



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINA NACHI ROSSI

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE EXPOSIÇÃO DE FRANGOS DE  
CORTE E GALINHAS POEDEIRAS À CONTAMINAÇÃO  
NATURAL POR FUMONISINAS E AFLATOXINAS**

---

Londrina  
2011



**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R831a Rossi, Carolina Nachi.  
Avaliação do risco de exposição de frangos de corte e galinhas poedeiras à  
contaminação natural por fumonisinas e aflatoxinas / Carolina Nachi Rossi. –  
Londrina, 2011.  
122 f. : il.

Orientador: Elisabete Yurie Sataque Ono.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.  
Inclui bibliografia.

1. Micotoxinas – Teses. 2. Aflatoxina – Teses. 3. Teste imunoenzimático – Teses.  
4. Aves poedeiras – Alimentação e rações – Teses. 5. Aves domésticas – alimentação e  
rações – Teses. I. Ono, Elisabete Yurie Sataque. II. Universidade Estadual de Londrina.  
Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 641:579

CAROLINA NACHI ROSSI

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE EXPOSIÇÃO DE FRANGOS DE CORTE E  
GALINHAS POEDEIRAS À CONTAMINAÇÃO NATURAL POR  
FUMONISINAS E AFLATOXINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Benedito Corrêa  
USP – São Paulo - SP

---

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 18 de agosto de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais, avós e amigos  
pelo carinho, apoio e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono pela orientação e ensinamentos indispensáveis para a realização desse trabalho.

Ao Fundo Paraná/SETI, à Fundação Araucária, CNPq, PPSUS/Ministério da Saúde e CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. João Waine Pinheiro pela disponibilização das amostras de ração destinada a galinhas poedeiras.

Aos funcionários da Granja Experimental da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina pela colaboração.

Ao proprietário e funcionários da granja comercial pela disponibilização e auxílio nas amostragens de ração destinada a frangos de corte.

Ao Dr. Osamu Kawamura pelo fornecimento de hibridoma produtor de anticorpo monoclonal anti-AFB<sub>1</sub>.

À Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka, pelo auxílio e ensinamentos.

Aos professores do Programa de Mestrado em Biotecnologia, pelo auxílio e colaboração em diversos aspectos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC/UEL): Nelson Rodriguez, Elda Aguiar, Sílvia Borba, Sérgio Evangelista, Sandra Aparecida Defende, Neusa de Souza pela amizade, colaboração e auxílio.

Aos amigos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA/UEL), Tatiane Oliveira, Luciana Bernd, Patrícia Sambatti, Angélica Ishikawa, Thiago Souza, Tatiana Miguel, Dani Luce da Silva, Joice dos Santos, por toda amizade e colaboração

e, em especial, à Cássia Reika Takabayashi pela indispensável ajuda, dedicação e enorme contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos, colegas de curso, de laboratório e estagiários Jaqueline Bordini, Lucas Bissoqui, Fernando Bazani, Kelly Goes, Luciana Grade, Paulo Marcelino, Leonardo Cardoso, Patrícia Bittencourt, Alessandra Gasperini, Ana Carolina Corazza, Andressa Lofrano, Gervásio Saito, Thaís Lemes, Thiago Zaninelli, Ismael Amador, Jurandir Pinto, Emilyn Matsumura, Eddie Imada e em especial à Ana Elisa Vercelheze, Aline de Souza e Adriana Petri pela amizade e companheirismo no decorrer do curso e no dia-a-dia.

Aos amigos, Emanule França, Luís Lescano, Gabriele Freiria, Isabela Domiciano, Bárbara Arakaki, Ana Paula Liboni, Kristie Yamamoto, Gihan Jebai, Soraya Jebai, Leila Rostirola, Gustavo Jabor, Ana Carolina Delchiaro, Marcelo Abreu, Kelly Mathias, Kátia Rocha e Francine Pallermmo pela força e alegria que sempre me proporcionam.

Aos meus pais, Cacilda Tomoko Nachi Rossi e Dorival Rossi pelo amor, compreensão, apoio, incentivo e carinho a mim dedicados, sem os quais não chegaria até aqui.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

ROSSI, C. N. **Avaliação do risco de exposição de frangos de corte e galinhas poedeiras à contaminação natural por fumonisinas e aflatoxinas.** 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

## 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 indústria avícola. As micotoxinas estão associadas a problemas de saúde humana e animal e, ao serem metabolizadas pelos animais podem ocorrer em carne, ovos e leite. Dentre elas, destacam-se as aflatoxinas, devido à elevada toxicidade e as fumonisinas, por serem as micotoxinas de maior ocorrência em milho e derivados. Portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos sensíveis e rápidos de detecção de micotoxinas, visando o controle de qualidade dos produtos destinados ao consumo humano e animal. Os métodos imunoenzimáticos como os enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) destacam-se por serem rápidos, específicos e permitirem a análise de várias amostras por ensaio. Entretanto, no Brasil, há a dependência de importação de kits de ELISA comerciais. Assim, investimentos na produção de imunoreagentes constituem uma alternativa para redução de tempo e custos. Este estudo teve como objetivos padronizar e validar intra-laboratorialmente um ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) para detecção de aflatoxinas em rações destinadas a aves, assim como avaliar o risco de exposição de frangos de corte e galinhas poedeiras a fumonisinas e aflatoxinas. Um ic-ELISA baseado em anticorpo monoclonal anti-aflatoxina B<sub>1</sub> (AcM anti-AFB<sub>1</sub>) foi padronizado, validado e seu desempenho foi comparado com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e kit de ELISA comercial. O ic-ELISA apresentou linearidade adequada ( $R^2 = 0,994$ ) e limites de detecção e quantificação de, respectivamente, 1,25 e 1,43 ng g<sup>-1</sup> (ração para frangos de corte) e de 1,41 e 1,75 ng g<sup>-1</sup> (ração para galinhas poedeiras). Os parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária apresentaram desvios padrão relativos médios menores que os recomendados pela Commission of the European Communities (CEC), os quais foram de 8,03% e 11,58% (ração para frangos de corte) e 6,94% e 12,49% (ração para galinhas poedeiras). Quanto à exatidão, as taxas de recuperação de aflatoxinas variaram de 90% a 107% (ração para frangos de corte) e de 98% a 103% (ração para galinhas poedeiras) situando-se entre os valores recomendados pela CEC. A análise por CLAE, ic-ELISA e ELISA comercial detectou aflatoxinas em 88,2%, 88,2% e 100% das amostras de ração para frangos de corte (n = 34) e em 92%, 92% e 97,2% das amostras de ração para galinhas poedeiras (n = 36). Os coeficientes de correlação linear entre CLAE-ic-ELISA foram de 0,97 e 0,98; entre CLAE-ELISA comercial de 0,76 e 0,93; e entre ELISA comercial-ic-ELISA de 0,82 e 0,95, considerando as análises de ração de frangos de corte e de galinhas poedeiras, respectivamente. A maioria das rações destinadas a frangos de corte (52,9%) e a galinhas poedeiras (61,1%) apresentou razões ic-ELISA/CLAE entre 0,81 e 1,8. Paralelamente, foram avaliados a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) e aflatoxinas em quatro tipos de rações (pré-inicial, inicial, engorda e abate) destinadas a frangos de corte (n = 158) coletadas em uma granja comercial na região norte do Estado do Paraná e em rações destinadas a galinhas poedeiras (n = 98) coletadas na granja experimental da Universidade Estadual de Londrina, nos períodos de junho a agosto e de janeiro a dezembro de 2010, respectivamente. A determinação da contaminação fúngica foi realizada pelo método “Pour plate” empregando Ágar Batata Dextrose (BDA), enquanto que os níveis de fumonisinas e aflatoxinas foram determinados por CLAE e por ic-ELISA,

respectivamente. *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foram os gêneros de maior prevalência (97 a 100%) nos quatro tipos de ração destinadas a frangos de corte, enquanto *Fusarium* spp. foi detectado em menores frequências que variaram de 11% para ração pré-inicial a 30,3% para ração de abate. FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foram detectadas em 100% das amostras de ração pré-inicial (médias de 0,41 e 0,27 µg g<sup>-1</sup>) e inicial (médias de 0,45 e 0,16 µg g<sup>-1</sup>); em 91,9% (média = 0,48 µg g<sup>-1</sup>) e 81,1% (média = 0,23 µg g<sup>-1</sup>) nas amostras de ração de engorda e em 91% (média = 0,40 µg g<sup>-1</sup>) e 45,5% (média = 0,23 µg g<sup>-1</sup>) nas amostras de ração de abate. Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05) nos níveis médios de fumonisinas entre os quatro tipos de ração, sendo que predominaram baixos níveis da micotoxina (0,1 a 1,0 µg g<sup>-1</sup>). Aflatoxinas foram detectadas em 44% das amostras pré-inicial (média = 2,33 ng g<sup>-1</sup>), em 55% das amostras de ração inicial (média = 5,70 ng g<sup>-1</sup>), em 85% das amostras de engorda (média = 6,27 ng g<sup>-1</sup>) e em 82% das amostras de abate (média = 3,65 ng g<sup>-1</sup>), respectivamente. Entretanto, a maioria das amostras (93%) apresentou níveis abaixo de 6,0 ng g<sup>-1</sup>. Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05) nos níveis médios de aflatoxinas entre os quatro tipos de ração. Considerando os maiores níveis de FB<sub>1</sub> detectados nos quatro tipos de ração, foi calculado o consumo máximo diário provável desta toxina. Para todos os tipos de ração estes valores foram inferiores ao LOAEL (lowest observed adverse effect level) tolerado para frangos de corte segundo a European Food Safety Authority (EFSA). Com relação às aflatoxinas, 97% das amostras apresentaram níveis abaixo do limite considerado seguro pela EFSA. Nas amostras de ração destinadas a galinhas poedeiras, *Fusarium* spp. foi o gênero de maior prevalência (99%), seguido por *Penicillium* spp. (97%) e *Aspergillus* spp. (90%). Os níveis de fumonisinas variaram de 0,20 a 5,06 µg g<sup>-1</sup> (média = 1,47 µg g<sup>-1</sup>), no entanto, a maioria das amostras (67,4%) apresentou baixos níveis de fumonisinas (0,03 a 2,0 µg g<sup>-1</sup>). FB<sub>1</sub> foi detectada em 89,8% das amostras (média = 0,87 µg g<sup>-1</sup>), enquanto FB<sub>2</sub> foi detectada em 78,6% das amostras (média = 0,49 µg g<sup>-1</sup>). Aflatoxinas foram detectadas em 71,4% das amostras (média = 12,37 ng g<sup>-1</sup>), no entanto, a maioria das amostras positivas (53%) apresentou níveis abaixo de 5,0 ng g<sup>-1</sup>. Em 61,2% das amostras houve co-ocorrência de fumonisinas e aflatoxinas. O maior nível de fumonisinas detectado neste estudo foi 12 vezes menor que o valor de LOAEL, enquanto que 84,3% das amostras apresentaram níveis de aflatoxinas abaixo do limite considerado seguro pela EFSA. Considerando a alta frequência de contaminação das amostras de ração por fumonisinas e aflatoxinas, torna-se essencial o monitoramento contínuo da contaminação de milho e rações por micotoxinas ao longo de toda a cadeia produtiva a fim de minimizar as perdas econômicas e os riscos à saúde humana e animal. O ic-ELISA padronizado e validado demonstrou sensibilidade, confiabilidade e uma boa correlação com o HPLC, apresentando potencial para triagem de aflatoxinas em amostras de ração para aves.

**Palavras chave:** Micotoxinas. Fumonisinas. Aflatoxinas. Rações. Frangos de corte. Galinhas poedeiras. Risco de exposição. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

ROSSI, C. N. **Evaluation of broiler and laying hen exposure degree to natural fumonisin and aflatoxin contamination.** 2011. 122 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

Brazil is the world's third largest producer of chickens 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 human and animal health risks, and, additionally, when metabolized by animals may occur in meat, eggs and milk. The main groups of mycotoxins associated to corn crop include aflatoxins, due to the high toxicity, and fumonisins because they are the most frequent mycotoxins in corn and derivatives. Therefore, the development of sensitive and rapid mycotoxin detection methods is essential for quality control of products intended for human and animal consumption. Alternative approaches include the immunoenzymatic methods such as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) because they are fast, specific and allow the analysis of a large number of samples per assay. However, Brazil is dependent on importation of commercial ELISA kits. Thus, investments in immunoreagent production can reduce time and costs. The aims of this study were to standardize and intra-laboratorially validate an indirect competitive ELISA (ic-ELISA) for detection of aflatoxins in poultry feeds, and assess the exposure degree of broilers and laying hens to fumonisins and aflatoxins. An ic-ELISA based on anti-aflatoxin B<sub>1</sub> (MAb anti-AFB<sub>1</sub>) monoclonal antibody was standardized, validated and its performance was compared to high performance liquid chromatography (HPLC) and commercial ELISA kit. The ic-ELISA showed adequate linearity ( $R^2 = 0.994$ ) and detection and quantification limits of, respectively, 1.25 and 1.43 ng g<sup>-1</sup> (broiler feed) and of 1.41 and 1.75 ng g<sup>-1</sup> (laying hen feed). The repeatability and intermediate precision parameters showed mean relative standard deviations lower than the recommended values by the Commission of the European Communities (CEC), which were 8.03% and 11.58% (broiler feed) and 6.94% and 12.49% (laying hen feed). Concerning accuracy the aflatoxin recovery rates ranged from 90% to 107% (broiler feed) and from 98% to 103% (laying hen feed) and these values were in accordance with those recommended by the CEC. The HPLC, ic-ELISA and commercial ELISA analysis detected aflatoxins in 88.2%, 88.2% and 100% of broiler feed samples (n = 34) and in 92%, 92% and 97.2% of laying hen feed samples (n = 36). The linear correlation coefficients between HPLC and ic-ELISA were 0.97 and 0.98; 0.76 and 0.93 between HPLC and commercial ELISA kit; and 0.82 and 0.95 between commercial ELISA and ic-ELISA for broiler and laying hen feed analysis, respectively. Most of broiler (52.9%) and laying hen (61.1%) feed samples showed ic-ELISA/HPLC ratio between 0.81 and 1.8. In addition, the mycoflora and fumonisin (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) and aflatoxin levels were evaluated in four feed types intended for broilers (n = 158), collected from a poultry breeding in Northern Paraná State, and in 98 feed samples intended for laying hens collected at the Experimental Farm of the State University of Londrina, from June to August and from January to December 2010, respectively. Mycoflora contamination was accessed by "Pour plate" method using Potato Dextrose Agar (PDA), whereas fumonisin and aflatoxin levels were determined by HPLC and ic-ELISA, respectively. *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. were the prevalent genera (97 to 100%) for the four feed types, while *Fusarium* sp. was detected at lower frequencies of contamination ranging from 11% for pre-starter to 30.3% for finisher feed types. FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were detected in 100% pre-starter (means of 0.41 and 0.27 µg g<sup>-1</sup>) and starter (means of 0.45 and 0.16 µg g<sup>-1</sup>) feed samples; in 91.9% (mean = 0.48 µg g<sup>-1</sup>) and 81.1% (mean = 0.23 µg g<sup>-1</sup>)

of grower feed samples and in 91% (mean = 0.40  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and 45.5% (mean = 0.23  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) of finisher samples. There was no significant difference by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) in the mean fumonisin levels among all the feed types and most samples showed low fumonisin levels (0.1 to 1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Aflatoxins were detected in 44% pre-starter (mean = 2.33  $\text{ng g}^{-1}$ ), in 55% starter samples (mean = 5.70  $\text{ng g}^{-1}$ ), in 85% grower (mean = 6.27  $\text{ng g}^{-1}$ ) and in 82% finisher (mean = 3.65  $\text{ng g}^{-1}$ ), respectively. However, most of samples (93%) showed levels below 6.0  $\text{ng g}^{-1}$ . There was no significant difference by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) in the mean levels of contamination among all the types of feed. Considering the highest FB<sub>1</sub> levels detected in the four types of feed, the probable maximum daily intake of this toxin was calculated. For all the types of feed the values were below the LOAEL (lowest observed adverse effect level) for broilers according to the European Food Safety Authority (EFSA). Concerning aflatoxins, 97% of positive samples showed levels below the safety limit according to the EFSA. In laying hen feed samples *Fusarium* sp. was the prevalent genera (99%), followed by *Penicillium* sp. (97%) and *Aspergillus* sp. (90%). Fumonisin levels ranged from 0.20 to 5.06  $\mu\text{g g}^{-1}$  (mean = 1.47  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), but most samples (67.4%) showed low fumonisin levels (0.03 to 2.0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). FB<sub>1</sub> was detected in 89.8% samples (mean = 0.87  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), while FB<sub>2</sub> was detected in 78.6% samples (mean = 0.49  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Aflatoxins were detected in 71.4% of samples (mean = 12.37  $\text{ng g}^{-1}$ ), however, most samples (53%) showed levels below 5.0  $\text{ng g}^{-1}$  and 61.2% of samples showed co-contamination by fumonisins and aflatoxins. The highest fumonisin level detected in this study were 12-fold lower than the LOAEL, whereas, 84.3% samples showed aflatoxin levels below the safety limit according to the EFSA. Considering the high frequency of fumonisin and aflatoxin contamination, the continuous monitoring of corn and feed mycotoxin contamination throughout the producing chain is essential in order to minimize economic losses and human and animal health risks. The ic-ELISA standardized and validated showed sensitivity, reliability and good correlation with HPLC, indicating its potential for aflatoxins screening in poultry feed.

**Keywords:** Mycotoxins. Fumonisin. Aflatoxins. Feed. Broilers. Laying hens. Exposure degree. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras no período de 08/01/10 a 23/01/10.....	47
<b>Tabela 2</b> – Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras no período de 24/01/10 a 22/04/10.....	47
<b>Tabela3</b> – Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras no período de 23/04/10 a 19/06/10.....	48
<b>Tabela 4</b> – Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras no período de 20/06/10 a 30/08/10.....	48
<b>Tabela 5</b> – Exemplos de fórmulas de ração com base nos ingredientes milho e farelo de soja para atender as diferentes fases da produção de frangos .....	49
 <b>Artigo A</b>	
<b>Table 1</b> – Repeatability and intermediate precision of ic-ELISA for aflatoxin (AF) determination in laying hen feed and broiler feed.....	67
<b>Table 2</b> – Accuracy of ic-ELISA evaluated through total aflatoxin recovery from feed samples intended for broilers and laying hens .....	69
<b>Table 3</b> – Natural occurrence of aflatoxins in feed samples intended for broilers and for laying hens evaluated by ic-ELISA, ELISA Ridascreen <sup>®</sup> and HPLC.....	71
<b>Table 4</b> – ic-ELISA/HPLC ratio in feed intended for broilers and for laying hens from northern Paraná State.....	73
 <b>Artigo B</b>	
<b>Table 1</b> – Water activity ( $a_w$ ) and relative frequency of the main fungal genera and distribution of fungal counting levels in four feed types collected from a poultry breeding in the Northern Paraná State (n=158).....	85
<b>Table 2</b> – Relative frequency and fumonisin levels in feed samples (n=158) intended for broiler from Northern Paraná State.....	86
<b>Table 3</b> – Relative frequency and aflatoxin levels in feed samples (n=158) intended for broiler from Northern Paraná State.....	88

<b>Table 4</b> – Weight, feed consumption, FB <sub>1</sub> levels and maximum FB <sub>1</sub> probable daily intake at the four stages of poultry breeding .....	91
--	----

### **Artigo C**

<b>Table 1</b> – Profile of <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. and total fungal colony count in 98 feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State .....	102
--	-----

<b>Table 2</b> – Fumonisin and aflatoxin contamination in 98 feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State .....	103
---	-----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura das aflatoxinas de ocorrência natural.....	23
<b>Figura 2</b> – Via biossintética das aflatoxinas .....	24
<b>Figura 3</b> – Esquema da metabolização da aflatoxina B <sub>1</sub> . As linhas cheias representam via conhecidas, enquanto que, as linhas tracejadas representam vias hipotéticas.....	26
<b>Figura 4</b> – Estruturas químicas das fumonisinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> e B <sub>3</sub> .....	34
<b>Figura 5</b> – Via biossintética das fumonisinas .....	35
<b>Figura 6</b> – Biossíntese dos esfingolipídios em células animais. O símbolo X indica a via enzimática inibida pela fumonisina B <sub>1</sub> .....	37
<b>Figura 7</b> – Estrutura química da FB <sub>1</sub> e dos principais metabólitos dos esfingolipídios .....	38
<b>Figura 8</b> – Efeito da FB <sub>1</sub> no peso corpóreo de patos tratados com 0 (esquerda) ou 128 mg FB <sub>1</sub> kg <sup>-1</sup> de ração (direita). A) após 14 dias de tratamento, B) após 35 dias de tratamento .....	39
<b>Figura 9</b> – Amostragem da ração destinada à alimentação de galinhas poedeiras .....	50
<b>Figura 10</b> – Amostragem da ração destinada à alimentação de frangos de corte. Em sequência: silo, caixa de abastecimento e pratos de arraçãoamento .....	50
<b>Figura 11</b> – Esquema de ic-ELISA.....	54

### Artigo A

<b>Figure 1</b> – Standard curve for AFB <sub>1</sub> detection by ic-ELISA. Circles represent the mean binding from seven standard curves performed on different days. Bars represent standard deviations. The detection limit was 0.036 ng ml <sup>-1</sup> (1.25 ng g <sup>-1</sup> ) for feed intended for broiler (dashed line) and 0.040 ng ml <sup>-1</sup> (1.41 ng g <sup>-1</sup> ) for feed intended for laying hen (continuous line), corresponding to the minimum concentration over 3 and 5% inhibition, respectively (mean minus 3-fold SD of 0 ng ml <sup>-1</sup> AFB <sub>1</sub> ) detected by ic-ELISA.....	66
<b>Figure 2</b> – Correlation between HPLC, ic-ELISA and ELISA Ridascreen <sup>®</sup> data for aflatoxin determination in naturally contaminated feed samples	

intended for broilers (column A, n = 34) and for laying hens (column B, n = 36) .....	70
---	----

**Artigo B**

<b>Figure 1</b> – Distribution of fumonisin (FB <sub>1</sub> +FB <sub>2</sub> ) levels (A) and aflatoxin levels (B) in feed samples from Northern Paraná State.....	89
---	----

**Artigo C**

<b>Figure 1</b> – Relative frequency of the main fungal genera in 98 feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State .....	102
<b>Figure 2</b> – Distribution of fumonisin (FB <sub>1</sub> +FB <sub>2</sub> ) levels in 98 feed samplesintended for laying hens from Northern Paraná State.....	103
<b>Figure 3</b> – Distribution of aflatoxin levels in 98 feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State .....	104

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
2.1	MICOTOXINAS	20
2.1.1	Aflatoxinas	22
2.1.1.1	Fungos produtores	22
2.1.1.2	Estrutura química	23
2.1.1.3	Biossíntese	24
2.1.1.4	Mecanismo de ação das aflatoxinas	25
2.1.1.5	Efeitos toxicológicos em aves	27
2.1.1.6	Imunoensaio para análise de aflatoxinas	29
2.1.2	Fumonisinias	31
2.1.2.1	Fungos produtores	31
2.1.2.2	Estrutura química	33
2.1.2.3	Biossíntese	34
2.1.2.4	Biossíntese de Esfingolipídios e mecanismo de ação das fumonisinias	36
2.1.2.5	Efeitos toxicológicos em aves	39
2.2	INTERAÇÕES ENTRE MICOTOXINAS	40
2.3	OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS E AFLATOXINAS EM MILHO E RAÇÕES NO BRASIL	42
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	46
3.1	OBJETIVO GERAL	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	47
4.1	RAÇÃO DESTINADA À ALIMENTAÇÃO DE GALINHAS POEDEIRAS	47
4.2	RAÇÃO DESTINADA À ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	48
4.3	AMOSTRAGEM	49
4.4	DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA	50
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA	51
4.6	DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS NAS AMOSTRAS DE RAÇÃO	51

4.6.1	Extração de Fumonisinas.....	51
4.6.2	Determinação de Fumonisinas .....	51
4.7	DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS NAS AMOSTRAS DE RAÇÃO POR CLAE.....	52
4.7.1	Extração de Aflatoxinas .....	52
4.7.2	Determinação de Aflatoxinas .....	52
4.8	DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS NAS AMOSTRAS DE RAÇÃO POR IC-ELISA .....	53
4.8.1	Extração de Aflatoxinas .....	53
4.8.2	Determinação de Aflatoxinas .....	53
4.9	DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS NAS AMOSTRAS DE RAÇÃO POR ELISA COMERCIAL .....	55
4.10	VALIDAÇÃO INTRA-LABORATORIAL DO IC-ELISA.....	55
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1	ARTIGO A: IMMUNOASSAY BASED ON MONOCLONAL ANTIBODY FOR AFLATOXIN DETECTION IN POULTRY FEED.....	58
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>59</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>61</b>
2.1	PRODUCTION OF ANTI-AFB <sub>1</sub> MONOCLONAL ANTIBODY (MAB) .....	61
2.2	SAMPLING .....	61
2.3	AFLATOXIN ANALYSIS BY IC-ELISA .....	62
2.3.1	Aflatoxin Extraction .....	62
2.3.2	ic-ELISA .....	62
2.4	AFLATOXIN DETERMINATION BY HPLC .....	64
2.4.1	Extraction and Clean-up.....	64
2.4.2	HPLC analysis.....	64
2.5	AFLATOXIN ANALYSIS BY COMMERCIAL ELISA KIT.....	65
2.6	CORRELATION ANALYSIS OF IC-ELISA, RIDASCREEN <sup>®</sup> ELISA AND HPLC.....	65
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>66</b>

<b>4 ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	74
<b>References</b> .....	75
5.2 ARTIGO B: EVALUATION OF FUMONISIN AND AFLATOXIN LEVELS IN BROILER FEED FROM NORTHERN PARANÁ STATE, BRAZIL .....	78
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	79
<b>2 MATERIAL AND METHODS</b> .....	80
2.1 SAMPLING .....	80
2.2 MYCOFLORA ANALYSIS.....	81
2.3 WATER ACTIVITY ( $A_w$ ) DETERMINATION .....	81
2.4 FUMONISIN ANALYSIS.....	81
2.4.1 Extraction and Clean-up.....	81
2.4.2 HPLC analysis.....	82
2.5 AFLATOXIN ANALYSIS BY IC-ELISA .....	82
2.6 STATISTICAL ANALYSIS .....	83
<b>3 RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	83
<b>4 ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	92
<b>References</b> .....	93
5.3 ARTIGO C: CO-OCCURRENCE OF AFLATOXINS AND FUMONISINS IN FEED INTENDED FOR LAYING HENS FROM NORTHERN PARANÁ STATE, BRAZIL .....	96
<b>Introduction</b> .....	97
<b>Material and Methods</b> .....	99
<b>Sampling</b> .....	99
<b>Mycoflora analysis</b> .....	99
<b>Fumonisin analysis</b> .....	99
<b>Aflatoxin analysis by ic-ELISA</b> .....	100
<b>Results and Discussion</b> .....	101
<b>Acknowledgements</b> .....	105

<b>References</b> .....	107
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	110
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	111

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento. O País tornou-se 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 (MAPA, 2011).

No ano de 2010, o Estado do Paraná, maior produtor nacional, foi responsável por 28,5% do total de frangos abatidos e por 26,2% das exportações (SINDIAVIPAR, 2010). Quanto ao setor de ovos comerciais, o Estado foi o terceiro maior produtor nacional com um plantel de poedeiras de cerca de 5,6 milhões de aves e produção correspondente a 7,5% da produção do país (UBA, 2010).

No Brasil, cerca de 70% a 80% do milho produzido é destinado à alimentação animal. Destes, na indústria rações, estima-se que 51% são direcionados ao setor avícola, 33% à suinocultura, 11% à pecuária, principalmente a leiteira, e 5% para outros animais (NUNES, 2008). Entretanto, o milho está exposto à contaminação por fungos produtores de micotoxinas ao longo de toda cadeia produtiva, podendo acarretar grandes perdas à indústria avícola (CAST, 2003).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos por fungos filamentosos, associados a problemas de saúde humana e animal (CAST, 2003). Por apresentarem, de modo geral, grande estabilidade química, podem persistir no alimento mesmo após a inativação dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem e, ao serem metabolizadas pelos animais podem ocorrer em carne, ovos e leite (CAST, 2003).

Os principais grupos de micotoxinas associadas a esta cultura incluem as aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, devido a sua elevada toxicidade (DIENER et al. 1987) e 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).

Em aves, fumonisinas e aflatoxinas podem acarretar aumento no peso de fígado, rim, pro-ventrículo e moela, necrose multifocal hepática, hiperplasia biliar, diarreia, imunossupressão e diminuição no consumo de ração, ganho de peso, enzimas séricas, massa das penas, da produção e peso dos ovos (BROWN, ROTTINGHAUS, WILLIAMS, 1992; OLIVEIRA et al., 2001; SKLAN, KLIPPER, FRIEDMAN, 2001; CAST, 2003; GIACOMINI

et al., 2006), e adicionalmente a co-ocorrência dessas toxinas pode resultar na potencialização dos danos causados ao fígado e rins (DEL BIANCHI et al., 2005).

A melhor estratégia para o controle da contaminação de milho e rações por micotoxinas é a prevenção da infecção pelo fungo e da produção de micotoxinas no campo, transporte e armazenagem. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de métodos práticos e específicos de detecção de micotoxinas, visando o controle de qualidade dos produtos destinados ao consumo humano e animal.

Na análise de micotoxinas em rações e alimentos os métodos mais comumente empregados incluem cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), espectrometria de massa e ensaios imunoenzimáticos como os enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs) (CAST, 2003, KOLOSOVA et al., 2006). Em geral, os métodos cromatográficos e de espectrometria de massa, apesar da especificidade e sensibilidade apresentam desvantagens, uma vez que são laboriosos, possuem custo elevado, consomem muito tempo para a execução da análise, requerem procedimentos de pré-limpeza durante a extração da micotoxina da matriz, equipamentos sofisticados e exigem pessoal técnico qualificado (KOLOSOVA et al., 2006). Por outro lado, os métodos imunológicos não requerem instrumentação sofisticada, permitem a análise de várias amostras por ensaio (KRSKA et al., 2008), são rápidos, específicos, sensíveis e portáteis (ZHENG et al., 2005). Entretanto, os kits de ELISA comerciais apresentam custo elevado e em muitos países, como no Brasil, há a dependência de importação (DEVI et al., 1999), assim investimentos na produção de imunorreagentes constituem uma alternativa para redução de tempo e custos.

A contaminação de rações para aves com aflatoxinas e fumonisinas tem sido reportada em todo mundo (WANG et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2006; BEG et al., 2006). Levando em consideração que as micotoxinas não podem ser removidas pelo processamento industrial e que a exposição crônica dos animais pode acarretar sérios prejuízos econômicos e colocar em risco a qualidade de carne, ovos e derivados, levantamentos sobre a contaminação de micotoxinas em grãos e rações são de grande importância. Assim, este estudo teve por objetivos padronizar e validar, intra-laboratorialmente, um ELISA competitivo indireto para ser empregado na detecção de aflatoxinas em amostras de ração para aves bem como avaliar o risco de exposição de frangos de corte e galinhas poedeiras a fumonisinas e aflatoxinas de ocorrência natural.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos filamentosos que se desenvolvem naturalmente em alimentos, capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos a animais e ao homem (SMITH; MOSS, 1985). Constituem um grupo diversificado de compostos orgânicos de baixa massa molecular, que possuem tanto estruturas químicas quanto propriedades físicas, químicas e toxicológicas variadas (NORRED, 2000).

A exposição a micotoxinas ocorre, predominantemente, por meio da ingestão de alimentos e rações contaminados (CHU, 1991), no entanto, a intoxicação por via dérmica e por inalação também pode ocorrer (CAST, 2003). Milho, trigo, cevada, arroz, aveia, nozes, leite, queijo, amendoim e algodão são produtos que apresentam maior frequência de contaminação (ZHENG; RICHARD; BINDER, 2006).

Ressalta-se, ainda, o fato das toxinas apresentarem, de modo geral, grande estabilidade térmica e química, permitindo sua persistência no alimento mesmo após a inativação dos fungos pelos processos usuais de industrialização e, ao serem metabolizadas pelos animais podem ocorrer em carne, ovos e leite (CAST, 2003).

As micotoxinas de maior ocorrência em cereais são as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como *A. flavus* e *A. parasiticus*; as ocratoxinas, produzidas por *Aspergillus ochraceus* e diversas espécies do gênero *Penicillium*; e as fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (SMITH; MOSS, 1985); BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

A contaminação dos grãos por micotoxinas muitas vezes é um processo aditivo, iniciando-se no campo e sendo potencializada durante a colheita, secagem e armazenagem (CAST, 2003). Embora as espécies de *Fusarium* sejam classificadas como fungos de campo, produtores de micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita, as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* são mais comumente encontradas durante a secagem e armazenagem (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Os dois principais fatores que influenciam no crescimento de fungos e na produção de micotoxinas, tanto nos períodos de pré quanto pós-colheita, são temperatura e

umidade. Estes exercem efeitos diretos sobre a ecologia e patogenicidade do fungo e muitas vezes são importantes na predisposição da planta à infecção (CAST, 2003). Adicionalmente, durante a armazenagem, outros fatores importantes são atividade de água, aeração, temperatura do substrato, concentrações de inóculo, interações microbianas, danos mecânicos dos grãos e infestação por insetos (CAST, 2003).

No entanto, uma vez que as micotoxinas são produzidas por uma diversidade de fungos que diferem quanto à morfologia, bioquímica e nichos ecológicos, não é possível descrever um conjunto único de condições favoráveis à sua produção (CAST, 2003).

As enfermidades causadas por micotoxinas são denominadas micotoxicoses e seus efeitos gerais sobre a saúde animal e humana são dependentes da dose e toxicidade da micotoxina, tempo de exposição, espécie, raça, gênero e idade, sendo que, em geral, indivíduos jovens são mais suscetíveis que adultos (BENNETT; KLICH, 2003; CAST, 2003). As micotoxicoses são caracterizadas por síndromes difusas, no entanto, apresentam predomínio de lesões em determinados órgãos, como fígado, rins, tecido epitelial e Sistema Nervoso Central. Contudo, a co-ocorrência de duas ou mais micotoxinas pode conduzir à potencialização dos efeitos tóxicos sobre o organismo suscetível (ROSMANINHO; OLIVEIRA; BITTENCOURT, 2001).

Embora animais e seres humanos sejam suscetíveis a esses efeitos, os animais apresentam maior probabilidade de contaminação devido à ingestão de grãos de baixa qualidade (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999). Sendo assim, o maior problema das micotoxicoses é atribuído aos prejuízos relacionados à queda no desempenho produtivo do animal (SMITH; MOSS, 1985).

As micotoxicoses podem ser de natureza aguda ou crônica. As micotoxicoses agudas ocorrem quando os indivíduos consomem doses moderadas a altas de micotoxinas e são caracterizadas, geralmente, por causar hepatite, hemorragia, nefrite, necrose das mucosas digestivas e morte. A micotoxicose crônica é a mais frequente, e ocorre quando existe o consumo de doses moderadas a baixas. Nestes casos, os animais apresentam um quadro caracterizado pela redução da eficiência reprodutiva, diminuição da conversão alimentar, da taxa de crescimento e do ganho de peso. No entanto, os sinais clínicos podem ser confundidos com outras doenças, inclusive as decorrentes desta micotoxicose, ou com deficiências nutricionais (SMITH; MOSS, 1985).

Com o aumento da demanda por alimentos, devido ao crescimento da população mundial, os riscos associados ao consumo de micotoxinas têm se elevado, uma vez que, alimentos deteriorados por fungos potencialmente toxigênicos vêm sendo consumidos ao invés de descartados (NELSON; DESJARDINS; PLATTNER, 1993).

### 2.1.1 Aflatoxinas

#### 2.1.1.1 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, castanhas do Brasil, figo e tabaco são culturas que apresentam maior frequência de contaminação (DIENER et al., 1987; BENNETT; KLICH, 2003).

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. pseudotamari* (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987; 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 sendo milho, amendoim, algodão, amêndoas, pistache, nozes e castanhas o Brasil culturas frequentemente suscetíveis à contaminação por aflatoxinas (CAST, 2003). 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, escleródios como estrutura de resistência (COTTY, 1988; YU et al., 2005).

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 injúrias causadas por insetos (CAST, 2003).

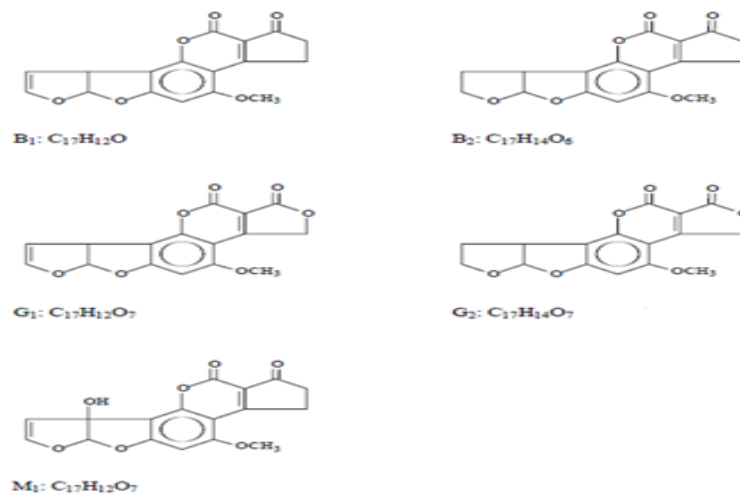
### 2.1.1.2 Estrutura química

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 AFB<sub>2</sub> as mais comumente encontradas em produtos agrícolas (GOLDBLATT, 1971; YU et al., 2005) (Figura 6). 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 à AFB<sub>1</sub>, respectivamente (LEESON et al., 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).

Dentre os fungos produtores de aflatoxinas, *A. flavus* e *A. pseudotamarii* sintetizam apenas as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, enquanto que, *A. parasiticus* e *A. nomius* são capazes de sintetizar tanto AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> quanto AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (DO; CHOI, 2007). Ademais, *A. flavus* sintetiza outros compostos tóxicos como o ácido ciclopiazônico, ácido kójico, ácido β-nitropropiónico, aspertoxina, aflatrem e ácido aspergílico (YU et al., 2005).

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 (YU et al., 2005) (Figura 1). 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 (DO; CHOI, 2007).

**Figura 1** – Estrutura das aflatoxinas de ocorrência natural.

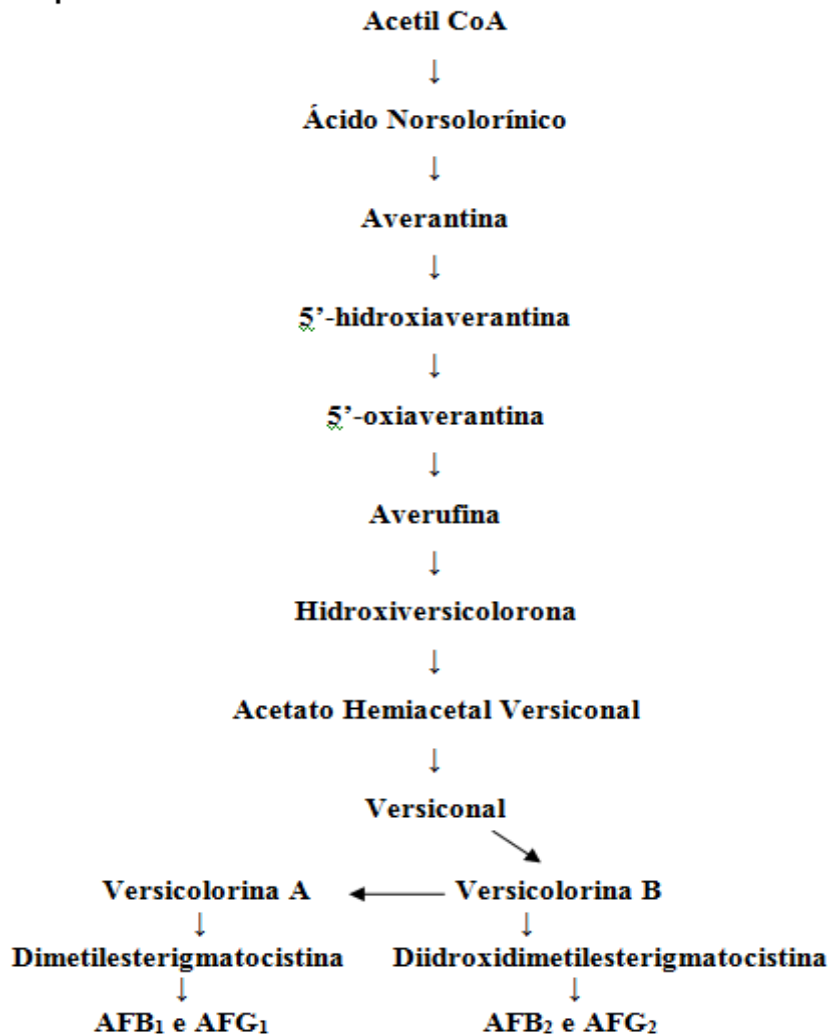


Fonte: IARC (2002).

### 2.1.1.3 Biossíntese

A via biossintética das aflatoxinas inicia-se com a conversão de acetil CoA a uma unidade hexanoil iniciadora pela ação de uma ácido graxo sintase. Essa é subsequentemente estendida, pela ação de uma policetida sintase, originando o ácido norsolorínico decacetida 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, 5'-oxiaverantina, averufina, hidroxiversicolorona, acetato hemiacetal versiconal, versiconal e versicolorina B. Posteriormente, a via divide-se originando as aflatoxinas AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> a partir da dimetilesterigmatocistina, e as AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> a partir da dihidroxidimetilesterigmatocistina (SWEENEY; DOBSON, 1998; SHIMA et al., 2009) (Figura 2).

**Figura 2** – Via biossintética das aflatoxinas.



Fonte: Adaptado de SHIMA et al. (2009).

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 por *A. flavus* e *A. parasiticus* são 35 °C e  $a_w = 0,95$  e 33 °C e  $a_w = 0,99$ , respectivamente, sendo que, essas toxinas não são sintetizadas em temperaturas abaixo de 7,5 °C ou acima de 40 °C (BARKAI-GOLAN, 2008). Em milho, altas temperaturas e estresse hídrico são fatores que contribuem para o aumento nos níveis de contaminação (CAST, 2003).

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 do milho europeia (*Ostrinia nubilalis*), uma vez que favorece tanto a colonização da espiga pelo fungo bem como sua desidratação (PAYNE, 1998; CAST, 2003).

#### 2.1.1.4 Mecanismo de ação

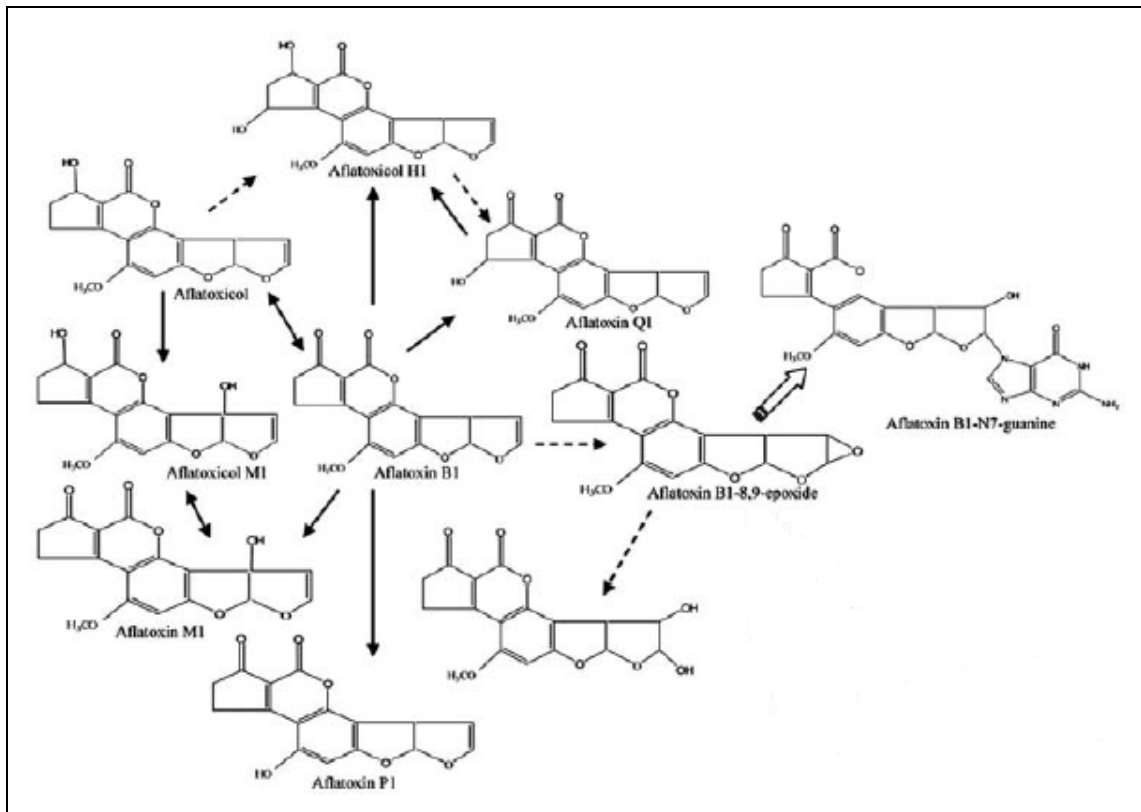
As aflatoxinas estão associadas à toxicidade e carcinogenicidade em animais e seres humanos (NEWBERNE; BUTLER, 1969; PEERS; LINSELL, 1973) sendo classificadas pela International Agency for Research on Cancer (IARC) como carcinógenos do grupo 1, i.e., carcinogênico para humanos. A AFB<sub>1</sub> é considerada o mais potente carcinógeno natural conhecido e, usualmente, é o análogo produzido em maior quantidade pelas cepas toxigênicas (SQUIRE, 1981).

Os efeitos tóxicos e cancerígenos 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>, os quais possuem menor toxicidade, bem como a formação do AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido (AFBO) o qual 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; WANG et al., 1996; DOI; CHOI, 2007) (Figura 3).

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; DOI; CHOI, 2007) (Figura 3).

**Figura 3** – Esquema da metabolização da aflatoxina B<sub>1</sub>. As linhas cheias representam vias conhecidas, enquanto que, as linhas tracejadas representam vias hipotéticas.



**Fonte:** Dói e Choi (2007) adaptado de Coulombe (1993).

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* a qual possui ação “supressora de tumor” (MENDY; WALTON, 2009). 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 (MENDY; WALTON, 2009). 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 a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) as quais promovem a oxidação do DNA (DOI; CHOI, 2007).

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).

#### 2.1.1.5 Efeitos toxicológicos em aves

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 pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (LEESON et al., 1995). Na aflatoxicose crônica, a qual 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 et al., 1995). Essa doença constitui a principal forma de intoxicação em condições naturais, ocasionando grandes perdas econômicas (PIER, 1992).

No Brasil, o limite máximo permitido de aflatoxinas, segundo a portaria do Ministério da Agricultura (1988), é de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) para qualquer produto utilizado na alimentação animal (BRASIL, 1988), enquanto que nos Estados Unidos, segundo a FDA (2001), e na União Européia esse limite, para aves maduras, é de 100 (somatório dos 4 análogos) e 20 (AFB<sub>1</sub>)  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (FAO, 2003).

Pintinhos com 2 dias de idade (n = 60) tratados, via oral, com 50 e 100  $\mu\text{g AFB}_1 \text{ kg}^{-1}$  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).

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

No estudo de Salle et al. (2001) foram determinados os níveis 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 detectadas variaram de 0,54  $\mu\text{g kg}^{-1}$  a 2,41  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , em amostras coletadas durante a primavera e o outono, respectivamente. Adicionalmente, houve maior frequência de contaminação após as aves consumirem ração do tipo inicial 1, a qual permanece por maior período estocada na propriedade (14 a 16 dias) em relação aos demais tipos de ração, sugerindo que quanto maior o tempo de estocagem maior é a frequência de contaminação do fígado com aflatoxinas.

Em outro estudo com pintinhos ( $n = 240$ ), 1 dia de idade, tratados com 3 mg aflatoxinas  $\text{kg}^{-1}$  de ração (83% de AFB<sub>1</sub>; 9,5% de AFB<sub>2</sub>; 4,2% de AFG<sub>1</sub>; e 3,3% de AFG<sub>2</sub>), durante 42 dias, foi observada diminuição no consumo de ração e no ganho de peso das aves; redução em 33,8% da massa das penas; aumento no peso do coração e fígado; alterações histopatológicas como degeneração hepática, com reação proliferativa ductal e hiperplásica dos ductos biliares, no fígado; depleção linfóide, nas bursas e nos rins, hemorragias multifocais e intensa degeneração gordurosa na forma de microvacuolização em células de alguns túbulos (GIACOMINI et al., 2006).

Perus ( $n = 48$ ), 3,5 meses de idade, tratados com 100, 200 e 400  $\mu\text{g}$  de aflatoxinas totais  $\text{kg}^{-1}$  de ração durante 2 semanas apresentaram decréscimo no consumo de ração e no ganho de peso bem como alterações nas enzimas hepáticas e na resposta imune celular (QUIST et al., 2000).

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 e, nos tratamentos com as maiores doses, 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, as quais constituem indicadores de toxicidade crônica nessa espécie (OLIVEIRA et al., 2004).

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).

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 níveis 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% nos níveis de  $\text{AFB}_1$ .

#### 2.1.1.6 Imunoensaio para análise de Aflatoxinas

Dentre os métodos imunológicos, os ensaios imunoenzimáticos (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) são amplamente empregados no monitoramento da contaminação de alimentos e ração por aflatoxinas devido à sensibilidade, especificidade, rapidez e simplicidade do método (KOLOSOVA et al., 2006). Os ELISAs têm sido utilizados tanto em análises quantitativas quanto para fins de triagem (REITER; ZENTEK; RAZZAZI, 2009). No entanto, sub ou superestimações dos resultados podem ocorrer devido à interação dos anticorpos com compostos da matriz alimentar (efeito de matriz), que apresentam grupamentos químicos similares aos das micotoxinas (ZHENG et al., 2005).

Abbas et al., 2006, utilizando kit de ELISA comercial, detectou níveis de aflatoxinas totais variando de 40 a 699  $\text{ng g}^{-1}$  (média = 215  $\text{ng g}^{-1}$ ) e de 66 a 428  $\text{ng g}^{-1}$  (média = 197  $\text{ng g}^{-1}$ ) em 17 e 4 amostras de híbridos de milho convencional e Bt, respectivamente. A mesma análise foi conduzida por HPLC e em 43% das amostras os níveis obtidos por ELISA foram mais elevados que os por HPLC.

Klarić et al., 2009, empregando ELISA comercial, detectaram aflatoxinas em 33,3% e 30,8% das amostras de milho (n =12) e de ração a base de milho (n = 13)

coletadas na Croácia. Os níveis de contaminação variaram de 2,7 a 4,5 ng g<sup>-1</sup> (média = 3,4 ng g<sup>-1</sup>) e de 4,2 a 10,3 ng g<sup>-1</sup> (média = 6,9 ng g<sup>-1</sup>), respectivamente.

Além do emprego de kits de ELISA comerciais, pesquisadores tem investido no desenvolvimento de testes de ELISA próprios. Uma vantagem seria a obtenção de menores limites de detecção, i.e., mais próximos aos da CLAE (REITER; ZENTEK; RAZZAZI, 2009).

Chinaphuti et al., 2002, desenvolveram um ELISA denominado de DOA-ELISA baseado em anticorpos policlonais anti-AFB<sub>1</sub>. As porcentagens de recuperação de AFB<sub>1</sub> em milho artificialmente contaminado com 10, 50 e 100 ng g<sup>-1</sup>, analisadas em duplicata, foram de 128 e 100%, 102,8 e 93,2% e 83,6 e 92,6%, respectivamente. Os resultados obtidos por CLAE e por ELISA não apresentaram diferença significativa. No entanto em 40% das amostras de milho (n =10) os níveis de aflatoxinas detectados por ELISA foram mais elevados que os por CLAE.

Zheng et al., 2005, desenvolveram o ELISA AgraQuant<sup>®</sup> para detecção de aflatoxinas em milho e derivados e em outros alimentos. O ensaio apresentou limites de detecção abaixo de 5,0 ng g<sup>-1</sup> em 10 dos 13 alimentos testados sendo que para detecção de aflatoxinas em milho este foi de 2,5 ng g<sup>-1</sup>. O coeficiente de correlação entre ELISA e CLAE foi de 0,95 obtido a partir da análise de amostras de milho artificialmente contaminadas com 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 320 ng g<sup>-1</sup> de aflatoxinas totais. Adicionalmente foram analisadas amostras de milho naturalmente contaminadas com 19 e 138 ng g<sup>-1</sup>. Cada amostra foi dividida em dez sub-porções sendo metade analisada por ELISA, em triplicata, por três analistas diferentes (totalizando 30 análises) e metade analisada por CLAE. O nível médio de aflatoxina obtido nas análises por ELISA foi de 23,3 ± 1,5 ng g<sup>-1</sup> e de 129,3 ± 11,5 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Em 18 análises os resultados obtidos por ELISA foram mais elevados que os obtidos por HPLC.

Kolosova et al., 2006, desenvolveram um ELISA competitivo direto baseado em anticorpos monoclonais para detecção de AFB<sub>1</sub> em arroz, cevada e centeio. O método apresentou limite de detecção de 0,05 ng mL<sup>-1</sup> e taxas de recuperação de AFB<sub>1</sub> variando de 94 a 113% (análise de amostras de arroz artificialmente contaminadas com 10 a 500 ng g<sup>-1</sup>). Em 25 amostras de arroz (n =63) foram detectadas concentrações de AFB<sub>1</sub> de 5 a 10 ng g<sup>-1</sup>. Uma amostra apresentou concentração de 12,8 ng g<sup>-1</sup>. Quando analisadas por CLAE, AFB<sub>1</sub> foi detectada em apenas duas amostras em concentrações de 4,2 e 10,4 ng g<sup>-1</sup>. Essas concentrações seriam correspondentes às de 5,6 e 12,8 ng g<sup>-1</sup> detectados por ELISA.

Li et al., 2009, desenvolveram um ELISA baseado em AcM anti AFB<sub>1</sub> para detecção de aflatoxinas em amendoim. O método apresentou limite de detecção de 0,06-0,09 ng mL<sup>-1</sup>. A taxa de recuperação de aflatoxinas totais (amostras de amendoim artificialmente contaminadas com 4 ng mL<sup>-1</sup>) foi de 87,5 ± 6,8%.

## 2.1.2 Fumonisinias

### 2.1.2.1 Fungos produtores

As fumonisinias constituem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) e *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (THIEL et al., 1991; BURGESS et al., 1994), sendo a primeira a de maior prevalência em milho (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Essas espécies são capazes de produzir níveis elevados de fumonisinias, possuem ampla distribuição geográfica, ocorrência frequente em milho, e associação com micotoxicoses em animais (RHEDDER; MARASAS; VISMER, 2002).

No entanto, outras 15 espécies do gênero, incluindo, *F. napiforme* e *F. nygamai*, de grande ocorrência em milheto e sorgo, e uma espécie de *Alternaria alternata* foram relatadas como produtoras de fumonisinias (NELSON et al., 1992; CHEN et al., 1992; RHEDDER; MARASAS; VISMER, 2002).

O gênero *Fusarium* Link ex Fr. pertence à classe Sordariomycetes, subdivisão Pezizomycotina e inclui espécies que formam colônias com colorações diversas (branco, rosa pálido, roxo, alaranjado, púrpura), produzem macroconídios hialinos septados que podem ou não apresentar microconídios e clamidósporos (BURGESS et al., 1994).

*F. verticillioides* representa a fase anamórfica ou assexuada de *Gibberella moniliformis* Winel (= *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito). É um ascomiceto cosmopolita, produtor de outras micotoxinas como moniliformina, ácido fusárico, fusariocina C e fusarina C, sendo a última um potente mutagênico (BULLERMAN, 1996; SHIER et al., 1997; KERÉNYI et al., 1999; GLENN et al., 2001). *F. verticillioides* foi descrito pela primeira vez associado a doenças em animais em 1904 (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997) e juntamente com outros anamorfos de *G. fujikuroi* (*F. proliferatum* e *F. subglutinans*) são os fungos mais comumente encontrados em milho na América do Norte e outras regiões temperadas do mundo (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Pertence à seção Liseola do complexo *G. fujikuroi*, o qual possui pelo menos oito espécies biológicas geneticamente distintas designadas por letras de A a H, dentre as quais, A, D e E são as mais frequentes em milho. A maioria das espécies biológicas corresponde particularmente às espécies anamórficas de *Fusarium* pertencentes à seção Liseola sendo as espécies biológicas A e F consideradas como *F. verticillioides*. A primeira concentra a maioria das cepas produtoras de fumonisinas que ocorrem principalmente em milho, enquanto que, na segunda encontram-se as cepas que produzem pouca ou nenhuma fumonisina e que são mais frequentes em sorgo (LESLIE et al. 1992; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; KERÉNYI et al., 1999).

Essa espécie é caracterizada por apresentar micélios aéreos constituídos por microconidióforos, sem ramificações, contendo de 1 a 3 fiálides alongadas simples, a partir das quais são formadas cadeias longas de microconídios. Estes podem apresentar ou não septos e são clavados com base truncada. Algumas cepas podem formar macroconidióforos a partir das hifas, na forma de ramos laterais, constituídos de uma célula basal única com 2-3 filíades ou com 2-3 métulas. Os macroconídios são delgados, septados (3-7 septos), retos ou ligeiramente curvos, fusiformes e apresentam parede fina com célula apical longa e curvada e célula basal pedicelada (SAMSON; van REENEN-HOEKSTRA, 1988).

Cresce em ampla faixa de temperatura, porém, somente em atividades de água ( $a_w$ ) relativamente altas e teores de umidade acima de 18%. As condições ótimas de desenvolvimento em milho são 25 °C e  $a_w$  de 0,98 (MARÍN et al., 1998).

*F. verticillioides* está associado a doenças em todas as fases de desenvolvimento do milho, causando danos em plântulas e podridão de raiz, colmo, espiga e grãos. Durante a colheita, o fungo pode ser encontrado tanto nas plantas como nos restos culturais (MUNKVOLD; McGEE; CARLTON, 1997). Este não é apenas o patógeno mais comumente encontrado nessa cultura, como também está entre os fungos que mais colonizam assintomaticamente a planta, relação esta denominada de endofítica (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). A contaminação do milho por *F. verticillioides* ocorre principalmente por meio da infecção dos estigmas por conídios carreados pelo ar ou água. No entanto, a doença pode estabelecer-se 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 injúrias causadas por insetos, os quais, também podem atuar como vetores de inoculo (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 com fumonisina 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 (WEIBKING et al., 1993; NAGARAJ et al., 1994;) e ação hepatotóxica e hepatocarcinogênica em ratos (GELDERBLOM et al., 1991).

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

#### 2.1.2.2 Estrutura química

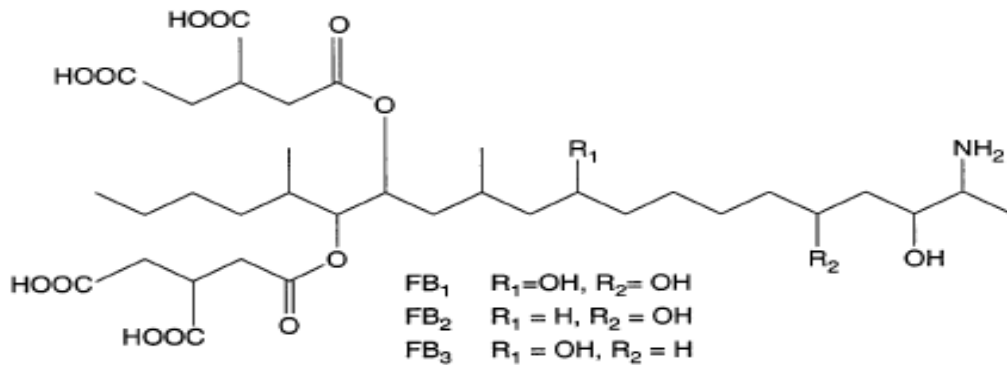
As fumonisinas foram descobertas, em 1988, a partir de culturas da cepa de *F. verticillioides* MRC 826, isolada em 1975 de milho destinado ao consumo humano em Transkei, África do Sul, uma área de alta incidência de câncer esofágico (GELDERBLOM et al., 1988).

Apresentam 28 análogos caracterizados divididos em quatro grupos principais A, B, C e P (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). Dentre eles, as fumonisinas 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; SHEPHARD et al., 1996), sendo a FB<sub>1</sub> o análogo mais tóxico e abundante (NELSON et al., 1992). Este representa cerca de 70% a 80% da concentração total de fumonisinas produzidas em cultivos utilizando como substrato milho e arroz e em cultivos em meio líquido, enquanto que, a FB<sub>2</sub> responde por 15 a 25% e a FB<sub>3</sub> por 3 a 8% (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002).

A estrutura química das fumonisinas (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>) foi elucidada por Bezuidenhout et al., em 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 C14 e C15 estão esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido tricarbóxico. A FB<sub>2</sub> não possui o grupo hidroxila em C10, enquanto que a FB<sub>3</sub> não apresenta o grupo hidroxila em C5 (BOLGER et al., 2001) (Figura 4). As fumonisinas da série A diferem das fumonisinas da

série B por serem N-acetiladas no C2; as da série P pela presença de 3-hidroxipiridina no C2 e as da série C por não apresentarem o grupo metila terminal no C1 (NELSON et al., 1993; MUSSER; GAY; MAZZOLA, 1996).

**Figura 4** – Estruturas químicas das fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub>.



Fonte: Westhuizen et al.(2003)

As fumonisinas são moléculas polares altamente solúveis em água e ao contrário das outras micotoxinas contaminantes de alimentos não possuem nenhuma estrutura aromática ou cromófora de fácil detecção analítica (MURPHY et al., 2006). Possuem alta solubilidade em água, metanol e acetonitrila:água (IARC, 2002).

Os métodos de análise de fumonisinas utilizam como solventes para extração metanol-água, acetonitrila-água ou acetonitrila-metanol-água e para pré-limpeza, colunas de fase reversa, de imunoafinidade ou de troca iônica. A detecção e quantificação são realizadas principalmente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência ou por espectrometria de massa. Adicionalmente, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, eletroforese capilar e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) podem ser utilizados (SORIANO; DRAGACCI, 2004).

### 2.1.2.3 Biossíntese

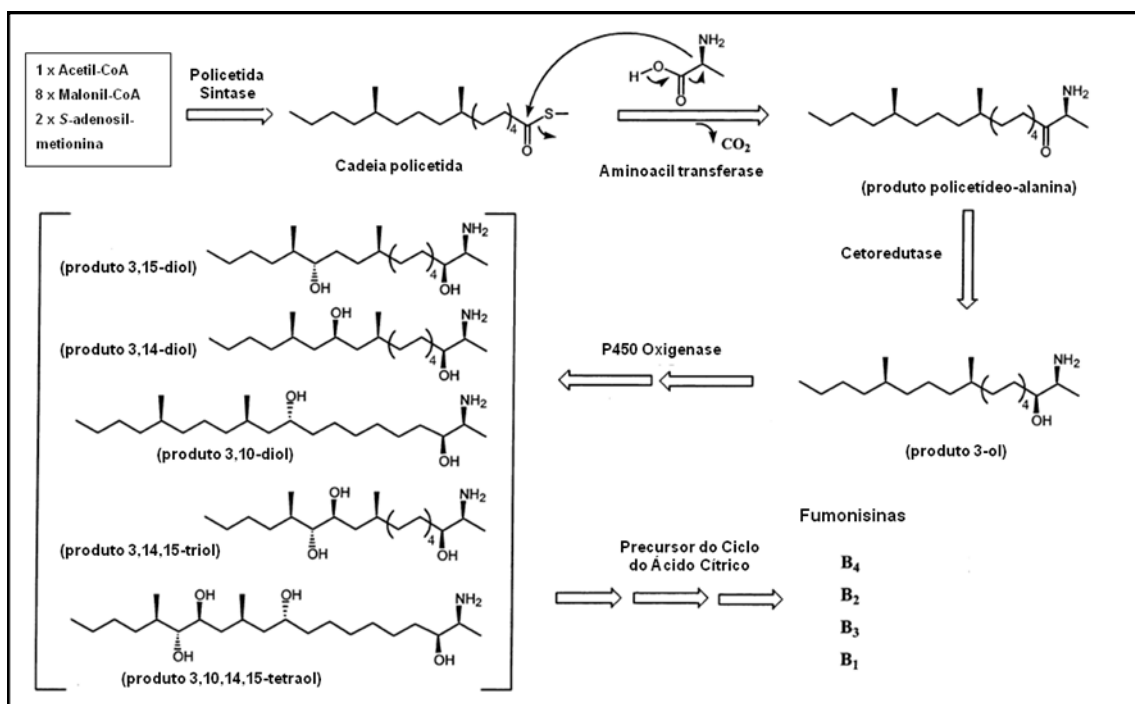
As fumonisinas são sintetizadas pela via das policetidas durante o metabolismo secundário do fungo o qual se inicia frequentemente, após o término da fase de crescimento (GRIFFIN, 1994).

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 poliketida sintase, é um policetídeo de 18 carbonos o qual é condensado ao aminoácido alanina (BOJJA et al., 2004; SWEENEY; DOBSON, 1999) (Figura 5).

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) (Figura 5).

**Figura 5** – Via biossintética das fumonisinas.



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

Os componentes das moléculas das fumonisinas 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 tricarbóxicos provavelmente são derivados do ácido glutâmico pela via do ciclo do ácido cítrico (ex. ácido aconítico) (BLACKWELL et al., 1996).

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).

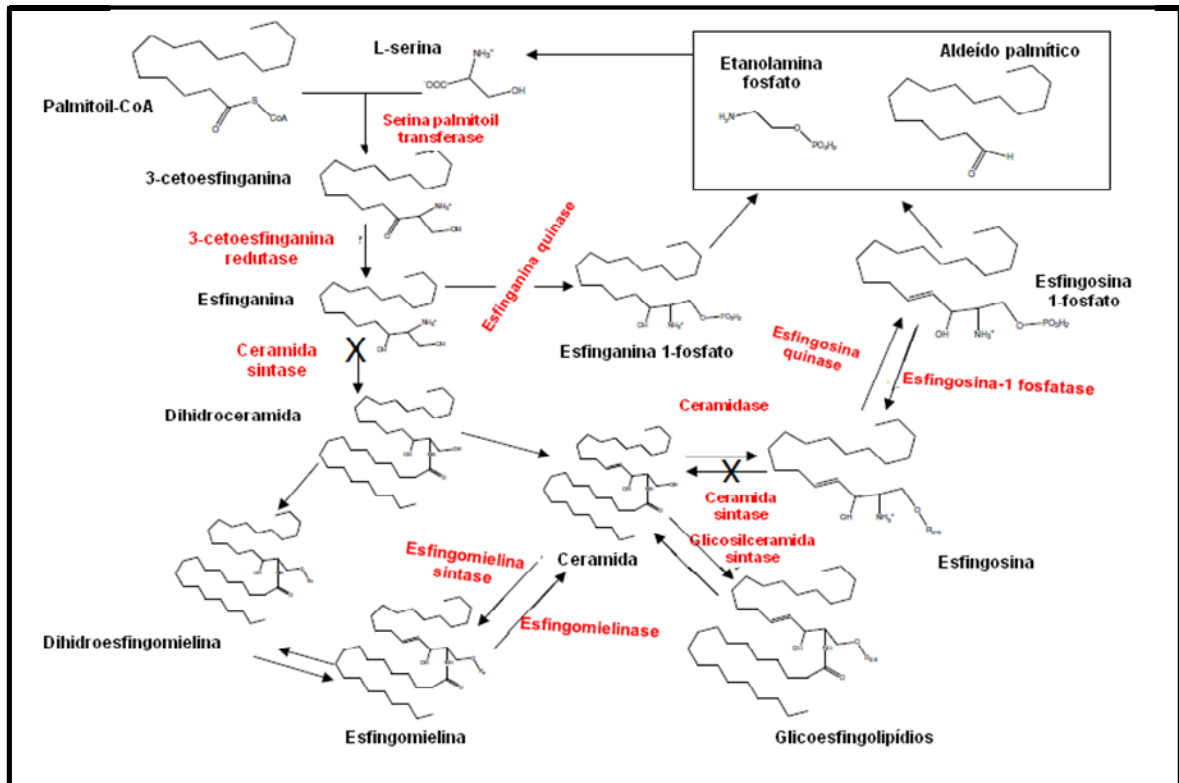
Em geral, para *F. verticillioides* as condições ótimas de produção de fumonisinas em milho são de  $a_w$  0,95-0,98, temperatura de 30 °C e período de incubação de 4 a 6 semanas (MARÍN et al., 1995; MARÍN et al., 1999a; MARÍN et al., 1999b).

#### 2.1.2.4 Biossíntese de Esfingolipídios e mecanismo de ação das fumonisinas

A biossíntese dos esfingolipídios 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-esfinganina que ao ser reduzida é convertida a esfinganina (dihidroesfingosina). Esta, por sua vez, pode ser fosforilada originando esfinganina 1-fosfato ou *N*-acilada, pela ação da ceramida sintase, formando a dihidroceramida, que é então dessaturada a ceramida (SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005) (Figura 6).

A ceramida pode originar a esfingomielina, pela adição de uma fosfocolina; os glicosfingolipídios, pela complexação com oligossacarídeos; ou esfingosina, por meio da ação catalítica da ceramidase. A fosforilação da esfingosina, pela ação da esfingosina quinase, origina esfingosina-1-fosfato, a qual juntamente com a esfinganina-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) (Figura 6).

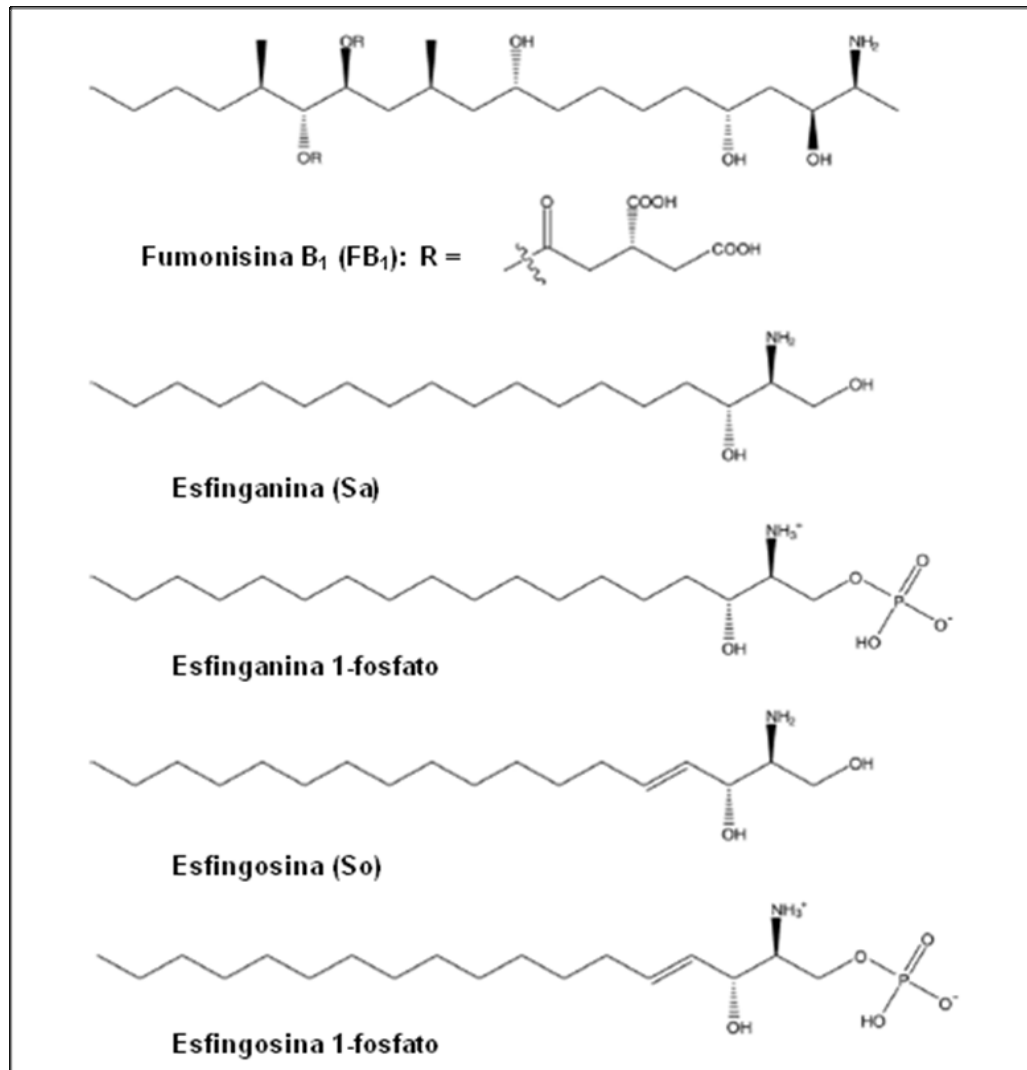
**Figura 6** – Biossíntese dos esfingolípídios em células animais. O símbolo **X** indica a via enzimática inibida pela fumonisina B<sub>1</sub>.



Fonte: Adaptado de Soriano, González e Catalá (2005).

Devido à semelhança estrutural das fumonisinas com as bases esfingóides (esfinganina e esfingosina) (Figura 7), estas são potentes inibidores da ceramida sintase (esfingosina e esfinganina *N*-aciltransferase), enzima chave na biossíntese e na degradação dos esfingolípídios (WANG et al., 1991; TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999) (Figura 6). Esta é inibida por todas as fumonisinas que possuem o grupamento amino livre no C2 por meio de interações não covalentes (SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005).

**Figura 7** – Estrutura química da FB<sub>1</sub> e dos principais metabólitos dos esfingolípídios.



Fonte: Cai et al. (2007).

A cadeia aminopentol (AP1) das fumonisinas compete pelo sítio de ligação das bases esfingóides, enquanto que os ácidos tricarbálicos aniônicos interferem na ligação do acil-CoA graxo, impedindo a conversão da esfinganina à dihidroceramida e a reacilação da esfingosina a ceramida (SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005).

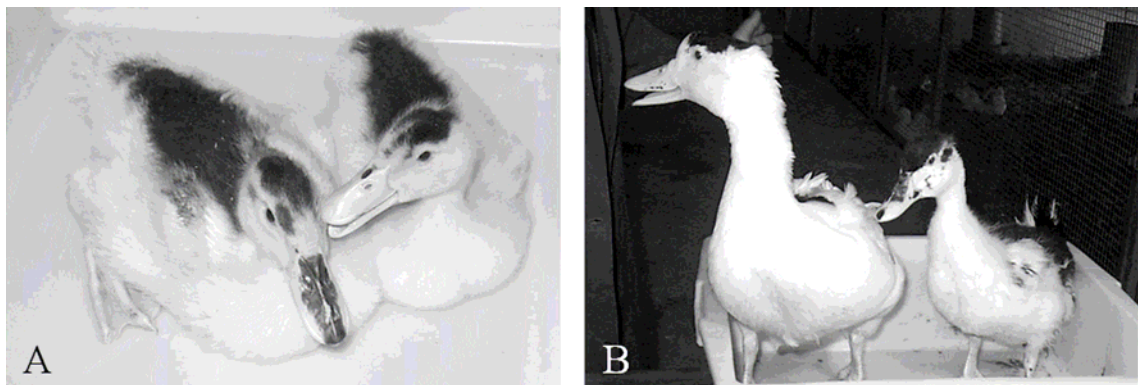
O mecanismo de ação das fumonisinas é um evento seqüencial no qual a inibição da ceramida sintase acarreta a inibição da biossíntese de ceramidas, aumento de esfinganina e esfingosina livres, redução na reacilação da esfingosina e da degradação dos esfingolípídios provenientes da dieta (SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005). Estes efeitos são resultantes da toxicidade promovida pela FB<sub>1</sub> 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).

#### 2.1.2.5 Efeitos toxicológicos em aves

Em estudo de administração prolongada de FB<sub>1</sub> (77 dias), 40 patos com 7 dias de idade tratados por gavagem com doses correspondentes a ingestão de 2, 8, 32 e 128 mg FB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de ração, apresentaram diminuição no peso corporal (Figura 8) e aumento dos pesos da moela, baço e fígado nos tratamentos com as duas maiores doses (TRAN, et al., 2005).

**Figura 8** – Efeito da FB<sub>1</sub> no peso corpóreo de patos tratados com 0 (esquerda) ou 128 mg FB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de ração (direita). A) após 14 dias de tratamento, B) após 35 dias de tratamento.



Fonte: Tran et al. (2005).

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<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de ração durante 21 dias. Após esse período, o peso das aves e a média de ganho de peso diária diminuíram significativamente com o aumento da dose de FB<sub>1</sub>, enquanto que, os pesos do fígado, pró-ventrículo e moela, e os níveis de cálcio, colesterol e das enzimas aspartato amino-transferases no soro, aumentaram. As aves também apresentaram diarreia, 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 Cobb), machos, com 1 dia de idade, com ração contendo 5 mg kg<sup>-1</sup> de FB<sub>1</sub>. 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 e 30% de aumento do peso do fígado de pintinhos (1 dia de idade) alimentados com ração contendo  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{FB}_1$  durante duas semanas. Histopatologicamente, os animais apresentaram necrose multifocal hepática, hiperplasia biliar e necrose muscular.

Em estudo com 128 codornas japonesas poedeiras em início de postura, 7 semanas de idade, alimentadas com ração contendo 10, 50 e  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{FB}_1$ , 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, histopatologicamente, os tecidos hepático, renal e do miocárdio, não apresentaram diferenças em relação aos do grupo controle. No grupo exposto a  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  houve diminuição da produção média e do peso dos ovos (BUTKERAITIS, 2003).

No entanto, no país, não existe uma legislação específica que determine o nível máximo de fumonisinas em alimentos para consumo animal. Segundo a FDA (2001) o nível máximo permitido, considerando o somatório de  $\text{FB}_1$ ,  $\text{FB}_2$  e  $\text{FB}_3$ , 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 recomendado para aves em geral é de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $\text{FB}_1 + \text{FB}_2$ ) (JORNAL OFICIAL DA UE, 2006).

## 2.2 INTERAÇÕES ENTRE AFLATOXINAS E FUMONISINAS

Prathapkumar et al. (1997) relataram a ocorrência de surtos de micotoxicoses na Índia em 6.700 galinhas poedeiras de 64 semanas de idade e em 3.000 com 36 semanas de idade alimentadas com ração naturalmente contaminada com  $8,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{FB}_1 + 100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  de  $\text{AFB}_1$  e com  $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{FB}_1 + 90 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  de  $\text{AFB}_1$ , respectivamente. Os animais apresentaram diarreia escura e viscosa seguida por redução no ganho de peso, na ingestão de alimentos e de aproximadamente 30% na produção de ovos. Nos dois casos o índice de mortalidade foi de 10%.

No estudo de Ogido et al. 2004, codornas japonesas ( $n = 288$ ), com 8 semanas de idade, foram tratadas por 5 períodos de 28 dias com ração artificialmente contaminada com  $10 \text{ mg}$  de  $\text{FB}_1$ ;  $50 \text{ } \mu\text{g}$   $\text{AFB}_1$ ;  $50 \text{ } \mu\text{g}$   $\text{AFB}_1 + 10 \text{ mg}$   $\text{FB}_1$ ;  $200 \text{ } \mu\text{g}$   $\text{AFB}_1$  e  $200 \text{ } \mu\text{g}$   $\text{AFB}_1 + 10 \text{ mg}$   $\text{FB}_1 \text{ kg}^{-1}$  de ração. Ao final do 5º período, todos os tratamentos acarretaram diminuição no consumo de ração e no peso dos ovos sendo esta mais pronunciada nos grupos

tratados com as duas micotoxinas em combinação e com 200  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub>. As aves tratadas com 10 mg FB<sub>1</sub> e em combinação com 50  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub> apresentaram decréscimo na produção de ovos a partir do 3º período. Com exceção do tratamento com 50  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>, todos os grupos apresentaram diminuição no peso corpóreo no 5º período.

Em estudo de administração oral de AFB<sub>1</sub> e FB<sub>1</sub>, pintinhos (n = 350), com 21 dias de idade, foram submetidos a tratamentos com 10 mg de FB<sub>1</sub>; 50  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub>; 50  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub> + 10 mg de FB<sub>1</sub>; 350  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub>; 350  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub> + 10 mg de FB<sub>1</sub>; 2.450  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub>; e 2.450  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub> + 10 mg de FB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de ração, durante 21 dias. Comparado com o grupo controle a porcentagem de heterófilos diminuiu nos grupos tratados com 50  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub> + 10 mg de FB<sub>1</sub> e 2.450  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub> ou em combinação com FB<sub>1</sub>. Altas porcentagens de linfócitos foram detectadas nas aves que receberam 50  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub> + 10 mg de FB<sub>1</sub>, 350  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub> + 10 mg de FB<sub>1</sub> e 2.450  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub> + 10 mg de FB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de ração. O último tratamento também ocasionou decréscimo nos níveis de albumina plasmática. O fígado das aves tratadas com AFB<sub>1</sub> apresentou áreas de necrose e de infiltrados inflamatórios e os animais que receberam ração contendo somente FB<sub>1</sub> 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 FB<sub>1</sub> foram detectados no fígado e na excreta de todos os grupos tratados com a toxina em níveis variando de 0,013 a 0,051 mg kg<sup>-1</sup> e de 1,19 a 2,79 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Del BIANCHI et al., 2005).

Frangos de corte (n = 188), machos, foram tratados do 8º a 41º dia de idade com ração contaminada com 50 mg kg<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub>; 200 mg kg<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub>; 50  $\mu\text{g}$  kg<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub>; 50  $\mu\text{g}$  kg<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub> + 50 mg kg<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub>; 50  $\mu\text{g}$  kg<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub> + 200 mg kg<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub>; 200  $\mu\text{g}$  kg<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub>; 200  $\mu\text{g}$  kg<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub> + 50 mg kg<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub>; 200  $\mu\text{g}$  kg<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub> + 200 mg kg<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub>. Ao final do estudo, todos os tratamentos acarretaram diminuição no peso corpóreo e no ganho de peso sendo os efeitos mais pronunciados nos grupos que receberam ração contaminada com AFB<sub>1</sub> em combinação com FB<sub>1</sub>. Todos os tratamentos acarretaram aumento no peso relativo do coração das aves exceto o tratamento 200  $\mu\text{g}$  kg<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub> + 50 mg kg<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub>. Houve aumento no peso relativo do fígado das aves tratadas com ração contendo somente FB<sub>1</sub> (200 mg kg<sup>-1</sup>) ou em combinação com AFB<sub>1</sub>. Todos os tratamentos ocasionaram mudanças na histopatologia do fígado sendo as principais alterações a degeneração vacuolar e proliferação celular nos ductos biliares (TESSARI et al., 2006).

Em estudo de Pozzi et al., 2000, ratos Wistar machos (n = 60) foram submetidos a tratamentos por gavagem durante 21 dias com 72 µg AFB<sub>1</sub>; 0,5 mg FB<sub>1</sub>; 1,5 mg FB<sub>1</sub>; 72 µg AFB<sub>1</sub> + 0,5 mg FB<sub>1</sub>; 72 µg AFB<sub>1</sub> + 1,5 mg FB<sub>1</sub> 100 g<sup>-1</sup> peso corpóreo. Todos os tratamentos acarretaram redução no peso corpóreo, nos pesos absoluto e relativo do fígado e rins e aumento no peso do cérebro sendo os efeitos mais pronunciados nos grupos tratados com 72 µg AFB<sub>1</sub> + 1,5 mg FB<sub>1</sub> 100 g<sup>-1</sup> peso corpóreo. Os animais também apresentaram aumentos nos níveis séricos das enzimas aspartatoaminotransferase e fosfatase alcalina e nos níveis de albumina. O fígado foi o órgão mais afetado pelos tratamentos sendo que a co-administração de AFB<sub>1</sub> e de FB<sub>1</sub> ocasionou grave degeneração vacuolar, perturbação acentuada da estrutura trabecular do tecido hepático e intensa megalocitose.

Em estudo de Orsi et al. (2007), coelhos (n = 24) foram tratados por gavagem (21 dias) com 30 µg AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup>; 1,5 mg FB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> + 30 µg AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup>; 1,5 mg FB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> peso corpóreo. Todos os animais tratados com AFB<sub>1</sub> e com AFB<sub>1</sub> + FB<sub>1</sub> apresentaram sinais clínicos de intoxicação como apatia, anorexia e letargia sendo que três animais do grupo no qual as duas toxinas foram administradas simultaneamente morreram. A co-administração de AFB<sub>1</sub> e FB<sub>1</sub> acarretou maior diminuição no ganho de peso e no peso de fígado, no entanto, houve aumento no peso dos rins. Neste grupo, a análise bioquímica sérica apresentou decréscimo no nível de albumina e aumentos nos níveis de proteína total, das enzimas fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama-glutamilttransferase e nos níveis de uréia e creatinina, caracterizando o comprometimento do fígado e rins. Histopatologicamente houve rompimento da estrutura trabecular hepática, presença de áreas necróticas, hiperplasia ductal, presença de degeneração vacuolar dos túbulos renais e depleção linfocitária no baço. Todos os tratamentos acarretaram a elevação da razão esfingalina:esfingosina (biomarcador de exposição à fumonisinas) no soro, urina e fígado.

### 2.3 OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS E AFLATOXINAS EM MILHO E RAÇÕES NO BRASIL

No Brasil, o primeiro relato sobre a ocorrência natural de fumonisinas em milho foi realizado por Sydenham et al. (1992), que analisaram amostras de rações associadas a surtos confirmados e suspeitos de micotoxicoses em diversas espécies de animais no Estado do Paraná. As FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foram detectadas em 20 e 18, das 21 amostras, respectivamente, em concentrações de 0,2 - 38,5 µg g<sup>-1</sup> (FB<sub>1</sub>) e 0,1 - 12,0 µg g<sup>-1</sup> (FB<sub>2</sub>).

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<sub>1</sub> e 94,8% para FB<sub>2</sub>. As espécies fúngicas predominantes foram *F. verticillioides* e *Aspergillus* spp. seção Flavi (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 foi detectada FB<sub>1</sub> em 100% das amostras (média de 2,39 µg g<sup>-1</sup>) e FB<sub>2</sub> em 97,7% (média de 1,09 µg g<sup>-1</sup>) (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 µg g<sup>-1</sup> para FB<sub>1</sub> e de 0,38 – 8,6 µg g<sup>-1</sup> para FB<sub>2</sub> (CAMARGOS et al., 2000).

Mallmann et al. (2001) analisaram 92 amostras de ração, baseada em milho, destinadas à alimentação de aves, suínos e equinos, da região sul do Brasil, coletadas entre os anos de 1996 e 1998. Foram detectados 30,4% de positividade para FB<sub>1</sub> sendo que os níveis variaram de 0,64 a 68,33 µg de FB<sub>1</sub> g<sup>-1</sup> de ração (média = 15,39 µg g<sup>-1</sup>).

A análise de amostras de milho recém colhido coletadas em cooperativas das regiões centro-sul (n = 27), centro-oeste (n = 86) e norte (n = 37) do Estado do Paraná, safra 1994/1995, demonstrou alta frequência de contaminação (98%) com fumonisinas em todas as regiões, enquanto que a contaminação com aflatoxinas concentrou-se nas amostras da região centro-oeste (média = 191 ng g<sup>-1</sup>). As médias de contaminação com fumonisinas foram de 1,14 µg g<sup>-1</sup> (região centro-sul); 5,08 µg g<sup>-1</sup> (região centro-oeste); 9,85 µg g<sup>-1</sup> (região norte) (ONO et al., 2001).

Westhuizen et al. (2003), analisando 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, detectaram médias de fumonisinas totais (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + B<sub>3</sub>) de 3,2, 3,4, 1,7 e 1,5 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Em todas as amostras *F. verticillioides* foi a espécie de maior ocorrência.

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 fúngica e por fumonisinas. Nas amostras de ração a espécie predominante foi *F. verticillioides* com médias de contaminação variando de 2,4 x 10<sup>4</sup> – 6,5 x 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> e contaminação por fumonisinas (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) de 2,89 – 14,54 µg g<sup>-1</sup>. Na safra de 1991 todas as amostras de milho (n = 27) da região norte estavam contaminadas com fumonisinas em níveis de 2,32 a 16,64 µg g<sup>-1</sup>,

enquanto que, na safra de 1995 houve um decréscimo nos níveis de contaminação (0,57 – 9,97  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) fato que se repetiu na safra de 1997, na qual 21 das 37 amostras estavam contaminadas com níveis de 0,05 – 2,67  $\mu\text{g g}^{-1}$ . 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  $\mu\text{g g}^{-1}$  (ONO et al., 2004).

Em outro estudo, ONO et al. (2006a), detectaram *Fusarium* spp. e fumonisinas em 100% das amostras (n = 109) de milho recém colhido das regiões centro-sul, centro-oeste e norte do Estado do Paraná. A contaminação com *Fusarium* spp. variou de  $1,0 \times 10^3$  a  $2,2 \times 10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$  e os níveis de fumonisinas de 0,13 – 20,38  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Adicionalmente, grãos aparentemente sadios e ardidos (n= 24) foram selecionados para análise de fumonisinas, sendo, os níveis de contaminação de 0,57 – 20,38  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 68,96 – 336,38  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

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, apontou 97,9% de positividade para FB<sub>1</sub>, com concentrações variando entre 0,3 a 9,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Em 66,7% das amostras houve co-ocorrência de FB<sub>1</sub> e AFB<sub>1</sub>, a qual foi detectada em 66,3% das amostras em níveis variando de 2 a 21  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Adicionalmente, zearalenona foi detectada em 77,1% das amostras, porém em baixas concentrações (< 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (OLIVEIRA, 2006).

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 os principais gêneros fúngicos contaminantes foram *Penicillium* spp., seguido por *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., sendo que 25% das amostras apresentaram contaminação com *A. flavus*. Quanto à presença de micotoxinas, a FB<sub>1</sub> foi a mais frequente, presente em 97,8% das amostras (níveis 1,5 a 5,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), seguida por zearalenona (77,1%; níveis 0,1 a 7,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e AFB<sub>1</sub> (66,7%; níveis 1,2 a 17,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Em 64,5% das amostras houve co-ocorrência de FB<sub>1</sub> e AFB<sub>1</sub> (OLIVEIRA et al., 2006).

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<sub>1</sub> em toda a cadeia produtiva do milho. Os níveis de contaminação variaram de 0,11 – 12,68  $\mu\text{g g}^{-1}$  nas amostras recém-colhidas, 0,10 – 11,83  $\mu\text{g g}^{-1}$  na recepção e 0,02 – 10,98  $\mu\text{g g}^{-1}$  na etapa de pré-secagem. Quanto à contaminação por FB<sub>2</sub> os níveis foram de 0,01 – 5,26  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 0,02 – 5,25  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 0,07 – 7,89  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente (ONO et al., 2008).

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 variando de 2,54  $\mu\text{g g}^{-1}$  (recepção) e 3,12  $\mu\text{g g}^{-1}$  (pré-secagem). Por outro lado, na safra 2004 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. Apenas 8% das amostras apresentaram co-contaminação com aflatoxinas sendo que os níveis médios de contaminação variaram de 23,4 a 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

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 fúngica e por micotoxinas. Todas as amostras (100%) apresentaram contaminação com fungos sendo que *F. verticillioides* foi a espécie de maior prevalência em todas as regiões. As fumonisinas foram as micotoxinas mais frequentemente encontradas, sendo que 98% das amostras estavam contaminadas com FB<sub>1</sub> e 74,5% com FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>. Os níveis mais altos foram detectados nas amostras de Nova Odessa, com concentrações de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> 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 AFB<sub>1</sub>, 7 (3,5%) com AFB<sub>2</sub> e 1 (0,5%) com AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>. As amostras de Santa Maria foram as que apresentaram os maiores níveis de contaminação. Das 50 amostras, 7 estavam contaminadas com AFB<sub>1</sub> (níveis variando de 13,7 a 1.393  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); 5 com AFB<sub>2</sub> (níveis = 5,6 a 55,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); e uma com AFG<sub>1</sub> (39,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) + AFG<sub>2</sub> (29,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (ROCHA et al., 2009).

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 AFB<sub>1</sub> com níveis de 1 a 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (ALMEIDA et al., 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um ensaio imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para detecção de aflatoxinas em ração destinada a aves.
- Avaliar o risco de exposição de frangos de corte e galinhas poedeiras a fumonisinas e aflatoxinas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e validar intra-laboratorialmente um ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) baseado em anticorpo monoclonal anti-AFB<sub>1</sub> para análise de aflatoxinas em ração destinada a frangos de corte e galinhas poedeiras;
- Avaliar a microbiota fúngica e os níveis de fumonisinas e aflatoxinas em ração destinada a frangos de corte e galinhas poedeiras.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 RAÇÃO DESTINADA À ALIMENTAÇÃO DE GALINHAS POEDEIRAS

As amostras de ração destinada a galinhas poedeiras foram coletadas na Granja Experimental da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. A ração (lote de 500 kg) era preparada em intervalos de 7 a 10 dias, de acordo com a constituição elaborada pelo zootecnista responsável (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Foram realizadas amostragens com intervalos de aproximadamente dois a três dias compreendendo amostras do início, meio e final do lote durante o período de janeiro a dezembro de 2010 totalizando 98 amostras.

**Tabela 1** – Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras no período de 08/01/10 a 23/01/10.

<b>Composição da Ração</b>	
	Quantidade (kg)
Milho grão	64,8
Farelo de soja	23,8
Calcário	8,8
Fosfato bicálcico	1,2
Premix postura	0,4
Óleo de soja	0,4
Sal	0,3
DL – metionina	0,12

**Tabela 2** – Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras no período de 24/01/10 a 22/04/10.

<b>Composição da ração</b>	
	Quantidade (kg)
Milho grão	65
Farelo de soja	24
Calcário	9
Fosfato bicálcico	1,2
Premix postura	0,5
Óleo de soja	0,1
Sal	0,3

**Tabela 3** – Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras no período de 23/04/10 a 19/06/10.

<b>Constituição da ração</b>	
	Quantidade (kg)
Milho grão	61,2
Farelo de soja	25,6
Calcário	8,2
Fosfato bicálcico	2,1
Premix postura	0,5
Sal	0,3
Óleo de soja	1,9
DL- Metionina	0,11
Lisina	0,036

**Tabela 4** – Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras no período de 20/06/10 a 30/08/10.

<b>Constituição da ração</b>	
	Quantidade (kg)
Milho grão	61
Farelo de soja	25,6
Calcário	9
Fosfato bicálcico	1,6
Premix postura	0,4
Óleo de soja	1,7
Sal	0,3
DL - Metionina	0,18

#### 4.2 RAÇÃO DESTINADA À ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Quatro tipos de ração peletizada destinadas à alimentação de frangos de corte (pré-inicial, inicial, engorda e abate) foram coletados em uma granja comercial situada na Região Norte do Paraná. Na tabela abaixo, estão representados exemplos de constituição dos diferentes tipos de ração. Foram realizadas três amostragens por dia (manhã, meio-dia e tarde) durante o período correspondente a um ciclo de produção (junho a agosto de 2010) totalizando 158 amostras.

**Tabela 5** – Exemplos de fórmulas de ração com base nos ingredientes milho e farelo de soja para atender as diferentes fases da produção de frangos.

Ingredientes (kg)	Pré-inicial	Inicial	Engorda	Abate
	1 a 7 (dias)	8 a 21 (dias)	22 a 35 ou 22 a 42 (dias)	35 a 42 ou 42 a 49 (dias)
Milho	55,58	54,70	57,82	57,93
Farelo de soja	37,10	36,62	32,90	32,88
Calcário	1,33	1,29	1,11	1,11
Fosfato bicálcico	1,98	1,83	1,74	1,74
Óleo de soja	2,75	4,35	5,39	5,37
Sal	0,51	0,51	0,46	0,46
Premix mineral	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix vitamínico	0,13	0,12	0,10	0,10
L – Lisina HCl	0,16	0,15	0,12	0,12
DL - Metionina	0,23	0,22	0,18	0,18
Cloreto de Colina (70%)	0,11	0,09	0,06	0,06
Avilamicina	0,01	0,01	0,01	-
Monensina	0,06	0,06	0,06	-
Total	100	100	100	100

Fonte: Bellaver (2003).

#### 4.3 AMOSTRAGEM

A amostragem da ração destinada a galinhas poedeiras consistiu na coleta de subamostras em vários pontos a diferentes profundidades do “baú” no qual a ração é armazenada (Figura 9), enquanto que, a amostragem da ração destinada a frangos de corte consistiu na coleta de subamostras nas caixas de alimentação dos comedouros automatizados do tipo “Tuboflex” (Figura 10). Os comedouros automatizados estão conectados diretamente a silos que se localizam adjacentes ao aviário. Destes, a ração é conduzida até as caixas de alimentação, situadas no interior dos galpões. No sistema “Tuboflex”, helicóides conduzem a ração para os pratos de arraçamento (IGAYARA, 2006). Após homogeneização do material, as amostras de ração (aproximadamente 500g) foram conduzidas ao laboratório e estocadas a 4 °C. Posteriormente, foram trituradas até a granulometria de 50 mesh e uma subalíquota de 200 g foi utilizada para a análise da microbiota fúngica e para determinação de fumonisinas e aflatoxinas.

**Figura 9** – Amostragem da ração destinada à alimentação de galinhas poedeiras.



**Figura 10** – Amostragem da ração destinada à alimentação de frangos de corte. Em seqüência: silo, caixa de abastecimento e pratos de arraçamento.



#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA

Uma alíquota de 10 g de ração triturada foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1% (v/v) e submetida a diluições seriadas em tubos contendo 9,0 mL do mesmo diluente até fator  $10^{-5}$ . Em seguida, 1 mL de cada diluição foi plaqueado, em duplicata, pelo método de “Pour plate” utilizando ágar batata dextrosado (BDA - pH 4,0) adicionado de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cloranfenicol. As placas foram incubadas a  $25^\circ\text{C}$  por seis dias e, submetidas à contagem e identificação dos gêneros fúngicos de acordo com os métodos preconizados por Nelson et al. (1983), Singh et al. (1991) e Samson et al. (1995).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA

Para determinação da atividade de água, foram selecionadas as amostras de ração destinadas a frangos de corte coletadas no meio do dia. A análise foi realizada em medidor Aqua Lab/Decagon CX-2 calibrado com água destilada  $a_w = 1,000 \pm 0,003$  a 20 – 25 °C.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS NAS AMOSTRAS DE RAÇÃO

A determinação de fumonisinas (FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo método de Shephard et al. (1990) modificado por Ueno et al. (1993).

##### 4.6.1 Extração de Fumonisinas

Para extração de fumonisinas, uma alíquota de 10 g de ração triturada adicionada de 30 mL de metanol:água (3:1, v/v) foi agitada a 150 rpm por 30 minutos e, após, filtrada em papel filtro Whatman nº 1. O filtrado (1 mL) foi submetido à pré-limpeza em minicoluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda), previamente acondicionada com 5 mL de metanol seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v/v). Após lavagem da coluna com 6 mL de metanol:água (3:1, v/v) seguidos por 3 mL de metanol, as fumonisinas foram eluídas com 10 mL de ácido acético 0,5% em metanol. O eluato foi seco a 45 °C em chapa aquecedora e o resíduo ressuspensa em 800 µL de metanol:água (3:1, v/v). Este foi fracionado em alíquotas de 200 µL, as quais foram secas sob fluxo de gás N<sub>2</sub> a 45 °C, procedendo-se o acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior análise de fumonisinas.

##### 4.6.2 Determinação de Fumonisinas

A alíquota de 200 µL foi ressuspensa em acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetida à derivatização com 200 µL de o-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio a 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol). A amostra foi injetada dentro de 1 minuto no sistema cromatográfico (isocrático de fase reversa) utilizando como fase móvel metanol: fosfato de sódio (CH<sub>3</sub>OH:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,1 mol L<sup>-1</sup> (80:20, v/v) pH

3,3 ajustado com ácido orto-fosfórico e fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O sistema constituiu-se de bomba Shimadzu LC-10 AD, detector de fluorescência RF-10A XL e coluna C18 (2) Luna 5 $\mu$  100Å (4,6 x 250 mm, Phenomenex). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 nm e 450 nm, respectivamente.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS NAS AMOSTRAS DE RAÇÃO POR CLAE

##### 4.7.1 Extração de Aflatoxinas

A extração de aflatoxinas das amostras de ração e a pré-limpeza do extrato foram realizadas utilizando colunas de imunoafinidade (CIA) Aflatest® (Vicam) de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 20 g de ração adicionada de 2 g de NaCl e 40 mL de metanol: H<sub>2</sub>O (80:20) foi agitada a 150 rpm por 10 minutos, sendo, posteriormente, filtrada em papel filtro Whatman n° 1. A 10 mL do filtrado foram adicionados 40 mL de água ultra-pura e a solução foi filtrada em filtro de microfibras de vidro. Em seguida, 10 mL foram submetidos à limpeza em CIA sendo as aflatoxinas eluídas com 1,0 mL de metanol. O eluato foi seco a 45 °C sob fluxo de N<sub>2</sub>.

##### 4.7.2 Determinação de Aflatoxinas

A determinação de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) foi realizada por CLAE segundo o método de Miyamoto, Hamada e Kawamura (2008). As amostras foram submetidas à derivatização, pela adição de 100  $\mu$ L de ácido trifluoroacético (TFA), agitadas por 30 segundos, sonicadas por 5 minutos e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, na ausência de luz. Após o período de incubação, foram adicionados 900  $\mu$ L de acetonitrila:água (1:9, v/v) seguido de agitação por 15 segundos, sendo uma alíquota de 20  $\mu$ L injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

O sistema cromatográfico foi isocrático de fase reversa utilizando como fase móvel acetonitrila:água (25:75, v/v) a um fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, e cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japan) SCL-10AVP equipado com bomba LC-10AT, injetor Rheodyne modelo 7725i, detector de fluorescência RF-10A XL e coluna Luna C-18 Phenomenex (250 x 4,6 mm de diâmetro interno, 5  $\mu$ m, Scharlau, Barcelona, Spain). A determinação de aflatoxinas foi

realizada utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 450 nm, respectivamente.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS NAS AMOSTRAS DE RAÇÃO POR IC-ELISA

##### 4.8.1 Extração de Aflatoxinas

Alíquotas de 2 g de ração adicionadas de 10 mL de metanol:água (70:30, v/v) foram agitadas a 150 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o extrato bruto foi filtrado em papel filtro Whatman nº1 e diluído em PBST (PBS + 0,05 Tween 20) para as análises por ic-ELISA.

##### 4.8.2 Determinação de Aflatoxinas

A As aflatoxinas foram determinadas por ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) baseado em anticorpo monoclonal (AcM) de acordo com o método descrito por Kawamura et al. (1988). O hibridoma linhagem AF2 secretor de AcM específico para AFB<sub>1</sub> (isotipo IgG<sub>1</sub> lambda), derivada de mieloma linhagem SP2/0-AG14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, foi preparado na Universidade de Kagawa, Japão (Kawamura et al. 1988). O AcM apresentou 133%, 13,4% e 14,7% de reatividade cruzada com AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente, e baixas reatividades com AFM<sub>1</sub> (0,9), AFQ<sub>1</sub> (> 0,5), AFP<sub>1</sub> (0,9), AFB<sub>2a</sub> (> 0,5) (KAWAMURA et al., 1988).

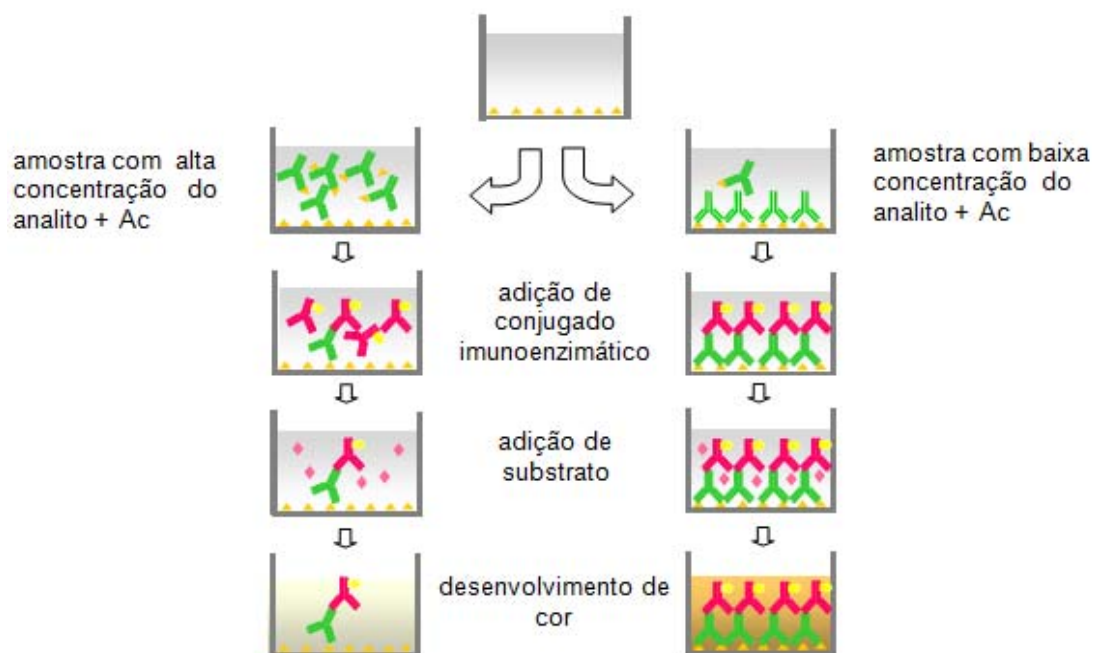
O hibridoma foi recuperado em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gradualmente adaptado em RPMI+10% SFB:H-SFM (meio hibridoma livre de soro, Gibco Co, USA) (25:75, v/v). Após a saturação celular, as células foram removidas e o sobrenadante precipitado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a 50% de saturação, seguido por estocagem a -80 °C. Para uso, o precipitado foi dissolvido em PBS (0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,3) e dialisado contra PBS seguido por água-ultra-pura (4 °C, 32 h). Azida sódica (0,02%) foi adicionada ao AcM dialisado e este foi aliquotado (30 µL) e estocado a -20 °C.

As microplacas (Corning, New York, USA) foram sensibilizadas com 100 µL de AFB<sub>1</sub>-BSA (2,5 µg mL<sup>-1</sup> em tampão PBS 0,015 M, pH 7,3) e incubadas a 4 °C por 18 h. Após 5 lavagens com PBST (PBS + 0,05% Tween 20), as placas foram bloqueadas com 200 µL de solução ovalbumina 0,1% em PBS e incubadas por 1 h a 37 °C. Após 5 lavagens

com PBST, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  das soluções padrão de AFB<sub>1</sub> em concentrações de 0,05 a 10  $\text{ng mL}^{-1}$  ou 50  $\mu\text{L}$  dos extratos das amostras, seguido pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de AcM anti-AFB<sub>1</sub> (diluído 1:10.000 em PBST). Após incubação a 25 °C por 1 h as placas foram lavadas com PBST (5 vezes) e adicionadas de 100  $\mu\text{L}$  de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* (diluído 1:7.000 em PBST) seguido por incubação a 25 °C por 1 h. Após 5 lavagens com PBST, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução de substrato cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (1,66  $\mu\text{L}$  30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100  $\mu\text{L}$  0,1% TMB em dimetil sulfóxido por 10 mL de tampão acetato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 5,0) por 20 min a 25 °C sendo a reação enzimática interrompida com 100  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A absorvância for lida a 450 nm em leitora de ELISA (Bio-Tek Instruments ELX800, USA).

O ELISA competitivo indireto desenvolvido neste estudo fundamentou-se na competição entre a micotoxina presente na amostra e a toxina imobilizada na microplaca, pelo mesmo sítio específico do AcM anti-AFB<sub>1</sub>. A concentração de aflatoxinas nas amostras foi indiretamente quantificada uma vez que o conjugado anti-IgG-enzima (Ac secundário) é adicionado posteriormente à lavagem da microplaca após a etapa de competição ligando-se, portanto, somente aos AcMs anti-AFB<sub>1</sub> que estão aderidos à aflatoxina imobilizada na microplaca (AFB<sub>1</sub>-BSA) (Figura 11).

**Figura 11** – Esquema de ic-ELISA



Fonte: Ono et al. (2006b).

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS NAS AMOSTRAS DE RAÇÃO POR ELISA COMERCIAL

A determinação de aflatoxinas por kit comercial Ridascreen® Aflatoxin Total (R-Biopharm, Alemanha) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Para extração de aflatoxinas, 2 g de ração adicionados de 10 mL de metanol:água (70:30, v/v) foram agitados a 150 rpm por 10 minutos seguido por filtração em papel filtro Whatman n°1. Para as análises, 100 µL do filtrado foram diluídos em tampão de diluição da amostra (600 µL).

Foram adicionados à microplaca, revestida com anticorpos direcionados aos anticorpos anti-aflatoxinas (anticorpos de captura), 50 µL dos padrões (0,5 a 40,5 ng g<sup>-1</sup>) ou dos extratos das amostras e 50 µL das soluções de anticorpo anti-aflatoxinas e de conjugado AFB<sub>1</sub>-enzima peroxidase seguido por incubação por 30 minutos a 25 °C no escuro. Após três lavagens com água destilada, foram adicionados 50 µL da solução de substrato (peróxido de uréia) e 50 µL de TMB. Após outro período de incubação foram adicionados 100 µL de ácido sulfúrico 1N sendo as absorvâncias lidas a 450 nm (leitora de ELISA Bio-Tek Instruments ELX800, USA).

#### 4.10 VALIDAÇÃO INTRA-LABORATORIAL DO IC-ELISA

Para a validação intra-laboratorial do ic-ELISA desenvolvido foram determinados parâmetros como linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão e especificidade.

A linearidade foi avaliada pela análise de regressão linear de sete curvas de calibração utilizando padrão de AFB<sub>1</sub> em concentrações variando de 0,05 a 10,0 ng mL<sup>-1</sup> (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados conforme as fórmulas: LD = média - 3 x desvio padrão e LQ = média - 5 x desvio padrão, i.e., média e desvio padrão das absorvâncias de 7 replicatas de uma amostra de ração na qual não foram detectadas aflatoxinas por CLAE (amostra branco) (INMETRO, 2007).

A determinação da exatidão foi realizada por meio de testes de recuperação de aflatoxinas em amostras de ração artificialmente contaminadas com 10, 25, 50 e 100 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) (ANVISA, 2003; Commission of the European Communities, 2006).

A precisão foi determinada pelos parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada pela análise dos desvios padrão relativos de 7 replicatas, de um mesmo extrato, para cada concentração avaliada (10, 25, 50 e 100 ng g<sup>-1</sup> aflatoxinas totais) sendo os ensaios conduzidos no mesmo dia. Para o cálculo da precisão intermediária foi realizado o mesmo procedimento por mais dois dias consecutivos totalizando três determinações para cada concentração (ANVISA, 2003; Commission of the European Communities, 2006; INMETRO, 2007).

A especificidade do método foi avaliada por meio da análise da interferência causada pela matriz da amostra (sem aflatoxinas) (ANVISA, 2003). Foram testadas diluições do extrato da amostras entre 1:10 a 1:500. Adicionalmente, foi confeccionada uma curva padrão diluída no extrato da amostra em comparação à curva padrão preparada em PBS:metanol (9:1). Havendo sobreposição das duas curvas o efeito de matriz não é significativo (Zhang et al., 2009).

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas utilizando o software Statistica versão 7.0 (Tulsa, Oklahoma, USA).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão foram redigidos sob a forma de artigos científicos a serem submetidos para publicação, os quais se encontram listados abaixo.

Os Artigos A: Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed e 2: Evaluation of fumonisin and aflatoxin levels in broiler feed from Northern Paraná State, Brazil, foram redigidos de acordo com as normas do periódico Food Chemistry.

Artigo C: Co-occurrence of aflatoxins and fumonisins in feed intended for laying hens from Northern Paraná State, Brazil, foi redigido de acordo com as normas do periódico Food Additives and Contaminants.

## ARTIGO A

### 5.1 IMMUNOASSAY BASED ON MONOCLONAL ANTIBODY FOR AFLATOXIN DETECTION IN POULTRY FEED

## IMMUNOASSAY BASED ON MONOCLONAL ANTIBODY FOR AFLATOXIN DETECTION IN POULTRY FEED

### Abstract

An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on an anti-Aflatoxin B<sub>1</sub> monoclonal antibody was standardized and validated for aflatoxin screening in poultry feed samples and its performance was compared with high performance liquid chromatography and commercial ELISA kit. The ic-ELISA showed detection limit of 1.25 ng g<sup>-1</sup> for broiler feed and 1.41 ng g<sup>-1</sup> for laying hen feed. Mean aflatoxin recovery rates by ic-ELISA were 102% (laying hen feed) and 98% (broiler feed). Among 34 broiler feed samples evaluated, aflatoxins were detected in 88.2% by ic-ELISA (mean 10.48 ng g<sup>-1</sup>), 88.2% by HPLC (mean 8.41 ng g<sup>-1</sup>) and 100% by ELISA kit (mean 14.46 ng g<sup>-1</sup>). Additionally, aflatoxins were detected in 92%, 92% and 97.2% laying hen feed samples (n=36) by ic-ELISA, HPLC, and ELISA kit, respectively. The developed ic-ELISA showed reliability and high correlation with HPLC and commercial ELISA indicating its potential for aflatoxin screening in poultry feed samples.

**Keywords:** Mycotoxins. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Broiler feed. Laying hen feed. Validation.

### 1 INTRODUCTION

Aflatoxins are a group of structurally related toxic metabolites produced mainly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* (Eaton & Groopman, 1994). The major naturally occurring aflatoxin analogues are B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) and G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>). AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub> are the most commonly detected analogues in agricultural commodities (Goldblatt, 1971).

These mycotoxins have been shown to cause mutagenic, teratogenic and hepatocarcinogenic effects (CAST, 2003). The International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002) has classified naturally occurring mixtures of aflatoxins as carcinogenic to humans (Group 1). In poultry, they can cause an increase in liver and kidney weights, multifocal hepatic necrosis, biliary hyperplasia, diarrhea, immunosuppression and decreased feed intake, weight gain and feather mass (Sklan, Klipper & Friedman, 2001; Giacomini, Fick, Dilkin, Mallmann, Rauber & Almeida, 2006).

Aflatoxin contamination in poultry feed is a worldwide problem (Dalcero et al., 1998; Beg, Al-Mutairi, Beg, Al-Mazeedi, Ali and Saeed, 2006; Oliveira et al., 2006) and can cause serious economic losses due to increased mortality in farm animals and grain downgrading as an animal feed and as an export commodity (Bennet & Klich, 2003). Furthermore, when metabolized by poultry, aflatoxins or its metabolites can occur in tissues,

blood, breasts, gizzard, liver and eggs consisting in a potential threat to the human consumer (Herzallah, 2009; Cortés et al., 2010; Salwa & Anwer, 2009)

Aflatoxin determination in food and feed is currently performed by high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS) (CAST, 2003, Kolosova, Shim, Yang, Eremin & Chung, 2006). Although most of these methods are sensitive and accurate, they are laborious, expensive, time-consuming, unsuitable for analysis of large number of samples and also require costly equipment and extensive clean-up procedures (Kolosova et al., 2006).

Due to the strict guidelines on mycotoxin contamination that have been imposed by importing countries, fast, reliable and sensitive analytical methods are needed. This demand has led to the development of rapid screening methods for mycotoxins based on immunochemical techniques such as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), since they do not require costly instrumentation and are able to analyze a large number of samples simultaneously (Krska, Schubert-Ullrich, Molinelli, Sulyok, Macdonald & Crews, 2008; Zhang, Wang & Fang, 2011). In general, ELISAs are rapid, simple, specific, sensitive, can be used in the field and have become the most common rapid methods for mycotoxin detection in food and feed (Zheng, Humphrey, King & Richard, 2005). Additionally, the detection limits of ELISA can be comparable with or even lower than those obtained by instrumental methods (Kolosova et al., 2006).

However, commercial ELISA kits are expensive which makes their inclusion difficult in routine analysis in developing countries (Devi et al., 1999), therefore investments on immunoreagent production are an alternative to reduce costs. Several researchers have reported the development of ELISA methods based on monoclonal antibodies for AFB<sub>1</sub> detection and their application to different matrices (Zheng et al., 2005; Kolosova et al., 2006; Chun, Kim, Ok, Hwang & Chung, 2007; Li et al., 2009).

Aflatoxins are heat stable and cannot be removed by industrial processing, therefore carry-over of aflatoxin metabolites to meat and eggs can occur and increase the human hazard exposure. The most effective control measure depends on a rigorous program of monitoring the feed producing chain by sensitive and reliable analytical methods in order to minimize health risks. In this study, an indirect competitive ELISA (ic-ELISA) based on an anti-AFB<sub>1</sub> monoclonal antibody was standardized and validated for aflatoxin screening in poultry feed samples and its performance was compared to high performance liquid chromatography (HPLC) and commercial ELISA kit.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 PRODUCTION OF ANTI-AFB<sub>1</sub> MONOCLONAL ANTIBODY (MAB)

The hybridoma cell line AF2 secreting specific anti-AFB<sub>1</sub> mAb (IgG<sub>1</sub> lambda isotype), derived from myeloma cell line Sp2/0-AG14 and BALB/c splenic cell, was prepared at Kagawa University, Japan (Kawamura, Nagayama, Sato, Ohtani, Ueno & Ueno, 1988).

The hybridoma cell line AF2 was cultured in RPMI + 10% Fetal Bovine Serum: H-SFM (Hybridoma Serum-Free Medium, Gibco Co, USA) (25:75, v/v). Anti-AFB<sub>1</sub> mAb was precipitated with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 50% saturation from the supernatant and stored at -80 °C. Before using, the precipitate was dissolved in 0.1 mol l<sup>-1</sup> phosphate buffered saline (PBS) pH 7.3 and then dialyzed against PBS followed by ultrapure water (4 °C, 32 h). Sodium azide 0.02% was added to the dialyzed mAb (semipurified) and it was aliquoted (30 µl) and stored at -20 °C. The anti-AFB<sub>1</sub> mAb was used for aflatoxin determination by ic-ELISA. This mAb cross-reacted with AFB<sub>1</sub> (100%), AFB<sub>2</sub> (133%), AFG<sub>1</sub> (13.4 %) and AFG<sub>2</sub> (14.7 %), but it showed very low cross-reactivity against AFL<sub>1</sub>, AFL<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub> and AFB<sub>2a</sub> (Kawamura et al., 1988).

### 2.2 SAMPLING

Feed samples intended for broilers (n = 34) and for laying hens (n = 36), collected in 2010, from a poultry breeding and from the Experimental Farm of the State University of Londrina, Northern Paraná State, Brazil, respectively, were evaluated for natural aflatoxin contamination. Feed intended for broilers belonged to four feed types (pre-starter, starter, grower and finisher) and were pelleted, while feed intended for laying hens were mashed. For aflatoxin determination, 200 g of each sample were ground to 50 mesh and stored at -20 °C.

## 2.3 AFLATOXIN ANALYSIS BY IC-ELISA

### 2.3.1 Aflatoxin Extraction

Aflatoxin extraction was performed according to Kawamura et al. (1988). An aliquot of feed sample (2 g) was shaken for 10 min at 150 rpm with 10 ml methanol: water (70:30, v/v). Then, the crude extract was filtered through Whatman n° 1 filter paper and diluted in PBST (PBS + 0.05% Tween 20) for ic-ELISA determination.

### 2.3.2 ic-ELISA

Aflatoxins were determined by a monoclonal antibody based ic-ELISA according to Kawamura et al. (1988). Polystyrene microtitre plate wells (Corning, New York, USA) were coated with 100 µl AFB<sub>1</sub>-BSA (bovine serum albumin) in PBS 0.015 mol l<sup>-1</sup> pH 7.3 at 4 °C for 18 h. The microtitre plates were washed five times after each incubation step with PBST (PBS + 0.05% Tween 20). In order to minimize nonspecific binding, the wells were blocked with 200 µl 0.1% ovalbumin in PBS at 37 °C for 1 h. After the washing step, 50 µl anti aflatoxin B<sub>1</sub> monoclonal antibody and 50 µl AFB<sub>1</sub> standards (0.05 - 10 ng ml<sup>-1</sup>) or feed extracts were added, and incubated at 25 °C for 1 h. Following a washing step, 100 µl horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgG were added and incubated at 25 °C for 1 h. The microplates were washed again, and 100 µl 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution were added. After 20 min the reaction was stopped by adding 50 µl with 100 µl 1 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The absorbance was measured at 450 nm in ELISA microplate reader (Bio-Tek Instruments ELX800, USA). The average absorbance was calculated from the individual absorbances obtained from triplicate wells and results were expressed as percentage of binding:

$$\text{Binding (\%)} = A^+/A^- \times 100$$

Where A<sup>+</sup> is the mean absorbance in the presence of aflatoxin standard or feed extract sample and A<sup>-</sup> is the mean absorbance in their absence.

An in-house validation was applied, and the parameters evaluated were linearity, detection limit (LOD), quantification limit (LOQ), accuracy, precision and specificity.

The linearity was assessed according to the linear regression analysis of seven calibration curves of AFB<sub>1</sub> standard at concentrations ranging from 0.05 to 10.0 ng ml<sup>-1</sup> (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

The LOD and LOQ were calculated as 3-fold and 5-fold the standard deviation of absorbance from three replicate wells of unspiked sample of each matrix analyzed on 7 different days, respectively (INMETRO, 2007). A method blank was prepared in order to verify that none of the solvents, reagents, and instrumentation added any detectable positive biases to the toxin concentrations.

Accuracy and precision (repeatability and intermediate precision) were based on relative standard deviations (RSD %) of aflatoxin recovery tests. Feed samples intended for broilers and laying hens with non-detectable aflatoxin levels by HPLC were artificially spiked with aflatoxins at concentrations of 10, 25, 50 and 100 ng g<sup>-1</sup> (sum of the four analogues) and were maintained at 4 °C for 18 h before the extractions. Accuracy was assessed by aflatoxin recovery from two determinations (two extractions) in triplicate. Repeatability was evaluated by one determination (one extraction) of each concentration analyzed in seven replicates at the same day, while for intermediate precision three determinations were performed by different analysts and on three different days (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

The method specificity was evaluated by interference of each matrix analyzing samples without contamination (ANVISA, 2003). The matrix interferences of feed intended for broilers and for laying hens were analyzed testing dilutions ranging from 10-fold to 500-fold. Additionally, matrix interference was determined by comparing a standard curve prepared in PBS, with a calibration curve added by a blank of the sample extract. If the two curves are superimposed, the matrix effect is not significant (Zhang, Wang, Fang, Wang & Fang, 2009).

## 2.4 AFLATOXIN DETERMINATION BY HPLC

### 2.4.1 Extraction and Clean-up

Aflatoxin extraction and clean up were carried out using AflaTest<sup>®</sup> immuno-affinity columns (Vicam), according to the manufacturer instructions for feed samples. An aliquot of feed sample (20 g) added to 2 g NaCl was shaken at 150 rpm for 10 min with 40 ml methanol: water (80:20, v/v). The extract was filtered through Whatman n° 1 filter paper. The filtrate (10 ml) was diluted with 40 ml ultra-pure water and then filtered through a glass microfibre filter. Then, an aliquot of 10 ml was applied on immuno-affinity column at a flow rate of 1 to 2 drops s<sup>-1</sup>. The column was washed twice with 10 ml ultra-pure water. Finally, aflatoxins were eluted with 1 ml methanol. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45 °C.

### 2.4.2 HPLC analysis

Aflatoxins (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>) were analyzed according to Miyamoto, Hamada and Kawamura (2008). The dried samples were derivatized with 100 µl Trifluoroacetic acid (TFA), mixed for 30 seconds, sonicated for 5 min and incubated at 25 °C for 15 min, in the dark. Then, 900 µl acetonitrile: water (1:9, v/v) were added following mixing for 15 seconds and an aliquot (20 µl) was injected into HPLC.

Aflatoxins were analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a C-18 Luna Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Spain). Excitation and emission wavelengths were 365 and 450 nm, respectively. The mobile phase was CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O (25:75, v/v) and the flow rate was 1.2 ml min<sup>-1</sup>.

The detection and quantification limits were defined as three and five times, respectively, the area standard deviation of seven spiked standards at lower concentration (2 ng g<sup>-1</sup>) detectable by HPLC in different days. Detection limits for HPLC were 0.13 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>1</sub>), 0.03 ng g<sup>-1</sup> (AFG<sub>1</sub>), 0.59 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>2</sub>) and 0.22 ng g<sup>-1</sup> (AFG<sub>2</sub>). The LOQs were 0.32 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>1</sub>), 0.15 ng g<sup>-1</sup> (AFG<sub>1</sub>), 1.09 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>2</sub>) and 0.48 ng g<sup>-1</sup> (AFG<sub>2</sub>).

The method accuracy was evaluated by aflatoxin recovery rates from feed samples artificially spiked with aflatoxins at concentrations of 10, 25, 50 and 100 ng g<sup>-1</sup> (sum

of the four analogues) obtained from two determinations of each concentration (ANVISA, 2003). Recovery rates for total aflatoxins ranged from 84 to 109% with mean of 102% (RSD: 0.29 – 13.96%) while the mean recovery rates for each analogue spiked at concentrations from 2.5 to 25 ng g<sup>-1</sup> were 96% for AFB<sub>1</sub>, 113% for AFG<sub>1</sub>, 92% for AFB<sub>2</sub> and 102% for AFG<sub>2</sub> (mean CV 12.1%).

## 2.5 AFLATOXIN ANALYSIS BY COMMERCIAL ELISA KIT

Aflatoxins were also determined by a competitive enzyme immunoassay (Ridascreen<sup>®</sup> Aflatoxin Total, R-Biopharm, Germany) according to the manufacturer instructions. Aflatoxin extraction was carried out by shaking 2 g feed sample with 10 ml methanol:water (70:30, v/v) at 150 rpm for 10 min, at 25 °C and then filtering through Whatman No. 1 filter paper. Briefly, 50 µl aflatoxin standard (0.05 to 4.05 ng g<sup>-1</sup>) or sample extracts, 50 µl conjugate AFB<sub>1</sub>-peroxidase and 50 µl antibody solutions were added into microtiter plate wells coated with capture antibodies against anti-aflatoxin antibodies, followed by incubation at 25 °C for 30 min in the dark. After three washing steps with distilled water, 50 µl substrate (urea peroxide) and 50 µl chromogen (tetramethylbenzidine) were added to each well. After incubation at 25 °C for 30 min, in the dark, 100 µl stop solution (sulfuric acid 1N) were added and the absorbances were measured at 450 nm in ELISA microplate reader (Bio-Tek Instruments ELX800, USA).

According to the manufacturer, the aflatoxin detection limit was 1.75 ng g<sup>-1</sup>. The AFB<sub>1</sub> recoveries from spiked corn starch in the range from 2.5 to 80 ng g<sup>-1</sup> were 85% with CV 15%.

## 2.6 CORRELATION ANALYSIS OF IC-ELISA, RIDASCREEN<sup>®</sup> ELISA AND HPLC

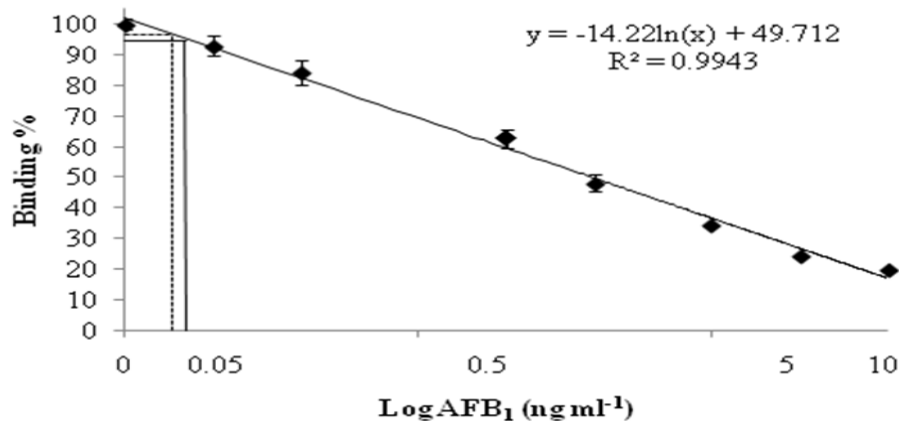
Aflatoxin levels of positive samples detected by ic-ELISA, ELISA Ridascreen<sup>®</sup> and HPLC were compared using the Pearson correlation test (software Statistica 7.0, Tulsa, USA).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

In this study an ic-ELISA based on monoclonal antibody was standardized for aflatoxin detection in naturally contaminated poultry feed samples. The optimized coating AFB<sub>1</sub>-BSA concentration, anti-AF mAb and anti-IgGHRP were 250 ng ml<sup>-1</sup>, 1:10,000 (corresponding to 173 ng ml<sup>-1</sup> protein concentration), and 1:7,000, respectively. Intra-laboratory validation of the ic-ELISA was based on the following parameters: linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, specificity and accuracy.

Figure 1 shows the ic-ELISA standard curve for aflatoxins (0.05 – 10.00 ng ml<sup>-1</sup>) and the linear regression analysis. A linear range was obtained between 0.05 ng ml<sup>-1</sup> and 10.0 ng ml<sup>-1</sup> with a good coefficient of determination ( $R^2 = 0.994$ ) and coefficient of linear correlation ( $r = 0.997$ ), which was higher than the minimal acceptable ( $r = 0.99$ ) (ANVISA, 2003). The LOD and LOQ was, respectively, 0.036 and 0.041 ng ml<sup>-1</sup> corresponding to 1.25 and 1.43 ng g<sup>-1</sup> for feed intended for broiler and 0.040 and 0.050 ng ml<sup>-1</sup> (1.41 and 1.75 ng g<sup>-1</sup>) for feed intended for laying hen. These results are similar to those reported by Li et al. (2009) but lower than those reported by Zheng et al. (2005). Li et al. (2009) obtained a LOD of 0.06 – 0.09 ng ml<sup>-1</sup> for a monoclonal antibody based ELISA developed for peanuts. Zheng et al. (2005) evaluated an ELISA AgraQuant<sup>®</sup> for total aflatoxin detection in cereals and derivatives and obtained a LOD of 2.5 ng g<sup>-1</sup> for corn.

**Figure 1** – Standard curve for AFB<sub>1</sub> detection by ic-ELISA. Circles represent the mean binding from seven standard curves performed on different days. Bars represent standard deviations. The detection limit was 0.036 ng ml<sup>-1</sup> (1.25 ng g<sup>-1</sup>) for feed intended for broiler (dashed line) and 0.040 ng ml<sup>-1</sup> (1.41 ng g<sup>-1</sup>) for feed intended for laying hen (continuous line), corresponding to the minimum concentration over 3 and 5% inhibition, respectively (mean minus 3-fold SD of 0 ng ml<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub>) detected by ic-ELISA.



Precision of ic-ELISA method was evaluated for repeatability and intermediate precision, in terms of relative standard deviations (RSD) calculated in percentage (Table 1). The repeatability and intermediate precision showed RSDs ranging, respectively, from 4.26 to 10.13% (mean = 8.03%) and 9.95 to 13.63% (mean = 11.58%) for broiler feed and from 5.92 to 8.47 (mean = 6.94%) and 7.28 to 15.96 (mean = 12.49%) for laying hen feed. All the results were below the recommended RSD values ( $\leq 10.56\%$  for repeatability) and  $\leq 16\%$  for intermediate precision for analysis at  $\text{ng g}^{-1}$  concentrations) by the Commission of the European Communities (2006).

**Table 1** – Repeatability and intermediate precision of ic-ELISA for aflatoxin (AF) determination in laying hen feed and broiler feed.

Feed	Total AF ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recovery					
		Repeatability *			Intermediate Precision*		
		mean $\pm$ SD	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> mean (%)	mean $\pm$ SD	RSD <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> mean (%)
Broiler	10	10.2 $\pm$ 0.4	4.26	8.03	10.22 $\pm$ 1.07	10.46	11.58
	25	24.3 $\pm$ 2.3	9.55		25.27 $\pm$ 3.44	13.63	
	50	51.2 $\pm$ 5.2	10.13		50.59 $\pm$ 6.22	12.29	
	100	104.4 $\pm$ 8.5	8.19		102.48 $\pm$ 10.2	9.95	
Laying hen	10	10.2 $\pm$ 0.9	8.47	6.94	10.6 $\pm$ 1.69	15.96	12.49
	25	25.5 $\pm$ 1.9	7.36		25.99 $\pm$ 2.35	9.02	
	50	48.6 $\pm$ 2.9	5.92		49.57 $\pm$ 3.61	7.28	
	100	97.5 $\pm$ 5.9	6.01		98.87 $\pm$ 10.35	10.47	

RSD: Relative Standard Deviation.

\* Repeatability was evaluated by one determination of feed samples artificially spiked with 10, 25, 50 and 100 ng g<sup>-1</sup> (aflatoxin total) analyzed in seven replicates at the same day, while for intermediate precision were performed three determinations by different analysts and on three different days.

Recommended values according to the Commission of the European Communities (2006): RSD<sub>r</sub> = 10.56% (0.66 times precision RSD<sub>R</sub> at the concentration of interest); RSD<sub>R</sub> = 16% calculated by the formula  $RSD_R = 2^{(1-0.5\log C)}$  (C = 0.000001 i.e. ng g<sup>-1</sup>) derived from Howirtz equation.

Specificity was evaluated by interference of each matrix without contamination. Matrix interferences in ic-ELISA were tested using feed samples intended for broilers and for laying hens with non-detectable aflatoxin levels by HPLC. Matrix interferences in ic-ELISA can result from non-specific interaction caused by protein, pigments, fat and solvents, or steric hindrance, which would overestimate the real toxin level. The matrix effect could be minimized by sample dilution prior to ELISA method (Ono et al., 2000). For the two types of feeds, 30-fold and 40-fold dilutions showed lower percentages of matrix interference. In addition, a calibration curve added by a blank of the sample extract (diluted 35-fold) was compared to a standard curve prepared in PBS: methanol (9:1) and the two curves were superimposed, indicating that the matrix effect was minimized (Zhang et al., 2009). Taking into account that 35-fold is an intermediate dilution between 30-fold and 40-fold and that in commercial ELISA tests the 35-fold dilutions are used, this dilution was selected for ic-ELISA standardized in this study.

The aflatoxin recovery rates from feed intended for broilers and for laying hens are shown in Table 2. In laying hen feed, aflatoxin recovery by ic-ELISA ranged from 98% to 103% (mean = 102%; RSD: 6.21 – 11.90%) and from 90% to 107% (mean 98%; RSD: 3.47 – 14.79%) for broiler feed. These results (Table 2) were similar to those reported for AFB<sub>1</sub> recovery (94 to 113%) from rice samples spiked with 10 to 500 ng g<sup>-1</sup> (Kolossova et al., 2006), but higher than aflatoxin recovery (87.5%) in peanut spiked with 4.0 ng ml<sup>-1</sup> total aflatoxins (Li et al., 2009).

**Table 2** – Accuracy of ic-ELISA evaluated through total aflatoxin recovery from feed samples intended for broilers and laying hens.

Feed	Aflatoxin total added (ng g <sup>-1</sup> )	Recovery (%)*	RSD <sup>a</sup>	Mean±SD
Laying	10	103±12.22	11.90	102±2.58
hen	25	98±8.46	8.65	

	50	103±6.40	6.21	
	100	103±7.23	7.01	
	10	97±14.29	14.79	
	25	90±7.88	8.75	
Broiler	50	107±14.46	13.5	98±7.02
	100	99±3.44	3.47	

\* Each result represents the mean ±SD of six determinations (duplicate spiking and triplicate analysis).

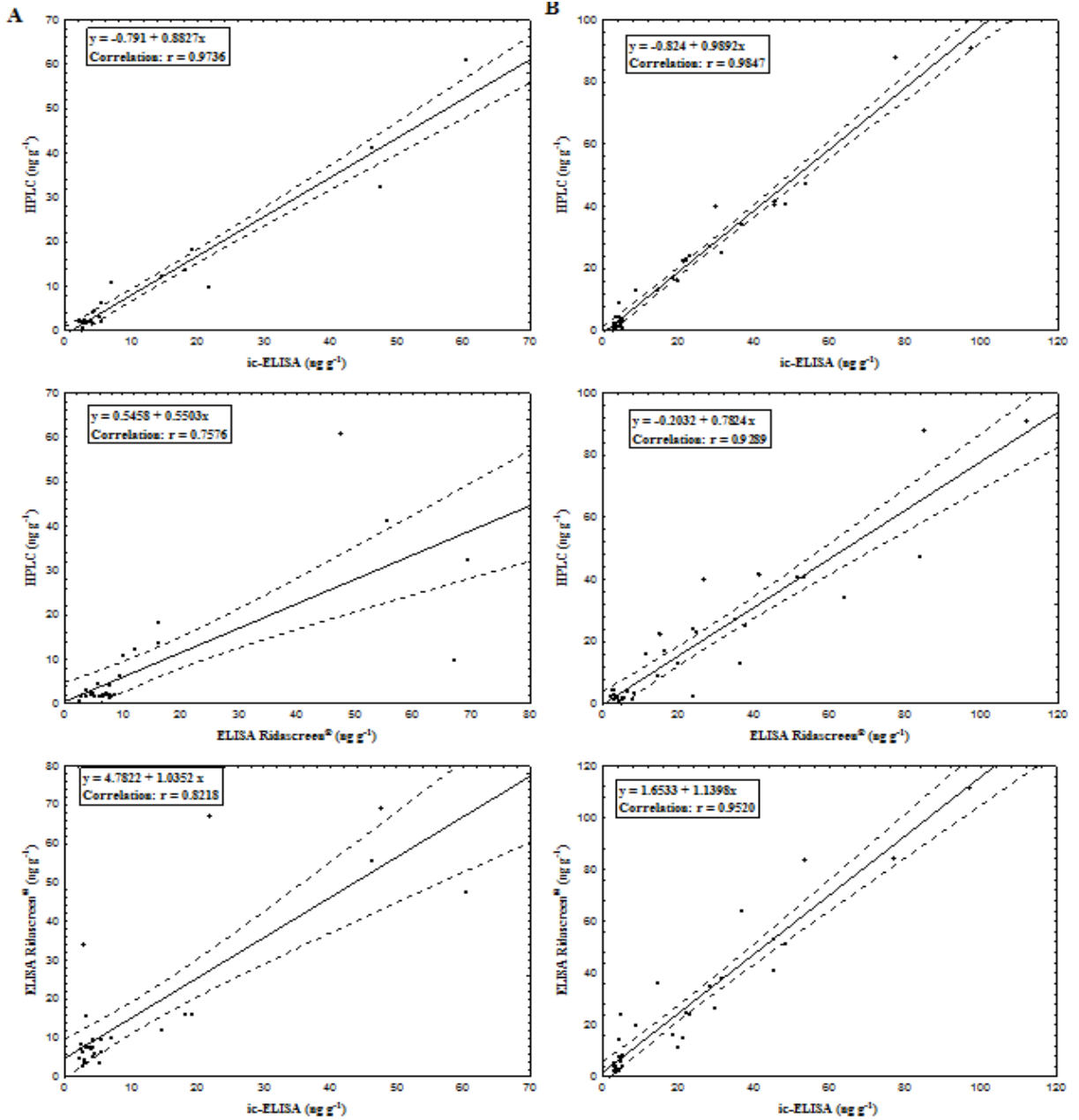
<sup>a</sup>Relative Standard Deviation (RSD): calculated as standard deviation/mean x 100.

Critical values for AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub> recovery (%) according to the Commission of the European Communities (2006): 1 – 10 ng g<sup>-1</sup> = 70 – 110%; >10 ng g<sup>-1</sup> = 80 – 110%.

According to the Commission of the European Communities (2006) the critical values for recovery of AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub> are 70 – 110%, for concentrations between 1 to 10 ng g<sup>-1</sup>, and 80 – 110% for concentrations higher than 10 ng g<sup>-1</sup>. Therefore, the standardized ic-ELISA showed adequate accuracy because the recovery rates remained within the recommended values.

Aflatoxin levels in feed samples intended for broiler (n = 34) and intended for laying hen (n = 36) analyzed by ic-ELISA, HPLC and commercial ELISA are shown in table 3. The analysis of broiler feeds (n = 34) by HPLC detected AFB<sub>1</sub> in 88.2% and AFB<sub>2</sub> in 26.5% samples. AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> were not detected in any sample. Considering total aflatoxins, 88.2% samples were contaminated at levels ranging from 0.79 to 60.80 ng g<sup>-1</sup> (mean = 8.41 ng g<sup>-1</sup>) by HPLC, while analysis carried out by ic-ELISA detected 88.2% aflatoxin positive samples at levels ranging from 2.20 to 60.45 ng g<sup>-1</sup> (mean = 10.48 ng g<sup>-1</sup>). Commercial ELISA (Ridascreen<sup>®</sup>) detected aflatoxins in 100% samples at levels ranging from 2.66 to 69.32 ng g<sup>-1</sup> (mean = 14.46 ng g<sup>-1</sup>). In four samples, aflatoxins were not detected by ic-ELISA but were detected by HPLC, probably because the levels were close to the LOD of ic-ELISA. However, in four samples aflatoxins were not detected by HPLC but were detected by both ELISA tests. The linear coefficients of correlation (r) were 0.97 between HPLC and ic-ELISA, 0.76 between HPLC and Ridascreen<sup>®</sup> ELISA and 0.82 between Ridascreen<sup>®</sup> ELISA and ic-ELISA (Figure 2).

**Figure 2** – Correlation between HPLC, ic-ELISA and ELISA Ridascreen<sup>®</sup> data for aflatoxin determination in naturally contaminated feed samples intended for broilers (column A, n = 34) and for laying hens (column B, n = 36).



**Table 3** – Natural occurrence of aflatoxins in feed samples intended for broilers and for laying hens evaluated by ic-ELISA, ELISA Ridascreen<sup>®</sup> and HPLC.

Feed	N	Positive samples (%)	ic-ELISA		Positive samples (%)	ELISA Ridascreen <sup>®</sup>		Positive samples (%)	HPLC	
			Aflatoxins (ng g <sup>-1</sup> )			Aflatoxins (ng g <sup>-1</sup> )			Aflatoxins (ng g <sup>-1</sup> )	
			Mean	Range		Mean	Range		Mean	Range
Broilers	34	30 (88.2)	10.48	2.20 – 60.45	100	14.46	2.66 – 69.32	30 (88.2)	8.41	0.79 – 60.80
Laying hens	36	33 (92.0)	20.83	2.90 – 96.8	35 (97.2)	24.24	1.90 – 111.48	33 (92)	19.75	1.03 – 91.04

ND = not detected aflatoxins: ic-ELISA: < 2.20 ng g<sup>-1</sup> (broilers) and 2.90 ng g<sup>-1</sup> (laying hens); ELISA Ridascreen<sup>®</sup>: < 2.66 ng g<sup>-1</sup> (broilers) and 1.90 ng g<sup>-1</sup> (laying hens); HPLC: < 0.79 ng g<sup>-1</sup> (broilers) and 1.03 ng g<sup>-1</sup> (laying hens).

Laying hen feeds ( $n = 36$ ) showed aflatoxin contamination in 92% samples at levels ranging from 2.90 to 96.80  $\text{ng g}^{-1}$  (mean = 20.83  $\text{ng g}^{-1}$ ) assessed by ic-ELISA and in 97.2% samples at levels ranging from 1.90 to 111.48  $\text{ng g}^{-1}$  (mean = 24.24  $\text{ng g}^{-1}$ ) by Ridascreen<sup>®</sup> ELISA. HPLC analysis detected AFB<sub>1</sub> in 89.7%, AFB<sub>2</sub> in 35.9% and AFG<sub>1</sub> in 2.6% samples. Regarding total aflatoxins, 92% samples were contaminated at levels ranging from 1.03 to 91.04  $\text{ng g}^{-1}$  (mean = 19.75  $\text{ng g}^{-1}$ ). In one sample aflatoxins were not detected by the three methods and in one sample they were detected only by Ridascreen<sup>®</sup> ELISA. In one sample aflatoxins were not detected by HPLC but were detected by both ELISAs. The linear coefficients of correlation ( $r$ ) were 0.98 between HPLC and ic-ELISA, 0.93 between HPLC and Ridascreen<sup>®</sup> and 0.95 between Ridascreen<sup>®</sup> ELISA and ic-ELISA (Figure 2). These differences are probably due to the use of immunoaffinity column for clean up prior to HPLC analysis which can minimize matrix interferences (Krska et al., 2008). However, high correlation coefficients were obtained independently of the method or the type of feed. Zheng et al. (2005) reported a similar coefficient of correlation (0.95) between AgraQuant<sup>®</sup> ELISA and HPLC for corn matrix.

The ic-ELISA/HPLC ratio for feed samples intended for broiler and for laying hen ranged from 0.65 to 3.69 and from 0.49 to 4.27, respectively, however, most of samples (52.9% and 61.1%) showed ratios between 0.81 and 1.8 (Table 4). The overestimation of mycotoxin levels by immunoassay has already been reported (Chinaphuti, Trikarunasawat, Wongurai and Kositcharoenkul, 2002; Zheng et al., 2005). In immunoassays, the sample matrix may contain compounds with similar chemical groups which could also bind to the antibodies and can lead to underestimates or overestimates the mycotoxin concentrations in commodity samples (Zheng et al., 2005).

In Brazil, the maximum allowed limit for aflatoxins in any product intended for animal feeding is 50  $\text{ng g}^{-1}$  (sum of the four analogues) (Brasil, 1988). For mature poultry, 100  $\text{ng g}^{-1}$  (sum of the four analogues) are the maximum allowed level in the United States of America (USA) while in European Union (EU) are 20  $\text{ng g}^{-1}$  (AFB<sub>1</sub>) (FAO, 2004). Therefore, in this study 86.7% and 93.3% (ic-ELISA) and 90% and 96.7% (HPLC analysis) feed samples intended for broiler showed aflatoxin levels below the maximum allowed levels in EU and Brazil. For laying hen feed samples these rates were 60.6% and 90.9% (ic-ELISA) and 60.6% and 93.9% (HPLC analysis), respectively. No sample of both feed types showed levels above the USA legislation.

The standardized ic-ELISA showed linearity, precision, accuracy, high sensitivity and high correlation coefficient with HPLC indicating its potential for aflatoxin screening in poultry feed samples, adding advantages such as simplicity, reduction of organic solvents and analysis of large number of samples which reduces the cost of analysis.

**Table 4** – ic-ELISA/HPLC ratio in feed intended for broilers and for laying hens from northern Paraná State.

ic-ELISA/HPLC ratio	Broiler (n = 34)	Laying hen (n = 36)
	N (%)	N (%)
ND – ND*		2 (5.56)
ND - D	4 (11.77)	1 (2.78)
D - ND	4 (11.77)	1 (2.78)
0.40 – 0.6	-	1 (2.78)
0.60 – 0.8	1 (2.94)	3 (8.33)
0.81 – 1.0	4 (11.77)	5 (13.89)
1.01 – 1.2	7 (20.59)	10 (27.78)
1.21 – 1.4	2 (5.88)	3 (8.33)
1.41 – 1.6	1 (2.94)	3 (8.33)
1.61 – 1.8	4 (10.26)	1 (2.78)
1.81 – 2.0	3 (8.82)	-
2.01 – 2.2	2 (5.88)	1 (2.78)
2.21 – 2.41	-	2 (5.56)
2.5 – 2.92	1 (2.94)	2 (5.56)
3.7 – 4.3	1 (2.94)	1 (2.78)

\* ND = not detected aflatoxins: ic-ELISA: < 2.20 ng g<sup>-1</sup> (broiler) and 2.90 ng g<sup>-1</sup> (laying hen); HPLC: < 0.79 ng g<sup>-1</sup> (broiler) and 1.03 ng g<sup>-1</sup> (laying hen).  
N = number of samples.

#### **4 ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors acknowledge the CNPq (the Brazilian Government organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers) in association with MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply), the Araucária Foundation (Paraná State grant), Paraná Fund/SETI and CAPES (Coordination for formation of High Level Professionals) – Nanobiotechnology Network Program (04/CII-2008) for financial support. The CNPq research productivity fellowship is greatly appreciated by E.Y.S.Ono, M.A. Ono and E.Y.Hirooka.

## References

- ANVISA (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil -Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
- Beg, M. U., Al-Mutairi, M., Beg, K. R., Al-Mazeedi, H. M., Ali, L. N. & Saeed, T. (2006). Mycotoxins in Poultry Feed in Kuwait. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 594–602.
- Bennett, J. W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, (3), 497-516.
- Brasil, Ministério da Agricultura. (1988). Portaria MA/ SNAD/ SFA nº 07, de 09/11/88. Diário Oficial da União, Brasília, 9 nov. 1988. Seção I, p.21968.
- CAST (2003). Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa.
- Chinaphuti, A., Trikarunasawat, C., Wongurai A. & Kositcharoenkul, S. (2002). Production of in-house ELISA test kit for detection of aflatoxin in agricultural commodities and their validations. *Kasetsart Journal : Natural Science*, 36, 179-186.
- Chun, H. S., Kim, H. J., Ok, H. E., Hwang, J-B. & Chung, D-H. (2007). Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102, 385–391.
- Cortés, G., Carvajal, M., Méndez-Ramírez, I., Ávila-González, E., Chilpa-Galván, N., Castillo-Urueta, P. & Flores, C. M. (2010). Identification and quantification of aflatoxins and aflatoxicol from poultry feed and their recovery in poultry litter. *Poultry Science*, 89, 993–1001.
- Commission of the European Communities. (2006). Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 12-30.
- Dalcero, A., Magnoli, C., Luna, M., Ancasi, G., Reynoso, M. M., Chiacchiera, S., Miazzo, R. & Palacios, G. (1998). Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 141, 37-43.
- Devi, K. T., Mayo, M. A., Reddy, K. L. N., Delfosse, P., Reddy, G., Reddy, S. V. & Reddy, D. V. R. (1999). Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B<sub>1</sub>. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 284–288.
- Eaton, D. L. & Groopman, J. D. (1994). The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary and agricultural significance. New York: Academic Press.

- FAO (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, Rome.
- Giacomini, L., Fick, F. A., Dilkin, P., Mallmann, C. A., Rauber, R. H. & Almeida, C. (2006). Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. *Ciência Rural*, Santa Maria, 36, 1, 234-239.
- Goldblatt, L. A. (1971). Control and removal of aflatoxin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48, 605-610.
- Herzallah, S. M. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*, 114, 1141–1146.
- IARC (2002). International Agency for Research on Cancer. Some mycotoxins – Aflatoxins, p. 171-300. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene, 82.
- INMETRO (2007). Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: julho/2007.
- Kawamura, O.; Nagayama, S.; Sato, S.; Ohtani, K.; Ueno, I. & Ueno, Y. (1988). A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut products. *Mycotoxin Research*, 4, 75-87.
- Kolosova, A. Y.; Shim, W.; Yang, Z.; Eremin, S. A. & Chung, D. (2006). Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B<sub>1</sub>. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 286-294.
- Krska, R.; Schubert-Ullrich, P.; Molinelli, A.; Sulyok, M.; Macdonald, S. & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2), 152-163.
- Li, P., Zhang, Q., Zhang, W., Zhang, J., Chen, X., Jiang, J., Xie, L. & Zhang, D. (2009). Development of class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut. *Food Chemistry*, 115, 313-317.
- Miyamoto, K.; Hamada, A. & Kawamura, O. (2008). Determination of aflatoxins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF.2 monoclonal antibody-HPLC method. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kawaga University*, 60 (113), 75-81.
- Oliveira, G. R., Ribeiro, J. M., Fraga, M. E., Cavaglieri, L. R., Direito, G. M., Keller, K. M., Dalcero, A. M. & Rosa, C. A. (2006). Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, 162, 355–362.
- Ono, E. Y. S.; Kawamura, O.; Ono, M. A.; Ueno, Y. & Hirooka, E. Y. (2000). A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the state of Parana, Brazil. *Food Agricultural Immunology*, 12, 5-14.

- Salwa, A. A. & Anwer, W. 2009. 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*. 8(2), 181-186.
- Sklan, D., Klipper, E. & Friedman, A. (2001). 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*, 10, 79-85.
- Zhang, Y.; Wang, F. X.; Fang, L.; Wang, S. & Fang, G. Z. (2009). Rapid determination of Ractopamine Residues in Edible Animal Products by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Development and Investigation of Matrix Effects. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-9.
- Zhang, H.; Wang, S. & Fang, G. (2011). Applications and recent developments of multi-analyte simultaneous analysis by enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Immunological Methods*, 368, 1-23.
- Zheng, Z., Humphrey, C. W., King R. S. & Richard, J. L. (2005). Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, 159, 255-263.

**ARTIGO B****5.2 EVALUATION OF FUMONISIN AND AFLATOXIN LEVELS IN BROILER FEED FROM NORTHERN  
PARANÁ STATE, BRAZIL**

EVALUATION OF FUMONISIN AND AFLATOXIN LEVELS IN BROILER FEED FROM NORTHERN  
PARANÁ STATE, BRAZIL

**Abstract**

Natural mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins were evaluated in four feed types intended for broilers (n = 158), collected from a poultry breeding in northern Paraná State, Brazil, in 2010. *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. were the prevalent genera (97 to 100%) while *Fusarium* sp. was detected at lower frequencies (11 to 30.3%). Fumonisins and aflatoxins were detected, respectively, in 100% and 44% of pre-starter samples; in 100% and 55% of starter samples; in 92% and 86% of grower samples and in 91% and 82% of finisher samples. In most samples (75% and 93%) fumonisin and aflatoxin levels were below  $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $6.0 \text{ng g}^{-1}$ , respectively. All the samples showed fumonisin levels below the Lowest Observed Adverse Effect Level ( $2 \text{mg kg}^{-1}$  body weight day) for broilers. Moreover in 96.4% positive samples aflatoxin levels were below the safe limit established by the European Food Safety Authority.

**Keywords:** Poultry feed. Mycotoxins. Mycotoxin exposure degree.

## 1 INTRODUÇÃO

In the last three decades, the Brazilian poultry industry has shown high growth rates. Currently the country is the third largest producer of broilers and the leading exporter, supplying 142 countries (MAPA, 2011). In 2010, the Paraná State, the largest national producer, accounted for 28.5% of the production and 26.2% of exports (SINDIAVIAPAR, 2011).

In Brazil, 70% to 80% corn produced is intended for animal feed industry and of these, 51% are directed to the poultry industry (Nunes, 2008). However, the natural occurrence of mycotoxins in corn can cause serious losses to the poultry industry (CAST, 2003).

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by filamentous fungi which can cause acute and/or chronic intoxication symptoms in both humans and animals at low concentration levels. The main groups of mycotoxins contaminating corn include fumonisins and aflatoxins, due to the frequent occurrence and the high toxic potential to poultry (CAST, 2003). Aflatoxins, produced mainly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, have high toxicity, and fumonisins, produced by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*, are the most frequent mycotoxins in corn and derivatives (CAST, 2003).

In poultry, fumonisins and aflatoxins can cause an increase in liver, kidney, pro-ventricle and gizzard weight, multifocal hepatic necrosis, biliary hyperplasia, diarrhea,

immunosuppression and decreased feed intake, weight gain and egg weight and production (Brown, Rottinghaus & Williams, 1992; CAST, 2003). Moreover, the co-occurrence of these mycotoxins frequently results in a potentiation of these effects and of lesions in liver and kidneys (del Bianchi, Oliveira, Albuquerque, Guerra & Correa, 2005; Tessari, Oliveira, Cardoso, Ledoux & Rottinghaus, 2006).

The isolation of *A. flavus* and *F. verticillioides* and the co-occurrence of aflatoxins and fumonisins in poultry feed have frequently been reported (Wang, Liang, Chau, Dien, Tanaka & Ueno, 1995; Oliveira et al., 2006; Beg, Al-mutairi, Beg, Al-mazeedi, Ali and Saeed, 2006). In addition, these toxins can also pass from contaminated commodities through poultry and occur in tissues, blood, breasts, gizzard, liver and eggs (aflatoxins) and in liver (fumonisins) consisting in a potential risk to the human consumer (del Bianchi et al., 2005; Herzallah, 2009; Salwa & Anwer, 2009).

The high frequency and mycotoxin co-contamination in agricultural staples and animal feed can cause serious losses to the poultry industry. Taking into account that mycotoxins cannot be removed by industrial processing and the potential risk to human health by consuming poultry meat and derivatives, monitoring feed contamination is essential. Therefore, the aim of this study was to evaluate the co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in feed intended for broilers from Northern Paraná State, Brazil.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 SAMPLING**

A total of 158 pelleted feed samples belonging to four feed types (pre-starter, starter, grower and finisher) were collected from June to August 2010, during one cycle of production, from a poultry breeding in the northern Paraná State, Brazil. Sampling was performed three times a day (morning, midday and afternoon) from the deposits of Tuboflex feeders. After homogenization, 500 g of each feed sample was sent to the laboratory and maintained at 4 °C for a maximum of 7 days for microbiological analysis. For fumonisin and aflatoxin determination, 200 g of each sample were ground to 50 mesh and stored at - 20 °C.

## 2.2 MYCOFLORA ANALYSIS

Sub-samples (10 g) of feed, ground to 50 mesh, were blended with 90 ml of sterile 0.1% peptone water (v/v), and serial dilutions were carried out with 9.0 ml of the same diluent to  $10^{-5}$ . One milliliter of each dilution was transferred into a Petri dish and pour-plated with potato dextrose agar (PDA, pH 4.0), added to  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  chloramphenicol and incubated at  $25^\circ\text{C}$  for 7 days. After total fungal colony count, mould genera were identified according to Singh, Frisvad, Thrane, and Mathur (1991).

## 2.3 WATER ACTIVITY ( $A_w$ ) DETERMINATION

Water activity was determined by Aqua Lab/Decagon CX-2 using distilled water for calibration ( $a_w = 1,000 \pm 0,003$ ) at  $20 - 25^\circ\text{C}$ .

## 2.4 FUMONISIN ANALYSIS

Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Shephard, Sydenham, Thiel, and Gelderblom (1990) with some modification (Ueno et al., 1993).

### 2.4.1 Extraction and Clean-up

Sub-samples (10 g) of feed were mixed with 30 ml methanol: water (3:1, v/v), shaken at 150 rpm for 30 min, and filtered through Whatman n° 1 filter paper. The filtrate (1.0 ml) was applied to preconditioned Sep-Pak Accell Plus QMA cartridge (Waters Corporation, Milford, MA) with methanol (5 ml) followed by methanol: water (3:1, 5 ml). After washing the cartridge with methanol: water (3:1, 6 ml) followed by methanol (3 ml), fumonisins were eluted with 10 ml methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness at  $40^\circ\text{C}$ .

#### 2.4.2 HPLC analysis

The sample residue was dissolved in methanol–water (3:1, 800  $\mu\text{l}$ ) and a 200  $\mu\text{l}$  aliquot dried under nitrogen. After derivatisation with 200  $\mu\text{l}$  O-phthaldialdehyde reagent, HPLC injections were made within 1 min. Fumonisin were analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a Luna C-18 Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Scharlau, Barcelona, Spain). Excitation and emission wavelengths were 335 and 450 nm, respectively. The eluent was  $\text{CH}_3\text{OH}:0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$  (80:20, v/v) pH 3.3. The flow rate was 1  $\text{ml min}^{-1}$ . The detection limits for  $\text{FB}_1$  and  $\text{FB}_2$  were 27.5 and 35.3  $\text{ng g}^{-1}$ , respectively, defined as the minimum amount of toxin that could generate a chromatographic peak five times over the height/noise rate of the baseline.

#### 2.5 AFLATOXIN ANALYSIS BY IC-ELISA

Aflatoxins were determined by a monoclonal antibody based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) according to Kawamura, Nagayama, Sato, Ohtani, Ueno and Ueno (1988). The monoclonal antibody (mAb) was produced by hybridoma cell line AF.2, which was prepared at Kagawa University (Japan). This mAb cross-reacted with  $\text{AFB}_1$  (100%),  $\text{AFB}_2$  (133%),  $\text{AFG}_1$  (13.4 %) and  $\text{AFG}_2$  (14.7 %), but it showed very low cross-reactivity against  $\text{AFL}_1$ ,  $\text{AFL}_2$ ,  $\text{AFM}_1$ ,  $\text{AFQ}_1$  and  $\text{AFB}_{2a}$ . Polystyrene microtitre plate wells (Corning, New York, USA) were coated with 100  $\mu\text{l}$   $\text{AFB}_1$ -BSA (2.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) in phosphate-buffered saline (PBS) 0.015  $\text{mol l}^{-1}$  pH 7.3 at 4 °C overnight. The microtitre plates were washed five times after each incubation step with PBST (PBS + 0.05% Tween). In order to minimize nonspecific binding, the wells were blocked with 200  $\mu\text{l}$  0.1% ovalbumin in PBS at 37 °C for 1 h. After the washing step, 50  $\mu\text{l}$  anti aflatoxin  $\text{B}_1$  monoclonal antibody (diluted 10,000-fold in PBST) and 50  $\mu\text{l}$   $\text{AFB}_1$  standards (0.05 – 10.00  $\text{ng ml}^{-1}$ ) or feed extracts were added, and incubated at 25 °C for 1 h. Following a washing step, 100  $\mu\text{l}$  horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (IgG-HRP, diluted 7,000-fold in PBST) were added and incubated at 25 °C for 1 h. The plates were washed again, and 100  $\mu\text{l}$  3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution were added. The color development was stopped after 20 min with 100  $\mu\text{l}$  1  $\text{mol l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The absorbance was measured at 450 nm in ELISA microplate reader (Bio-Tek Instruments ELX800, USA). The average

absorbance was calculated from the individual absorbance obtained from triplicate wells and results were expressed as percentage of binding:

$$\text{Binding (\%)} = A^+/A^- \times 100$$

Where  $A^+$  is the mean absorbance in the presence of aflatoxin standard or feed extract sample and  $A^-$  is the mean absorbance in their absence.

The ic-ELISA was previously validated and its performance was compared to HPLC. The detection limit for aflatoxins ( $1.25 \text{ ng g}^{-1}$ ) was calculated as 3-fold the standard deviation of absorbance from three replicate wells of unspiked sample analysed on 7 different days.

The correlation coefficient (R) between ic-ELISA and HPLC was 0.97 and it was calculated by comparing the aflatoxin concentrations in 34 naturally contaminated feed samples by Pearson correlation test (Statistic software, Version 7.0, Tulsa, OK, USA).

## 2.6 STATISTICAL ANALYSIS

Differences in mean values of *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., total fungal colony count, fumonisin, aflatoxin and water activity among the four types of feed samples were evaluated statistically using ANOVA, followed by the Tukey multiple-comparison test ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed by Statistic software, version 7.0 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA).

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

The relative frequency of the main fungal genera in 158 feed samples intended for broilers belonging to four types is shown in Table 1. *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. were the prevalent genera (97 to 100%) for the four feed types while *Fusarium* sp. was detected at lower frequencies of contamination ranging from 11% for pre-starter to 30.3% for finisher feed.

Despite at higher frequencies, the predominance of *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. (Table 1) is in accordance with the data reported by Oliveira et al. (2006). *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. were detected in 41.26% and 33.33%, respectively, while

*Fusarium* sp. in 20.63% poultry feed samples (n = 480) from two factories of Rio de Janeiro State, Brazil (OLIVEIRA et al., 2006).

As shown in Table 1, the main fungal genera (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp.) were detected, predominantly, in the range from  $<10^3$  to  $<10^4$  CFU g<sup>-1</sup>. There was no significant difference (p < 0.05) in the mean *Penicillium* sp. count among all the types of feed. For *Fusarium* sp. contamination, mean of pre-starter differed from the other types of feed except of starter, while pre-starter and grower feed showed significant difference in mean *Aspergillus* sp. count (Table 1). Rosa et al. (2006) reported higher mean contamination of *Aspergillus* sp. ( $4.06 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup>) and *Penicillium* sp. ( $3.98 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup>) in 96 samples from four factories of Rio de Janeiro State.

The a<sub>w</sub> values ranged from 0.51 to 0.755 (Table 1) which could favored the high frequency of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. According to Maciorowski, Herrera, Jones, Pillai and Ricke (2007) when the water activity of the grain decreases to a range from 0.68 to 0.80 there is predominance of these genera.

Fumonisin (FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>) levels in 158 feed samples are shown in Table 2. FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were detected in 100% pre-starter and starter samples at mean levels of 0.41 and 0.45 µg g<sup>-1</sup>, for FB<sub>1</sub>, and 0.27 and 0.16 µg g<sup>-1</sup>, for FB<sub>2</sub>, respectively. In grower and finisher samples, FB<sub>1</sub> was detected in 91.9% and 91% with mean values of 0.48 µg g<sup>-1</sup> and 0.40 µg g<sup>-1</sup>, respectively. FB<sub>2</sub> was detected in 81.1% (grower) and 45.5% (finisher) samples at mean level of 0.23 µg g<sup>-1</sup>. There was no significant difference (p < 0.05) in the mean fumonisin levels among all the feed types.

The high frequency of fumonisin is in accordance with those reported by Jindal, Mahipal and Rottinghaus (1999), Oliveira et al. (2006) and Labuda, Parich, Vekiru and Tancinová (2005). Jindal, Mahipal and Rottinghaus (1999) detected FB<sub>1</sub> in 84% poultry feed samples (n = 50) from Haryana, India, at levels ranging from 0.02 to 28 µg g<sup>-1</sup>. Oliveira et al. (2006) detected FB<sub>1</sub> in 97.8% poultry feed samples (n = 480) from Rio de Janeiro State, Brazil at levels ranging from 1.5 to 5.5 µg g<sup>-1</sup>. Labuda et al. (2005), analyzing poultry feed from Slovakia, detected FB<sub>1</sub> (mean = 0.22 µg g<sup>-1</sup>) in 97.3% and FB<sub>2</sub> (mean = 0.08 µg g<sup>-1</sup>) in 81% pre-starter feed (n = 37); FB<sub>1</sub> in 100% (mean = 0.36 µg g<sup>-1</sup>) and FB<sub>2</sub> in 86% (mean = 0.15 µg g<sup>-1</sup>) grower feed (n = 7) and FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> in 100% finisher feed (n = 6) at mean levels of 0.16 µg g<sup>-1</sup> and 0.05 µg g<sup>-1</sup>, respectively.

Despite the high frequency of contamination all the samples showed fumonisin levels below the maximum allowed for broilers established by FDA (2001) (100 µg

$\text{g}^{-1}$  of sum  $\text{FB}_1$ ,  $\text{FB}_2$  and  $\text{FB}_3$ ) and for poultry by Official Journal of the European Union (2006) ( $20 \mu\text{g g}^{-1}$  of sum  $\text{FB}_1$  and  $\text{FB}_2$ ). As shown in Table 2 and Figure 1 low fumonisin levels ranging from  $0.1$  to  $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$  were predominant in samples from all the feed types. These fumonisin levels (Table 2) were lower than those reported by Beg et al. (2006) in broiler feed from Kuwait detected 100% fumonisin positivity in 14 starter feed (mean =  $2.4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and in 19 finisher feed samples (mean =  $3.2 \mu\text{g g}^{-1}$ ) at levels ranging from  $0.22$  to  $6.0 \mu\text{g g}^{-1}$ .

**Table 1** – Water activity ( $a_w$ ) and relative frequency of the main fungal genera and distribution of fungal counting levels in four feed types collected from a poultry breeding in the Northern Paraná State (n=158).

Feed	N	Water Activity ( $a_w$ )		Fungal genera	RF (%)	Mean CFU $\text{g}^{-1}$	Percentage of samples with contamination				
		Mean <sup>a</sup>	Range				< $10^3$	$10^3$ - $<10^4$	$10^4$ - $<10^5$	$10^5$ - $<10^6$	
Pre-starter (PS)	8	0.6 0.1 <sup>a</sup>	0.523 – 0.687	<i>Fusarium</i> sp.	PS	11	$2.8 \times 10^3$ <sup>a</sup>	6	6		
					S	21	$8.8 \times 10^2$ <sup>a,b</sup>	18	3		
					G	16	$3.2 \times 10^2$ <sup>b</sup>	15	1		
					F	30	$1.3 \times 10^2$ <sup>b</sup>	30			
Starter (S)	6	0.5 0.7 <sup>a</sup>	0.521 – 0.669	<i>Penicillium</i> sp.	PS	10	$3.0 \times 10^3$ <sup>a</sup>	50	50		
					S	97	$2.4 \times 10^4$ <sup>a</sup>	45	39	9	6
					G	10	$2.7 \times 10^3$ <sup>a</sup>	59	38	3	
					F	10	$2.5 \times 10^3$ <sup>a</sup>	55	36	9	
Grower (G)	11	0.6 1.0 <sup>a</sup>	0.501 – 0.703	<i>Aspergillus</i> sp.	PS	10	$5.8 \times 10^3$ <sup>a</sup>	50	39	11	
					S	10	$2.7 \times 10^3$ <sup>a,b</sup>	61	30	6	
					G	97	$9.3 \times 10^2$ <sup>b</sup>	76	24		
					F	10	$2.5 \times 10^3$ <sup>a,b</sup>	73	24	3	
Finisher (F)	6	0.6 5.5 <sup>a</sup>	0.528 – 0.755	Total Count*	PS		$3.3 \times 10^3$ <sup>a,b</sup>	44	50	6	
					S		$9.4 \times 10^3$ <sup>a</sup>	52	39	6	3
					G		$1.5 \times 10^3$ <sup>b</sup>	69	30	1	
				F		$2.7 \times 10^3$ <sup>a,b</sup>	52	45	3		

RF\* = Relative Frequency.

Total Count\* = Total mould and yeast count

<sup>a</sup> Means followed by the same letter are not significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Table 2** – Relative frequency and fumonisin levels in feed samples (n=158) intended for broiler from Northern Paraná State.

Feed	N	FB <sub>1</sub> (µg g <sup>-1</sup> )			FB <sub>2</sub> (µg g <sup>-1</sup> )			FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> (µg g <sup>-1</sup> )				
		Positive samples*	Mean	Median	Range	Positive samples*	Mean	Median	Range	Mean <sup>b</sup>	Median	Range
Pre-starter	18	100%	0.41	0.45	0.20 – 0.61	100%	0.27	0.31	0.09 – 0.40	0.68 <sup>a</sup>	0.77	0.31 – 1.00
Starter	33	100%	0.45	0.32	0.11 – 2.03	100%	0.16	0.16	0.08 – 0.33	0.60 <sup>a</sup>	0.46	0.19 – 2.15
Grower	74	91.9%	0.48	0.49	0.05 – 1.11	81.1%	0.23	0.20	0.04 – 0.90	0.73 <sup>a</sup>	0.77	0.10 – 1.81
Finisher	33	91%	0.40	0.26	0.06 – 1.86	45.5%	0.23	0.08	0.04 – 0.51	0.56 <sup>a</sup>	0.33	0.12 – 1.19

\* Detection limit: FB<sub>1</sub> = 27.5 ng g<sup>-1</sup>; FB<sub>2</sub> = 35.3 ng g<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Means followed by the same letter are not significantly different by the Tukey test (p < 0.05).

Although the samples showed high frequency of contamination with fumonisin, frequency of *Fusarium* sp. was low probably due to the pelletization of feed. According to Pettersson (2004) commercial feeds are frequently extruded, pelletized and added by propionic or formic acids to reduce the mould growth and *Salmonella* sp. Thus, microbiological methods may not reveal whether the feed or its ingredients had low contamination before processing. Mycotoxins, however, can be detected due to their chemical stability.

The relative frequency and aflatoxin levels are shown in Table 3. Aflatoxins were detected in 44% pre-starter and 55% starter samples at levels ranging from 1.60 to 3.50 ng g<sup>-1</sup> (mean = 2.33 ng g<sup>-1</sup>) and from 2.20 to 46.30 ng g<sup>-1</sup> (mean = 5.70 ng g<sup>-1</sup>), respectively. Grower and finisher samples showed the highest positivity for aflatoxins (82%) with levels ranging from 1.90 to 60.45 ng g<sup>-1</sup> (mean = 6.27 ng g<sup>-1</sup>) and from 2.0 to 5.58 ng g<sup>-1</sup> (mean = 3.65 ng g<sup>-1</sup>). There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in mean aflatoxin levels among all the types of feed.

Aflatoxin levels detected in pre-starter and finisher feeds (Table 3) were lower than data reported by Oliveira et al. (2006), however, were higher than those reported by Beg et al. (2006). Oliveira et al. (2006) detected aflatoxins in 66.7% poultry feed samples ( $n = 480$ ) from two factories from Rio de Janeiro State, Brazil, at levels ranging from 1.2 to 17.5 ng g<sup>-1</sup>. In 64.5% samples there were co-occurrence of FB<sub>1</sub> and AFB<sub>1</sub>. Beg et al. (2006) detected aflatoxins in 71% starter feed ( $n = 24$ ) at mean level of 0.484 ng g<sup>-1</sup> and in 82.2% finisher feed ( $n = 28$ , mean = 0.387 ng g<sup>-1</sup>) from Kuwait.

Despite the wide range of aflatoxin levels detected in starter and grower feed samples (Table 3), these levels were lower than those reported by Dalcerro, Magnoli, Chiacchiera, Palacios and Reynoso (1997). Dalcerro et al. (1997) analyzed 300 poultry feed samples from five factories from Córdoba, Argentina, and detected AFB<sub>1</sub> levels ranging from 17 to 197 ng g<sup>-1</sup>.

In Brazil, the maximum limit allowed for aflatoxins in any product intended for animal feeding is 50 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) (Brasil, 1988). In United States of America and European Union the maximum allowed levels, for mature poultry, are 100 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) and 20 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>1</sub>) (FAO, 2004), respectively. Thus, out of 158 feed samples, one starter and three grower samples showed aflatoxin levels higher than those allowed by European Union; and in one grower sample aflatoxin level was

above the maximum limit allowed in Brazil. However, in most samples (93%) aflatoxin levels were below  $6.0 \text{ ng g}^{-1}$  (Figure 1).

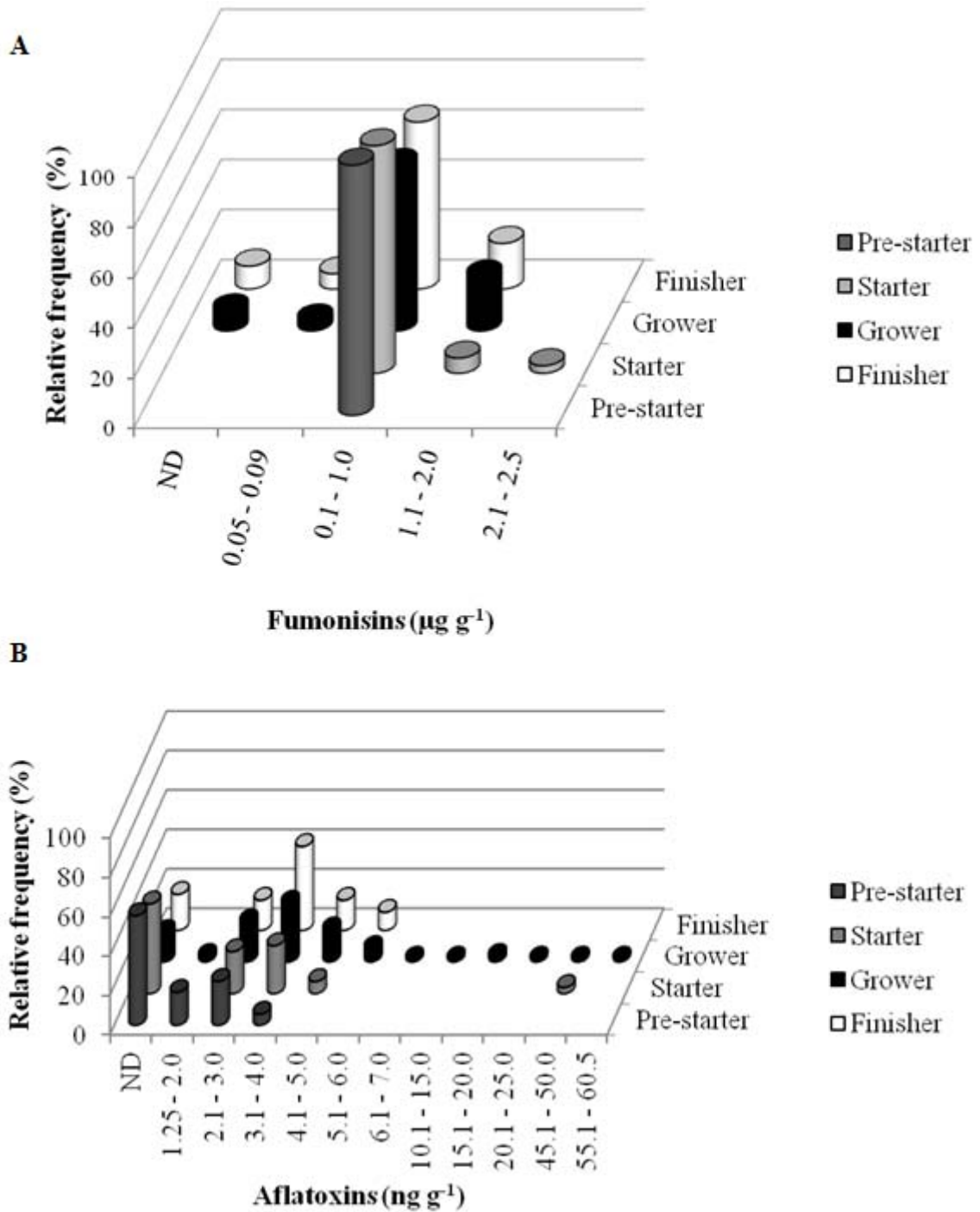
**Table 3** – Relative frequency and aflatoxin levels in feed samples (n=158) intended for broiler from Northern Paraná State.

Feed	N	Aflatoxins ( $\text{ng g}^{-1}$ )			
		Positive samples*	Mean <sup>b</sup>	Median	Range
Pre-starter	18	44 %	2.33 <sup>a</sup>	2.3	1.60 – 3.50
Starter	33	55 %	5.70 <sup>a</sup>	3.3	2.20 – 46.30
Grower	74	82 %	6.27 <sup>a</sup>	3.6	1.90 – 60.45
Finisher	33	82%	3.65 <sup>a</sup>	3.4	2.00 – 5.58

\* Detection limit:  $1.25 \text{ ng g}^{-1}$

<sup>b</sup> Means followed by the same letter are not significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Figure 1** – Distribution of fumonisin (FB<sub>1</sub> +FB<sub>2</sub>) levels (A) and aflatoxin levels (B) in feed samples from Northern Paraná State.



Taking into account the results obtained in this study fumonisin exposure degree of broilers was determined based on the daily probable consume of these toxins. According to the European Food Safety Authority - EFSA (2005) the lowest FB<sub>1</sub> level which causes adverse effect (LOAEL - lowest observed adverse effect level) in broilers is 2 mg kg<sup>-1</sup> body weight per day. Considering the highest FB<sub>1</sub> levels detected in the four feed types and,

for male broilers, the maximum consumption and body weight (bw) reached at the four stages, according to Cobb Vantress manual (2008), the maximum FB<sub>1</sub> consumption would be 0.085, 0.25, 0.087 and 0.121 mg kg<sup>-1</sup> body weight per day for pre-starter, starter, grower and finisher feeds, respectively (Table 4). These levels are much lower than the LOAEL indicating that 100% samples were safe for broiler consumption.

Concerning aflatoxins, according to the EFSA (2004), the margin between toxic doses ( $> 1.5 \mu\text{g g}^{-1}$  feed) and the statutory limit (20 ng g<sup>-1</sup> feed), of at least 75-fold, would provide adequate protection from adverse effects to animal health. Therefore in this study 96.4% of positive samples showed levels below the statutory limit.

In summary, low fumonisin and aflatoxin levels were detected in most of the feed samples from Northern Paraná State. Taking into account that more and more strict guidelines on mycotoxin contamination have been imposed by the importing countries, the most effective control measure depends on a rigorous program of monitoring the feed producing chain in order to minimize health risks, increase productivity and ensure poultry products quality.

**Table 4** – Weight, feed consumption, FB<sub>1</sub> levels and maximum FB<sub>1</sub> probable daily intake at the four stages of poultry breeding.

<b>Feed</b>	<b>Stages (days)</b>	<b>Weight (kg)</b>	<b>Feed consumption (g)</b>	<b>FB<sub>1</sub> (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>Maximum FB<sub>1</sub> probable daily intake (<math>\text{mg kg}^{-1}</math> body weight per day)</b>
Pre-starter	1° - 7°	0.18	25	0.61	0.085
Starter	8° - 21°	0.90	111	2.03	0.25
Grower	22° - 42°	2.70	211	1.11	0.087
Finisher	43° - 49°	3.30	215	1.86	0.121

#### **4 ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors acknowledge the CNPq (the Brazilian Government organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers) in association with MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply), the Araucária Foundation (Paraná State grant), Paraná Fund/SETI and CAPES (Coordination for formation of High Level Professionals) – Nanobiotechnology Network Program (04/CII-2008) for financial support. The CNPq research productivity fellowship is greatly appreciated by E.Y.S.Ono, M.A. Ono and E.Y.Hirooka.

## References

- Beg, M. U., Al-Mutairi, M., Beg, K. R., Al-Mazeedi, H. M., Ali, L. N., Saeed, T. (2006). Mycotoxins in Poultry Feed in Kuwait. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 594–602.
- Brasil, Ministério da Agricultura. (1988). Portaria MA/ SNAD/ SFA nº 07, de 09/11/88. Diário Oficial da União, Brasília, 9 nov. 1988. Seção I, p.21968.
- Brown, T. P., Rottinghaus, G. E. & Williams, M. E. (1992). Fumonisin mycotoxicosis in broilers: Performance and pathology. *Avian Diseases*, 36, 450-454.
- CAST (2003). Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa.
- Cobb-Vantress (2008). Suplemento de crescimento e nutrição para frangos de corte. Available from: <[http://www.cobb-vantress.com/contactus/brochures/Cobb500\\_BPN\\_PORT.pdf](http://www.cobb-vantress.com/contactus/brochures/Cobb500_BPN_PORT.pdf)>. Accessed 2010 November 11.
- Dalcero, A., Magnoli, C., Chiacchiera, S., Palacios, G. & Reynoso, M. M. (1997). Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 137, 179-184.
- Del Bianchi, M., Oliveira, C. A. F., Albuquerque, R., Guerra, J. L. & Correa, B. 2005. Effects of Prolonged Oral Administration of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Fumonisin B<sub>1</sub> in Broiler Chickens. *Poultry Science Association*, 84, 1835-1840.
- EFSA (2004). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B<sub>1</sub> as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal*. 39, 1-27.
- EFSA (2005). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal*, 235, 1 – 32.
- FAO (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Rome, 2004.
- FDA (2001). U. S. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine. 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. 12
- Herzallah, S. M. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*, 114, 1141–1146.
- Jindal, N., Mahipal, S. K. & Rottinghaus, G. E. (1999). Occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> in maize and poultry feeds in Haryana, India. *Mycopathologia*, 148, 37–40.

Kawamura, O., Nagayama, S., Sato, S., Ohtani, K., Ueno, I. & Ueno, Y. (1988). A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of alatoxin B<sub>1</sub> in peanut products. *Mycotoxin Research*, 4, 75-87.

Labuda, R., Parich, A., Vekiru, L & Tancinová, D. (2005). Incidence of fumonisins, moniliformin and *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 12, 81-86.

Maciorowski, K. G., Herrera, P., Jones, F. T., Pillai, S. D. & Ricke, S. C. (2007). Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 109–136.

MAPA (2001). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Available from: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/especies/aves>>. Accessed 2011 July 25.

Nunes, J. L. S. (2008). Agrolink – culturas – milho – comercialização- consumo. Available from: <<http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/comercializacao.aspx>>. Accessed 2009 June 08.

Official journal of the European Union (2006). Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding.

Oliveira, G. R., Ribeiro, J. M., Fraga, M. E., Cavaglieri, L. R., Direito, G. M., Keller, K. M., Dalcero, A. M. & Rosa, C. A. (2006). Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, 162, 355–362.

Pettersson, H. (2004). Controlling mycotoxins in animal feed. In: N., Magan & M., OLSEN (Eds.), *Mycotoxins in food: detection and control* (Chapter 12 – 1rd ed.). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.

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. (2006). Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Veterinary Microbiology*, 113, 89-96.

Salwa, A. A. & Anwer, W. 2009. 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*. 8, 2,181-186.

Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G. & Gelderblom, W. C. A. (1990). Quantitative determination of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13 (10), 2077-2087.

SINDIAVIAPAR (2001). Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. Available from: <<http://www.sindiavipar.com.br>>. Accessed 2011 July 25.

Singh, K., Frisvad, J. C., Thrane, U. & Mathur, S. B. (1991). An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup, Denmark: Danish Government.

Tessari, E. N. C., Oliveira, C. A. F., Cardoso, A. L. S. P., Ledoux, D. R. & Rottinghaus, G. E. (2006). Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *British Poultry Science*, 47, 3, 357-364.

Ueno, Y., Aoyama, S., Sugiura, Y., Wang, D. S., Lee, U. S., Hirooka, E. Y., Hara, S., Karki, T., Chen, G. & YU, S-Z. (1993). A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*, 9, 27-34.

Wang, D-S., Liang, Y-X., Chau, N. T., Dien, L. D., Tanaka, T. & Ueno, Y. 1995. Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B<sub>1</sub> in corn for feed in North Vietnam. *Natural Toxins*, 3, 445-449.

**ARTIGO C****5.3 CO-OCCURRENCE OF AFLATOXINS AND FUMONISINS IN FEED INTENDED FOR LAYING HENS  
FROM NORTHERN PARANÁ STATE, BRAZIL**

CO-OCCURRENCE OF AFLATOXINS AND FUMONISINS IN FEED INTENDED FOR LAYING HENS  
FROM NORTHERN PARANÁ STATE, BRAZIL

**Abstract**

Co-occurrence of aflatoxins and fumonisins were evaluated in 98 feed samples intended for laying hens collected from January to December 2010 from the Experimental Farm of the State University of Londrina, Paraná State, Brazil. Aflatoxins and fumonisins were detected in 88.8 and 71.4% of samples at means of 12.37 ng g<sup>-1</sup> and 1.47 µg g<sup>-1</sup>, respectively, and 61.2% of samples showed co-occurrence of both toxins. However, most of positive samples (53%) showed aflatoxin levels below 5.0 ng g<sup>-1</sup> and 67.4% showed low fumonisin levels (from 0.03 to 2.0 µg g<sup>-1</sup>). All the samples showed fumonisin levels below the Lowest Observed Adverse Effect Level (2 mg/kg body weight day) for broilers. Most of positive samples (84.3%) showed aflatoxin levels below the maximum safety limit established by the European Food Safety Authority.

**Key words:** Poultry feed. Mycotoxins. Exposure degree. Lowest Observed Adverse Effect Level.

**Introduction**

Paraná State is the third Brazilian commercial egg producer accounting for 7.5% of national production with 5.6 million laying hens. The Brazilian exports exceeded 27,000 tons in 2010 (UBA, 2010).

In Brazil approximately 51% of corn intended for feed industry are directed to poultry (Nunes, 2008). However, corn and feed can be contaminated with mycotoxins before harvest, during harvesting and storage, causing serious economic losses (CAST, 2003).

The mycotoxins likely to be of greatest significance in Brazil and other tropical developing countries include aflatoxins, produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* (Diener et al. 1987), and fumonisins, which are produced mainly by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* (Thiel and Marasas, 1991).

Aflatoxins cause several biological effects, such as liver injuries, reduction in growth rates, alterations in immune response and native defense mechanisms, in different animal species, especially in domestic poultry (Pier, 1992). In laying hens, the main manifestations of chronic aflatoxicosis, in experimental conditions, include reduction of production and egg weight, increase of hepatic fat and alterations in serum enzyme levels (Oliveira et al., 2001). In addition, when metabolized by hens these mycotoxins can occur in eggs being an additional source for human aflatoxin contamination (Herzallah, 2009; Salwa; Anwer, 2009).

Herzallah (2009) detected naturally occurring aflatoxins in 20% of eggs collected on winter 2007 in Jordan at levels ranging from 0.31 to 5.80 ng g<sup>-1</sup> and in 5% of eggs collected on spring at levels ranging from 0.20 to 5.15 ng g<sup>-1</sup>. Salwa and Anwer (2009) detected low aflatoxin levels ranging from 0.03 to 0.09 ng g<sup>-1</sup> in eggs of laying hens which received artificially contaminated feed with 25 to 100 ng g<sup>-1</sup> aflatoxins. However, AFB<sub>1</sub> showed high stability to boiling with a maximum reduction of 1.0% after 20 minutes of boiling.

Fumonisin also induce several toxicological effects in animals. In poultry, these toxins can cause an increase in liver and kidney weight, liver necrosis, diarrhea, immunosuppression and decreased weight gain (Ledoux et al., 1992). In experimental conditions, Japanese quail showed decrease of weight gain, increase of liver weight and liver necrosis (Oliveira et al., 2007).

Natural co-occurrence of fumonisin and aflatoxins in feed is a worldwide problem (Wang et al., 1995; Oliveira et al., 2006; Beg et al., 2006). Moreover the interaction of these mycotoxins can result in a potentiation of negative effects on poultry such as reduction in feed intake, body weight and in weight and egg production and lesions in liver and kidneys (Ogido et al., 2004; del Bianchi et al., 2005). Wang et al. (1995) detected co-occurrence of these mycotoxins in 63.3% of corn samples and corn powder for feeds (n = 30) from Northern Vietnam. Oliveira et al. (2006) detected co-occurrence in 64.5% of poultry feed samples (n = 480) from Rio de Janeiro State (Brazil) and Beg et al. (2006) detected aflatoxin in 66.7% (n = 33) and fumonisin in 100% (n = 20) layer mash samples from Kuwait. Additionally Prathap Kumar et al. (1997) reported laying hens outbreaks in two farms from India after consumption of feed contaminated with fumonisin (8.5 µg g<sup>-1</sup>) and aflatoxin B<sub>1</sub> (100 ng g<sup>-1</sup>) and with fumonisin (3.5 µg g<sup>-1</sup>) and aflatoxin B<sub>1</sub> (90 ng g<sup>-1</sup>). Hens showed black sticky diarrhoea, severe reduction in feed intake, egg production and body weight. Overall 9,700 animals were affected and 20% died.

Taking into account that mycotoxin co-contamination in feed can lead to enhancement of toxic effects on poultry and the potential hazard to human health due to carryover of aflatoxin metabolites into eggs, the aim of this study was to evaluate the co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in feed intended for laying hens from Northern Paraná State, Brazil.

## **Material and Methods**

### **Sampling**

A total of 98 mash feed samples intended for laying hens belonging to 40 batches of 500 kg, were collected from January to December 2010 from the Experimental Farm of the State University of Londrina, Northern Paraná State, Brazil. Sampling was performed at the beginning, middle and final of each batch. After homogenization, 500 g of each feed sample was sent to the laboratory and maintained at 4 °C for a maximum of seven days for microbiological analysis. For fumonisin and aflatoxin determination, 200 g of each sample were ground to 50 mesh and stored at - 20 °C.

### **Mycoflora analysis**

Sub-samples (10 g) of feed, ground to 50 mesh, were blended with 90 ml of sterile 0.1% peptone water (v/v), and serial dilutions were carried out with 9.0 ml of the same diluent to  $10^{-5}$ . One milliliter of each dilution was transferred into a Petri dish and pour-plated with potato dextrose agar (PDA, pH 4.0), added to 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  chloramphenicol and incubated at 25 °C for 7 days. After total fungal colony count, mould genera were identified, according to Singh et al. (1991).

### **Fumonisin analysis**

Fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Shephard, Sydenham, Thiel, and Gelderblom (1990) with some modification (Ueno et al., 1993).

#### *Extraction and clean-up*

Sub-samples (10 g) of feed were mixed with 30 ml methanol: water (3:1, v/v), shaken at 150 rpm for 30 min, and filtered through Whatman n° 1 filter paper. The filtrate (1.0 ml) was applied to preconditioned Sep-Pak Accell Plus QMA cartridge (Waters Corporation, Milford, MA) with methanol (5 ml) followed by methanol: water (3:1, 5 ml).

After washing the cartridge with methanol: water (3:1, 6 ml) followed by methanol (3 ml), fumonisins were eluted with 10 ml methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness at 40 °C.

#### *HPLC analysis*

The sample residue was dissolved in methanol: water (3:1, 800 µl) and a 200 µl aliquot dried under nitrogen. After derivatisation with 200 µl O-phthalaldehyde reagent (40 mg OPA, 1 ml methanol, 5 ml 0.1 M sodium borate and 50 µl 2-mercaptoethanol), HPLC injections were made within 1 min. Fumonisins were analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a Luna C-18 Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Spain). Excitation and emission wavelengths were 335 and 450 nm, respectively. The eluent was CH<sub>3</sub>OH:0.1 mol l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with orthophosphoric acid. The flow rate was 1 ml min<sup>-1</sup>. The detection limits for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were 27.5 and 35.3 ng g<sup>-1</sup>, respectively, defined as the minimum amount of toxin that could generate a chromatographic peak five times over the height/noise rate of the baseline. Recoveries of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> from spiked corn in the range 100–400 ng g<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub> and 250–450 ng g<sup>-1</sup> FB<sub>2</sub> averaged 95.6% (mean CV 8%) and 96.9% (mean CV 10%), respectively, based on duplicate spiking and triplicate analyses.

#### **Aflatoxin analysis by ic-ELISA**

Aflatoxins were determined by a monoclonal antibody based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) according to Kawamura, Nagayama, Sato, Ohtani, and Ueno (1988). The monoclonal antibody (mAb) was produced by hybridoma cell line AF.2, which was prepared at Kagawa University (Japan). This mAb cross-reacted with AFB<sub>1</sub> (100%), AFB<sub>2</sub> (133%), AFG<sub>1</sub> (13.4 %) and AFG<sub>2</sub> (14.7 %), but it showed very low cross-reactivity against AFL<sub>1</sub>, AFL<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub> and AFB<sub>2a</sub>. Polystyrene microtitre plate wells (Corning, New York, USA) were coated with 100 µl AFB<sub>1</sub>-BSA (2.5 µg ml<sup>-1</sup>) in phosphate-buffered saline (PBS) 0.015 mol l<sup>-1</sup> pH 7.3 at 4 °C overnight. The microtitre plates were washed five times after each incubation step with PBST (PBS + 0.05% Tween). In order to minimize nonspecific binding, the wells were blocked with 200 µl 0.1%

ovalbumin in PBS at 37°C for 1 h. After the washing step, 50 µl anti aflatoxin B<sub>1</sub> monoclonal antibody (diluted 10000-fold in PBST) and 50 µl AFB<sub>1</sub> standards (0.05 - 10 ng ml<sup>-1</sup>) or feed extracts were added, and incubated at 25 °C for 1 h. Following a washing step, 100 µl horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (IgG-HRP, diluted 7000-fold in PBST) were added and incubated at 25 °C for 1 h. The plates were washed again, and 100 µl 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution were added. The color development was stopped after 20 min with 100 µl 1 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The absorbance was measured at 450 nm in ELISA microplate reader (Bio-Tek Instruments ELX800, USA). The average absorbance was calculated from the individual absorbance obtained from triplicate wells and results were expressed as percentage of binding:

$$\text{Binding (\%)} = A^+ / A^- \times 100$$

Where A<sup>+</sup> is the mean absorbance in the presence of aflatoxin standard or feed extract sample and A<sup>-</sup> is the mean absorbance in their absence.

The ic-ELISA was previously validated and its performance was compared with HPLC. The detection limit for aflatoxins (1.41 ng g<sup>-1</sup>) was calculated as 3-fold the standard deviation of absorbance from three replicate wells of unspiked sample analysed on 7 different days. The correlation coefficient (R) between ic-ELISA and HPLC was 0.98 and it was calculated by comparing the aflatoxin concentrations in 40 naturally contaminated feed samples by Pearson correlation test (Statistic software, Version 7.0, Tulsa, OK, USA).

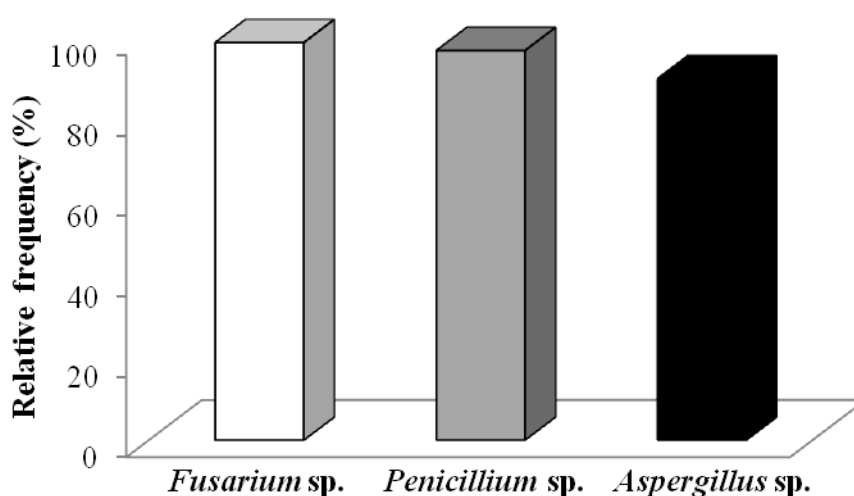
## Results and Discussion

The relative frequencies of the main fungal genera in 98 feed samples intended for laying hens are shown in Figure 1. *Fusarium* sp. was the prevalent genera (99%), followed by *Penicillium* sp. (97%) and *Aspergillus* sp. (90%). The mean fungal counts were similar (10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup>) and ranged from 1.0 x 10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup> (*Aspergillus* sp.) to 5.5 10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup> (*Fusarium* sp.) (Table 1).

Different data of genera prevalence in feed samples were reported. Dalcero et al. (1997) detected prevalence of *Penicillium* sp. (98%) and *Fusarium* sp. (87%), whereas, *Aspergillus* sp. were detected in 52% poultry feed samples (n = 300) from five factories in Cordoba, Argentina. In a similar study, Dalcero et al. (1998) detected higher frequencies of

*Aspergillus* sp. (85%) and *Fusarium* sp. (70%) in poultry feed samples (n =130) from two factories in the same region. On the other hand, despite at lower frequencies, Oliveira et al. (2006) reported prevalence of *Penicillium* sp. (41.3%) and *Aspergillus* sp. (33.3%), while *Fusarium* sp. was detected in 20.6% poultry feed samples (n =480) from two factories of Rio de Janeiro State, Brazil.

**Figure 1** – Relative frequency of the main fungal genera in 98 feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State.



**Table 1** – Profile of *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. and total fungal colony count in 98 feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State.

Genera	Mean	Range
	(CFU g <sup>-1</sup> )	(CFU g <sup>-1</sup> )
<i>Fusarium</i> sp.	5,5 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup> – 7,5 x 10 <sup>5</sup>
<i>Penicillium</i> sp.	1,3 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup> – 2,0 x 10 <sup>5</sup>
<i>Aspergillus</i> sp.	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup> – 1,0 x 10 <sup>5</sup>
<b>Total fungal colony count</b>	2,4 x 10 <sup>4</sup>	1,25 x 10 <sup>2</sup> – 2,9 x 10 <sup>5</sup>

The relative frequency and fumonisin levels in 98 feed samples for laying hen are shown in Table 2. Total fumonisin levels (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) ranged from 0.20 to 5.06 µg g<sup>-1</sup> (mean = 1.47 µg g<sup>-1</sup>, median = 1.19 µg g<sup>-1</sup>) but, most samples (67.4%) showed low levels ranging from 0.03 to 2.0 µg g<sup>-1</sup> (Figure 2). FB<sub>1</sub> was detected in 89.8% samples at levels ranging from 0.03 to 3.22 µg g<sup>-1</sup> (mean = 0.87 µg g<sup>-1</sup>, median = 0.67 µg g<sup>-1</sup>), while FB<sub>2</sub> was

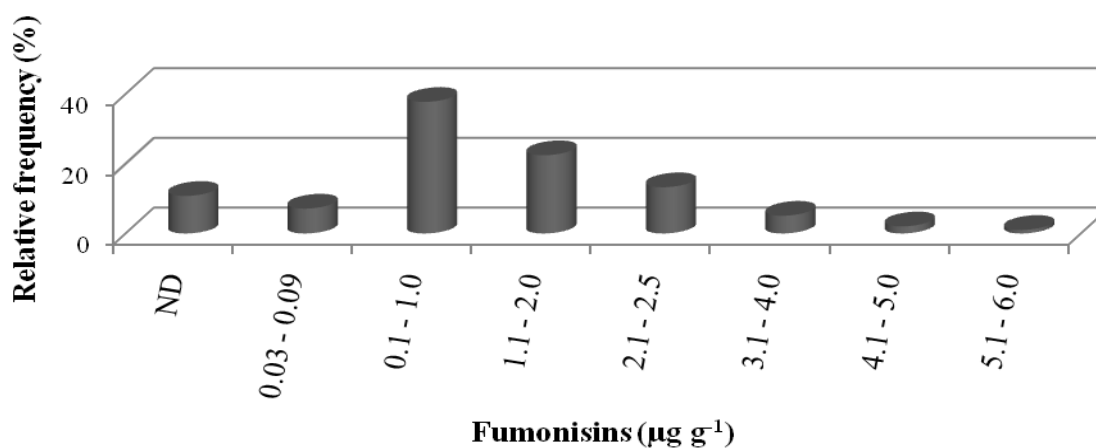
detected in 78.6% samples at levels ranging from 0.04 to 1.84  $\mu\text{g g}^{-1}$  (mean = 0.49  $\mu\text{g g}^{-1}$ , median = 0.41  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Fumonisin levels (Table 2) were similar to those reported by Westhuizen et al. (2003) and Beg et al. (2005), however were higher than data reported by Martins et al. (2006). Westhuizen et al. (2003) detected fumonisins in 100% of corn samples (n = 14) intended for animal feed from Southern Santa Catarina State, Brazil, at levels ranging from 0.15 to 4.79  $\mu\text{g g}^{-1}$  (mean = 1.53  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Beg et al. (2005) detected fumonisins in 100% of layer mash samples from Kuwait (n = 20) at levels ranging from 0.22 to 6.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  (mean = 2.6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Martins et al. (2006) analyzed 52 feed samples intended for laying hens from Portugal and detected FB<sub>1</sub> in 19.2% samples at levels ranging from 0.050 to 0.109  $\mu\text{g g}^{-1}$  (mean = 0.098  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), while, FB<sub>2</sub> was not detected in any sample.

**Table 2** – Fumonisin and aflatoxin contamination in 98 feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State.

	Fumonisins ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			Aflatoxins ( $\text{ng g}^{-1}$ )
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>	
<b>Positive samples (%) *</b>	89.8%	78.6%		71.4%
<b>Mean</b>	0.87	0.49	1.47	12.37
<b>Median</b>	0.67	0.41	1.19	4.82
<b>Range</b>	0.03 – 3.22	0.04 – 1.84	0.20 – 5.06	2.30 – 96.80

\* Fumonisin detection limit: FB<sub>1</sub> = 27.5  $\text{ng g}^{-1}$ ; FB<sub>2</sub> = 35.3  $\text{ng g}^{-1}$   
Aflatoxin detection limit: 1.41  $\text{ng g}^{-1}$

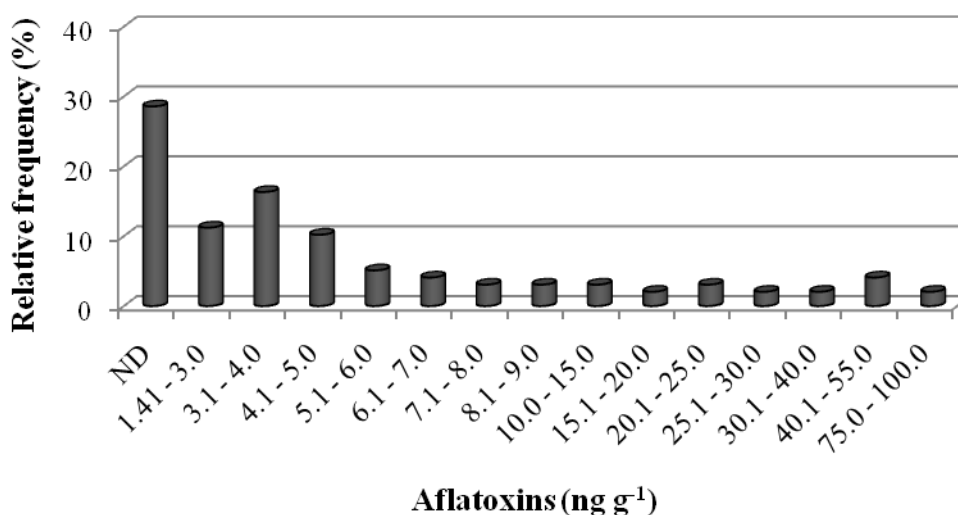
**Figure 2** – Distribution of fumonisin (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) levels in 98 feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State.



Despite the high frequency of contamination all the samples showed fumonisin levels below the maximum allowed for laying hens established by FDA (2001) ( $30 \mu\text{g g}^{-1}$  of sum  $\text{FB}_1$ ,  $\text{FB}_2$  and  $\text{FB}_3$ ) and for poultry by Official Journal of the European Union (2006) ( $20 \mu\text{g g}^{-1}$  of sum  $\text{FB}_1$  and  $\text{FB}_2$ ).

The relative frequency and aflatoxin levels in 98 feed samples for laying hens are shown in Table 2. Aflatoxins were detected in 71.4% samples at levels ranging from 2.30 to  $96.80 \text{ ng g}^{-1}$  (mean =  $12.37 \text{ ng g}^{-1}$ , median =  $4.82 \text{ ng g}^{-1}$ ), however, most of positive samples (53%) showed levels below  $5.0 \text{ ng g}^{-1}$  (Figure 3). Out of 98 samples, 61.2% showed co-contamination by fumonisins and aflatoxins. Aflatoxin levels (Table 2) were higher than those reported by Oliveira et al. (2006) and Beg et al. (2006) but lower than those obtained by Dalcero et al. (1997) and Dalcero et al. (1998). Oliveira et al. (2006) detected aflatoxins in 66.7% poultry feed samples ( $n = 480$ ) from two factories from Rio de Janeiro State, Brazil, at levels ranging from 1.2 to  $17.5 \text{ ng g}^{-1}$ . Moreover, 64.5% samples showed co-contamination by  $\text{FB}_1$  and  $\text{AFB}_1$  (OLIVEIRA et al., 2006). Beg et al. (2006) analyzed 33 layer mash samples from Kuwait and detected aflatoxins in 66.7% samples at mean level of  $0.212 \text{ ng g}^{-1}$ .

**Figure 3** – Distribution of aflatoxin levels in 98 feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State.



Dalcero et al. (1997) analyzed 300 poultry feed samples from Argentina and detected  $\text{AFB}_1$  levels ranging from 17 to  $197 \text{ ng g}^{-1}$ . In a similar study, Dalcero et al. (1998) detected  $\text{AFB}_1$  levels ranging from 10 to  $123 \text{ ng g}^{-1}$  in 130 poultry feed samples from the same region.

In Brazil, the maximum limit established for the sum of aflatoxins ( $AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$ ) in any product intended for animal feeding is  $50 \text{ ng g}^{-1}$  (Brasil, 1988). In United States of America and European Union, the maximum allowed levels, for mature poultry, are  $100 \text{ ng g}^{-1}$  ( $AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$ ) and  $20 \text{ ng g}^{-1}$  ( $AFB_1$ ) (FAO, 2004). Thus, out of 98 feed samples, 12 and 3 samples showed aflatoxin levels higher than those established by European Union and Brazilian guidelines, respectively.

Taking into account the results obtained in this study the fumonisin exposure degree was determined considering the probable daily consumption of these toxins. According to the European Food Safety Authority - EFSA (2005) the lowest level of  $FB_1$  which causes adverse effect (LOAEL - lowest observed adverse effect level) in broilers is  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight per day. Mature laying hens (age of 24 to 70 weeks) consume, approximately, 100 g of feed per day and have a mean weight of 2 kg (Argôlo, 2010). Therefore, considering the highest  $FB_1$  level ( $3.22 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) detected in this study the maximum probable  $FB_1$  daily intake would be  $0.161 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight per day, which is approximately 12-fold below the LOAEL, indicating that feed samples were safe for poultry consumption.

Concerning aflatoxins, according to the EFSA (2004), the maximum allowed limit of  $0.02 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  feed is at least 75-fold lower than the toxic dose ( $> 1.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  feed), therefore, this limit would provide adequate protection from adverse effects on animal health. Thus, in this study most of positive samples (84.3%) showed aflatoxin levels below the maximum allowed limit.

In summary, 61.2% feed samples intended for laying hens from Northern Paraná State showed co-contamination with fumonisins and aflatoxins, but low levels of these mycotoxins were detected in most samples. Therefore, monitoring studies and prevention of natural mycotoxin contamination of feed ingredients and at storage period are essential in order to minimize health risks, increase productivity and ensure poultry products and egg quality.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge the CNPq (the Brazilian Government organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers) in association with MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply), the Araucária Foundation (Paraná State grant),

Paraná Fund/SETI and CAPES (Coordination for formation of High Level Professionals) – Nanobiotechnology Network Program (04/CII-2008) for financial support. The CNPq research productivity fellowship is greatly appreciated by E.Y.S.Ono, M.A. Ono and E.Y.Hirooka.

## References

- Argôlo, GR. Criação de aves. 2010. Available from: <http://www.ceplac.gov.br/radar/Artigos/artigo15.htm>
- Beg, MU, Al-Mutairi, M, Beg, KR, Al-Mazeedi, HM, Ali, LN, Saeed, T. 2006. Mycotoxins in Poultry Feed in Kuwait. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50:594–602.
- Brasil, Ministério da Agricultura. 1988. Portaria MA/ SNAD/ SFA nº 07, de 09/11/88. Diário Oficial da União, Brasília, 9 nov. 1988. Seção I, p.21968.
- CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa.
- Dalcero, A, Magnoli, C, Chiacchiera, S, Palacios, G, Reynoso, MM. 1997. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*. 137:179-184.
- Dalcero, A, Magnoli, C, Luna, M, Ancasi, G, Reynoso, MM., Chiacchiera, S, Miazzo, R, Palacios, G. 1998. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*. 141:37-43.
- Del Bianchi, M, Oliveira, CAF, Albuquerque, R, Guerra, J L, Correa, B. 2005. Effects of Prolonged Oral Administration of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Fumonisin B<sub>1</sub> in Broiler Chickens. *Poultry Science Association*. 84:1835-1840.
- Diener, UL, Cole, RJ, Sanders, TH, Payne, GA, Lee, LS, Klich, MA. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*. 25:249-270.
- EFSA- European Food Safety Authority. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B<sub>1</sub> as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal*. 39:1-27.
- EFSA- European Food Safety Authority. 2005. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal*. 235:1-32.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Rome.
- FDA - U. S. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine. 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.
- Herzallah, S.M. 2009. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*. 114: 1141–1146.

- Kawamura, O, Nagayama, S, Sato, S, Ohtani, K, Ueno, I, Ueno, Y. 1988. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of alatoxin B<sub>1</sub> in peanut products. *Mycotoxin Research*. 4:75-87.
- Ledoux, DR, Brown, TP, Weibking, TS, Rottinghaus, GE. 1992. Fumonisin toxicity in broiler chicks. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 4:330-333.
- Martins, HM, Guerra, MM, Bernardo, F. 2006. Zearalenone, deoxynivalenol and fumonisins in mixed-feed for laying hens. *Mycotoxin Research*. 22(4):206-210.
- Nunes, J L S. 2008. Agrolink – culturas – milho – comercialização- consumo. Available from: <http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/comercializacao.aspx>.
- Official journal of the European Union. 2006. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding.
- Ogido, R., Oliveira, CAF, Ledoux, DR, Rottinghaus, GE, Corrêa, B, Butkeraitis, P, Reis, TA, Gonçalves, E, Albuquerque, R. 2004. Effects of prolonged administration of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in laying japanese quail. *Poultry Science*. 83:1953–1958.
- Oliveira, CAF, Albuquerque, R, Correa, B, Kobashigawa, E, Reis, TA, Fagundes, ACA, Lima, FR. 2001. Produção e qualidade dos ovos de poedeiras submetidas à intoxicação prolongada com aflatoxina B<sub>1</sub>. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo*. 68(2):1-4.
- Oliveira, GR, Ribeiro, JM, Fraga, ME, Cavaglieri, LR, Direito, GM, Keller, KM, Dalcero, AM, Rosa, CA. 2006. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. 162:355–362.
- Oliveira, CAF., Butkeraitis, P, Ledoux, DR, Rottinghaus, GE. 2007. Efeito da ingestão de fumonisin B<sub>1</sub> no peso corporal e na histopatologia de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). *Ciência Rural, Santa Maria*. 37 (1) 284-287.
- Pier, AC. 1992. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal of Animal Sciences*. 70:3964-3967.
- Prathapkumar, S.H., Rao, V.S., Paramkishan, R.J., Bhat, R.V. 1997. Disease outbreak in laying hens arising from the consumption of fumonisin-contaminated food. *British Poultry Science*. 38:475-479.
- Salwa, AA, Anwer, W. 2009. 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*. 8(2):181-186.
- Shephard, GS, Sydenham, EW, Thiel, PG, Gelderblom, WCA. 1990. Quantitative determination of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*. 13(10):2077-2087.

Singh, K, Frisvad, JC, Thrane, U, Mathur, SB. 1991. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup, Denmark: Danish Government.

Thiel, PG, Marasas, WFO. 1991. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39:1958-1962.

UBA – União Brasileira de Avicultura. 2010. Relatório Anual UBA.

Ueno, Y, Aoyama, S, Sugiura, Y, Wang, DS, Lee, US, Hirooka, EY, Hara, S, Karki, T, Chen, G, YU, S-Z. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*. 9:27-34.

Wang, D-S, Liang, Y-X, Chau, NT, Dien, LD, Tanaka, T, Ueno, Y. 1995. Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B<sub>1</sub> in corn for feed in North Vietnam. *Natural Toxins*. 3:445-449.

Westhuizen, LVD, Shephard, GS, Scussel, LLFC, Vismer, HF, Rheeder, JP, Marasas, WFO. 2003. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:5574-5578.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Considerando a alta frequência de contaminação das rações por fumonisinas e aflatoxinas, 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.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K.; CARTWRIGHT, R. D.; XIE, W.; SHIER, W. T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Protection*, v. 25, p. 1-9, 2006.
- 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.
- BARKAI-GOLAN, R. 2008. *Aspergillus* mycotoxins. In: BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Academic Press, Elsevier, San Diego, CA, p. 115-151.
- 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.
- BELLAVER, C. 2003. Embrapa Suínos e Aves – Sistemas de Produção de Frangos de Corte – Nutrição e Alimentação – Exigências dos frangos. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaodeFrangodeCorte/Racao-tab.html#tab3>. Acesso em: 02/09/2011.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, n.3, p. 497-516, 2003.
- BEZUIDENHOUT., S.C.; GELDERBLUM, 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*, 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. *Turkeys*. 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.
- 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. Portaria MA/ SNAD/ SFA nº 07, de 09/11/88. Diário Oficial da União, Brasília, 9 nov. 1988. Seção I, p.21968.

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. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L.S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.) *Fumonisin in food*. New York: Plenum Press, p.27-38, 1996.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, v.119, p.140-146, 2007.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3 ed. Sydney: University of Sydney, 1994.

BUTKERAITIS, P. Efeitos da fumonisina B<sub>1</sub> em codornas poedeiras (*Coturnix coturnix japonica*). 2003. 109p. Dissertação de mestrado. Mestrado em Nutrição Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

CAI, Q.; TANG, L.; WANG, J.S. Validation of fumonisin biomarkers in F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v.225, p.28–39, 2007.

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.

CHEN, J.; MIROCHA, C.J.; XIE, W.; HOGGE, L.; OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub> by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.12, p.3928-3931, 1992.

CHINAPHUTI, A.; TRIKARUNASAWAT, C.; WONGURAI A.; KOSITCHAROENKUL, S. Production of in-house ELISA test kit for detection of aflatoxin in agricultural commodities and their validations. *Kasetsart Journal : Natural Science*, v. 36, p. 179-186, 2002.

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

Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of

the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 70, p. 12-34, 2006.

COULOMBE, R.A. Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p.880-891, 1993.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v.127, p.19-28, 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.

DEVI, K. T.; MAYO, M. A.; REDDY, K. L. N.; DELFOSSE, P.; REDDY, G.; REDDY, S. V.; REDDY, D. V. R. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B<sub>1</sub>. *Letters in Applied Microbiology*, v. 29, p. 284–288, 1999.

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.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos,clínicos e patológicos. *Biológico*, São Paulo, v.64, n.2, p.187-191, jul./dez., 2002.

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

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: 07/07/2009.

FDA - U. S. 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.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisin- 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*, Oxford, 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*, Santa Maria, v.36, n.1, p.234-239, 2006.

GLENN, A. E.; HINTON, D. M.; YATES, E.; BACON, C. W. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.67, n.7, p.2973-2981, 2001.

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.

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.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Monographs of the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans – Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthall.php>. Acesso em: 01/02/2010.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some mycotoxins – Aflatoxins, p. 171-300. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*, v. 82, 2002.

IGAYARA, L. A. Granjas de Frangos de Corte. In: OLIVO, R. *O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango*. Criciúma, SC, p. 51-59, 2006.

INMETRO-Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: julho/2007.

Jornal Oficial da União Européia. 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. (Texto relevante para efeitos do EEE) (2006/576/CE). Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:229:0007:0009:PT:PDF>. Acesso em: 07/07/2009.

KAWAMURA, O.; NAGAYAMA, S.; SATO, S.; OHTANI, K.; UENO, I.; UENO, Y. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut products. *Mycotoxin Research*, v.4, p.75-87, 1988.

KERÉNYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J. F. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.65, n.9, p.4071-4076, 1999.

- KLARIĆ, M. S.; CVETNIĆ, Z.; PEPELJNJAK, S.; KOSALEC, I. Co-Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A, Fumonisin and Zearalenone in Cereals and Feed, Determined by Competitive Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Thin-Layer Chromatography. *Arh Hig Rada Toksikol*, v. 60, p. 427-434, 2009.
- KLICH, M.A.; MULLANEY, E.J.; DALY, C.B.; CARY, J.W. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A. tamaritii* and *A. ochraceoroseus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.53, p.605–609, 2000.
- KOLOSOVA, A. Y.; SHIM, W.; YANG, Z.; EREMIN, S. A.; CHUNG, D. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B<sub>1</sub>. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 384, p. 286-294, 2006.
- KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; MOLINELLI, A.; SULYOK, M.; MACDONALD, S.; CREWS, C. Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants*, v. 25, n. 2, p. 152-163, 2008.
- 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.
- KURTZMAN, C.P., HORN, B.W., HESSELTINE, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie Leeuwenhoek*, v.53, p.147-158, 1987.
- 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.
- LESLIE, J. F.; PLATTNER, R. D.; DESJARDINS, A. E.; AND KLITTICH, C. J. R. Fumonisin B<sub>1</sub> production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology*, v.82, p.341-345, 1992.
- LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, J.; CHEN, X.; JIANG, J.; XIE, L.; ZHANG, D. Development of class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut. *Food Chemistry*, v. 115, p. 313-317, 2009.
- MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; ALMEIDA, C.A.A.; DILKIN, P. Fumonisin B<sub>1</sub> levels in cereals and feeds from southern Brazil. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, n.1, p.41-45, jan./jun., 2001.
- MALLMANN, C.A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L.; RAUBER, R.H. Intoxicação experimental de frangos de corte com fumonisina B<sub>1</sub>. 2005. Disponível em: [http://www.lamic.ufsm.br/papers/Fumonisinina\\_em\\_frangos\\_de\\_corte.pdf](http://www.lamic.ufsm.br/papers/Fumonisinina_em_frangos_de_corte.pdf). Acesso em: 02/02/2010.

MAPA (2001). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/especies/aves>>. Acesso em: 25/07/2011.

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 B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, Pretoria, 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.; COMPANYS, E.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycological Research*, v.120, p.959-964, 1998.

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.; GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. Zearalenone, deoxynivalenol and fumonisins in mixed-feed for laying hens. *Mycotoxin Research*. v. 22, n. 4, p. 206-210, 2006.

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.

MENDY, M.; WALTON, R. Molecular pathogenesis and early detection of hepatocellular carcinoma – Perspectives from West Africa. *Cancer Letters*, v.236, p.44-51, 2009.

MERRILL, A. H., Jr.; WANG, E.; GILCHRIST, D. G.; RILEY, R. T. Fumonisin and other inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis. *Advances Lipid Research*, v.26, p.215–234, 1993.

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

MERRILL, A.H., Jr.; SULLARDS, C.M.; 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, 2001.

- MERRILL, A.H., Jr. Sphingolipids. In: VANCE, D.E.; VANCE, J.E. (Eds.). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier B.V., 2008. p. 363-397.
- MIYAMOTO, K.; HAMADA, A.; KAWAMURA, O. Determination of aflatozins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF.2 monoclonal antibody-HPLC method. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kawaga University*, v.60, n. 113, p. 75-81, 2008.
- 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.; 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-hydroxypyridine. *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*, Campaign, v.73, n.5, p.617-626, 1994.
- NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A.; MARASAS, W.F.O. *Fusarium species – An illustrated manual for identification*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983.
- 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.
- 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.
- NORRED, W. P.; VOSS, K. A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.57, p.522-527, 1994.
- NORRED, W.P. Agriculturally important fungal toxins. *Chemical Health & Safety*, p. 22-25, 2000.
- NUNES, J.L.S. 2008. Agrolink – culturas – milho – comercialização- consumo. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/comercializacao.aspx>. Acesso em: 08/06/09.
- OGIDO, R.; OLIVEIRA, C.A.F.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; CORRÊA, B.; BUTKERAITIS, P.; REIS, T.A.; GONÇALES, E.; ALBUQUERQUE, R. Effects of prolonged administration of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in laying Japanese quail. *Poultry Science*, v.83, p.1953–1958, 2004.
- OLIVEIRA, C.A.F.; ALBUQUERQUE, R.; CORRÊA, B.; KOBASHIGAWA, E.; REIS, T.A.; FAGUNDES, A.C.A.; LIMA, F.R. Produção e qualidade dos ovos de poedeiras

submetidas à intoxicação prolongada com aflatoxina B<sub>1</sub>. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo*, v.68, n.2, p.1-4, 2001.

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, 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, Santa Maria*, v.34, n.1, p.213-217, 2004.

OLIVEIRA, G.R. Análises micológicas e micotoxicológicas de rações de frangos de corte no município de São José do Vale do Rio Preto-RJ. 2006. 95p. Dissertação de mestrado. 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. 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.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; KAWAMURA, O.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. *Food Additives and Contaminants*, v.18, n.8, p.719-729, 2001.

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.; BIAZON, L.; DA SILVA, M.; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Fumonisins in corn: correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. *Brazilian Archives of Biology and Technology - An International Journal*, v.49, n.1, p. 63-71, 2006a.

ONO, E. Y. S.; BIAZON, L.; FUJII, S.; ONO, M. A.; HIROOKA, E. Y. Advances in immunochemical methods for mycotoxin/mycotoxigenic fungi detection in the agri-food system. In: B.N. Ganguli and S.K. Deshmukh. (Org.). *Fungi: Multifaceted Microbes*. New Delhi: Anamaya Publishers, p. 275-293, 2006b.

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.

ORSI, R.B.; OLIVEIRA, C.A.F.; DILKIN, P.; XAVIER, J.G.; DIREITO, G.M.; CORRÊA B. Effects of oral administration of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Chemico-Biological Interactions*, v.170, p.201–208, 2007.

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.

PIENNAR, J.G.; KELLERMAN, T.S.; MARASAS, W.F. Field outbreaks of leukoencephalomalacia in horses consuming maize infected by *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) in South Africa. *Journal of South African Veterinary Association*, v.52, n.1, p. 21-24, 1981.

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.

PINTO, V.E.F.; VAAMONDE, G. Hongos productores de micotoxinas en alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, v.28, n.3, p.147-162, 1996.

PLATTNER, R.D.; SHACKELFORD, D.D. Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, v.117, p.17-22, 1992.

POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; XAVIER, J.G.; DIREITO, G.M.; ORSI, R.B.; MATARAZZO, S.V. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B<sub>1</sub> and aflatoxin B<sub>1</sub> in rats. *Mycopathologia*, v.151, p.21–27, 2000.

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

PRATHAPKUMAR, S.H.; RAO, V.S.; PARAMKISHAN, R.J.; BHAT, R.V. Disease outbreak in laying hens arising from the consumption of fumonisin-contaminated food. *British Poultry Science*, v.38, p.475-479, 1997.

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.

REITER, E.; ZENTEK, J.; RAZZAZI, E. Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 53, p. 508 – 524, 2009.

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.

ROSMANINHO, J.F. ; OLIVEIRA, C.A.F.; BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das Micotoxicoses Crônicas na Produção Avícola. Comunicação científica - *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, n.2, p.107-114, jul./dez., 2001.

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.

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.

SAMSON, R.A.; van REENEN-HOESKSTRA, E.S. Identification of the common food-borne fungi – Ascomycetes – *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. In: *Introduction to food-borne fungi*. 3.ed. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1988. p.110.

SAMSON, R.A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. *Introduction to food-borne fungi*. 4.ed. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.

SHIER, T. W.; ABBAS, H. K.; BADRIA, A. F. Structure activity relationships of the corn fungal toxin fumonisin B<sub>1</sub>: Implications for food safety. *Journal of Natural Toxins*, Fort Collins, v.6, n.3, p.225-242, 1997.

SHIMA, Y.; SHIINA, M.; SHINOZAWA, T.; ITO, Y.; NAKAJIMA, H.; ADACHI, Y.; YABE, K. Participation in aflatoxin biosynthesis by a reductase enzyme encoded by *vrda* gene outside the aflatoxin gene cluster. *Fungal Genetics and Biology*, v.46, p. 221-231, 2009.

SINDIAVIPAR – Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. 2009. Estatísticas – Produção de frango 2009 - Exportação de carne de frango - 2009. Disponível em: <http://www.sindiaVIPAR.com.br/index.php?modulo=8&acao=detalhe&cod=1013>. Acesso em: 10/11/10.

SINGH, K.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; MATHUR, S.B. *An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins*. Hellerup, Denmark: Danish Government, 1991.

- 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.
- SMITH, J.E.; MOSS, M.O. *Mycotoxins Formation, Analysis and Significance*. 1. ed. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd., 1985, 148p.
- 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.
- 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.
- SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, v.175, p.149-163, 1999.
- 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, 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.
- TESSARI, E.N.C.; OLIVEIRA, C.A.F.; CARDOSO, A.L.S.P.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *British Poultry Science*, v.47, n.3, p. 357-364, 2006.
- 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. GELDERBLUM, 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.
- 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.
- UBA – União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual UBA - 2010.

UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D. S.; LEE, U. S.; HIROOKA, E. Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S.-Z. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*, v. 9, p. 27-34, 1993.

UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.-D.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S.-Z. Fumonisins 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.

Van EGMOND, H.P. Aflatoxin M<sub>1</sub>: occurrence, toxicity, regulation, p.11–55. In: Van EGMOND, H.P. (ed.), *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London. 1989.

WANG, D-S.; LIANG, Y-X.; CHAU, N. T.; DIEN, L. D.; TANAKA, T.; UENO, Y. Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B<sub>1</sub> in corn for feed in North Vietnam. *Natural Toxins*, v. 3, p. 445-449, 1995.

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.

WANG, E.; NORRED, W.P.; RILEY, R.T.; MEREDITH, F.I.; MERRIL, A.H. Jr. Fumonisin B<sub>1</sub> consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *Journal of Nutrition*, v.129, p.214-220, 1999.

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.

YU, J.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.22, p.194-202, 2005.

ZAGHINI, A.; MARTELLI, G.; RONCADA, P.; SIMIOLI, M.; RIZZI, L. Mannan oligosaccharides and aflatoxin B<sub>1</sub> in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> residues in eggs, and aflatoxin B<sub>1</sub> levels in liver. *Poultry Science*, v.84, p.825–832, 2005.

ZHENG, Z.; HUMPHREY, C. W.; KING R. S.; RICHARD, J. L. Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, v. 159, p. 255-263, 2005.

ZHENG, M.Z.; RICHARD, J.L.; BINDER, J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, v.161, p.261–273, 2006.