH, B.J.; CARSON, M.L.; CUBETA, M.A.; HAGLER, W.M.; PAYNE, G.A. Infection and Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* in Developing Maize Kernels. **Phytopathology**, v.94, n.1, p.88-93. 2004.

CAMERON, E.A.; FRENCH, E.B. St. Anthony's Fire Rekindled: Gangrene Due to Therapeutic Dose of Ergotamine. **British Medical Journal**, v.2, n.5191, p.28-30. 1960. Disponível em: <<http://www.bmj.com/cgi/reprint/2/5191/28?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMA T=1&author1=EA+Cameron&author2=EB+French+&andorexactitle=and&andorexactitleabs=and&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=date&fdate=1/1/1959&tdate=6/30/1961&resourcetype=HWCIT>>. Acesso em: 14 de junho de 2010.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. . Campinas - SP: Fundação Cargill. 1988

CASTELO, M.M.;SUMNER, S.S.;BULLERMAN, L.B. Stability of Fumonisin in Thermally Processed Corn Products. **Journal of Food Protection**, v.61, p.1030-1033. 1998. Disponível em:<<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1998/00000061/00000008/art00018>>. Acesso em 17 de novembro de 2010.

ÇELİK, I.;OGUZ, H.;DEMET, O.;DONMEZ1, H.H.;BOYDAK, M.;SUR, E. Efficacy of polyvinylpyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. **British Poultry Science**, v.41, p.430-439. 2000.

CHANG, H.-S. Overview of the World Broiler Industry: Implications for the Philippines. **Asian Journal of Agriculture and Development**, v.4, n.2, p.67-82. 2007.

CHENG, Y.-H.;DING, S.-T.;CHANG, M.-H. Effect of fumonisins on macrophage immune functions and gene expression of cytokines in broilers. **Archives of Animal Nutrition**, v.60, n.4, p.267-276. 2006.

CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v.259, n.3-4, p.291. 1991. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B73FB-47RTB96-2F/2/7a3f523eff57c9aa3213caf6f186da71>>. Acesso em 21 de setembro de 2009.

CIRILLO, T.;RITIENI, A.;GALVANO, F.;COCCHIERI, R.A. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.6, p.566. 2003. Disponível em:<<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=g713811253~db=all>>. Acesso em 22 de junho de 2007.

COELHO, A.A.D.;SAVINO, J.M.;ROSÁRIO, M.F. Frango Feliz - Caminhos para avicultura alternativa. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários " Luiz de Queiroz" - FEALQ. 2008. 88 p.

COLTHERD, J.B. THE DOMESTIC FOWL IN ANCIENT EGYPT. **Ibis: The International Journal of Avian Science** v.108, n.2, p.217-223. 1966. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-919X.1966.tb07268.x>>. Acesso em 21 de junho de 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. Sétimo Levantamento Abril/2010. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/07_levantamento_abr2010.pdf> Acesso em: 31 de maio de 2010.

CORTÉS, G.;CARVAJAL, M.;MENDEZ-RAMIREZ, I.;AVILA-GONZALEZ, E.;CHILPA-GALVAN, N.;CASTILLO-URUETA, P.;FLORES, C.M. Identification and quantification of aflatoxins and aflatoxinol from poultry feed and their recovery in poultry litter. **Poultry Science**, v.89, n.5, p.993-1001. 2010. Disponível em: <<http://ps.fass.org/cgi/content/abstract/89/5/993>>. Acesso em 27 de julho de 2010.

COULOMBE, R.A., JR. Biological Action of Mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.3, p.880-891. 1993. Disponível em: <<http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/76/3/880>>. Acesso em 20 de julho de 2010.

CREPPY, E.E.;CHIARAPPA, P.;BAUDRIMONT, I.;BORRACCI, P.;MOUKHA, S.;CARRATÚ, M.R. Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro

cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? **Toxicology**, v.201, n.1-3, p.115. 2004. Disponível

em:<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_tokey=%23TOC%235175%232004%23997989998%23513432%23FLA%23&_cdi=5175&_pubType=J&view=c&_auth=y&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=729d48d6c3f481c9dd23774e08644291>. Acesso em 22 de junho de 2007.

DANIELSEN, S.;JENSEN, D.F. Relationships between seed germination, fumonisin content, and *Fusarium verticillioides* infection in selected maize samples from different regions of Costa Rica. **Plant Pathology**, v.47, p.609-614. 1998.

DE COSTA, C. St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine. **The Lancet**, v.359, n.9319, p.1768-1770. 2002. Disponível

em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T1B-45Y4J33-13/2/ea2a7eaa22e0232eae9216ec2e4c762>>. Acesso em: 14 de junho de 2010.

DEL BIANCHI, M.;OLIVEIRA, C.A.;ALBUQUERQUE, R.;GUERRA, J.L.;CORREA, B. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in broiler chickens. **Poultry Science**, v.84, n.12, p.1835-1840. 2005. Disponível em: <<http://ps.fass.org/cgi/content/abstract/84/12/1835>>. Acesso em: 15 de junho de 2010.

DEMAIN, A.L.;VELASCO, J.;ADRIO, J.L. Industrial mycology: past, present and future. In: Z. An. **Handbook of Industrial Mycology**. New York: Marcel Dekker, v.22, 2005. p.763

DERSJANT-LI, Y.;VERSTEGEN, M.W.A.;GERRITS, W.J.J. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. **Nutrition Research Reviews**, v.16, n.2, p.223-239. 2003. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayFulltext?type=1&pdfType=1&fid=635248&jid=NRR&volumeld=16&issueld=&aid=607816>>. Acesso em 03 de outubro de 2006.

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

DILKIN, P.;MALLMANN, C.A.;SANTURIO, J.M.;HICKMANN, J.L. Classificação Macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. v.30, p.137-141. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782000000100022&nrm=iso>. Acesso em 02 de fevereiro de 2010.

DUTTA, T.K.;DAS, P. Isolation of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* and detection of aflatoxin B1 from feeds in India. **Mycopathologia**, v.151, p.29-33. 2000.

EATON, D.L.;GALLAGHER, E.P. Mechanisms of Aflatoxin Carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.34, n.1, p.135-172. 1994. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pa.34.040194.001031>>. Acesso em 16 de novembro de 2010.

ELLIS, W.O.;SMITH, J.P.;SIMPSON, B.K.;OLDHAM, J.H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** v.30, n.4, p.403-39. 1991.

ELLIS, W.O.;SMITH, J.P.;SIMPSON, B.K.;RAMASWAMY, H. Effect of inoculum level on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. **Food Microbiology**, v.10, p.525-535. 1993.

EMBRAPA. Introdução e Importância econômica do Milho. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>> Acesso em 31 de maio de 2010.

EMBRAPA. Soja. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=112&cod_pai=33>. Acesso em 31 de maio de 2010.

ENGLERT, S.I. Avicultura: Tudo Sobre Raças, Manejo e Alimentação. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária. 1998. 238 p.

ESPOSITO, E.;AZEVEDO, J.L.D. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul. 2004. 510 p.

ETCHEVERRY, M.;TORRES, A.;RAMIREZ, M.L.;CHULZE, S.;MAGAN, N. In vitro control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.624-632. 2002.

FABBRI, A.A.;PANFILI, G.;FANELLI, C.;VISCINTI, A. Effect of T-2 toxin on aflatoxin production. **Transactions of the British Mycological Society**, v.83, n.1, p.150-152. 1984. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B985G-4VJ0WYY-K/2/f89890180871daacd04212e911b21387>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

FARIAS, A.X.D.;ROBBS, C.F.;BITTENCOURT, A.M.;ANDERSEN, P.M.;CORRÊA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.3, p.617-621. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v35n3/v35n3a18.pdf>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

FIGUEIRA, E.L.Z.;COELHO, A.R.;ONO, E.Y.S.;HIROOKA, E.Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.2, p.359-378. 2003. http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina_24_2_19_22.pdf.

FIORENTIN, L. As micotoxinas e a produção de suínos. **Suinocultura Dinâmica-Periódico técnico-informativo elaborado pela EMBRAPA-CNPSA**, v.10. 1993. Disponível em: <<http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/suino/suidin/sudi010.pdf>>. Acesso em 17 de novembro de 2010.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A. 2002. 424 p.

GALVANO, F.;GALOFARO, V.;GALVANO, G. Occurrence and Stability of Aflatoxin M1 in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. **Journal of Food Protection**, v.59, n.10, p.1079-1090. 1996. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1996/00000059/00000010/art00011>>. Acesso em: 09 de junho de 2010.

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

GIAMBRONE, J.J.;EWERT, D.L.;WYATT, R.D.;EIDSON, C.S.;. Effect of aflatoxin on the humoral and cell-mediated immune systems of the chicken. **American Journal of Veterinary Research**, v.39, p.305-308. 1978.

GOLDBLATT, L.A. Implications of Mycotoxins. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v.5, n.4, p.453 - 464. 1972. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/10.3109/15563657208991026>>. Acesso em 13 de setembro de 2010.

GOMPERTZ , O.F.;GAMBALE , W.;PAULA , C.R.;CORRÊA, B. Características gerais dos fungos. In: L. R. Trabulsi e F. Alterthum **Microbiologia**. São Paulo - SP: Atheneu, 2008. p.760

GONÇALEZ, E.;PINTO, M.M.;FELICIO, J.D. Análise de Micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, v.63, n.1/2, p.15-19. 2001.

GOODMAN, M.M. História e origem do milho. In: E. Paterniani **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Piracicaba: Fundação Cargill - ESALQ, 1980. p.1-31

GRIZZLE, J.M.;KERSTEN, D.B.;MCCRACKEN, M.D.;HOUSTON, A.E.;SAXTON, A.M. Determination of the Acute 50% Lethal Dose T-2 Toxin in Adult Bobwhite Quail: Additional Studies on the Effect of T-2 Mycotoxin on Blood Chemistry and the Morphology of Internal Organs. **Avian Diseases**, v.48, n.2, p.392-399. 2004. Disponível em:<<http://www.jstor.org/stable/1593289>>. Acesso em 02 de novembro de 2010.

HARRIS, T.M.;STONE, M.P.;GOPALAKRISHNAN, S.;BAERTSCHI, S.W.;RANEY, K.D.;BYRD, S. Aflatoxin B1-epoxide, the ultimate carcinogenic form of aflatoxin B1: synthesis and reaction with DNA. **Journal of Toxicology and Toxin Review**, v.8, p.111-120. 1989.

HARRISON, L.R.;COLVIN, B.M.;GREENE, J.T.;NEWMAN, L.E.;COLE, J.R., JR. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.2, n.3, p.217-221. 1990. Disponível em:<<http://jvdi.org/cgi/content/abstract/2/3/217>>. Acesso em 16 de novembro de 2010.

HASCHEK, W.M.;VOSS, K.A.;BEASLEY, V.R.;WANDA, M.H.;COLIN, G.R.;MATTHEW, A.W. Selected Mycotoxins Affecting Animal and Human Health. In. **Handbook of Toxicologic Pathology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2002. p.645. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B84CX-4NT468F-1H/2/a6d7caedf24c1952f33dea9313c5beec>>. Acesso em 16 de novembro de 2010.

HASSE, G. O Brasil da Soja - Abrindo fronteiras, semeando cidades. Porto Alegre - RS: L&PM Editores S.A. 1996. 256 p.

HENRY, M.H.;WYATT, R.D. A Review of Fumonisin Production by *Fusarium moniliforme* and Fumonisin Toxicosis in Animals. **Journal of Applied Poultry Research**, v.2, n.2, p.188-192. 1993. Disponível em:<<http://japr.fass.org/cgi/content/abstract/2/2/188>>. Acesso em 20 de novembro de 2009.

HESELTIME, C.W.;SHOTWELL, L.;ELLIS, J.J.;STUBBLEFIELD, R.D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Bacteriological Reviews**, v.30, n.4, p.795-805. 1966.

HIROOKA, E.Y.;YAMAGUCHI, M.M.;AOYAMA, S.;SUGIURA, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives & Contaminants**, v.13, n.2. 1996. Disponível em:<http://pdfserve.informaworld.com/998152_731408342_907633707.pdf>. Acesso em 11 de novembro de 2010.

HUFF, W.E.;DOERR, J.A.;HAMILTON, P.B.;VESONDER, R.F. Acute toxicity of vomitoxin (deoxynivalenol) in broiler chickens. **Poultry Science**, v.60, p.1412-1414. 1981.

HUSSAIN, Z.;KHAN, M.Z.;KHAN, A.;JAVED, I.;SALEEMI, M.K.;MAHMOOD, S.;ASI, M.R. Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.12, p.3304-3307. 2010. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6P-50TRXBM-9/2/a50965b1f51a2bdac4c409cb4fa65889>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

HUSSEIN, H.S.;BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCN-4417FSK-1/2/aba3a984feb3cee75f20d487d7486231>>. Acesso em: 08 de junho de 2010.

IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins**. Lyon, v.56. 1993. 489-521 p.

IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene**. Lyon, v.82. 2002. 301-366 p.

JAIMEZ, J.;FENTE, C.A.;VAZQUEZ, B.I.;FRANCO, C.M.;CEPEDA, A.;MAHUZIER, G.;PROGNON, P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.882, n.1-2, p.1. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG8-40F1PGM-1/2/4539d406edaae4b48f16bf94a2e1480c>> Acesso em 17 de abril de 2007.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre-RS: Artmed. 2005. 711 p.

JINDAL, N.;MAHIPAL, S.K.;ROTTINGHAUS, G.E. Occurrence of fumonisin B1 in maize and poultry feeds in Haryana, India. **Mycopathologia**, v.148, p.37-40. 1999.

KANISAWA, M.;SUZUKI, S.;KOZUKA, Y.;YAMAZAKI, M. Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats. I. Acute oral toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.42, n.1, p.55-64. 1977. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WXH-4DDNM5N-9C/2/4c7505706e67c6870e56f3e72dbfc20e>>. Acesso em 02 de novembro de 2010.

KAREL, M.;LUND, D.B. Water Activity and Food Preservation. In: M. Karel e D. B. Lund. **Physical Principles of Food Preservation**: CRC Press, v.null, 2003. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1201/9780203911792.ch5>>. Acesso em 17 de novembro de 2010.

KEDERA, C.J.;PLATTNER, R.D.;DESJARDINS, A.E. Incidence of *Fusarium* spp. and Levels of Fumonisin B1 in Maize in Western Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.41-44. 1999.

KOZAKIEWICZ, Z.;SMITH, D. Physiology of *Aspergillus*. In: J. E. Smith. **Biotechnology Handbooks 7 - Aspergillus**. New York: Plenum Press, 1994. p.23-40

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

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

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 Poults. **Poultry Science**, v.76, p.256-264. 1997.

LACEY, J.;MAGAN, N. Fungi in cereal grains: Their occurrence and water and temperature relationships. In: J. Chelkowski. **Cereal Grain Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.77-118.

LACEY, J.;RAMAKRISHNA, N.;HAMER, A.;MAGAN, N.;MARFLEET, C. Grain fungi. In: D. K. M. Arora, K. G.; Marth, E. H. **Handbook of applied mycology: foods and feeds**. New York: Marcel Dekker, v.3, 1991. p.121-177

LEDOUX, D.R.;BROWN, T.P.;WEIBKING, T.S.;ROTTINGHAUS, G.E. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, n.3, p.330-333. 1992. Disponível em: <<http://jvdi.org/cgi/content/abstract/4/3/330>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

LEESON, S., DIAZ, G. ;SUMMERS, J.D. Aflatoxins. In: S. : Leeson, J. D. G. Gonzala, et al. **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**. Ontario-Canada: Guelph, 1995. p.249-298

LEESON, S.;SUMMERS, J.D. **Commercial Poultry Nutrition**. Guelph-Ontario: University Books. 1997. 355 p.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de alimentos. In: I. Roitman, L. R. Travassos, et al. **Tratado de microbiologia**. São Paulo-SP: Manole, 1988. p.1-81

LEXTEC. Disponível em: <http://www.instituto-camoes.pt/lextec/por/domain_1/definicion/20734.html>. Acesso em 10 de setembro de 2010.

LI, Y.C.;LEDOUX, D.R.;BERMUDEZ, A.J.;FRITSCHKE, K.L.;ROTTINGHAUS, G.E. Effects of Fumonisin B1 on Selected Immune Responses in Broiler Chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1275-1282. 1999.

LIN, M.T.;DIANESE, J.C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin producing by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v.66, n.12, p.1466-1469. 1976.

LINO, C.M.;SILVA, L.J.G.;PENA, A.S. Metodologias Analíticas para Determinação das Fumonisinas em Milho e Alimentos à Base de Milho. **Química Nova**, v.29, n.2, p.293-299. 2006.

LOGRIECO, A.;MULÈ, G.;MORETTI, A.;BOTTALICO, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.597-609. 2002.

MAGAN, N.;LACEY, J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.82, n.1, p.83-93. 1984. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B985G-4VHJHYV-9/2/baf645ddb829cd8542ceec1e7f1df5>>. Acesso em 04 de novembro de 2010.

MAGNOLI, C.;DALCERO, A.M.;CHIAACCHIERA, S.M.;MIAZZO, R.;SAENZ, M.A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v.142, p.27-32. 1998.

MAGNOLI, C.E.;SAENZ, M.A.;CHIAACCHIERA, S.M.;DALCERO, A.M. Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v.145, p.35-41. 1999.

MALAVAZZI, G. **Avicultura: Manual Prático** São Paulo: Editora Nobel. 1983. 156 p.

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

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em 29 de maio de 2010.

MARÍN, S.;HOMEDES, V.;SANCHIS, V.;RAMOS, A.J.;MAGAN, N. Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. **Journal of Stored Products Research**, v.35, p.15-26. 1999.

MARIN, S.;SANCHIS, V.;RULL, F.;RAMOS, A.J.;MAGAN, N. Colonization of Maize Grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the Presence of Competing Fungi and Their Impact on Fumonisin Production. **Journal of Food Protection**, v.61, p.1489-1496. 1998. Disponível em:<<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1998/00000061/00000011/art00012>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

MARTINS, M.K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium ssp* e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 124 f. -Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005

MCMAHON, B.J. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. **Hepatology** v.49, n.S5, p.S45-S55. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/hep.22898>>. Acesso em: 20 de julho de 2010.

MENEGAZZO, R. Qualidade de Rações para Zootécnicos. In: V. M. Scussel, M. Rocha, et al. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenamento de Grãos II**. Florianópolis - SC: ABMAG, 2008. p.557-561

MIAZZO, R.;PERALTA, M.F.;MAGNOLI, C.;SALVANO, M.;FERRERO, S.;CHIAACCHIERA, S.M.;CARVALHO, E.C.Q.;ROSA, C.A.R.;DALCERO, A. Efficacy of Sodium Bentonite as a Detoxifier of Broiler Feed Contaminated with Aflatoxin and Fumonisin. **Poultry Science**, v.84, p.1-8. 2005.

MILLER, J.D. Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research. **Journal of Stored Products Research** v.31, n.1, p.1-16. 1995. Disponível em:<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_tokey=%23TOC%235099%231995%23999689998%23163598%23FLP%23&_cdi=5099&_pubType=J&view=c&_auth=y&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=834ffcd41b7f0b1ce3c98ded08cb2ae8>. Acesso em 26 de abril de 2008.

MINAMI, L.;MEIRELLES, P.G.;HIROOKA, E.Y.;ONO, E.Y.S. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25, n.3, p.207-224. 2004.

MIROCHA, C.J.;CHRISTENSEN, C.M. Annual Review of Phytopathology. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p.303-330. 1974. Disponível em:<<http://arjournals.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.py.12.090174.001511?cookieSet=1>>. Acesso em 14 de junho de 2010.

MOLYNEUX, R.J.;MAHONEY, N.;KIM, J.H.;CAMPBELL, B.C. Mycotoxins in edible tree nuts. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n.1-2, p.72-78. 2007. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7K-4P9SN8X-P/2/419164c0a5ce034de1698d8ae510f432>>. Acesso em 11 de novembro de 2010.

MONTANI, M.L.;VAAMONDE, G.;RESNIK, S.L.;BUERA, P. Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, n.4, p.349-353. 1988. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7K-476VNTT-2C/2/50cad31f061c32eb708a49b0c647227e>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

MORENG, R.;AVENS, J.S. **Ciência e Produção de Aves**. São Paulo: Livraria Rocca, Ltda. 1990. 380 p.

MOSS, M.O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: J. E. Smith e R. S. Henderson. **Mycotoxins and Animal Foods**. Florida: CRC Press, 1991. p.904. Disponível em:<<http://books.google.com/books?id=pNZHeXG8DJQC&pg=PA482&dq=Toxicology,+biochemistry+and+pathology+of+mycotoxins+Terao&hl=pt-BR&cd=2#v=onepage&q=10%2020%2050%25&f=false>>. Acesso em 14 de junho de 2010.

MOSS, M.O. Recent studies of mycotoxins. . **Journal of Applied Microbiology Symposium**, v.84, p.62S-76S. 1998.

NAIM, M.;GESTETNER, B.;ZILKAH, S.;BIRK, Y.;BONDI, A. Soybean Isoflavones. Characterization, Determination, and Antifungal Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.22, n.5, p.806-810. 1974. Disponível em:<<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf60195a031>>. Acesso em 21 de junho de 2010.

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

NELSON, P.E.;TOUSSOUN, T.A.;MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State: University Press, University Park,. 1983. 193 p.

NESBITT, B.F.;O'KELLY, J.;SARGEANT, K.;SHERIDAN, A. *Aspergillus flavus* and Turkey X Disease: Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus* **Nature**, v.195, n.4846, p.162-

163. 1962. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nature/journal/v195/n4846/pdf/1951062a0.pdf>>. Acesso em 09 de junho de 1962.

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

OLIVEIRA, C.A.F.;BUTKERAITIS, P.;ROSMANINHO, J.F.;GUERRA, J.L.;CORREA, B.;REIS, T.A. Alterações hepáticas em codornas japonesas submetidas à intoxicação prolongada por aflatoxina B1. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.213-217. 2005. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000100033. jan-fev

OLIVEIRA, C.A.F.;KOBASHIGAWA, E.;REIS, T.A.;MESTIERI, L.;ALBUQUERQUE, R.;CORRÊA, B. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.6, p.459-462. 2000. Disponível em: <http://pdfserve.informaworld.com/190309_731408342_713810671.pdf>. Acesso em 11 de junho de 2010.

OLIVEIRA, C.A.F.;SEBASTIÃO, L.S.;FAGUNDES, H.;ROSIM, R.E.;FERNANDES, A.M. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in São Paulo, Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v.1, n.2, p.147-152. 2008.

OPAS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Criterios de salud ambiental – 11: Micotoxinas. Cidade do México. 1983

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

ORTATATLI, M.;OGUZ, H.;HATIPOGLU, F.;KARAMAN, M. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Research in Veterinary Science**, v.78, n.1, p.61-68. 2005. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WWR-4D98HNW-1/2/02d12e23f54c7fab97adf303c5b37855>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

ORUC, H.H.;CENGİZ, M.;KALKANLI, O. Comparison of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA. **Animal Feed Science and Technology**, v.128, n.3-4, p.337-341. 2006. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T42-4JHMS0B-1/2/c808f2835f3734bd1bf0f6ffbd4cb72>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

OSHIMA-FRANCO, Y.;FRANCO, L.M. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde em Revista**, v.5, n.9, p.69-76. 2003. Disponível em: <<http://www.unimep.br/phpg/editora/revistaspdf/saude09art09.pdf>>. Acesso em 21 de junho de 2010.

OSWALD, I.P.;MARIN, D.E.;BOUHET, S.;PINTON, P.;TARANU, I.;ACCENSI, F. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.22, n.4, p.354 - 360. 2005. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/10.1080/02652030500058320>>. Acesso em: 15 de junho de 2010.

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

PAL, A.;ACHARYA, D.;SAHA, D.;ROY, D.;DHAR, T.K. In Situ Sample Cleanup during Immunoassay: A Simple Method for Rapid Detection of Aflatoxin B1 in Food Samples. **Journal of Food Protection**, v.68, n.10, p.2169-2177. 2005. Disponível em: <<http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/iafp/0362028x/v68n10/s25.pdf?expires=1276035099&id=57170751&titleid=5200021&accname=UNIVERSIDADE+SAO+PAULO+IF&checksum=0AEAE0DCFFB7E7CE04151FEDAF849EE6>>. Acesso em 18 de maio de 2007.

PARIKH, A.;GILLAM, E.M.;GUENGERICH, F.P. Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450. **Nature Biotechnology**, v.15, p.784-788. 1997.

PASHA, T.N.;FAROOQ, M.U.;KHATTAK, F.M.;JABBAR, M.A.;KHAN, A.D. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v.132, n.1-2, p.103-110. 2007. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T42-4JRVDXD-C/2/f63a639b6e8a4183431b19804250b05d>>. Acesso em 09 de novembro de 2010.

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento do milho. In. **Cultura do milho - Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba - SP: Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fosfato, 1993. p.23-43

PERAICA, M.;RADIC, B.;LUCIC, A.;PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v.77, n.9, p.754-766. 1999. Disponível em:<[https://www.who.int/bulletin/archives/77\(9\)754.pdf](https://www.who.int/bulletin/archives/77(9)754.pdf)>. Acesso em 14 de junho de 2010.

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

PINTO, V.E.F.;VAAMONDE, G.;MONTANI, M.L. Influence of water activity, temperature and incubation time on the accumulation of aflatoxin B1 in soybeans. **Food Microbiology**, v.8, n.3, p.195-201. 1991. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WFP-4HCKH28-3/2/c6010f75e3cd2f2536e58a85f43562d0>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

PITT, J.I.;BASÍLICO, J.C.;ABARCA, M.L.;LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, v.38,suppl.1, p.41-46. 2000. Disponível em:<http://pdfserve.informaworld.com/630710_731298257_744118730.pdf>. Acesso em 14 de junho de 2010.

PITT, J.I.;HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=B1s6GhOlzkC&oi=fnd&pg=PA1&dq=fungi+requirement+mycotoxin&ots=L8iFY4GTnY&sig=N8CsTmPepMeAEkFTqHY0j3sjgh4#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em 14 de junho de 2010.

POHLAND, A.E. Mycotoxins in review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.10, n.1, p.17 - 28. 1993. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/10.1080/02652039309374126>>. Acesso em 14 de junho de 2010.

POZZI, C.R.;ARCARO, J.R.P.;ARCARO JR, I.;FAGUNDES, H.;CORRÊA, B. Aspectos Relacionados à Ocorrência e Mecanismo de Ação de Fumonisin. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.901-907. 2002. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n5/11885.pdf>>. Acesso em 22 de junho de 2010.

PURCHASE, I.F.H.;VAN DER WATT, J.J. Acute toxicity of sterigmatocystin to rats. **Food and Cosmetics Toxicology**, v.7, p.135-139. 1969. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B73F7-4GT1M66-1B/2/c22dd0b0eb60eed7ac54e0cebc9ed2d4>>. Acesso em 02 de novembro de 2010.

QUIN, P.J.;MARKEY, B.K.;CARTER, M.E.;DONNELLY, W.J.C.;LEORNARD, F.C.;MAGUIRE, D. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre-RS: Artmed. 2005

RAO, K.S.;GEHRING, P.J. Acute toxicity of aflatoxin B1 in monkeys. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.19, n.2, p.169-175. 1971. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WXH-4DDR1TV-C0/2/6c4f0197ec30d227513afdd6dedcaaa8>>. Acesso em 02 de novembro de 2010.

RAPER, K.B.;FENNELL, D.I. **The Genus Aspergillus**. Baltimore: Williams & Wilkins Company. 1965. 686 p.

RAWAL, S.;KIM, J.E.;COULOMBE JR, R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, v.In Press, Corrected Proof. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WWR-5027F46-1/2/26ab3b56ed9d16101c1a05fa1e26c3d5>>. Acesso em: 15 de junho de 2010.

REDDY, R.;JOHNSON, G.;ROTTINGHAUS, G.;CASTEEL, S.;REDDY, C. Developmental effects of fumonisin B1 in mice. **Mycopathologia**, v.134, n.3, p.161-166. 1996. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1007/BF00436724>>. Acesso em 17 de novembro de 2010.

RIBEIRO, S.A.L.;CAVALCANTI, M.A.Q.;FERNANDES, M.J.S.;LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica** v.26, n.2, p.223-229. 2003.

RICHARD, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n.1-2, p.3-10. 2007. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7K-4P9SN8X-8/2/821cecb54a9ac5a6069d5b1f85a3a062>>. Acesso em 30 de setembro de 2009.

RICHARDSON, L.R.;WILKES, S.;GODWIN, J.;PIERCE, K.R. Effect of Moldy Diet and Moldy Soybean Meal on the Growth of Chicks and Poults. **The Journal of Nutrition**, v.78, n.3, p.301-306. 1962. Disponível em:<<http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/78/3/301>>. Acesso em 02 de novembro de 2010.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v.42, p.265-270. 1950.

RORH, R. **A Soja**. Campinas - SP: Ultra Rápida. 1971. 60 p.

ROSA, C.A.R.;RIBEIRO, J.M.M.;FRAGA, M.J.;GATTI, M.;CAVAGLIERI, L.R.;MAGNOLI, C.E.;DALCERO, A.M.;LOPES, C.W.G. Mycoflora of poultry feeds and

ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v.113, n.1-2, p.89. 2006. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TD6-4HMNG18-1/2/2439d3bacee36ddf3cbbbae061d8ecca>>. Acesso em 20 de junho de 2010.

ROSMANINHO, J.F.;OLIVEIRA, C.A.F.;BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p.107-114. 2001.

ROSS, P.F.;RICE, L.G.;OSWEILER, G.D.;NELSON, P.E.;RICHARD, J.L.;WILSON, T.M. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, v.117, n.1-2, p.109-114. 1992. Disponível em:<<http://www.springerlink.com/content/t681771484vn6h0p/fulltext.pdf>>. Acesso em 11 de novembro de 2010.

ROSTAGNO, H.S.;ALBINO, L.F.T.;DONZELE, J.L.;GOMES, P.C.;OLIVEIRA, R.F.;LOPES, D.C.;FERREIRA, A.S.;BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005. 186 p.

SALES, A.C.;YOSHIZAWA, T. Updated profile of aflatoxin and *Aspergillus* section *Flavi* contamination in rice and its byproducts from the Philippines. **Food Additives & Contaminants**, v.22, n.5, p.429-436. 2005.

SALES, M.N. **As origens da galinha doméstica e a história de sua relação com as sociedades humanas**. Disponível em:<<http://sistema.assesoar.org.br/arquivos/TAP000301.htm>>. Acesso em 26 de maio de 2010.

SALLE, C.T.P.;LORENZINI, G.;SFOGGIA, M.;CÉ, M.C.;GUAHYBA, A.S.;MORAES, H.L.S.;NASCIMENTO, V.P.;SALLE, F.O. Presença de Aflatoxinas em Fígados de Frangos de Corte Criados a Campo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS.**, v.29, n.2, p.101-106. 2001.

SANCHIS, V.;ABADIAS, M.;ONCINS, L.;SALA, N.;VIÑAS, I.;CANELA, R. Fumonisin B1 and B2 and toxigenic *Fusarium* strains in feeds from the Spanish market. **International Journal of Food Microbiology**, v.27, p.37-44. 1995.

SANCHIS, V.;MARÍN, S.;MAGAN, N.;RAMOS, A.J. Ecophysiology of fumonisin producers in *Fusarium* section *Liseola*. In: A. D. Hocking, J. I. Pitt, et al. **Advances in Food Mycology** New York: Springer Press, v.571, 2006

SANTOS, J.P. Predisposição de Grãos Danificados por Insetos à Produção de Micotoxinas. In: V. M. Scussel, M. Rocha, et al. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenamento de Grãos II**. Florianópolis - SC: ABMAG, 2008. p.557-561

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.1, p.01-12. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2000000100001&nrm=iso> Acesso em 29 de setembro de 2006.

SARGEANT, K.;SHERIDAN, A.;O'KELLY, J.;CARNAGHAN, R.B.A. Toxicity associated with Certain Samples of Groundnuts. **Nature**, v.192, n.4807, p.1096-1097. 1961. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nature/journal/v192/n4807/pdf/1921096a0.pdf>>. Acesso em 09 de junho de 2010.

SAS. SAS INSTITUTE 9.1 **User's guide**. Carey: SAS Institute Inc. 2004. 1040 p.

SAUER, D.B. Effects of fungal deterioration on grain: nutritional value, toxicity, germination. **International Journal of Food Microbiology**, v.7, n.3, p.267-275. 1988. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7K-476W7BH-40/2/ae4d7dce6d7269b09dfe7339bb26b614>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

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

SEMPLE, R.L.;FRIO, A.S.;HICKS, P.A.;LOZARE, J.V. **Mycotoxin prevention and control in foodgrains**. Disponível em:<<http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E00.htm#Contents>>. Acesso em 14 de junho de 2010.

SEO, J.-A.;LEE, Y.-W. Natural Occurrence of the C Series of Fumonisin in Moldy Corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.1331-1334. 1999. Disponível em:<<http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/65/3/1331>>. Acesso em 22 de junho de 2010.

SHEPHARD, G.S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, v.815, n.1, p.31. 1998. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG8-3VCCRJD-3/2/71f221f688d2f8c67fba66870927b51a>>. Acesso em 21 de junho de 2010.

SHEPHARD, G.S.;THIEL, P.G.;STOCKENSTRÖM, S.;SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of AOAC International**, v.79, p.671. 1996.

SHEPHARD, G.S.;THIEL, P.G.;SYDENHAM, E.W.;ALBERTS, J.F.;CAWOOD, M.E. Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B1 in a non-human primate. **Toxicon**, v.32, n.6, p.735-741. 1994. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCS-475TB3G-J2/2/74f946920aeac0392223634b4625fea5>>. Acesso em 16 de novembro de 2010.

SHEPHARD, G.S.;THIEL, P.G.;SYDENHAM, E.W.;SNIJMAN, P.W. Toxicokinetics of the mycotoxin fumonisin B2 in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7, p.591-595. 1995. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6P-3YKM34B-1X/2/5b331dbea5a653bcf0231def64b0cc46>>. Acesso em 09 de novembro de 2010.

SILVA, C.S. **Composição química e energia metabolizável de milho segregado pela mesa gravimétrica e sua utilização na formulação de ração para frangos de corte**. 2009. 103p. f. -Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.Disponível em:<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-23022010-081553/>>. Acesso em: 25 de maio de 2010.

SILVA, J.O. **Ocorrência de Aflatoxina B1 em Arroz consumido por Militares do Exército Brasileiro por Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. 2009. 101p. f. -Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2009.

SINDIRAÇÕES. **Alimentação Animal Produção 2009 e projeções 2010**. Disponível em:

<http://www.sindiracoes.org.br/images/stories/noticias/sindiracoes_boletim_mai2010%20online.pdf> Acesso em 28 de maio de 2010.

SMITH, J.E. Mycotoxins. In: D. H. Watson. **Food chemical safety**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, v.1, 2001. p.238-259

SMITH, J.E.;ROSS, K. The Toxigenic Aspergilli. In: J. E. Smith e R. S. Henderson. **Mycotoxins and Animal Foods**. Florida: CRC Press, 1991. p.904. Disponível em: <<http://books.google.com/books?id=pNZHeXG8DJQC&pg=PA482&dq=Toxicology,+bio+chemistry+and+pathology+of+mycotoxins+Terao&hl=pt-BR&cd=2#v=onepage&q=10%2020%2050%25&f=false>>. Acesso em 14 de junho de 2010.

SOUZA, F.R.D. **Avaliação de diferentes doses de aflatoxina e fumonisina sobre os parâmetros reprodutivos de galos**. 2007. 114 f. -Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007

STAMFORD, T.L.M.;VILAR, E.A.;BASTOS, S.T.G.;SILVA, C.G.M. Pesquisa micotóxica de produtos avícolas “in natura” e processados. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.v. 23, n.1, p.135-160. 2005. Acesso em 29 de setembro de 2006

SYDENHAM, E.W.;GELDERBLUM, W.C.A.;THIEL, P.G.;MARASAS, W.F.O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n.1, p.285-290. 1990. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1021/jf00091a064>>. Acesso em 16 de novembro de 2010.

TABIB, Z.;JONES, F.T.;HAMILTON, P.B. Microbiological quality of poultry feed and ingredients. **Poultry Science**, v.60, p.1392-1397. 1981.

TAMAMES, F. Micotoxinas, Micotoxicosis e Inmunosupresión. In: V. M. Scussel, M. Rocha, et al. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenamento de Grãos II**. Florianópolis - SC: ABMAG, 2008. p.557-561

TARDIEU, D.;BAILLY, J.-D.;BENLASHEHR, I.;AUBY, A.;JOUGLAR, J.-Y.;GUERRE, P. Tissue persistence of fumonisin B1 in ducks and after exposure to a diet containing the maximum European tolerance for fumonisins in avian feeds. **Chemico-Biological Interactions**, v.182, n.2-3, p.239-244. 2009. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T56-4WM0JD2-1/2/c591e089c4b070dc5a93bdcc9918a0d4>>. Acesso em 09 de novembro de 2010.

TARDIEU, D.;BAILLY, J.-D.;SKIBA, F.;GROSJEAN, F.;GUERRE, P. Toxicokinetics of fumonisin B1 in turkey poult and tissue persistence after exposure to a diet containing the maximum European tolerance for fumonisins in avian feeds. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.9, p.3213-3218. 2008. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6P-4T2M62C-4/2/cfba7febe31049b051ee42fe33df4648>>. Acesso em 09 de novembro de 2010.

TEITELL, L. Effects of Relative Humidity on Viability of Conidia of Aspergilli. **American Journal of Botany**, v.45, n.10, p.748-753. 1958. Disponível em:<<http://www.jstor.org/stable/2439735>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

TESSARI, E.N.C. **Efeitos da administração de aflatoxina B1 e fumonisina B1 sobre frangos de corte**. 2004. 134 f. -Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004

TESSARI, E.N.C.;OLIVEIRA, C.A.F.;CARDOSO, A.L.S.P.;LEDOUX, D.R.;ROTTINGHAUS, G. Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B1 e fumonisina B1. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.924-929. 2006.

TURNER, P.C.;NIKIEMA, P.;WILD, C.P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.443, n.1-2, p.81. 1999. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T2D-3X10VXR-6/2/967367999d27b6300b2a4732a477fcae>>. Acesso em 22 de junho de 2007.

UBA. Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura. http://www.uba.org.br/site3/relatorios_anuais.php#. Acesso em 27 de maio de 2010.

USDA/FAS. Livestock and Poultry: World markets and Trade / 2010 Forecast: Economic Recovery Bolsters World Meat Trade. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2009/livestock_poultry_10-2009.pdf>. Acesso em 28 de maio de 2010.

USDA/FAS. World Agricultural Production. Disponível em: <<http://ffas.usda.gov/wap/circular/2010/10-04/productionfull04-10.pdf>> Acesso em: 31 de maio de 2010.

VAN DER WESTHUIZEN, L.;SHEPHARD, G.S.;SCUSSEL, V.M.;COSTA, L.L.F.;VISMER, H.F.;RHEEDER, J.P.;MARASAS, W.F.O. Fumonisin Contamination and *Fusarium* Incidence in Corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.5574-5578. 2003.

VERMA, J.;JOHRI, T.S.;SWAIN, B.K.;AMEENA, S. Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. **British Poultry Science**, v.45, n.4, p.512-518. 2004.

VOSS, K.A.;HOWARD, P.C.;RILEY, R.T.;SHARMA, R.P.;BUCCI, T.J.;LORENTZEN, R.J. Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B1: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). **Cancer Detection and Prevention**, v.26, p.1-9. 2002.

VUDATHALA, D.K.;PRELUSKY, D.B.;AYROUD, M.;TRENHOLM, H.L.;MILLER, J.D. Pharmacokinetic fate and pathological effects of 14C-fumonisin B1 in laying hens. **Natural Toxins**, v.2, n.2, p.81-88. 1994. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1002/nt.2620020206>>. Acesso em 21 de novembro.

WALUM, E. Acute Oral Toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v.106, n.Suppl 2, p.497-503. 1998. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/instance/1533392/pdf/envhper00537-0100.pdf>>. Acesso em 01 de novembro de 2010

WATKINS, P.B. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. **Gastroenterology Clinics of North America** v.21, p.511-526,. 1992.

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

WETZEL, M.M.V.S. Fungos de armazenamento. In: J. Soave e M. M. V. S. Wetzel. **Patologia de sementes**. Campinas - SP: Fundação Cargill, 1987. p.260-275

WHO. **Environmental Health Criteria. 11. Mycotoxins**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>>. Acesso em 18 de maio de 2007.

WHO. World Health Organization. **International Programme on Chemical Safety. Fumonisin B1 (Environmental Health Criteria Monographs, 219)**. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_219_rev_1.pdf> Acesso em 18 de maio de 2007.

WHO. World Health Organization. Evaluation of certain mycotoxins in foods. **WHO Technical Report Series**. Geneva, p.62. 2002. (906)

WOOLF, A. Witchcraft or Mycotoxin? The Salem Witch Trials. **Journal of Toxicology -- Clinical Toxicology**, v.38, n.4, p.457-460. 2000. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=7430216&site=eho-st-live>>. Acesso em 10 de junho de 2010.

ZAGHINI, A.;MARTELLI, G.;RONCADA, P.;SIMIOLI, M.;RIZZI, L. Mannanligosaccharides and Aflatoxin B1 in Feed for Laying Hens: Effects on Egg Quality, Aflatoxins B1 and M1 Residues in Eggs, and Aflatoxin B1 Levels in Liver. **Poultry Science**, v.84, p.825-832. 2005.

ZANOTTO, D.L.;BRUM, P.A.R.D. **Adequando a Moagem do Milho as Rações**. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/?ids=Sq4r54z6x&ano=2005>>. Acesso em 10 de setembro de 2007.

ZINEDINE, A.;JUAN, C.;SORIANO, J.M.;MOLTÓ, J.C.;IDRISSI, L.;MAÑES, J. Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.1, p.124-127. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7K-4MSHT3S-1/2/7be21c8d6514dc13b52936d5e2bdbc4d>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

8. ANEXOS

8.1. Dados meteorológicos no período de janeiro de 2008 a março de 2009

8.2. Preparo do reativo OPA

Diluir 40 mg de o-oftaldialdeído (Sigma®) em 5 mL de solução de tetraborato de sódio

0,1 M

Adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol

O reativo OPA é estável por 1 semana em temperatura ambiente e protegido da luz.

8.3. Cromatograma de padrão para aflatoxinas (AFG1: 21,95 ng/mL; AFB1: 29,25 ng/mL; AFG2: 31,25 ng/mL; AFB2: 21,55 ng/mL)