

## Impact of Fumonisin, Aflatoxins and Ochratoxin A on Poultry Industry Impacto das Fumonisinas, Aflatoxinas e Ocratoxina A na Avicultura

### Abreviações

Mycotoxins in Feed

Micotoxinas em Rações

Jaqueline Gozzi Bordini<sup>1</sup>; Carolina Nachi Rossi<sup>1</sup>; Elisa Yoko Hirooka<sup>2</sup>; Elisabete Yurie Sataque Ono<sup>1\*</sup>

### ABSTRACT

Brazil is the third largest producer of poultry in the world and the leading exporter. However, mycotoxin contamination in corn and feed can cause serious economic losses to the poultry industry. Mycotoxins have been linked to several poultry diseases and, when metabolized may occur in meat and eggs and are an additional source for human contamination. Therefore, continuous monitoring of mycotoxin levels in the feed producing chain is essential to increase productivity, ensure poultry product quality and minimize human health hazards. The aim of this study was to revise the main aspects of mycotoxins (fumonisin, aflatoxins and ochratoxin A), including the producing fungi, the biosynthesis pathway, the toxicological effects in poultry and occurrence in corn and poultry feed

**Keywords:** fumonisins, aflatoxins, ochratoxin A, chicken, corn

### RESUMO

O Brasil é o terceiro produtor mundial de aves e o líder em exportações. No entanto, a contaminação de milho e rações por micotoxinas pode acarretar grandes perdas econômicas à avicultura. As micotoxinas estão associadas a diversos efeitos tóxicos em aves e, ao serem metabolizadas, podem ocorrer em carne e ovos, constituindo um risco para a saúde humana. Portanto, o monitoramento contínuo de micotoxinas na cadeia produtiva de rações é essencial para aumentar a produtividade, assegurar a qualidade do produto e minimizar os riscos à saúde humana. Este estudo teve como objetivo revisar os principais aspectos das micotoxinas (fumonisinas, aflatoxinas e ocratoxina A), incluindo os fungos produtores, via de biossíntese, efeitos toxicológicos em aves e a ocorrência em milho e rações de aves.

**Palavras-chave:** fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxina A, aves, rações

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – Pr – E-mail: biq@uel.br.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – Pr – E-mail: deptam@uel.br

\* Autor para correspondência: eysono@uel.br

## INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento. O País se tornou o terceiro produtor mundial e líder em exportação abastecendo 142 países. Fatores como manejo adequado do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada contribuíram para aperfeiçoar a produtividade no setor (BRASIL, 2011).

Em 2012, o Brasil produziu aproximadamente 13 milhões de toneladas de carne de frango. O principal produtor nacional foi o Estado do Paraná, responsável por 28,4% do total de frangos abatidos e por 26,2% das exportações. Este crescimento foi impulsionado pelo aumento no consumo de carne de frango e pela expansão de 5,1% nas exportações (CONAB, 2012).

Aproximadamente 80% da produção brasileira de milho é destinada à produção de ração de suínos e frangos de corte, enquanto que seu processamento para o consumo humano corresponde a 13% (ABIMILHO, 2008). Devido à alta qualidade nutricional, o milho está exposto à contaminação por microrganismos, principalmente por fungos toxigênicos, produtores de micotoxinas, cujo desenvolvimento é favorecido pelo clima tropical predominante no Brasil.

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos por fungos filamentosos que causam diversos efeitos adversos para seres humanos e animais, acarretando perdas econômicas para produtores e processadores de grãos. Por apresentarem, de modo geral, grande estabilidade química e térmica, podem persistir nos alimentos ou rações mesmo após a inativação dos fungos por meio de processos de industrialização e, ao serem metabolizadas pelos animais, podem ocorrer em carne, ovos e leite, constituindo um risco para a saúde humana (CAST, 2003).

Os principais grupos de micotoxinas associadas a esta cultura incluem, as fumonisinas, cujos principais produtores são *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*, por serem as micotoxinas de maior ocorrência em milho e derivados (THIEL; MARASAS, 1991), as aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (DIENER et al., 1987) e a ocratoxina A (OTA), produzida principalmente por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus steynii*. Embora *Aspergillus* da Seção *Nigri* seja produtora de OTA, é mais frequente em café e frutas, especialmente uvas (ABARCA et al., 1994).

Em aves, as fumonisinas, as aflatoxinas e a ocratoxina A podem acarretar aumentos no peso de fígado, rins, pró-ventrículo e moela, necrose multifocal

hepática, hiperplasia biliar, diarreia, imunossupressão, diminuição no consumo de ração, ganho de peso, enzimas séricas, massa das penas, da produção e peso dos ovos (BROWN, ROTTINGHAUS, WILLIAMS, 1992; CAST, 2003; GIACOMINI et al., 2006; KUBENA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2001; SAKTHIVELAN; RAO, 2010; SKLAN, KLIPPER, FRIEDMAN, 2001; STOEV, 2010) e, adicionalmente, a co-ocorrência dessas toxinas pode resultar na potencialização dos danos causados ao fígado e rins (DEL BIANCHI et al., 2005).

A contaminação de rações destinadas à alimentação de aves por aflatoxinas, fumonisinas e ocratoxina A tem sido reportada em todo mundo (BEG et al., 2006; JAIMEZ et al., 2004; MARTINS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2006). Considerando que as micotoxinas não podem ser removidas pelo processamento industrial, e a exposição crônica das aves pode acarretar sérios prejuízos econômicos para produtores dos animais, além de diminuir a qualidade da carne, ovos e derivados, a avaliação da presença de micotoxinas em rações é de grande importância, a fim de minimizar seus efeitos adversos. Esta revisão apresenta as características gerais das fumonisinas, aflatoxinas e ocratoxina A, bem como o mecanismo de ação, os efeitos toxicológicos, a ocorrência e a co-ocorrência dessas micotoxinas em milho e ração destinada à alimentação de aves.

## FUMONISINAS

### Fungos Produtores

As fumonisinas foram descobertas em 1988, a partir de culturas da cepa de *F. verticillioides* MRC 826 isolada em 1975 de milho destinado ao consumo humano em Transkei, África do Sul, uma área de alta incidência de câncer esofágico (GELDERBLOM et al., 1988).

As fumonisinas constituem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon), fungo prevalente em milho, e *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; THIEL et al., 1991). Essas espécies são capazes de produzir níveis elevados de fumonisinas, possuem ampla distribuição geográfica, ocorrência frequente em milho e, associação com micotoxicoses em animais (RHEDDER; MARASAS; VISMER, 2002).

*Fusarium verticillioides* está associado a doenças em todas as fases de desenvolvimento do milho, causando danos em plântulas e podridão de raiz, colmo e espiga, bem como danos em milho armazenado. Durante a colheita, o fungo

pode ser encontrado tanto nas plantas como nos restos das culturas. Por outro lado, *F. verticillioides* pode também colonizar o milho de forma assintomática, e, neste caso, não causa doenças visíveis, relação esta denominada de endofítica (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; MUNKVOLD; McGEE; CARLTON, 1997; SIEGAL; LATCH; JOHNSON, 1987).

A contaminação de milho por *F. verticillioides* ocorre principalmente por meio da infecção dos estigmas por conídios carregados pelo ar ou água. No entanto, a doença pode se estabelecer via contaminação da semente chegando à espiga e grãos por meio da circulação sistêmica caulinar; pela infecção da raiz atingindo os grãos através do colmo e espiga; e via ferimentos causados por insetos, os quais, também podem atuar como vetores de inóculo (MUNKVOLD; McGEE; CARLTON, 1997; SORIANO; DRAGACCI, 2004).

Ambas as infecções, sintomáticas e assintomáticas, por *F. verticillioides* podem resultar em perdas econômicas e da qualidade do milho devido à contaminação, principalmente, com fumonissina B<sub>1</sub>, uma micotoxina associada a graves doenças em animais, como leucoencefalomalácia em equinos (ELEM) (MARASAS et al., 1988), edema pulmonar em suínos (ROSS et al., 1990), redução no desenvolvimento e imunossupressão em aves (NAGARAJ; WU; VESONDER, 1994; WEIBKING et al., 1994) e ação hepatotóxica e hepatocarcinogênica em ratos (GELDERBLUM et al., 1991).

Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a associação das fumonissinas com o câncer esofágico e hepático primário (RHEEDER et al., 1992; SYDENHAM et al., 1990; UENO et al., 1997) sendo classificadas pela International Agency for Research on Cancer (IARC) como carcinógenos do grupo 2B, i.e., provavelmente carcinogênicos para seres humanos (IARC, 2002).

### Biossíntese

Existem 28 análogos caracterizados de fumonissinas, divididos em quatro grupos principais A, B, C e P (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). Dentre eles, as fumonissinas B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) e B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>) são as mais frequentes em milho e derivados naturalmente contaminados (CAWOOD et al., 1991). A FB<sub>1</sub> é o análogo mais tóxico e abundante (NELSON et al., 1992), representando cerca de 70% a 80% da concentração total de fumonissinas produzidas em cultivos utilizando como substrato milho e arroz e em cultivos em meio líquido, enquanto que, a FB<sub>2</sub> corresponde de 15 a 25% e a FB<sub>3</sub>, de 3 a 8% (RHEEDER; MARASAS; VISMER,

2002).

A estrutura química das fumonissinas (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>) foi elucidada por Bezuidenhout et al. (1988). A FB<sub>1</sub> é um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-penta-hidroxi-eicoisano, em que os grupos hidroxilas nos C-14 e C-15 estão esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido tricarbóxico. A FB<sub>2</sub> não possui o grupo hidroxila em C-10, enquanto que a FB<sub>3</sub> não apresenta o grupo hidroxila em C-5 (BOLGER et al., 2001) (Figura 1). As fumonissinas da série A diferem das fumonissinas da série B por serem N-acetiladas no C-2; as da série P pela presença de 3-hidroxipiridina no C-2 e as da série C por não apresentarem o grupo metila terminal no C-1 (MUSSER; GAY; MAZZOLA, 1996; NELSON et al., 1993).

As fumonissinas são moléculas polares e, ao contrário das outras micotoxinas contaminantes de alimentos, não possuem nenhuma estrutura aromática ou cromófora de fácil detecção analítica (MURPHY et al., 2006).

As fumonissinas são sintetizadas pela via das policetidas durante o metabolismo secundário do fungo a qual se inicia, frequentemente, após o término da fase de crescimento (GRIFFIN, 1994).

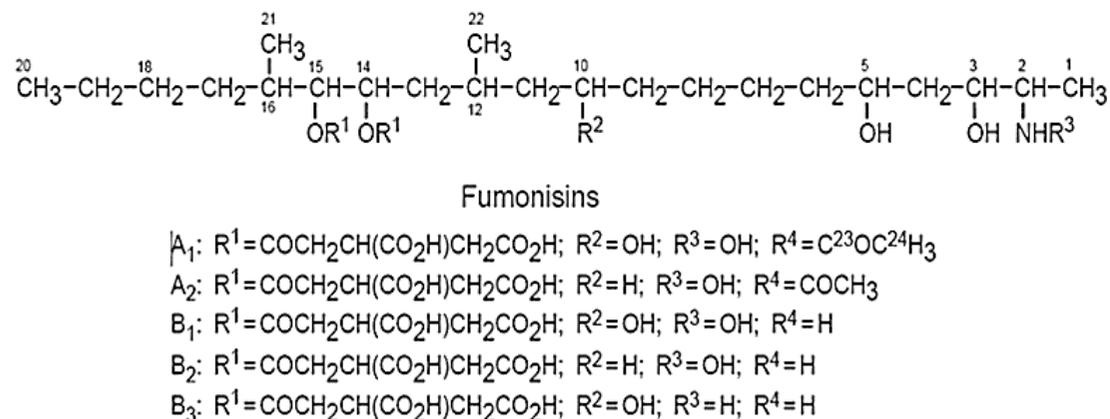
A biossíntese dessas toxinas inicia-se com a formação da cadeia carbônica principal a partir da condensação de uma molécula de acetil-CoA, 8 moléculas de malonil-CoA e duas moléculas de metionina, sob forma de S-adenosil. O produto desta reação, catalisada por uma policetida sintase, é um policetídeo de 18 carbonos o qual é condensado ao aminoácido alanina (BOJJA et al., 2004; SWEENEY; DOBSON, 1999).

Posteriormente, ocorrem subseqüentes oxidações nas posições C-14 e C-15, catalisadas por oxigenases citocromo P450 dependentes; esterificações com propano-1,2,3-ácidos tricarbóxicos nos grupos hidroxilas dos carbonos 14 e 15, catalisadas por uma aciltransferase, e hidroxilação no C-5 pela ação da dioxigenase 2-ceto-glutarato-dependente (BOJJA et al., 2004).

Os componentes das moléculas de fumonissinas apresentam diferentes origens biogênicas. Os carbonos 3-20 são derivados do acetato, os grupos aminos em C-1 e C-2 da alanina (BLACKWELL et al., 1996; BRANHAM; PLATTNER, 1993), e os dois grupamentos metil nos carbonos 12 e 16 da metionina (PLATTNER; SHACKELFORD, 1992). O grupo hidroxila no C-3 é proveniente do grupo carbonila derivado do acetato, enquanto que os grupos hidroxila nos carbonos 5, 10, 14 e 15 são originados do oxigênio molecular (CALDAS et al., 1998). Os ácidos

tricarboxílicos provavelmente são derivados do ácido glutâmico pela via do ciclo do ácido cítrico (ex. ácido aconítico) (BLACKWELL et al., 1996).

Figura 1- Estrutura das fumonisinas (Com permissão do CAST, 2003 para reprodução).



A contaminação de produtos agrícolas por fumonisinas depende de fatores como região geográfica, estação do ano e condições de plantio, colheita e estocagem. Grãos cultivados em regiões subtropicais e tropicais estão mais propensos à contaminação por fumonisinas devido ao período de cultivo relativamente longo e quente, sendo milho e sorgo as culturas que apresentam maior risco de contaminação (HENRY; WYATT, 1993).

Em geral, para *F. verticillioides* as condições ótimas de produção de fumonisinas em milho são de atividade de água ( $a_w$ ) de 0,95-0,98, temperatura de 30°C e período de incubação de 4 a 6 semanas (MARÍN et al., 1995; MARÍN et al., 1999a; MARÍN et al., 1999b).

#### Biossíntese de Esgingolipídios e Mecanismo de Ação das Fumonisin

A biossíntese dos esgingolipídios complexos ocorre na face citosólica do retículo endoplasmático e inicia-se com a condensação de uma L-serina e um palmitoil-CoA, pela ação da enzima, piridoxal-dependente, serina palmitoil-transferase. O produto desta reação é a 3-ceto-esginganina que ao ser reduzida é convertida a esginganina (dihidroesgingosina). Esta, por sua vez, pode ser fosforilada originando esginganina 1-fosfato ou *N*-acilada, pela ação da ceramida sintase, formando uma diidroceramida, que é então dessaturada a ceramida

(SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005).

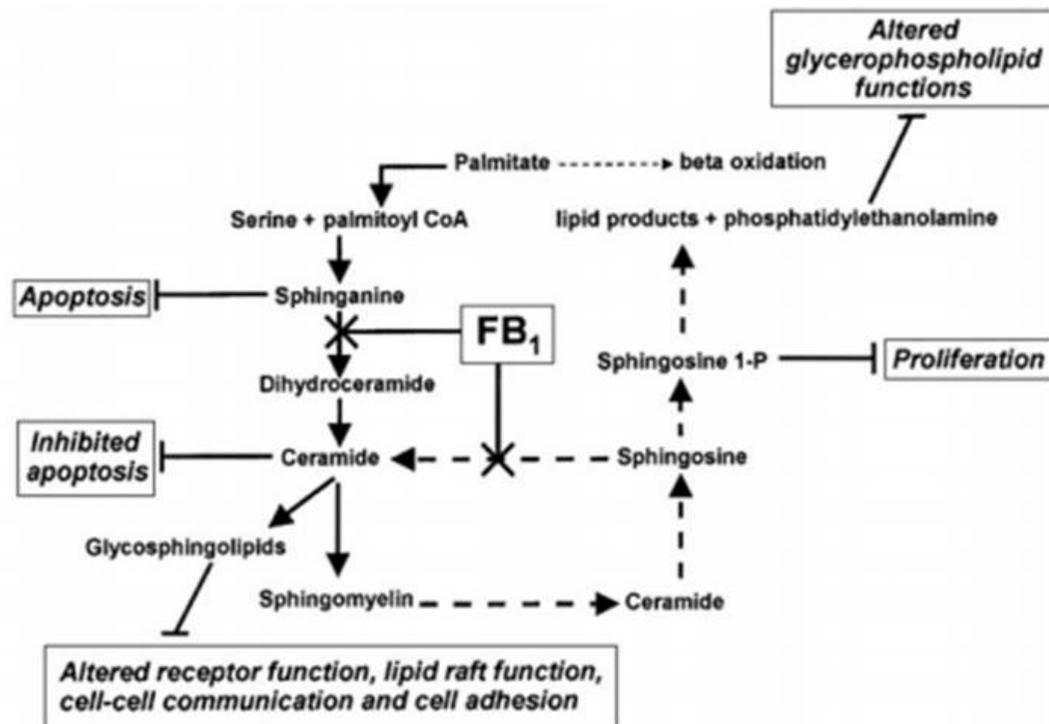
A ceramida pode originar a esgingomiolina, pela adição de uma fosfocolina; os glicoesgingolipídios, pela complexação com oligossacarídeos; ou esgingosina, por meio da ação catalítica da ceramidase. A fosforilação da esgingosina, pela ação da esgingosina quinase, origina esgingosina-1-fosfato, a qual, juntamente com a esginganina-1-fosfato, podem ser catabolizadas a etanolamina fosfato e aldeído graxo. Estes podem então ser utilizados como substratos para regeneração da L-serina e do palmitoil-CoA (SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005).

Os efeitos tóxicos causados por meio da ingestão de alimentos ou rações contaminados por fumonisinas estão relacionados à sua estrutura, semelhantes aos esgingolipídios (esginganina e esgingosina). Devido a essa semelhança, as fumonisinas inibem competitivamente a ceramida sintase (esgingosina e esginganina *N*-acetiltransferase), enzima chave na biossíntese e degradação de esgingolipídios (TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999), sendo inibida por todas as fumonisinas que possuem o grupamento amino livre no C-2 por meio de interações não covalentes (Figura 2) (RILEY et al., 1994; WANG et al., 1991;).

A cadeia aminopentol (AP1) das fumonisinas compete pelo sítio de ligação das bases esgingóides, enquanto que os ácidos tricarboxílicos aniônicos interferem na ligação do acil-CoA graxo, impedindo a conversão da esginganina à diidroceramida e a reacilação da esgingosina à ceramida (MERRILL et al., 2001).

O mecanismo de ação das fumonisinas é um evento seqüencial na qual a inibição da ceramida sintase acarreta a inibição da biossíntese de ceramidas, aumento de esginganina e esgingosina livres, redução na reacilação da esgingosina e da degradação dos esgingolipídios provenientes da dieta (RILEY et al., 1998). Estes efeitos são resultantes da toxicidade promovida pela  $\text{FB}_1$  a qual é caracterizada por alterações na atividade de proteínas quinases, no crescimento e diferenciação celular, na apoptose e na peroxidação lipídica (SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005).

Figura 2 – Biossíntese dos esfingolípídios em células mamárias. O símbolo X indica a via enzimática inibida pela fumonisina B1 (Com permissão da IARC, 2002 para reprodução).



### Efeitos Toxicológicos em Aves

Em estudo de administração prolongada de  $FB_1$  (77 dias), 40 patos com 7 dias de idade tratados por gavagem com doses correspondentes à ingestão de 2, 8, 32 e 128 mg  $FB_1$   $Kg^{-1}$  de ração, apresentaram diminuição no peso corporal e aumento dos pesos da moela, baço e fígado nos tratamentos com as duas maiores doses (TRAN *et al.*, 2006).

No estudo de Ledoux *et al.* (1992), 45 frangos de corte, machos, com 1 dia de idade, foram submetidos a dietas contendo 100, 200, 300 ou 400 mg de  $FB_1$   $Kg^{-1}$  de ração durante 21 dias. O peso corporal das aves e a média de ganho de peso diário diminuíram significativamente com o aumento da dose de  $FB_1$  e, além disso, as aves apresentaram diarreia. Por outro lado, os pesos do fígado, pró-ventrículo e moela, e os níveis séricos de cálcio, de colesterol e da enzima aspartato amino-transferase no soro, aumentaram. Histologicamente, as aves apresentaram atrofia cortical do timo, necrose hepática multifocal e hiperplasia biliar.

Em estudo semelhante, Mallmann *et al.* (2005) trataram durante 21 dias, 120 frangos de corte (raça linhagem Cobb), machos, com 1 dia de idade, com ração contendo 5 mg  $Kg^{-1}$  de  $FB_1$ . Foi observada diminuição no peso e no consumo de ração pelas aves bem como um pequeno efeito da toxina sobre o fígado o qual foi evidenciado pelo aumento no peso relativo deste órgão.

Brown, Rottinghaus e Williams (1992) relataram ocorrência de diarreia, 19% de redução do peso corporal e 30% de aumento do peso do fígado de pintinhos (1 dia de idade) alimentados com ração contendo 300 mg  $Kg^{-1}$  de  $FB_1$  durante duas semanas. Histologicamente, os animais apresentaram necrose multifocal hepática, hiperplasia biliar e necrose muscular.

Em estudo com 128 codornas japonesas poedeiras em início de postura, com 7 semanas de idade, alimentadas com ração contendo 10, 50 e 250 mg  $Kg^{-1}$  de  $FB_1$ , durante 28 dias, ocorreu diminuição no consumo de alimentos e do ganho de peso e aumento no peso relativo do fígado, nos animais tratados com as duas últimas concentrações. No entanto, histologicamente, os tecidos hepático, renal e do miocárdio, não apresentaram diferenças em relação aos do grupo controle. No grupo exposto a 250 mg  $Kg^{-1}$  de  $FB_1$  houve diminuição da produção média e do peso dos ovos (BUTKERAITIS, 2003).

Em galinhas poedeiras, Bovan raça White Leghorn (144 animais com 24 semanas de idade), não foram observados efeitos deletérios sobre o desempenho e a saúde de aves alimentadas com ração contendo 100-200 mg  $Kg^{-1}$  de  $FB_1$  por 420 dias, porém, durante alguns períodos, ocorreu diminuição da produção de ovos, do peso relativo dos rins, das proteínas totais no soro e aumento no peso dos ovos, o qual acarretou 16,7% de óbitos por prolapso uterino durante os estágios finais de produção (KUBENA *et al.*, 1999).

Por outro lado, Prathapkumar, Rao e Paramkishan (1997) relataram a ocorrência de surtos de micotoxicoses em 6700 galinhas poedeiras de 64 semanas de idade e em 3000 com 36 semanas de idade alimentadas com ração naturalmente contaminada com 8,5 mg  $Kg^{-1}$  de  $FB_1$  e 100  $\mu g$   $Kg^{-1}$  de  $AFB_1$ . Os animais apresentaram diarreia escura e viscosa, diminuição na ingestão de alimentos, redução de 20% na produção de ovos e 10% de mortalidade.

No Brasil, o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu um limite máximo tolerado para fumonisinas ( $FB_1$  e  $FB_2$ ) em rações e concentrados para animais monogástricos de 5000  $\mu g$   $Kg^{-1}$  (BRASIL, 2006). Segundo a FDA (Food and Drug

Administration) (2001) o nível máximo permitido, considerando o somatório de  $FB_1$ ,  $FB_2$  e  $FB_3$ , para alimentação de galinhas poedeiras é de  $30 \text{ mg Kg}^{-1}$  e de  $100 \text{ mg Kg}^{-1}$  para frangos de corte (FAO, 2003), enquanto que, na União Européia o nível máximo tolerado para aves em geral é de  $20 \text{ mg Kg}^{-1}$  ( $FB_1 + FB_2$ ) (EUROPEAN COMMISSION, 2006a).

### Ocorrência de Fumonisinas

No Brasil, o primeiro relato sobre a ocorrência natural de fumonisinas em milho foi realizado por Sydenham et al. (1992), que analisaram 21 amostras de rações associadas a surtos confirmados e suspeitos de micotoxicoses em diversas espécies de animais no Estado do Paraná. As  $FB_1$  e  $FB_2$  foram detectadas em 20 e 18 amostras, respectivamente, em concentrações de  $0,2 - 38,5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  ( $FB_1$ ) e  $0,1 - 12,0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  ( $FB_2$ ).

A avaliação da contaminação natural por fumonisinas em 39 amostras de milho do Estado do Paraná e 9 dos Estados do Mato Grosso do Sul e de Goiás, revelou 97,4% de positividade para  $FB_1$  e 94,8% para  $FB_2$  (HIROOKA et al., 1996).

Na análise de 150 amostras de milho recém colhido das regiões centro-sul, centro-oeste e norte do Estado do Paraná foram detectadas  $FB_1$  em 100% das amostras (média de  $2,39 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) e  $FB_2$  em 97,7% (média de  $1,09 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) (ONO et al., 1999).

Na análise de 23 amostras de 19 cultivares de milho do Estado de São Paulo foi detectada 100% de positividade para fumonisinas. As médias de contaminação variaram de  $1,63 - 25,69 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  para  $FB_1$  e de  $0,38 - 8,6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  para  $FB_2$  (CAMARGOS et al., 2000).

Westhuizen et al. (2003), analisaram 75 amostras de milho, destinadas ao consumo humano, provenientes das regiões oeste, norte e sul do Estado de Santa Catarina e 15 amostras de milho destinado ao consumo animal da região sul do estado, e detectaram médias de fumonisinas totais ( $B_1 + B_2 + B_3$ ) de 3,2, 3,4, 1,7 e  $1,5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

Amostras de ração ( $n = 11$ ) associadas a seis casos de intoxicação em cavalos e frangos e amostras de milho ( $n = 128$ ) das regiões norte (safras 1991, 1995, 1997), e centro sul (safra 1995), do Estado do Paraná foram avaliadas quanto à contaminação por fumonisinas. Na safra de 1991 todas as amostras de milho ( $n = 27$ ) da região norte estavam contaminadas com fumonisinas em concentrações de 2,32 a  $16,64 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , enquanto que, na safra de 1995 houve um decréscimo

nos níveis de contaminação ( $0,57 - 9,97 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) fato que se repetiu na safra de 1997, na qual 21 das 37 amostras estavam contaminadas com concentrações de  $0,05 - 2,67 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ . Nas amostras da região centro sul ( $n = 27$ ) a frequência de contaminação foi de 96,3% com níveis de fumonisinas variando de  $0,07 - 3,66 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  (ONO et al., 2004).

A análise de amostras de milho (safra de 2003) recém colhido ( $n = 100$ ) e de amostras da recepção ( $n = 200$ ) e da etapa de pré-secagem ( $n = 90$ ) de indústrias de processamento de milho da região norte do Estado do Paraná, demonstrou contaminação por  $FB_1$  em todas as etapas avaliadas. Os níveis de contaminação variaram de  $0,11 - 12,68 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  nas amostras recém-colhidas,  $0,10 - 11,83 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  na recepção e  $0,02 - 10,98 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  na etapa de pré-secagem. Quanto à contaminação por  $FB_2$  as concentrações foram de  $0,01 - 5,26 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $0,02 - 5,25 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,07 - 7,89 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente (ONO et al., 2008).

Na análise de amostras de milho ( $n = 40$ ) provenientes de 10 áreas de agricultura familiar localizadas nas cidades de Esmeraldas, Pedro Leopoldo, Funilândia e Sete Lagoas, Estado de Minas Gerais, foram detectadas fumonisinas em 100% das amostras (concentração de 230 a  $6.450 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (QUEIROZ et al., 2012).

Amostras de milho ( $n = 63$ ) de diferentes regiões da Croácia apresentaram 90% de positividade para fumonisinas (concentração média de  $1756 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (PLEADIN et al., 2013).

## AFLATOXINAS

### Fungos Produtores

As aflatoxinas constituem um grupo de metabólitos secundários tóxicos, descobertos em 1960, após provocarem um surto de micotoxicose em perus, na Inglaterra (Turkey-X-disease), associado ao consumo de torta de amendoim na ração (BLOUNT, 1961). Milho, amendoim, algodão, cevada, trigo, aveia, feijão, soja, nozes, figo e tabaco são culturas que apresentam maior frequência de contaminação (BENNETT; KLICH, 2003; DIENER et al., 1987;).

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente pelas espécies *A. flavus* Link ex Fries e *A. parasiticus* Speare e por espécies encontradas em menor frequência como *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* e *A. pseudotamarii* (GOTO; WICKLOW; ITO, 1996; KLICH et al., 2000; PETERSON et al., 2001).

Na natureza, *A. flavus* é um dos fungos saprófitas mais abundantes e amplamente distribuídos no mundo. Mais de 90% da contaminação com aflatoxinas em milho e algodão são causadas por essa espécie (DIENER et al., 1987). Cresce em ampla faixa de temperatura (12 a 48°C) sendo que as temperaturas ótimas de crescimento situam-se entre 28 a 37°C. Apresenta-se predominantemente na forma de fungo filamentosos originando, sob condições adversas, como seca e escassez de nutrientes, esclerócios como estrutura de resistência (BENNET et al., 1986; COTTY, 1988).

O processo de infecção do milho por *A. flavus*, pode ocorrer via contaminação dos estigmas da planta por conídios carregados pelo vento ou por insetos ou, quando as condições ambientais forem favoráveis, o fungo pode colonizar diretamente sementes e espigas aderindo-se às suas superfícies ou por meio de ferimentos causados por insetos (CAST, 2003).

### Biossíntese

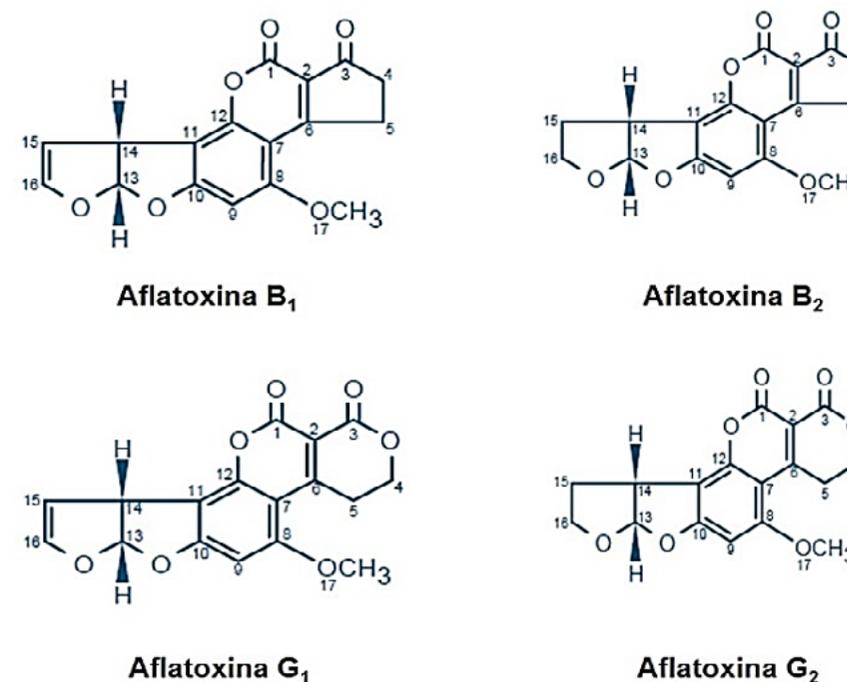
Dentre os 16 análogos estruturalmente relacionados, as quatro principais aflatoxinas são B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) sendo a AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> as mais comumente encontradas em produtos agrícolas (GOLDBLATT, 1971) (Figura 3). A AFB<sub>1</sub> é o análogo mais frequente em substratos vegetais e o mais tóxico, seguido por G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> com toxicidades de aproximadamente 50, 20 e 10% em relação a AFB<sub>1</sub>, respectivamente (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). Adicionalmente, em leite e derivados, a aflatoxina M<sub>1</sub>, produto da metabolização da AFB<sub>1</sub> por animais lactantes, é a forma de maior ocorrência (Van EGMOND, 1989).

As aflatoxinas são bisfuranos que podem conter anéis diidrofurano (AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>) ou tetraidrofurano (AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>) ligados a uma cumarina substituída (CAST, 2003) (Fig. 3). As aflatoxinas da série B são caracterizadas por apresentar fluorescência azul (425nm) e as da série G, fluorescência verde (540nm), sob radiação ultravioleta. Esta propriedade é amplamente utilizada para a detecção de cepas aflatoxigênicas bem como para detecção de aflatoxinas. No entanto, devido à possível presença de metabólitos fluorescentes sintetizados por outros fungos, é recomendável utilizar métodos baseados na fluorescência das aflatoxinas em conjunto com métodos de separação adequados, como as cromatografias em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE) (DO; CHOI, 2007).

A via biossintética das aflatoxinas inicia-se com a conversão de acetato e

malonilCoA a uma unidade hexanoil iniciadora, pela ação de uma enzima ácido graxo sintase. Essa é subsequentemente estendida, pela ação de uma poliketida sintase, originando o ácido norsolorínico decacetado que é o primeiro precursor estável na biossíntese das aflatoxinas. O policetídeo sofre, então, aproximadamente de 12 a 17 transformações enzimáticas originando uma série de intermediários como a averantina, 5'-hidroxiaverantina, averufanina, averufina, 1'-hidroxiversicolorona, acetato versiconal, versiconal e versicolorina B. Posteriormente, a via divide-se originando as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> a partir da dimetilesterigmatocistina (DMST), e as AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> a partir da diidrodimetilesterigmatocistina (DHDMST) (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Figura 3 - Estrutura das aflatoxinas (Com permissão do CAST, 2003 para a reprodução).



A contaminação das culturas com aflatoxinas pode ocorrer tanto no campo, geralmente quando ocorre estresse hídrico, quanto durante a estocagem sob temperatura elevada e baixa umidade (BENNETT; KLICH, 2003). As temperaturas ótimas para síntese de aflatoxinas situam-se entre 25 a 30°C, sendo que, em milho, altas temperaturas e estresse hídrico (umidade dos grãos abaixo de 32%) são fatores que contribuem para o aumento nos níveis de contaminação. No entanto, a produção de aflatoxinas pode ocorrer em condições de até 15% de

umidade. Outro fator que pode contribuir para contaminação com altos níveis dessas toxinas é a injúria causada nos grãos pela ação de insetos, como por exemplo, a broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis*), uma vez que favorece tanto a colonização da espiga pelo fungo bem como sua desidratação (CAST, 2003).

### Mecanismo de Ação

As aflatoxinas estão associadas à toxicidade e carcinogenicidade em animais e seres humanos (PEERS; LINSELL, 1973) sendo classificadas pela IARC como carcinógenos do grupo 1, i.e., carcinogênico para seres humanos (IARC, 2002). A AFB<sub>1</sub> é considerada o mais potente carcinógeno natural conhecido e, usualmente, é o análogo produzido em maior quantidade pelas cepas toxigênicas (SQUIRE, 1981).

Os efeitos tóxicos e carcinogênicos da AFB<sub>1</sub> são manifestados somente após sua metabolização, nos hepatócitos, pela monoxigenase citocromo P-450 dependente (CYP). Essa enzima catalisa o metabolismo oxidativo da AFB<sub>1</sub>, resultando na formação de vários derivados hidroxilados como a AFM<sub>1</sub> (mais prevalente), AFQ<sub>1</sub> e AFP<sub>1</sub>, que possuem menor toxicidade, bem como a formação do AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido (AFBO), que é altamente reativo. O efeito carcinogênico e mutagênico da AFB<sub>1</sub> é atribuído à afinidade eletrofílica do AFBO pelo DNA e proteínas resultando na formação de dois adutos macromoleculares principais o AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina com o DNA e o AFB<sub>1</sub>-lisina com a albumina do soro (COULOMBE, 1993; NEAL et al., 1987; WANG et al., 1996).

A AFB<sub>1</sub> pode, também, ser reduzida por enzimas citosólicas solúveis NADPH-dependentes originando o aflatoxicol, o qual, devido à reversibilidade desta reação, é considerado uma forma de estoque de AFB<sub>1</sub>. Outros dois metabólitos relativamente atóxicos, porém produzidos em menor quantidade, são o aflatoxicol M<sub>1</sub> e aflatoxicol H<sub>1</sub> (COULOMBE, 1993; WANG et al., 1996).

Os adutos AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua podem causar uma mutação somática pontual no gene TP53, na terceira base do códon 249, acarretando uma transversão GC para TA. Essa mutação provoca a substituição de uma arginina por uma serina na proteína p53 que possui ação “supressora de tumor” (SMELA et al., 2001). Sendo assim, se o dano ao DNA for grave, os mecanismos dependentes da p53 podem iniciar apoptose conduzindo à morte celular. A mutação somática no gene TP53 está intimamente associada ao risco de desenvolver câncer de fígado, sugerindo

que mecanismos dependentes da p53 normalmente agem para preservar a integridade genômica (KIRK et al., 2005). Adicionalmente, a AFB<sub>1</sub> pode atuar como alquilante do DNA resultando na formação de sítios apurínicos devido à perda de bases nitrogenadas, e, pode induzir à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) as quais promovem a oxidação do DNA (CHU; SAFFHIL, 1983; GUIDON; BERDARD; MASSEY, 2007).

### Efeitos Tóxicológicos em Aves

O fígado é o órgão mais afetado pela AFB<sub>1</sub>. As lesões primárias a esse órgão incluem necrose hemorrágica, infiltração de ácidos graxos e proliferação de dutos biliares, sendo que, em patos e ratos a região periportal é o principal sítio de ação da toxina (COULOMBE, 1993).

As aflatoxinas podem provocar doenças hepáticas, alterações nas taxas de crescimento, efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos em várias espécies de animais, especialmente em aves domésticas (PIER, 1973; OLUBUYIDE, 1992).

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e do tempo de exposição, determinando, assim, intoxicações agudas ou crônicas. A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimentos com alta concentração de aflatoxina, sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo. Caracteriza-se principalmente pelo comprometimento do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte. Na aflatoxicose crônica, que ocorre de modo geral, a partir da ingestão de alimentos contaminados com baixos níveis de aflatoxinas por um longo período de tempo, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens e imunossupressão (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). Essa doença constitui a principal forma de intoxicação em condições naturais, ocasionando grandes perdas econômicas (PIER, 1992).

Pintinhos com 2 dias de idade (n = 60) tratados, via oral, com 50 e 100 µg Kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> de peso corpóreo, durante 3 semanas, apresentaram decréscimo nos níveis de colesterol e glicose plasmática e da resistência do fêmur a ruptura, e, aumento no peso e do conteúdo lipídico do fígado no tratamento com a maior dose. Nos dois tratamentos foram observados decréscimos nos níveis de albumina sérica, zinco, manganês e cobre hepáticos e de aminoácidos livres no plasma (MAURICE; BODINE; REHRER, 1983).

Perus ( $n = 48$ ), 3 meses e meio de idade, tratados com 100, 200 e 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de aflatoxinas totais de ração durante 2 semanas apresentaram decréscimo no consumo de ração e no ganho de peso. Além disso, apresentaram alterações nas enzimas hepáticas e na resposta imune celular (QUIST et al., 2000).

Em pintinhos ( $n = 40$ ) tratados com 200, 400 e 800  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de  $\text{AFB}_1$ , por 35 dias, foram verificadas lesões no fígado e rim em todos os tratamentos. Os sinais clínicos observados foram diminuição do peso corporal no tratamento com a maior dose (SKLAN; KLIPPER; FRIEDMAN, 2001).

No estudo de Salle et al. (2001) foram determinadas as concentrações de aflatoxinas em fígados de frangos de corte ( $n = 432$ ), com desenvolvimento abaixo da média do lote, provenientes de uma integração avícola (24 criadores) do Rio Grande do Sul. As concentrações variaram de 0,54  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  a 2,41  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , sendo que, conforme o aumento no tempo de estocagem do alimento foi observado aumento nas concentrações de aflatoxinas.

Galinhas poedeiras ( $n = 96$ ) brancas de linhagem comercial (Babcock), com 16 semanas de idade, tratadas com 100, 300 e 500  $\mu\text{g AFB}_1 \text{ Kg}^{-1}$  de ração, durante 8 semanas, apresentaram diminuição no consumo de ração (tratamento com 100  $\mu\text{g AFB}_1 \text{ Kg}^{-1}$  de ração) e no ganho de peso (tratamentos com 300 e 500  $\mu\text{g AFB}_1 \text{ Kg}^{-1}$  de ração). No entanto, a produtividade e a qualidade dos ovos não foram afetadas (OLIVEIRA et al., 2001).

Codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) ( $n = 256$ ), com 5 semanas de idade, submetidas a tratamentos com 25, 50 e 100  $\mu\text{g AFB}_1 \text{ Kg}^{-1}$  de ração, durante 168 dias, apresentaram alterações como vacuolização das células hepáticas e infiltração de ácidos graxos, no fígado. Nos tratamentos com as maiores doses, foram observadas diminuição no consumo de ração e no peso dos ovos (OLIVEIRA et al., 2002). Em estudo semelhante, as codornas ( $n = 24$ ) submetidas ao tratamento com a maior dose apresentaram diminuição no peso relativo do fígado e, adicionalmente, nas aves tratadas com 50 e 100  $\mu\text{g AFB}_1 \text{ Kg}^{-1}$  de ração foram observadas lesões hepáticas caracterizadas por degeneração vacuolar macrogoticular, desarranjo trabecular e hiperplasia de células de ductos biliares, que constituem indicadores de toxicidade crônica nessa espécie (OLIVEIRA et al., 2004).

Em estudo de administração oral de  $\text{AFB}_1$  e  $\text{FB}_1$ , pintinhos ( $n = 350$ ), com 21 dias de idade, foram submetidos a tratamentos com 10 mg de  $\text{FB}_1$ ; 50  $\mu\text{g AFB}_1$ ; 50  $\mu\text{g AFB}_1 + 10 \text{ mg de FB}_1$ ; 350  $\mu\text{g AFB}_1$ ; 350  $\mu\text{g AFB}_1 + 10 \text{ mg de FB}_1$ ; 2.450  $\mu\text{g AFB}_1$ ;

e 2.450  $\mu\text{g AFB}_1 + 10 \text{ mg de FB}_1 \text{ Kg}^{-1}$  de ração, durante 21 dias. Comparado com o grupo controle, a porcentagem de heterófilos diminuiu nos grupos tratados com 50  $\mu\text{g AFB}_1 + 10 \text{ mg de FB}_1$  e 2.450  $\mu\text{g AFB}_1$  ou em combinação com  $\text{FB}_1$ . Altas porcentagens de linfócitos foram detectadas nas aves que receberam 50  $\mu\text{g AFB}_1 + 10 \text{ mg de FB}_1$ , 350  $\mu\text{g AFB}_1 + 10 \text{ mg de FB}_1$  e 2.450  $\mu\text{g AFB}_1 + 10 \text{ mg de FB}_1 \text{ Kg}^{-1}$ . O último tratamento também ocasionou decréscimo nos níveis de albumina plasmática. O fígado das aves tratadas com  $\text{AFB}_1$  apresentou áreas de necrose e de infiltrados inflamatórios e os animais que receberam ração contendo somente  $\text{FB}_1$  apresentaram hiperplasia e fibrose do ducto biliar e infiltração mononuclear acompanhada de desarranjo trabecular. Em contraste, nos tratamentos com as duas toxinas foi observada degeneração hepática vacuolar e glomerulonefrite. Resíduos de  $\text{FB}_1$  foram detectados no fígado e na excreta de todos os grupos tratados com a toxina em concentrações variando de 0,013 a 0,051  $\text{mg Kg}^{-1}$  e de 1,19 a 2,79  $\text{mg Kg}^{-1}$ , respectivamente (Del BIANCHI et al., 2005).

Em outro estudo com pintinhos ( $n = 240$ ), 1 dia de idade, tratados com 3  $\text{mg Kg}^{-1}$  aflatoxinas de ração (83% de  $\text{AFB}_1$ ; 9,5% de  $\text{AFB}_2$ ; 4,2% de  $\text{AFG}_1$ ; e 3,3% de  $\text{AFG}_2$ ), durante 42 dias, foi observada diminuição no consumo de ração e no ganho de peso das aves, redução em 33,81% da massa das penas, aumento no peso do coração e fígado. As alterações histopatológicas observadas foram degeneração hepática, com reação proliferativa ductal e hiperplásica dos ductos biliares, depleção linfóide nas bursas, e nos rins, hemorragias multifocais e intensa degeneração gordurosa na forma de microvacuolização em células de alguns túbulos renais (GIACOMINI et al., 2006).

Salwa e Anwer (2009) em estudo com galinhas poedeiras White Leghorn ( $n = 40$ ), com 32 semanas de idade, tratadas com 25, 50 e 100  $\mu\text{g AFB}_1 \text{ Kg}^{-1}$  de ração por 60 dias, não observaram alteração na produção e peso dos ovos, no entanto, o consumo de ração diminuiu nas aves tratadas com as maiores doses. Adicionalmente, foi determinada a concentração de  $\text{AFB}_1$  presente nos ovos do 1° ao 7° dia de tratamento, após 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias de tratamento e sua estabilidade após o cozimento (5, 10, 15 e 20 minutos). A toxina foi detectada a partir do 10° dia em concentrações variando de 0,03 a 0,09  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  sendo que o cozimento por 20 minutos resultou na redução de no máximo 1% nas concentrações de  $\text{AFB}_1$ .

No Brasil, o limite máximo tolerado de aflatoxinas, segundo o Grupo de Trabalho para Micotoxinas do MAPA é de 20  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  ( $\text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$ )

para ração destinada à alimentação animal e a bovinos em lactação, exceto para ruminantes adultos; e de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  para rações, concentrados e outros alimentos completos para animais de todas as espécies nas fases pré-inicial e inicial (BRASIL, 2006). Nos Estados Unidos, segundo a FDA (2001), e na União Européia esse limite, para aves maduras, é de  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (somatório dos 4 análogos) e  $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$  ( $\text{AFB}_1$ ), respectivamente (FAO, 2003; EUROPEAN COMMISSION, 2011).

### Ocorrência de Aflatoxinas

Amostras de milho ( $n = 80$ ), destinado à produção de ração para aves, coletadas em duas fábricas localizadas nos municípios de Conceição da Feira e Entre Rios, Estado da Bahia, no período de fevereiro de 2005 a janeiro de 2006, apresentaram 10% de frequência de contaminação com  $\text{AFB}_1$  em concentrações de 1 a  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (ALMEIDA et al., 2009).

Rossi et al. (2013) avaliaram a contaminação por aflatoxinas em 95 amostras destinadas à alimentação de galinhas poedeiras, coletadas da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Londrina. As aflatoxinas foram detectadas em 69,7% das amostras em concentrações variando de 2,3 a  $48,44 \text{ ng g}^{-1}$  (média de  $9,61 \text{ ng g}^{-1}$ ).

A avaliação de 35 amostras de ração peletizada destinada à alimentação de frangos de corte que foram coletadas de fábricas da região de Río Cuarto, Província de Córdoba, Argentina, mostrou que 20% das amostras estavam contaminadas por  $\text{AFB}_1$  com concentrações variando de 1,92 a  $2,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (ASTORECA et al., 2011).

Kana et al. (2013) avaliaram 201 amostras de milho, farelo de amendoim e ração de frangos de corte e de galinhas poedeiras de Camarões quanto à contaminação por  $\text{AFB}_1$ . Foram detectadas  $\text{AFB}_1$  em 9,1% (7/77) das amostras de milho com concentrações variando de 2 a  $42 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (média de  $1,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) e em 100% (41/41) das amostras de farelo de amendoim com concentrações variando de 39 a  $950 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (média de  $161,4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ). As amostras de ração de frangos de corte e de galinhas poedeiras mostraram contaminação em 93,3% (28/30) e em 83% (44/53) com níveis médios de 11,1 e  $6,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , respectivamente.

## OCRATOXINA A

### Fungos Produtores

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário tóxico produzido por fungos

dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. que contaminam principalmente culturas de cereais como milho, trigo, cevada, centeio e aveia, bem como grãos de café, cacau, frutas secas e uva (LARSEN, SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001; VARGA et al., 1996). *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus steynii*, duas novas espécies de *Aspergillus* sp. tem sido consideradas as principais espécies produtoras, uma vez que produziram maiores níveis de ocratoxina A em relação ao *Aspergillus ochraceus*, considerado como o principal produtor por um longo período de tempo (CAST, 2003; GIL-SERNA et al., 2011).

*Aspergillus westerdijkiae*, *A. steynii* e *A. ochraceus*, principais produtoras de OTA pertencentes à seção *Circumdati*, apresentam crescimento em temperaturas entre  $24 - 31^\circ\text{C}$  e altos valores de  $a_w$  (0,95 – 0,99). Essas espécies fúngicas podem contaminar os cereais, sendo mais importantes em frutas secas estocadas, castanhas, café e cacau (CABANÃS et al., 2008; GIL-SERNA et al., 2011).

O segundo grupo de *Aspergillus* ocratoxigênicos, *Aspergillus* section *Nigri*, sendo *Aspergillus carbonarius* o principal representante, contaminam principalmente produtos tropicais e subtropicais, principalmente na fase de maturação de frutas, especialmente uvas (ABARCA et al., 1994). Recentemente, foi relatado que em temperaturas entre  $20$  e  $35^\circ\text{C}$  e  $a_w$  de 0,98, ocorre crescimento e produção de OTA por *A. niger* e *A. carbonarius* em milho em apenas 5 dias (ALBORCH et al., 2011). A capacidade de outras espécies em produzir OTA, como *A. awamori* e *A. japonicus*, tem sido relatada (DALCERO et al., 2002; MAGNOLI et al., 2003).

Entre as espécies de *Penicillium* sp., *P. verrucosum* e *P. nordicum* são as principais espécies produtoras de OTA. (CABAÑES, BRAGULAT, CATELLÁ, 2010). As condições ótimas para o crescimento e produção de OTA por *Penicillium verrucosum* são de  $20^\circ\text{C}$  e 0,95 de  $a_w$ , sendo estas condições geralmente encontradas em regiões de clima temperado, como o Norte da Europa e Canadá, ocasionalmente na região do Mediterrâneo, como Espanha, Itália, França e Portugal (CAIRS-FULLER, ALDRED, MAGAN, 2005). Nessas regiões, *P. verrucosum* desenvolve-se principalmente em cereais armazenados que não foram adequadamente secos (ALDRED; CAIRS-FULLER; MAGAN, 2008; JOINT FAO/WHO, 1999).

A ocorrência de OTA não é restrita somente a matérias-primas, mas também em produtos processados, devido a sua estabilidade térmica (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). OTA foi detectada em produtos derivados de cereais, como

alimentos infantis, cervejas (ARAGUÁS et al., 2005), café processado (BATISTA et al., 2009), pimentas secas (JALILI; JINAP, 2011), vinhos e sucos de uvas (BATILLANI; PIETRI, 2002), pão fabricado com trigo contaminado com OTA (SCUDAMORE; BANKS; MACDONALD, 2003) e rações (BEG et al., 2006).

O risco à saúde humana existe não somente por meio do consumo de produtos de origem vegetal contaminados, mas também de origem animal, como carne de frango e suíno, salsichas e leite, devido à transferência de OTA para os tecidos (DUARTE; LINO; PENA, 2011).

### Biossíntese

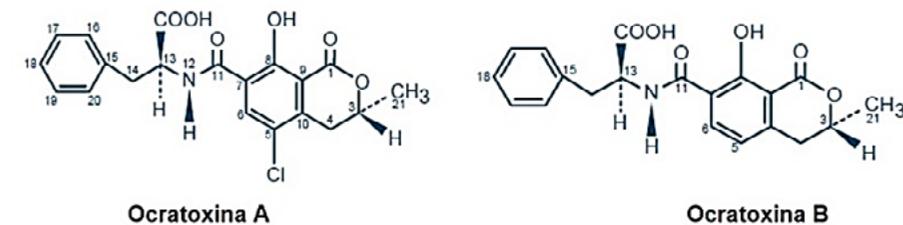
A OTA, quimicamente descrita 7-[L-β-fenilalanil carbonil] carboxil-5-cloro-8 hidróxi-3,4 diidro-3R metil isocumarina), é uma diidroisocumarina ligada ao aminoácido L-fenilalanina, na posição 7-carbonila, através de uma ligação amida (Figura 4) (CAST, 2003). Apresenta polaridade média, sendo solúvel em solventes orgânicos polares e solução aquosa bicarbonatada, mas fracamente solúvel em água. Além disso, é caracterizada pela presença de grupos cromóforos com propriedades fluorescentes sob luz UV a 335 nm. O grupo carboxil da fenilalanina não está ligado, razão pela qual a OTA é fracamente ácida (pKa 7,1) (VALENTA, 1998).

Ao menos 20 diferentes análogos de ocratoxinas foram caracterizados, como as ocratoxinas A, B, C, α, β, metiléster de OTα, 4-hidróxi-OTA, sendo a ocratoxina A a mais tóxica e de ocorrência natural (XIAO et al., 1995). A presença do átomo de cloro em um dos anéis diidroisocumarínicos da estrutura da OTA contribui para a sua atividade tóxica. A ocratoxina B, que contém um hidrogênio ao invés do átomo de cloro, é aproximadamente dez vezes menos tóxica que a OTA, enquanto que os produtos da hidrólise da OTA e da ocratoxina B, a ocratoxina α e β, respectivamente, não são tóxicas (XIAO et al., 1996).

A via biossintética da OTA não está completamente esclarecida. No entanto, estudos utilizando C-14 e C-13 marcados demonstraram que os precursores da ocratoxina A são a fenilalanina e a diidroisocumarina, derivados da via do chiquimato e da via pentacetida, respectivamente. A primeira etapa da via consiste na formação de uma cadeia policetida isocumarínica por meio da condensação de uma molécula de acetato (acetil-Coenzima A) com quatro moléculas de malonato. Na próxima etapa, a cadeia policetida é modificada por meio da formação de um anel lactona e da adição de um grupo carboxil derivado

de S-metilmetionina e formato de sódio. Subsequentemente, o átomo de cloro é incorporado pela ação da cloroperoxidase (formação de ocratoxina α), e, finalmente, a ocratoxina A sintase catalisa a ligação de fenilalanina à ocratoxina α, formando a OTA (HARRIS; MANTLE, 2001; YAMAZAKI; MAEBAYASHI; MIYAKI, 1971).

Figura 4 - Estrutura da ocratoxina A e ocratoxina B (Com permissão do CAST, 2003 para reprodução).



### Mecanismo de Ação

Os efeitos tóxicos da OTA são atribuídos principalmente ao detrimento do metabolismo das proteínas. A estrutura da OTA é similar à molécula de fenilalanina e, conseqüentemente, compete com a fenilalanina pelos sítios de ligação das enzimas fenilalanina-tRNA sintase e da fenilalanina hidroxilase, inibindo a síntese de proteínas, causando a perda de peso, redução da conversão alimentar, diminuição da produção de ovos, entre outros. Esta competição também causa hipoproteinemia e hipoalbuminemia, ainda mais agravadas pela depleção renal de albumina causada pelos danos renais relacionados à OTA. A alteração do metabolismo das proteínas eventualmente pode causar um aumento da susceptibilidade a várias infecções. Além disso, devido à inibição da síntese de proteínas, a OTA também afeta indiretamente a atividade de várias outras enzimas, como a fosfoenolpiruvato carboxilase citosólica, enzima chave na gliconeogênese, alterando o metabolismo dos carboidratos (DUARTE; LINO; PENA, 2011; RINGOT et al., 2006).

A toxicocinética e a toxicodinâmica são os fatores que determinam a toxicidade da OTA (RINGOT et al., 2006). Ao ser ingerida, a OTA é absorvida pelo trato gastrointestinal, e ao atingir a corrente sanguínea é ligada, em mais de 99%, a proteínas plasmáticas (principalmente a albumina - BSA). Esta ligação à BSA ocorre em dois sítios, um envolvendo forças hidrofóbicas relacionadas à

parte isocumarínica da toxina e o outro, envolve os centros catiônicos da BSA com o íon fenolato da toxina. Esta ligação prolonga o tempo de meia vida da OTA no organismo. Uma grande fração da OTA sofre excreção biliar seguida de reabsorção da toxina pelo intestino e reabsorção pelos túbulos renais, retornando à circulação sanguínea e favorecendo sua redistribuição a diferentes tecidos (FUCHS; HULTA, 1992). A reabsorção nos túbulos proximal e distal causa acumulação de OTA nos tecidos renais, resultando na alta susceptibilidade do rim aos danos causados por OTA (DUARTE; LINO; PENA, 2011). O mecanismo de toxicidade e carcinogenicidade de OTA não está totalmente esclarecido e existem resultados controversos sobre o mecanismo de ação (MALLY; HARD; DEKANT, 2007). De acordo com Aleo, Wyatt e Schnellmann (1991) a nefrotoxicidade da OTA pode estar relacionada com a disfunção mitocondrial que causa escassez de energia gerando espécies reativas de oxigênio. Em ratos, a nefrotoxicidade foi caracterizada por poliúria e alterações histopatológicas nos epitélios dos túbulos proximais, sendo que a patologia de OTA é geralmente restrita à medula externa e consiste na desorganização do arranjo dos túbulos e na degeneração celular (MALLY et al., 2005).

A concentração de OTA nos tecidos e no sangue depende da espécie animal, da dose administrada, da composição da alimentação, bem como do estado de saúde do animal. Os principais tecidos nos quais a OTA se acumula são rim, fígado, músculo, tecido adiposo e também tem sido encontrada no leite (FERRUFINO-GUARDIA et al., 2000; RINGOT et al., 2006).

### Efeitos Tóxicológicos em Aves

A OTA tem sido relacionada a diversas micotoxicoses humanas e animais. Os efeitos tóxicos incluem nefrotoxicidade, hepatotoxicidade (KUIPPER-GODMAN; SCOOT, 1989), teratogenicidade (WANGIKAR et al., 2004), imunotoxicidade (ELAROISSE et al., 2006) e carcinogenicidade. Além disso, é classificada como possivelmente carcinogênica para seres humanos (categoria 2B) pelo IARC (1993).

O primeiro relato de nefropatia relacionada com a ingestão de OTA ocorreu em aves. De 14 aves avaliadas, quatro apresentaram nefropatia caracterizada por atrofia e degeneração dos túbulos proximais e distais, bem como fibrose intersticial (ELLING et al., 1975).

Nos Estados Unidos, Hamilton et al. (1982) descreveram episódios de ocratoxicoses em perus, galinhas poedeiras e frangos de corte. As três espécies de

aves desenvolveram nefropatia, sendo que os perus apresentaram mortalidade acima de 59%, as galinhas poedeiras reduziram a produção de ovos e os frangos de corte apresentaram redução do ganho de peso e da conversão alimentar.

Além disso, em aves, a OTA aumenta a susceptibilidade e agrava o quadro clinicopatológico em caso de coccidioses (STOEV; KOYNARSKY; MANTLE, 2002), salmoneloses (GUPTA et al., 2008) e colibacilloses (KUMAR et al., 2004). Frangos de corte alimentados com ração artificialmente contaminada com OTA ( $800 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) durante cinco semanas, apresentaram redução do peso corpóreo, do consumo de ração, além de diminuição da taxa de conversão alimentar e aumento da mortalidade (ELAROISSE et al., 2006).

Sakthivelan e Rao (2010) contaminaram rações destinada a frangos de corte com OTA em concentrações de 1000 a 2000  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  e também relataram redução da taxa de crescimento, da ingestão de ração, da conversão alimentar, além da redução de proteínas séricas e albumina.

Em pintos alimentados com ração contaminada artificialmente com 5000  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA ocorreram efeitos degenerativos em fígado e rim, mudanças degenerativas e depleção de células em órgãos linfoides, degeneração e edemas em cérebro. Além disso, ocorreram hemorragias musculares e adenocarcinoma de fígado e rim (STOEV, 2010).

Em seres humanos, a OTA tem sido relacionada com tumores de bexiga e do trato urinário e com a nefropatia endêmica dos Balkans, condição envolvendo uma nefropatia crônica progressiva na região próxima ao Rio Danubio, abrangendo parte da Bulgária, Romênia e Iugoslávia (PETKOVA-BOCHAROVA; CHERNOZEMSKI; CASTEGNARO, 1998; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002).

Devido aos efeitos tóxicos causados pela OTA, a European Commission (2006 b) recomendou o limite máximo tolerável de 250  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para cereais e produtos de cereais destinados à alimentação animal e de 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  em ração destinada a aves. No Brasil, o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas do MAPA sugere que o limite máximo tolerado de OTA em rações e concentrados para frangos de corte seja de 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  (BRASIL, 2006).

### Ocorrência de Ocratoxina A

Sekiyama et al. (2005) avaliaram a contaminação por OTA em 121 produtos derivados de milho destinados ao consumo humano, em Maringá, Estado do Paraná. Os produtos analisados foram milho degerminado ( $n = 37$ ), farinha de milho ( $n = 17$ ), flocos de milho ( $n = 10$ ), sêmola de milho ( $n = 26$ ), pipoca ( $n = 24$ ) e farelo ( $n = 7$ ), sendo que a contaminação por OTA ocorreu em somente uma amostra de farinha de milho em concentração de  $64 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

Rosa et al. (2006) analisaram OTA em 96 amostras de ração destinadas à alimentação de frangos de corte, coletadas em quatro indústrias do Rio de Janeiro. A OTA foi detectada em 100% das amostras em níveis variando de  $1,3$  a  $80 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

Dalcerro et al. (2002) determinaram as concentrações de OTA em amostras de ração à base de milho para aves coletadas em indústrias argentinas, por um período de oito meses (maio de 1999 a abril de 2000). A OTA foi detectada em apenas três meses de amostragem (novembro, dezembro e janeiro), sendo que a frequência de contaminação foi de 38, 25 e 13 %, com concentração média de  $27 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Esses resultados mostram a dependência do tempo de estocagem e das condições de temperatura e umidade na produção de OTA, e destacam a importância das boas práticas de estocagem para a prevenção da produção dessa micotoxina. Além disso, a avaliação de OTA em matérias-primas estocadas para uso em ração animal é necessária a fim de determinar a ocorrência dessa micotoxina e seus riscos toxicológicos.

Jaimez et al. (2004) analisaram OTA em amostras de vários tipos ração ( $n = 39$ ) e matérias-primas de rações ( $n = 53$ ) (milho, glúten de milho, sementes de algodão e de palma). Do total, 14 amostras eram ração para aves, 11 amostras de ração para bovinos, oito amostras de ração para galinhas poedeiras e seis amostras de ração não especificada. Das 39 amostras de ração analisadas, OTA foi detectada em 13 (33 %) em concentrações variando de  $0,42$  a  $1,89 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Nas amostras das matérias-primas, 14 amostras apresentaram contaminação por OTA em concentração variando de  $0,47$  a  $12,24 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Apenas uma amostra de milho e uma de semente de algodão estavam contaminadas com OTA acima de  $5$  e  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , respectivamente.

Em estudo realizado por Martins et al. (2012) em Portugal foi avaliada a contaminação por OTA em 186 amostras de ração para galinhas poedeiras. OTA foi detectada em 12 amostras (6,41 %) com concentrações de  $3$  a  $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

### Co-ocorrência de Micotoxinas em Milho e Rações

A contaminação de alimentos e rações pode ocorrer por uma ou mais micotoxinas potencializando seus efeitos tóxicos. Portanto, é essencial a avaliação da co-ocorrência de micotoxinas.

A análise de 48 amostras de rações para frangos de corte do município de São José do Vale do Rio Preto, Estado do Rio de Janeiro, revelou 97,9% de positividade para  $\text{FB}_1$ , com concentrações variando de  $0,3$  a  $9,1 \mu\text{g g}^{-1}$ . Em 66,7% das amostras houve co-ocorrência de  $\text{FB}_1$  e  $\text{AFB}_1$ , que foi detectada em 66,3% das amostras em concentrações variando de  $2$  a  $21 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (OLIVEIRA, 2006).

Em estudo semelhante, Moreno et al. (2009) avaliaram a co-ocorrência de fumonisinas e aflatoxinas em 300 amostras de milho recém colhido da safra 2003 e 2004 do norte do Paraná coletadas na recepção e na fase de pré secagem. Na safra 2003 foram detectadas fumonisinas em 100% das amostras com médias de  $2,54 \mu\text{g g}^{-1}$  (recepção) e  $3,12 \mu\text{g g}^{-1}$  (pré-secagem). As aflatoxinas foram detectadas em 8,9% das amostras da recepção e em 16,7% das amostras de pré-secagem, com concentrações médias de  $24,1 \mu\text{g Kg}^{-1}$  e  $23,4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Por outro lado, na safra 2004, as fumonisinas foram detectadas em 98,9% (média de  $1,31 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e 95% (média de  $1,36 \mu\text{g g}^{-1}$ ) das amostras da recepção e pré-secagem, respectivamente. As aflatoxinas foram detectadas em 1,1% das amostras da recepção ( $40 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) e em 8,3% das amostras da pré-secagem ( $35,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ).

Em estudo de Rocha et al. (2009), 200 amostras de milho recém colhido (ano de 2005) de 4 diferentes regiões brasileiras ( $n = 50$  por região), Várzea Grande (Estado do Mato Grosso), Nova Odessa (Estado de São Paulo), Santa Maria (Estado do Rio Grande do Sul) e Oliveira do Campinhos (Estado da Bahia) foram analisadas quanto à contaminação por micotoxinas. As fumonisinas foram as micotoxinas mais frequentemente detectadas, sendo que 98% das amostras estavam contaminadas com  $\text{FB}_1$  e 74,5% com  $\text{FB}_1 + \text{FB}_2$ . Os níveis mais altos foram detectados nas amostras de Nova Odessa, com concentrações de  $\text{FB}_1$  e  $\text{FB}_2$  variando de  $0,091$  a  $9,67 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,017$  a  $3,06 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Das 200 amostras analisadas, 21 (10,5%) apresentaram contaminação por  $\text{AFB}_1$ , 7 (3,5%) com  $\text{AFB}_2$  e 1 (0,5%) com  $\text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$ . As amostras de Santa Maria foram as que apresentaram os maiores níveis de contaminação. Das 50 amostras, 7 estavam contaminadas com  $\text{AFB}_1$  (concentrações variando de  $13,7$  a  $1.393 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ); 5 com  $\text{AFB}_2$  (concentrações =  $5,6$  a  $55,7 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ); e uma com  $\text{AFG}_1$  ( $39,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) +  $\text{AFG}_2$  ( $29,7 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (ROCHA et al., 2009).

A análise de amostras de ração para aves (n = 480) coletadas em duas fábricas do Estado do Rio de Janeiro, no período de maio de 2003 a abril de 2004, revelou que a  $FB_1$  foi a micotoxina mais frequente, sendo detectada em 97,8% das amostras (1,5 a 5,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), seguida por  $AFB_1$  (66,7%; 1,2 a 17,5  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Em 64,5% das amostras houve co-ocorrência de  $FB_1$  e  $AFB_1$  (OLIVEIRA et al., 2006).

Machinski et al. (2001) analisaram 110 amostras de 48 cultivares de milho recém colhido provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, e duas amostras estavam contaminadas por OTA em concentrações de 128 e 206  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Adicionalmente, a  $AFB_1$  foi detectada em 60 amostras, em concentrações variando de 6 a 1600  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ .

Burukova et. al. (2012) analisaram amostras de milho, trigo, arroz, ração final, farelo de soja, glúten de milho, palha e silagem (n = 1.468), provenientes de fazendas de pecuária e de fábricas de ração animal localizadas em países da Ásia (China, Japão, Coreia do Sul, Taiwan, Malásia, Filipinas, Tailândia, Vietnã, Indonésia, Sri Lanka, Paquistão, Bangladesh, Índia) e Oceania (Nova Zelândia e Austrália).  $AFB_1$  foi detectada em 30,3% das amostras (concentração média de 46  $\mu\text{g kg}^{-1}$ );  $AFB_2$  em 17,4% (média = 7,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ );  $AFG_1$  em 5,7% (média = 8,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$ );  $AFG_2$  em 2,3% (média = 3,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ );  $FB_1$  em 46,3% (média = 1.093,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$ );  $FB_2$  em 30,6% (média = 524,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); OTA em 26,0% (média = 6,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Amostras de milho (n = 36) coletadas em mercados e em 6 regiões da zona agroecológica do Paquistão apresentaram média de contaminação com  $AFB_1$  de 15,58  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (83,3%) e de 3,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de OTA (77,7%) (SHAH et. al., 2010).

Devido aos efeitos tóxicos causados por micotoxinas, o seu monitoramento em alimentos e rações é essencial para evitar os riscos à saúde humana e animal, bem como os prejuízos econômicos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de micotoxinas constitui um problema para a indústria de alimentos, rações e produtores de animais que afeta todo o mundo. As micotoxinas contaminam principalmente os cereais e são estáveis ao processamento térmico dos alimentos, podendo ocorrer em produtos processados. Em aves, as micotoxinas causam diversos efeitos tóxicos, principalmente perda de peso, diminuição da conversão alimentar, diminuição da produção de ovos, além de efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e carcinogênicos, acarretando prejuízos para os produtores de animais.

Os riscos à saúde humana existem, não somente pela ingestão de cereais e derivados contaminados, mas também pela presença de micotoxinas em produtos de origem animal, uma vez que as micotoxinas, após serem metabolizadas pelo organismo, são redistribuídas para diferentes tecidos, como os músculos e ovos. As fumonisinas e a ocratoxina A são classificadas como possivelmente carcinogênicas para seres humanos e as aflatoxinas, como carcinogênicas.

Apesar da alta frequência de fumonisinas, aflatoxinas e ocratoxina A em milho e rações destinadas à alimentação de aves, a maioria dos estudos mostraram baixos níveis de contaminação, muitas vezes, abaixo do limite máximo tolerado pela European Commission, FAO e Legislação Brasileira. Porém, a presença dos baixos níveis de contaminação por micotoxinas em rações não deve ser negligenciado, uma vez que podem não causar efeitos tóxicos aparentes em animais, mas podem se acumular no organismo causando efeitos crônicos.

O número de países com legislação para os limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos e rações tem aumentado significativamente ao longo dos anos. Em 2003, período em que foi realizada a última pesquisa sobre os países com legislação para micotoxinas pelo *National Institute for Public Health and the Environment* contratado pela FAO, ao menos 99 países possuíam limites regulatórios para micotoxinas, o que significa um aumento de 30% em relação a 1995. Em 1995, aproximadamente, 23% da população mundial vivia em regiões onde não havia legislações vigentes para micotoxinas. Em 2003, esta porcentagem diminuiu para 13%, devido ao aumento do número de países na América Latina, Europa, África, Ásia e Oceania com regulamentação para micotoxinas. Comparando a situação em relação a 1995, aparentemente em 2003 houve um aumento no número de micotoxinas e de matérias-primas e produtos com limites regulatórios, enquanto que os limites tolerados permaneceram o mesmo ou tenderam a diminuir (FAO, 2004).

No Brasil, a Portaria nº7 de 1988 do MAPA (BRASIL, 1988) estabelecia um limite máximo para aflatoxinas de 50  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  em milho e em outras matérias-primas. Contudo, essa Portaria foi revogada pela Instrução Normativa de 2009 do MAPA (BRASIL, 2009), onde foram estabelecidos os padrões mínimos das matérias-primas empregadas na alimentação animal. Porém, essa Instrução Normativa não determina os limites para as micotoxinas. Em 2006, o MAPA criou o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas (BRASIL, 2006) que recomendou os limites máximos tolerados para micotoxinas em ração animal. O limite para

aflatoxinas, com essa nova proposta, diminuiu para 20 µg Kg<sup>-1</sup> e, além disso, foram recomendados também os limites para as fumonisinas e a ocratoxina A, que anteriormente não existiam no Brasil. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução RDC 07/2011 (BRASIL, 2011) estabeleceu limites máximos tolerados para micotoxinas destinada à alimentação humana. A implementação da Resolução deverá obedecer um cronograma, sendo que em 2012, já foram implementados os limites máximos tolerados de micotoxinas em alguns alimentos e em até 2016 serão implementados limites mais rigorosos.

As legislações para micotoxinas estão cada vez mais rigorosas e alguns países importadores podem banir ou restringir a importação de alguns produtos ou matérias-primas. Portanto, os países exportadores estão se adequando às novas exigências internacionais sobre os limites máximos tolerados de micotoxinas, visando a manutenção do mercado de seus produtos. Os efeitos econômicos causados pela diminuição dos limites máximos tolerados de micotoxinas são difíceis de prever. Contudo, os efeitos econômicos nem sempre são negativos e os limites mais rigorosos podem beneficiar os países exportadores, uma vez que podem comercializar produtos de alta qualidade.

Considerando a alta frequência de contaminação das rações por fumonisinas, aflatoxinas e ocratoxina A, estudos de monitoramento aliados a métodos eficientes de prevenção da contaminação natural por micotoxinas tanto no milho quanto durante o processamento de rações são essenciais para minimizar os riscos à saúde, aumentar a produtividade e assegurar a qualidade da carne, ovos e produtos derivados de frango.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, ao MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), à Fundação Araucária, ao Paraná Fundo SETI, à CAPES – Rede Nanobiotecnologia (04/CII-2008), pelo suporte financeiro. E.Y.S. Ono e E.Y. Hirooka agradecem ao CNPq pela concessão de Bolsa Produtividade, C.N. Rossi e J. G. Bordini à CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado e Doutorado, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994.
- ABIMILHO – Associação das Industrias de Milho. 2008. **Processos Industriais e Aplicações- Aproveitamento do milho**. Disponível em: [http://www.abimilho.com.br/estatistica/producao\\_mundial](http://www.abimilho.com.br/estatistica/producao_mundial). Acesso em: 20/10/2012.
- ALBORCH, L.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p. 53-57, 2011.
- ALDRED, D.; CAIRNS-FULLER, V.; MAGAN, N. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. **Journal Stored of Product Research**, v.44, p. 341-346, 2008.
- ALEO, M.D.; WYATT, R.D.; SCHNELLMANN, R.G. Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat proximal tubules. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 107, p. 73–80, 1991.
- ALMEIDA, A.V.A.F.; BOTURA, M.B.; ABREU, R.D.; BITTENCOURT, T.C.C.; BATATINHA, M.J.M. Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no estado da Bahia. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.3, p.353-358, 2009.
- ARAGUÁS, C.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. **Food Chemistry**, v. 92, p. 459-464, 2005.
- ASTORECA, A. L.; DALCERO, A. M.; FERNÁNDEZ PINTO, V.; VAAMOND, G. A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section Flavi in poultry feeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 38–43, 2011.
- BATISTA, L.R.; CHALFOUN, S.M.; SILVA, C.F.; CIRILLO, M.; VARGA, E.A.; SCHWAN, R.F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea Arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, p. 784-790, 2009.
- BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 639-643, 2002.
- BEG, M. U; AL-MUTAIRI, M; BEG, K. R; AL-MAZEEDI, H. M; ALI, L. N; SAEED, T. Mycotoxins in poultry feed in Kuwait. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.50, p.594-602, 2006.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, 2003.
- BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 82, p. 743-745, 1988.
- BLACKWELL, B.A.; EDWARDS, O.E.; FRUCHIER, A.; APSIMON, J.W.; MILLER, J.D. NMR structural studies of fumonisin B<sub>1</sub> and related compounds from *Fusarium moniliforme*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.392, p.75-91, 1996.

- BLOUNT, W.P. Turkey "X" disease. **Turkey**, v. 9, p. 52, 1961.
- BOJJA, R.S.; CERNY, R.L.; PROCTOR, R.H.; LIANGCHENG, D. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene – disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.2855-2860, 2004.
- BOLGER, M.; COKER, R.D.; DINOVI, M.; GAYLOR, D.; GELDERBLUM, W.; OLSEN, M.; PASTER, N.; RILEY, R. T.; SHEPHARD, G.; SPEIJERS, G. J. A. Fumonisin. In: **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO, Geneva, 2001. p.103–280.
- BORUTOVA, R.; ARAGON, Y. A.; NÄHRER, K.; BERTHILLER, F. Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010. **Animal Feed Science and Technology**, v.178, p.190-197, 2012.
- BRANHAM, B.E.; PLATTNER, R.D. Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v.124, p.99-104, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. 2011. **Aves**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acesso em: 11/10/2012.
- BRASIL. Portaria MA/ SNAD/ SFA nº 07, 09 de novembro de 1988. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece os padrões mínimos das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, 14 nov. 1988. Seção I, p. 21968.
- BRASIL. Portaria nº 130, 24 de maio de 2006. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, 25 de mai. 2006, Seção 2, p. 5.
- BRASIL. Instrução Normativa nº30, 5 de agosto de 2009. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece critérios e procedimentos para o registro de produtos, para rotulagem e propaganda e para isenção da obrigatoriedade de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, 07 de ago. de 2009, Seção 1, p. 13.
- BRASIL. Resolução RDC nº7, 18 de fevereiro de 2011. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, 22 de fev. de 2011, Seção 1, p. 72.
- BROWN, T.P.; ROTTINGHAUS, G.E.; WILLIAMS, M.E. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: Performance and pathology. **Avian Diseases**, v.36, p.450-454, 1992.
- BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.140-146, 2007.
- BUTKERAITIS, P. **Efeitos da fumonisin B<sub>1</sub> em codornas poedeiras (*Coturnix coturnix japonica*)**. 2003. 109p. **Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal)**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.
- CABAÑES, F. J.; BRAGULÁ, M. R.; CASTELLÁ, G. Ochratoxin A Producing Species in the Genus *Penicillium*. **Toxins**, v. 2, p. 1111-1120, 2010.
- CABAÑES, F.J.; BRAGULAT, M.R. Ochratoxin A in profiling and speciation. In: VARGA, J.; SAMSON, R.A. **Aspergillus in the Genomic**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008, p. 57–70.
- CAIRNS-FULLER, V.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1215-1221, 2005.
- CALDAS, E.D.; SADILKOVA, K.; WARD, B.L.; JONES, A.D.; WINTER, C.K.; GILCHRIST, D.G. Biosynthetic studies of fumonisin B<sub>1</sub> and AAL toxins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4734-4743, 1998.
- CAMARGOS, S.M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.226-229, 2000.
- CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa., n.139, 2003, 191p.
- CAWOOD, M.E.; GELDERBLUM, W.C.A.; VLEGGAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1958-1962, 1991.
- CHU, Y.-H.; SAFFHILL, R. Errors in DNA synthesis induced by aflatoxin B<sub>1</sub> modification of poly(dCdG). **Carcinogenesis**, v. 4, p. 643-646, 1983.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Produtos e serviços – safras – levantamentos de safra – 12º levantamento grãos safra 2011/2012 agosto de 2012**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/8218897d1eb5849906fc53856bdbc894.pdf>. Acesso em: 11/10/12.
- COULOMBE, R.A. Biological action of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.880-891, 1993.
- COTTY, P.J. Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: influence of pH. **Phytopathology**, v. 78: p. 1250-1253, 1988.
- DALCERO, A.; MAGNOLI, A.; HALLAK, C.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIO, G.; ROSA, C., A., R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 11, p. 1065-1072, 2002.
- Del BIANCHI, M.; OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J. L.; CORREA, B. Effects of Prolonged Oral Administration of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Fumonisin B<sub>1</sub> in Broiler Chickens. **Poultry Science Association**, v.84, p.1835-1840, 2005.
- DIENER, U.L.; COLE, R.J.; SANDERS, T.H.; PAYNE, G.A.; LEE, L.S.; KLICH, M.A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.249-270, 1987.
- DO, J. H.; CHOI, D-K. Aflatoxins: detection, toxicity and biosynthesis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, p. 585 – 593, 2007.

- DUARTE, S.C; LINO, C.M; PENA, A. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p. 1-13, 2011.
- ELAROUSSE, M.A.; MOHAMED, F.R.; EL BARKOUKY, E.M.; ATTA, A.M.; ABDOU, A.M.; HATAB, M.H. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 35, n. 4, p. 263- 269, 2006.
- ELLING, F., HALD, B., JACOBSEN, C., KROGH, P., Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. **Acta Pathology Microbiology et Immunologica Scandinava. – Sect. A**, v. 83, p. 739–741, 1975.
- EUROPEAN COMMISSION. Recomendação da comissão de 17 de Agosto de 2006 sobre a presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal. **Jornal Oficial da União Européia**, L 229/7- L 229/9, 2006a.
- EUROPEAN COMMISSION. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A. **The EFSA Journal**, p.1-56, 2006b.
- EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation of 16 June 2011 on undesirable substances in animal feed, 574/2011. **Official Journal of the European Union**, p. 159, 2011.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Rome, 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>. Acesso em: 07/08/2013.
- FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION CENTER FOR VETERINARY MEDICINE, November 9, 2001. **Background Paper in Support of Fumonisin Levels in Animal Feed: Executive Summary of this Scientific Support Document - Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds**.
- FERRUFINO-GUARDIA, E.V.; TANGNI, E.K.; LARONDELLE, Y.; PONCHAUT, S. Transfer of ochratoxin A during lactation: exposure of suckling via milk of rabbit does fed a naturally contaminated feed. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, p. 167–175, 2000.
- FUCHS, R.; HULTA, K. Ochratoxin A in blood and its pharmacokinetic. **Food and Chemical**, v. 30, p. 201-204, 1992.
- GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisins- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.7, p.1806-1811, 1988.
- GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B<sub>1</sub> in rats. **Carcinogenesis**, v.12, n.1-2, p.1247-1251, 1991.
- GIACOMINI, L.; FICK, F.A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; RAUBER, R.H.; ALMEIDA, C. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.234-239, 2006.
- GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; SARDIÑAS, N.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; PATIÑO, B. Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section Circumdati. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, v. 22, 343 – 345, 2011.
- GOLDBLATT, L.A. Control and removal of aflatoxin. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**. v. 48, p. 605-610, 1971.
- GOTO, T.; WICKLOW, D.T.; ITO, Y. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.4036–4038, 1996.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. 2<sup>a</sup>ed. New York: Wiley-Liss Inc., 1994.
- GUINDON, K. A.; BEDARD, L. L.; MASSEY, T. E. Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA from isolated mouse lung cells following in vivo treatment with aflatoxin B<sub>1</sub>. **Toxicological Science**, v. 98, p.57-62. 2007.
- GUPTA, S.; JINDAL, N.; KHOKHAR, R.S.; ASRANI, R.K.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of ochratoxin A and *Salmonella enterica serovar Gallinarum* infection on pathological changes in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 37, p. 265–272, 2008.
- HAMILTON, P.B.; HUFF, W.E.; HARRIS, J.R.; WYATT, R.D. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. **Poultry Science**, v. 51, p. 1832, 1982.
- HARRIS J.P.; MANTLE P.G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**. v. 58. p. 709–716, 2001.
- 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, p.188-192, 1993.
- HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 173 – 183, 1996.
- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Monographs. 1993. **Fumonisin B<sub>1</sub>**. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82-7B.pdf>. Acesso em: 06/05/2013.
- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some mycotoxins – Aflatoxins, p. 171-301. In: **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene**, v. 82, 2002 b.
- JAIMEZ, J.; FENTE, A.C.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A.; VÁZQUEA, B., I. A survey of the fungal contamination and presence of ochratoxin A and zearalenone on Spanish feed and raw materials. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 832-840, 2004.
- JALILI, M.; JINAP, S. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili. **Food Control**, p. 1-5, 2011.
- JOINT FAO/WHO. Position Paper on Ochratoxin A. **Codex Alimentarius Commission**, n.31, p. 22-26 Mar. 1999.
- KANA, J. R.; GNONLONFIN, B. G. J.; HAVEY, J.; WAINAINA, J.; WANJUK, I.; SKILTON, R. A.; TEGUIA, A. Assessment of aflatoxin contamination of maize, peanut meal and poultry feed mixtures from different agroecological zones in Cameroon. **Toxins**, v.5, p. 884-894, 2013.

KIRK, G.D.; LESI, O. A.; MENDY, M.; SZYMANSKA, K.; WHITTLE, H.; GOEDERT, J.J.; HAINAUT, P.; MONTESANO, R. 249(ser) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 24, p. 5858–5867, 2005.

KLICH, M.A.; MULLANEY, E.J.; DALY, C.B.; CARY, J.W. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A. tamarii* and *A. ochraceoroseus*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.605–609, 2000.

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

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. **Biomedical and Environmental Science**, v. 2, p.179-24, 1989.

KUMAR, A.; JINDAL, N.; SHUKLA, C.L.; ASRANI, R.K.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Pathological changes in broiler chickens fed ochratoxin A and inoculated with *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, v. 33, p. 413–417, 2004.

LARSEN, T.O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n. 8, p. 3630-3635, 2001.

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

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

MACHINSKI, M.; SOARES, L.V.S.; SAWASAKI, E.; BOLONHESI, E.; CASTRO, J.L.; BORTOLETTO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 1001-1007, 2001.

MAGNOLI, C.; VIOLANTE, M.; COMBINA, M.; PALACIO, G.; DALCERO, A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, p. 179-184, 2003.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L.; RAUBER, R.H. **Intoxicação experimental de frangos de corte com fumonisin B<sub>1</sub>**. 2005. Disponível em: [http://www.lamic.ufsm.br/papers/Fumonisin\\_em\\_frangos\\_de\\_corte.pdf](http://www.lamic.ufsm.br/papers/Fumonisin_em_frangos_de_corte.pdf). Acesso em: 02/02/2010.

MALLY, A.; VOLKEL, W.; AMBERG, A.; KURZ, M.; WANEK, P.; EDER, E.; HARD, G.; DEKANT, W. Functional, biochemical, and pathological effects of repeated oral administration of ochratoxin A to rats. **Chemical Research in Toxicological**, v. 18, p. 1242–1252, 2005.

MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLUM, W. C. A.; COETZER, J. A. W.; THIEL, P. G.; VANDERLUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.55, n.4, p.197-203, 1988.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; VINAS, I.; CANELA, R.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> PRODUCTION BY *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.298-301, 1995.

MARÍN, S.; MAGAN, N.; BELLÍ, N.; RAMOS, A.J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. Two-dimensional profiles of fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v.51, p.159-167, 1999a.

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

MARTINS, H. M.; ALMEIDA, I.; CAMACHO, C.; COSTA, J. M.; BERNARDO, F. A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds for swine and laying hens. **Mycotoxins Research**, v. 28, p. 107-110, 2012.

MAURICE, D.V.; BODINE, A.B.; REHRER, N.J. Metabolic effects of low Aflatoxin B<sub>1</sub> levels on broiler chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.3, p.980-984, 1983.

MERRILL JR., A.H.; SULLARDS, M.C.; WANG, E.; VOSS, K. A.; RILEY, R.T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, v. 109 (Supplement 2), p. 283–289, 2001.

MORENO, E.C.; GARCIA, G.T.; ONO, M.A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v.116, p.220–226, 2009.

MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D. C.; CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v. 87, p. 209-217, 1997.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in Maize Can We Reduce Their Occurrence? **Plant Disease**, v.81, n.6, p.556-565, 1997.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; DRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, 2006.

MUSSER, S.M.; GAY, M.L.; MAZZOLA, E.P.; PLATTNER, R.D. Identification of a new series of fumonisin containing 3-hidroxyppyridine. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 970 – 972, 1996.

NAGARAJ, R. Y; WU, W.D.; VESONDER, R. J. Toxicity of corn culture material of *Fusarium proliferatum* M-7176 and nutritional intervention in chicks. **Poultry Science**, v.73, n.5, p.617-626, 1994.

NEAL, G. E.; NIELSCH, U.; JUDAH, D. J.; HULBERT, P. B. Conjugation of model substrates or microsomal-activated aflatoxin B1 with reduced glutathione, catalysed by cytosolic glutathione-S-transferases in livers of rats, mice and guinea pigs. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, p. 4269-4276, 1987.

NELSON, P. E.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 233-252, 1993.

- NELSON, P.E.; PLATTNER, R.D.; SHACKELFORD, D.D.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.3, p. 984-989, 1992.
- OLIVEIRA, C.A.F.; ALBUQUERQUE, R.; CORREA, B.; KOBASHIGAWA, E.; REIS, T.A.; FAGUNDES, A.C.A.; LIMA, F.R. Produção e qualidade dos ovos de poedeiras submetidas à intoxicação prolongada com aflatoxina B<sub>1</sub>. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v.68, n.2, p.1-4, 2001.
- 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 B<sub>1</sub>. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.213-217, 2004.
- OLIVEIRA, C. A. F.; ROSMANINHO, J. F.; BUTKERAITIS, P.; CORREA, B.; REIS, T.A.; GUERRA, J. L.; ALBUQUERQUE, R.; MORO, M. E. G. Effect of low levels of dietary Aflatoxin B<sub>1</sub> on laying japanese quail. **Poultry Science**, v.81, p.976-980, 2002.
- OLIVEIRA, G. R. **Análises micológicas e micotoxológicas de rações de frangos de corte no município de São José do Vale do Rio Preto-RJ**. 2006. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Microbiologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- OLIVEIRA, G. R.; RIBEIRO, J. M.; FRAGA, M. E.; CAVAGLIERI, L. R.; DIREITO, G. M.; KELLER, K. M.; DALCERO A. M.; ROSA, C. A. R.. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v.162, p. 355-362, 2006.
- OLUBUYIDE, I. O. The natural history of primary liver cell carcinoma: a study of 89 untreated adult Nigerians. **Central African Journal of Medicine**, v.38, p.25-30, 1992.
- ONO, E. Y.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora in fumonisins freshly harvested corn of the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.147, p.139-148, 1999.
- ONO, E. Y. S.; FUNGARO, M. H. P.; SOFIA, S. H.; FIGUEIRA, E. L. Z.; GERAGE, A. C.; ICHINOE, M.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.158, p.451-455, 2004.
- ONO, E. Y. S.; SILVA, M.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; GARCIA, G. T.; KAWAMURA, O.; SABINO, M.; SUGIURA, Y.; HIROOKA, E. Y. Implication of pre-drying steps with natural fumonisin contamination levels in freshly harvested corn. **World Mycotoxin Journal**, v.1, n.3, p.341-347, 2008.
- PEERS, F. G.; LINSELL, C.A. Dietary aflatoxins and human liver cancer: a population study based in Kenya. **British Journal Cancer**, v.27, p.473-484, 1973.
- PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B.W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, v.93, p.689-703, 2001.
- PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I. N.; CASTEGNARO, M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. **Food Additives and Contaminants**, v.5, p. 299-301, 1998.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A.; PETROVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I. N.; CASTEGNARO, M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 283-302, 2002.
- PIER, A. C. An overview of the mycotoxicosis of domestic animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.163, p.1259-1261, 1973.
- PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Sciences**, v.70, p.3964-3967, 1992.
- PITT, J. I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.2, p. 266-269, 1986.
- PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D. Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v.117, p.17-22, 1992.
- PLEADIN, J.; VAHČIĆ, N.; PERŠI, N.; ŠEVELJ, D.; MARKOV, K.; FRECE, J. *Fusarium* mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. **Food Control**, v. 32, p. 49-54, 2013.
- PRATHAPKUMAR, S. H.; RAO, V. S.; PARAMKISHAN, R. J. Disease outbreak in laying hens arising from the consumption of fumonisin-contaminated food. **British Poultry Science**, v.38, p.475-479, 1997.
- QUEIROZ, V. A. V.; ALVES, G. L. O.; CONCEIÇÃO, R. R. P.; GUIMARÃES, L. J. M.; MENDES, S. M.; RIBEIRO, P. E. A.; COSTA, R. V. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, v. 28, p.83-86, 2012.
- QUIST, C.F.; BOUNOUS, D.I.; KILBURN, J.V.; NETTLES, V.F.; WYATT, R.D. The effect of dietary aflatoxin on wild turkey poults. **Journal of Wildlife Diseases**, v.36, n.3, p.436-444, 2000.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. G.; SCHALKWYK, D. J. V. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v.82, p.353-357, 1992.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H.F. Production of Fumonisin analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2101-2105, 2002.
- RILEY, R. T.; VOSS, K. A.; YOO, H-S.; GELDERBLOM, W. C. A.; MERRILL JR, A. H. Mechanism of fumonisin toxicity and carcinogenesis. **Journal of Food Protection**, v.57 p. 638-645, 1994.
- RILEY, R. T.; VOSS, K. A.; NORRED, W. P.; SHARMA, R. P.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Fumonisin: mechanism of mycotoxicity. **Revue Medecine Veterinaire**, v. 149, p. 617-626, 1998.
- RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p 18-46, 2006.
- ROCHA, L.O.; NAKAI, V.K.; BRAGHINI, R.; REIS, T.A.; KOBASHIGAWA, E.; CORRÊA, B. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, p. 5090 - 5193, 2009.

- 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, p. 89-96, 2006.
- ROSSI, C. N.; TAKABAYASHI, C.; ONO, M. A.; BORDINI, J. G.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; PINHEIRO, J. W.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. Exposure of laying hens to mycotoxins through naturally contaminated feed. **World Mycotoxin Journal**, v. 6, p. 199 – 207, 2013.
- ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWEILER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 3225-3226, 1990.
- SAKTHIVELAN, S. M.; RAO, G. V. S. Effect of ochratoxin A on body weight, feed intake and feed conversion in broiler chicken. **Veterinary Medicine International**, p. 1–4, 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.
- SALWA, A. A.; ANWER, W. Effect of naturally contaminated feed with aflatoxins on performance of laying hens and the carryover of Aflatoxin B<sub>1</sub> residues in table eggs. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, n.2, p.181-186, 2009.
- SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J.; MACDONALD, S. J. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during milling and bread production. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p.1153–116, 2003
- SEKIYAMA, L. B; RIBEIRO, A. B; MACHINSKI, P. A; MACHINSKI, M. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p. 289-294, 2005.
- SHAH, H. U.; SIMPSON, T. J.; ALAM, S.; KHATTAK, K. F.; PERVEEN, S. Mould incidence and mycotoxin contamination in maize kernels from Swat Valley, North West Frontier Province of Pakistan. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p.1111-1116, 2010.
- SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; Van SCHALKWYK, D. J.; KOCH, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n.10, p. 1900-1903, 1990.
- SYDENHAM, E. W.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P.G.; HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentrations in brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.994-997, 1992.
- SIEGAL, M. R.; LATCH, G. C. M.; JOHNSON, M. C. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review Phytopathology**, v. 25, p. 293-315, 1987.
- SKLAN, D.; KLIPPER, E.; FRIEDMAN, A. THE effect of chronic feeding of diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, and aflatoxin on performance, health, and antibody production in chicks. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.10, p.79-85, 2001.
- SMELA, M. E.; CURRIER, S. S., BAILEY, E. A., ESSIGMANN, J. M. The chemistry and biology of aflatoxin B<sub>1</sub>: from mutational spectrometry to carcinogenesis, **Carcinogenesis**, v. 22, p. 535–545, 2001.
- SORIANO, J. M.; DRAGACCI, S. Occurrence of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 985-1000, 2004.
- SORIANO, J. M.; GONZÁLEZ, L.; CATALÁ, A. I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B<sub>1</sub>. **Progress in Lipid Research**, v. 44, p. 345-356, 2005.
- SQUIRE, R. A. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. **Science**, v.214, p.877–880, 1981.
- STOEV, S. D. Studies on carcinogenic and toxic effects of ochratoxin A in chicks. **Toxins**, v. 2, p. 649-664, 2010.
- SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.175, p.149-163, 1999.
- SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.141–158, 1998.
- THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.1958-1962, 1991.
- THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S. GELDERBLOM, W. C. A.; NIEUWENHUIS, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.4, p. 1089-1093, 1991.
- TRAN, S. T.; TARDIEU, D.; AUVERGNE, A.; BAILLY, J. D.; BABILE, R.; DURAND, S.; BENARD, G.; GUERRE, P. Serum sphinganine and the sphinganine to sphingosine ratio as a biomarker of dietary fumonisins during chronic exposure in ducks. **Chemico - Biological Interaction**, v. 160, p. 41–50, 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**, Amsterdam, v.443, p.81-93, 1999.
- UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.-D.; SUGIURA, Y.; SEKIYAMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S.-Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.1143-1150, 1997.
- VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 75–92, 1998.
- Van EGMOND, H. P. Aflatoxin M<sub>1</sub>: occurrence, toxicity, regulation. In: Van EGMOND, H.P. (ed.), **Mycotoxins in Dairy Products**. London: Elsevier Applied Science, 1989, p.11–55.
- VARGA, J.; KEVEI, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A Production by *Aspergillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4461-4464, 1996.
- WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; MERRILL JR, A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 14486–90, 1991.

WANG, J. S.; QIAN, G-S.; ZARBA, A.; HE, X.; ZHU, Y-R.; ZHANG, B-C.; JACOBSON, L.; GAUGE, S. J.; MUÑOZ, A.; KENSLER, T. W.; GROOPMAN, J. D. Temporal Patterns of Aflatoxin-Albumin Adducts in Hepatitis B Surface Antigen-positive and Antigen-negative Residents of Daxin, Qidong County, People's Republic of China. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**.v.5, p.253-261, 1996.

WANGIKAR, P. B.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A. K.; SINHA, N. Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B<sub>1</sub>. ii. histopathological features of teratological anomalies induced in fetuses. **Birth Defects Research (Part B)**, v 71, p.352–358, 2004.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub>, and aflatoxin B<sub>1</sub> in the young turkey poult. **Poultry Science**, v.73, p.1517–1525, 1994.

WESTHUIZEN, L.V.D.; SHEPHARD, G.S.; SCUSSEL, L.L.F.C.; 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.

XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R.R.; SUZHEN, L.; VODELA, J.K.; FROHLICH, A.A.; KEMPPAINEN, B.W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure–activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v 137, p.182–192, 1996.

XIAO, H.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; LING, Y.Z. Synthesis and Structural Elucidation of Analogs of Ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 524-530, 1995.

YAMAZAKI, M.; MAEBAYASHI, Y.; MIYAKI, K.; Biosynthesis of ochratoxin A. **Tetrahedron Letter**, v. 25, p. 2301–2303. 1971.

*Received 17 May 2013*  
*Accepted 19 August 2013*