



UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO BIOMARCADOR (ESFINGANINA/ ESFINGOSINA)
COMO FATOR DE EXPOSIÇÃO ÀS FUMONISINAS EM FRANGOS
DE CORTE**

RODRIGO ALCANTARA DE CARVALHO

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

RODRIGO ALCANTARA DE CARVALHO

Sob a Orientação da Professora

Glória Maria Direito

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Microbiologia Veterinária do curso de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Seropédica, RJ
Agosto de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

RODRIGO ALCANTARA DE CARVALHO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Microbiologia Veterinária do curso de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

TESE APROVADA EM ____/____/____

Prof. Dra. Glória Maria Direito, Ph. D.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Dra. Gisela Lara da Costa
Fundação Oswaldo Cruz

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por esta e por todas as conquistas que tem me proporcionado;

Aos meus pais, Homero Dias de Carvalho e Maria Lúcia Alcantara de Carvalho, por todo carinho e compreensão;

Aos meus amigos, por todas as alegrias e toda a solidariedade durante nossa convivência.

636.508959529

C331a

T

Carvalho, Rodrigo Alcântara de, 1978-
Avaliação do biomarcador
(Esfinganina/Esfingosina) como fator de
exposição às fumonisinas em frangos de
corte / Rodrigo Alcântara de Carvalho. -
2006.

102 f. : il.

Orientadora: Glória Maria Direito.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 60-84.

1. Frango de corte - Toxicologia -
Teses. 2. Micotoxicoses - Contaminação -
Teses. 3. Toxicologia veterinária -
Teses. I. Direito, Glória Maria, 1961-
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Veterinária. III.
Título.

Bibliotecário: _____

Data: ___/___/_____

Sumário

RESUMO	0
ABSTRACT	0
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Avicultura no Brasil e no Mundo	3
2.2. O Gênero <i>Fusarium</i>	3
2.3. Ocorrência do Gênero <i>Fusarium</i>	4
2.4. Fumonisinas	5
2.4.1. Biossíntese das Fumonisinas	7
2.4.2. Absorção das Fumonisinas	8
2.4.3. Metabolismo das Fumonisinas	9
2.4.4. Distribuição das Fumonisinas no Organismo	9
2.4.5. Excreção das Fumonisinas	9
2.4.6. Efeitos Deletérios das Fumonisinas em Animais	10
2.4.6.1. Efeitos Deletérios das Fumonisinas em Aves	11
2.4.7. Efeitos Biológicos das Fumonisinas	16
2.4.8. Mecanismo da Ação das Fumonisinas	17
2.4.8.1. Esfingolipídeos	22
2.4.8.2. Determinação Cromatográfica dos Esfingolipídeos	23
2.5. O Gênero <i>Aspergillus</i>	25
2.6. Ocorrência do Gênero <i>Aspergillus</i>	25
2.7. Aflatoxinas	26
2.7.1. Biossíntese das Aflatoxinas	27
2.7.2. Absorção das Aflatoxinas	29
2.7.3. Metabolismo das Aflatoxinas	29
2.7.4. Distribuição das Aflatoxinas no Organismo	29
2.7.5. Excreção das Aflatoxinas	30
2.7.6. Efeitos Deletérios das Aflatoxinas em Animais	30
2.7.6.1. Efeitos Deletérios das Aflatoxinas em Aves	32
2.7.7. Efeitos Biológicos das Aflatoxinas	34
2.7.8. Mecanismo de Ação das Aflatoxinas	35
2.8. Estratégias de Controle	36
2.9. Perspectivas	39
3. JUSTIFICATIVA	41

4. OBJETIVOS	42
5. MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1. Amostras	43
5.2. Local	43
5.3. Padrões	43
5.3.1. Esfingolipídeos	43
5.3.2. Fumonisinias	43
5.3.3. Aflatoxina	43
5.4. Reagentes	44
5.4.1. Reativos para Derivatização	44
5.4.2. Solventes	44
5.4.3. Soluções	44
5.5. Filtros e Membranas Filtrantes	45
5.6. Equipamentos	45
5.6.1. Cromatógrafo Líquido	45
5.6.2. Centrífuga	45
5.6.3. Balança Analítica	45
5.6.4. Balança	45
5.6.5. Banho de Ultra-som	45
5.6.6. Agitador Orbital	45
5.6.7. Colunas	46
5.6.8. Bomba à Vácuo	46
5.6.9. pHmetro	46
5.7. Método para Determinação de Esfingosina e Esfinganina no Soro (CASTEGNARO, <i>et al.</i>, 1998)	46
5.7.1. Extração	46
5.7.2. Análise Cromatográfica	47
5.7.3. Cálculo das Concentrações de Esfinganina e Esfingosina Injetadas	48
5.7.4. Cálculo da Concentração de Esfinganina e Esfingosina nas Amostras	48
5.7.5. Cálculo da Proporção Sa/So	49
5.8. Determinação de Fumonisinias nas Amostras de Ração (SYDENHAM <i>et al.</i>, 1996)	49
5.8.1. Extração	49
5.8.2. Análise Cromatográfica	50
5.8.3. Cálculo das Concentrações de Fumonisinias na Ração	51
5.9. Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Ração	51
5.9.1. Extração	51

5.9.2. Análise Cromatográfica	52
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6.1. Análise de Esfingolípídeos no Soro	54
6.2. Análise de Micotoxinas na Ração	57
7. CONCLUSÕES	59
8. BIBLIOGRAFIA	60

RESUMO

CARVALHO, Rodrigo Alcantara. **Avaliação do biomarcador (esfinganina/esfingosina) como fator de exposição às fumonisinas em frangos de corte.** Seropédica: UFRRJ, 2006. (Dissertação, Mestrado Microbiologia Veterinária).

A contaminação mundial de alimentos e subprodutos com micotoxinas é um problema de extrema importância. As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, que possuem efeitos adversos à saúde humana e animal. As fumonisinas e aflatoxinas são as micotoxinas de maior importância agro-econômica pelos prejuízos acarretados à produção animal. Passos importantes na síntese destas micotoxinas são descritos, assim como seu metabolismo e efeitos adversos. Este trabalho avalia a determinação dos biomarcadores esfinganina (Sa) e esfingosina (So) no soro de frangos de corte como método de diagnóstico para exposição às fumonisinas e compara os dados obtidos com a análise da ração. Dos animais avaliados apenas 49% exibiram quantidades detectáveis de esfingolipídeos no soro, dentre estes, apenas 44,9% exibiram os 2 esfingolipídeos (Sa e So), 53,06% exibiram somente So e 2,04% exibiram somente Sa. Foi detectada na ração a presença de fumonisina B₁ na concentração de 374,92µg.kg⁻¹ e de aflatoxinas B₁, B₂ e G₁ nas concentrações de 440,99µg.kg⁻¹, 169,92µg.kg⁻¹ e 494,58µg.kg⁻¹, respectivamente. Foi possível estabelecer parcialmente o grau de intoxicação dos frangos e verificar que a sensibilidade do biomarcador pode ser afetada tanto pela presença de fumonisina quanto de aflatoxina.

Palavras Chave: fumonisinas, aflatoxinas, esfingolipídeos.

ABSTRACT

CARVALHO, Rodrigo Alcantara. **Evaluation of the biomarker (esfinganina/esfingosina) as a factor of exposition to fumonisins in poultry.** Seropédica: UFRRJ, 2005. (Dissertation, Master's degree Veterinary Microbiology).

The world wide contamination of foods and byproducts with mycotoxins is a problem of extreme importance. Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi that have adverse effects to human and animal health. The fumonisins and aflatoxins are the mycotoxins of greatest agro-economic importance due to the damage brought to animal production. Important steps in the synthesis of these mycotoxins are described, as such as their metabolism and adverse effects. This work evaluates the determination of the biomarkers sphinganin (Sa) and sphingosin (So) in poultry serum as a diagnose method for fumonisin exposition, and compares the obtained data with ration analysis. Of the evaluated animals only 49% exhibited 2 sphingolipids (Sa and So), 53,04% exhibited only So and 2,04% exhibited only Sa. It was detected at ration the presence of fumonisin B₁ at concentration of 374,92 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ and aflatoxins B₁, B₂, and G₁ at concentrations of 440,99 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, 169,92 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ and 494,58 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively. It was possible to partially establish the grade of intoxication of the poultry and to verify that the sensibility of the biomarker can be affected by the presence of fumonisin such as aflatoxins.

Key words: fumonisins, aflatoxins, sphingolipids.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos produzem diversos metabólitos secundários, como pigmentos, fitotoxinas, antibióticos e compostos tóxicos denominados micotoxinas. As micotoxinas podem ser, portanto, caracterizadas como metabólitos secundários produzidos por diversos fungos microscópicos.

Grãos cereais e subprodutos associados participam com freqüência da alimentação dos rebanhos de fazenda e animais de granja, constituindo fontes importantes de proteínas, carboidratos e lipídios. Quando os grãos são colonizados por fungos há um risco significativo de contaminação por micotoxinas. Produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, estes metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem ou animais, causando as micotoxicoses (MOSS, 1991).

Os fungos micotoxigênicos envolvidos nas cadeias alimentares humana e animal pertencem principalmente a quatro gêneros específicos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*. Muitas espécies destes gêneros não são apenas reconhecidas como patógenos de plantas, mas também fontes importantes de micotoxinas de ação deletéria para a saúde humana e animal (D'MELLO *et al.*, 1997).

As primeiras toxinas fúngicas foram descobertas em 1960, ao provocarem um surto com alta letalidade em perus na Inglaterra conhecido como a doença X dos perus. Nesse surto, milhares de aves morreram após consumirem torta de amendoim na ração (SARGEANT, 1961). O principal fungo encontrado na torta de amendoim foi o *Aspergillus flavus*. Na análise química da torta de amendoim foram encontrados compostos tóxicos que apresentavam fluorescência sob luz ultravioleta.

Esforços incessantes da comunidade científica proporcionaram o desenvolvimento da micotoxicologia. Como conseqüência, novos métodos de detecção de micotoxinas são desenvolvidos e novas micotoxinas são isoladas e caracterizadas. Recentemente, atenção especial tem sido despendida às toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*, pelo fato deste ser o mais comum contaminante

de cereais e seus produtos, sendo particularmente abundante no milho (LESLIE *et al.*, 1990). As principais micotoxinas produzidas por este gênero são os tricotecenos, moniliforminas, zearalenonas e fumonisinas. Estas últimas são alvo de intensa pesquisa pela observação de efeitos adversos produzidos pelas mesmas em animais e humanos e pelos relatos de sua ocorrência em diversos países do mundo. Diversas fusariotoxicoses são de importância conhecida na medicina veterinária, incluindo aquelas causadas principalmente por tricotecenos, zearalenona e fumonisinas.

A contaminação dos cereais, com toxinas fusarianas, leva a grandes perdas econômicas em caráter mundial. Há múltiplos critérios para avaliar o impacto econômico das micotoxinas em humanos, animais e na agricultura. Considerações incluem perda de vidas humanas e animais, cuidados com a saúde humana e cuidados veterinários, decréscimo da produção animal, custos regulatórios, pesquisa acerca do impacto e severidade do problema das micotoxinas e condenação de produtos originários da agricultura (VASANTHI & BHAT, 1998).

É incontestável a necessidade da manutenção de pesquisas nesta área, principalmente com relação às fumonisinas que, continuamente, vêm demonstrando ser um grande problema a ser equacionado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Avicultura no Brasil e no Mundo

A avicultura é um segmento de destaque crescente nas últimas décadas, como um dos setores agrícolas que apresenta maior dinamismo. O seu crescimento é decorrente, sobretudo, dos avanços tecnológicos em determinadas áreas como a genética, nutrição, sanidade e manejo, os quais possibilitaram a instalação de uma indústria altamente eficiente e competitiva em todo o mundo, particularmente no Brasil. Como em todo sistema com elevado grau de tecnificação, como ocorre na avicultura de modo geral, qualquer fator que afete negativamente a produção determina enormes prejuízos aos produtores. Desta forma fica evidente a importância dos contaminantes naturais de rações, como as micotoxinas, por acarretarem perdas consideráveis às criações de aves (ROSMANINHO *et al*, 2001).

2.2 O Gênero *Fusarium*

Muitas espécies, identificadas ou não, do gênero *Fusarium* exibem um grau elevado de variações correspondentes a características morfológicas, fisiológicas e de cultura. Esta capacidade de variação pode explicar, em parte, a habilidade das espécies deste gênero de colonizar diversos nichos ecológicos na maioria das áreas geográficas do mundo.

Estas espécies podem produzir três tipos de esporos denominados macroconídeos, microconídeos e clamidósporos, e algumas delas podem produzir até dois tipos de esporos (NELSON *et al.*, 1994).

2.3 Ocorrência do Gênero *Fusarium*

As espécies do gênero *Fusarium* são as principais invasoras de grãos de milho no campo, causando várias doenças como a podridão de sementes e colmo (MILLS, 1989). Estas espécies podem contaminar a planta no campo e também podem ser encontradas em outras fases da produção dos vegetais, como no armazenamento, caso as condições de temperatura e umidade não sejam controladas adequadamente.

Algumas espécies do gênero *Fusarium* foram encontradas em diversos estados brasileiros, isoladas do milho e outros substratos, com predominância do *F. verticillioides* (Sacc.) Niremb (POZZI *et al.*, 1995; ORSI *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2000).

As condições climáticas sob as quais os grãos são cultivados têm uma importante influência na prevalência de espécies de *Fusarium* (TORRES *et al.*, 2001; HIROOKA *et al.*, 1996). Comprovadamente, substratos localizados em ambientes úmidos são melhores do que substratos desidratados para o crescimento de *Fusarium* spp. *in vitro*. A associação entre temperatura elevada e umidade é um fator que influencia o crescimento fúngico e a subsequente produção de micotoxinas (ONO *et al.*, 2001).

Estudos desenvolvidos relacionados à distribuição e análise quantitativa da produção de fumonisinas em genótipos de milho em diversos países, sob condições ambientais de cada área específica, podem sugerir a existência de genótipos híbridos resistentes ao *Fusarium*, que poderiam ser adaptados a uma área específica (VISCANTI, 1996).

Relatos indicam que a esfoliação dos grãos também contribui para a maior contaminação por fungos, uma vez que estas lesões podem predispor à penetração de ácaros, insetos e até mesmo outros microrganismos presentes

na superfície dos grãos, fornecendo melhores condições para o crescimento fúngico (NELSON *et al.*, 1992).

2.4 Fumonisinias

Diversos relatos existentes indicam que as toxinas fusarianas são contaminantes extremamente incidentes em grãos e cereais em escala mundial (MULLER & SCHWADORF, 1993; BRAGULAT *et al.*, 1995a; CHULZE *et al.*, 1996; VIQUEZ *et al.*, 1996; AH SEO & WON LEE, 1999). As espécies de *Fusarium* sintetizam uma ampla diversidade de micotoxinas com estruturas químicas variadas. Dentre estas micotoxinas estão as fumonisinias, importantes com relação à saúde e produtividade dos animais (D'MELLO *et al.*, 1997).

As fumonisinias (FBs) caracterizam um importante grupo de micotoxinas produzidas pelo patógeno de cereais *Fusarium*. São um grupo de metabólitos polares, relacionados ou aparentados, originalmente isolados de *F. moniliforme* (BEZUIDENHOUT *et al.*, 1988). Suas estruturas são baseadas em uma longa cadeia de hidrocarbonetos (penta-hidroxiicosano) contendo metil e outros grupos amino (B₁ e B₂) ou acetil-amino (A₁ e A₂). Duas hidroxilas são esterificadas para duas moléculas de ácido propano-1,2,3-tricarboxílico, trivialmente denominados como ácido tricarbóxico (fig. 01). FB₁ se difere de FB₂ por ter uma hidroxila extra na posição 10 (DUTTON, 1996).

Devido à existência de 4 grupos carboxilas livres e do grupo amino, os compostos são solúveis em água, mas não-solúveis em solventes orgânicos não-polares. A ausência de solubilidade em solventes das fumonisinias, pode explicar, em parte, o retardo na sua descoberta, porque o isolamento da maioria das micotoxinas depende da extração por solvente, que evita a contaminação de extratos com materiais como os carboidratos e aminoácidos.

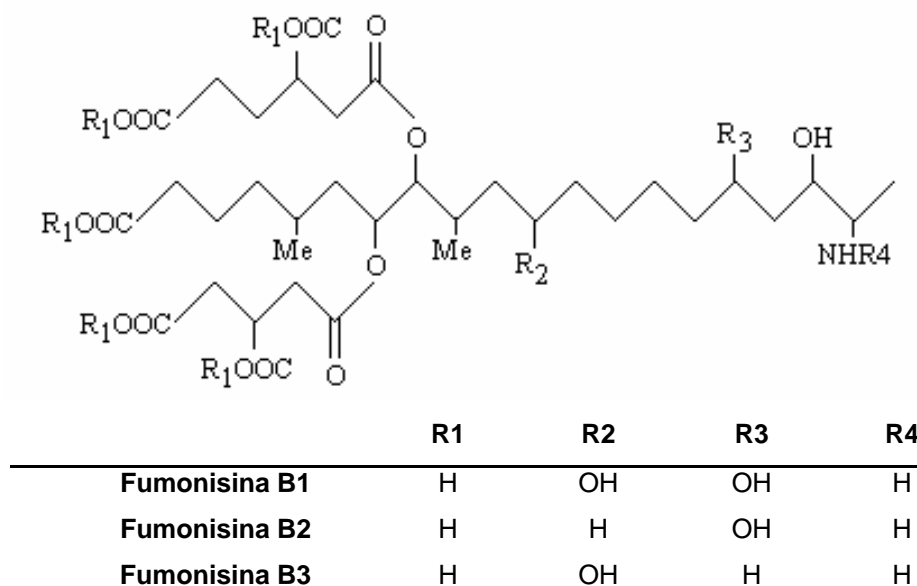


Figura 01 – Estrutura de algumas fumonisinas (SWEENEY *et al.*, 1999).

As fumonisinas B₁ e B₂ são metabólitos com propriedades cancerígenas que apresentam uma unidade hidrocarboneto de cadeia longa, que têm uma participação em sua toxicidade (WANG *et al.*, 1992). A fumonisina B₁ é a mais tóxica, e foi demonstrada como promotora de tumores em ratos (GELDERBLOM *et al.*, 1988), causadora da leucoencefalomalácia eqüina (MARASAS *et al.*, 1988) e edema pulmonar suíno (HARRISON *et al.*, 1990).

Todas as micotoxinas pertencem a um grupo de compostos conhecidos como metabólitos secundários. Esses diferem de compostos que são essenciais para o funcionamento e crescimento de uma célula viva normal e são caracterizados por sua natureza exclusiva. Existem diversas explicações sobre este fenômeno, incluindo evolução convergente, transferência direta de informação genética entre organismos e classificação taxonômica baseada na morfologia em detrimento dos princípios genéticos. Qualquer que seja a razão para ausência de estrita exclusividade, as fumonisinas não são caracterizadas uma exceção para esta regra, desta forma, outros gêneros diferentes podem

produzir compostos semelhantes, e os membros do gênero *Alternaria* produzem compostos muito semelhantes às fumonisinas e em pelo menos um caso, de fato produzem fumonisina eles mesmos (CHEN *et al.*, 1992).

São conhecidas, atualmente, 16 estruturas moleculares designadas pelo termo fumonisina (AH SEO & WON LEE, 1999), porém, a toxina predominantemente produzida por linhagens de *Fusarium* é a fumonisina B₁ (NORRED, 1993). Somente a FB₁, B₂ e B₃ foram detectadas quando a produção de fumonisinas ocorreu em condições naturais (HENRY & WYATT, 1994).

2.4.1 Biossíntese das Fumonisinas

Fumonisinas parecem ser sintetizadas através da condensação do aminoácido alanina a um precursor acetato derivado. Grupos metil são adicionados a C-12 e C-16 por uma S-adenosil metionina transferase. Os passos biosintéticos subseqüentes envolvem a oxigenação e esterificação do esqueleto acetato derivado, e ainda são desconhecidos. Não está claro se a oxigenação e metilação ocorrem antes ou depois da condensação com a alanina (fig. 02). Entretanto, aparentemente, fumonisinas menos oxigenadas como FB₂, FB₃ e FB₄ são precursoras da mais altamente oxigenada FB₁ (DESJARDINS *et al.*, 1996).

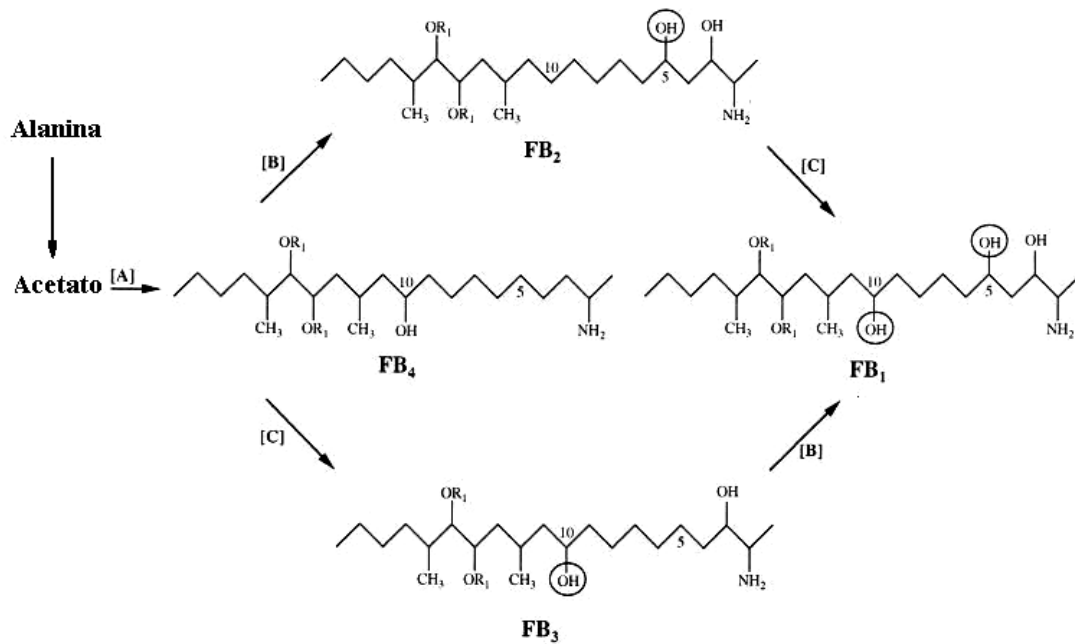


Figura 02 – Via de biossíntese da fumonisina, proposta por DESJARDINS *et al.*, 1996.

2.4.2 Absorção das Fumonisinas

A absorção gastrointestinal é a via que governa a passagem da micotoxina para o sangue e sua distribuição pelo organismo.

As fumonisinas estão pobremente disponíveis no trato digestivo (SHEPARD *et al.*, 1995). Após a ingestão de 7,5mg de FB₂/kg de peso corpóreo por ratos, mesmo quando a molécula não é detectada no plasma, sua presença na urina até 24 horas após a exposição indica uma efetiva absorção mesmo em uma taxa muito baixa (SHEPARD *et al.*, 1995). São necessárias pesquisas para determinação dos sítios de absorção para as aves domésticas, mas um pico plasmático de radioatividade, que corresponde a 28-103ng de FB₁ e derivados/ml é observado entre 1,5 e 2,5 horas após a ingestão de 2mg de FB₁ marcada, em galinhas (VUDATHALA *et al.*, 1994). Para ruminantes,

nenhum traço de FB₁ é detectado no plasma de vacas após a exposição oral de 1 a 5mg de FB₁/kg de peso corpóreo (PRELUSKY *et al.*, 1995).

2.4.3 Metabolismo das Fumonisinias

Nenhum estudo comprova o metabolismo de fumonisinina, mas as hidrolases hepáticas e enzimas intestinais poderiam hidrolizar FB₁ em monoéster e aminopentol e então excretá-la nas fezes (PRELUSKY *et al.*, 1995; SHEPARD *et al.*, 1994; GALTIER, 1999).

2.4.4 Distribuição das Fumonisinias no Organismo

As fumonisinias são hidrosolúveis, geralmente fracamente acumuladas nos tecidos animais (TURNER *et al.*, 1999). A FB₁ persiste por mais tempo nos órgãos do que no plasma (VUDATHALA *et al.*, 1994), sendo que 72 horas após a ingestão de FB₁ marcada, alguma radioatividade ainda é mensurada em suínos, notadamente no fígado e rins (PRELUSKY *et al.*, 1994), e 70% da dose administrada é encontrada na bile. Em galinhas, nenhum resíduo foi detectado nos ovos. A distribuição e eliminação de FB₁ no organismo não são dependentes da dose administrada intravenosamente em vacas (0,05 ou 0,2mg FB₁/kg de peso corpóreo) (PRELUSKY *et al.*, 1995).

2.4.5 Excreção das Fumonisinias

Como esperado, esses componentes geralmente são rapidamente eliminados (YOSHIZAWA & JIN, 1995), motivo pelo qual algumas das

toxicoses podem atingir resolução apenas pela remoção da micotoxina. Urina e fezes são as principais vias de excreção de fumonisinas e de seus metabólitos (ERIKSEN & PETTERSSON, 2004).

2.4.6 Efeitos Deletérios das Fumonisinias em Animais

Os efeitos adversos das fumonisinas emergiram como um ítem predominante na micotoxicologia e, provavelmente, permanecerão assim por algum tempo. Há evidências alarmantes de diversos danos morfológicos celulares e bioquímicos em animais de produção alimentados com dieta contaminada por fumonisina. Efeitos profundos, em termos de lesões no fígado, trato gastrointestinal, cérebro e pulmões têm sido relatados em suínos, aves, bovinos e eqüinos (D'MELLO, *et al.*, 1999). Essas micotoxinas estão associadas com a leucoencefalomalácia eqüina (KELLERMAN *et al.*, 1990; MARASAS *et al.*, 1988; WILSON *et al.*, 1990), edema pulmonar suíno (HARRISON *et al.*, 1990), nefrotoxicidade e câncer de fígado em ratos (GELDERBLUM *et al.*, 1991), efeito aterogênicos em macacos (FINCHAM *et al.*, 1992), hipertrofia medial das artérias pulmonares em suínos (CASTEEL *et al.*, 1994), aterosclerose em macacos (NORRED, 1993), imunossupressão em frangos (LI *et al.*, 1999) e hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI *et al.*, 1996).

Em todas as espécies animais estudadas, as fumonisinas alteraram a biossíntese dos esfingolipídios, com as maiores alterações nas concentrações das bases esfingóides no rim, fígado, pulmão e coração. O sistema imune específico não é afetado. Entretanto FB₁ inibiu a fagocitose e a biossíntese de esfingolipídios nos macrófagos pulmonares, induzindo um acúmulo de material membranoso nas células endoteliais dos capilares pulmonares. Essa alteração

parece ser específica para este tipo de célula e para a espécie suína (HASCHEK *et al.*, 2001).

Em comum com outros compostos fisiologicamente ativos, as micotoxinas de *Fusarium* são capazes de induzir tanto efeitos agudos como crônicos. Os efeitos observados são freqüentemente relacionados aos níveis da dose e duração da exposição.

Ensaio baseado em células isoladas emergiram como adjuvantes úteis na toxicologia animal geral, originando informação suplementar sobre os modos de ação bioquímica e fisiológica. Fumonisina B₁, por exemplo, causa anormalidades morfológicas e funcionais em macrófagos de frangos *in vitro*, indicando um efeito imunossupressivo (KIDD *et al.*, 1997). Estudos feitos com hepatócitos de roedores têm demonstrado que as fumonisinas bloqueiam a formação de esfingolipídios. Esta evidência corrobora a hipótese de que a interrupção da formação de esfingolipídios, com conseqüente acúmulo de esfinganina e esfingosina, constitui um dos mecanismos pelo qual se manifestam os efeitos de toxicidade aguda e carcinogenicidade das fumonisinas (NORRED, 1993). Os esfingolipídios são importantes para a manutenção da integridade da membrana celular além da regulação de receptores de superfície celular, bombas de íons e outros sistemas vitais para o funcionamento e sobrevivência da célula (LESSON *et al.*, 1995).

2.4.6.1 Efeitos Deletérios das Fumonisinias em Aves

Apesar da importância econômica de frangos e sua dependência de alimentos baseados no milho, que são com freqüência contaminados por *F. moniliforme* (BRAGULAT *et al.*, 1995a,b), investigações utilizando fumonisinas começaram apenas em 1992, mesmo que ensaios anteriores tenham sido efetuados com milho infectado por *F. moniliforme* (BRYDEN *et al.*, 1987).

LEDOUX *et al* (1992) alimentaram pintinhos de 1 dia com dietas contendo níveis de 0, 100, 200, 300 ou 400ppm de FB₁, durante 21 dias. O ganho diário de peso diminuiu com o aumento do nível de FB₁ na dieta. Lesões histopatológicas indicaram atrofia do timo, hiperplasia biliar e necrose hepática.

Em estudo com frangos de corte recebendo ração com 300mg.kg⁻¹ de FB₁, durante as duas primeiras semanas de vida, BROWN *et al* (1992) observaram diarreia, 19% de redução no ganho de peso, 30% de aumento no peso do fígado além de alterações histológicas, como necrose hepática multifocal, hiperplasia biliar, necrose de músculos e raquitismo.

WEIBKING *et al* (1993) avaliaram frangos de corte submetidos à ração com diferentes níveis de FB₁, observando lesões no fígado e redução no ganho de peso nos grupos que receberam rações contendo níveis de 225 e 450mg.kg⁻¹ de FB₁, respectivamente. Animais tratados com 75mg.kg⁻¹ apresentaram apenas redução na biossíntese de esfingolipídios, quando comparados com o controle, indicando que aquele nível pode ser tóxico para as aves, apesar de não resultar em sinais clínicos evidentes. Uma dose de 10mg de FB, dada em substância pura, ou 30mg em sua forma natural por quilo de alimento é tóxica para aves jovens.

Em outro teste, dessa vez com perus, WEIBKING *et al* (1993b, 1995) demonstraram que somente houve efeito deletério de fumonisina B₁ em níveis acima de 200ppm. Perus foram alimentados com material cultivado com diferentes níveis de FB₁ de 3 cepas de *F. moniliforme* que produziram quantidades variadas da micotoxina. Variações no peso corpóreo e orgânico foram observadas, dependendo do tratamento, com as proporções de esfinganina / esfingosina aumentadas na maioria das aves e hiperplasia hepatocelular generalizada em todos os perus tratados.

JAVED *et al* (1993 a e b) observaram aumentos na mortalidade dose dependente de embriões de galinha e frangos de corte após administração dietética de FB₁ pura. Moniliformina (MON) também aumentou a taxa de

mortalidade em frangos de corte, mas a ocorrência foi acelerada após a alimentação com as duas micotoxinas juntas. Esse aumento na mortalidade foi denominado síndrome da mortalidade aguda. Uma vez que o milho pode ser contaminado tanto com FB₁ como com MON, é possível que esta síndrome represente o efeito aditivo das duas micotoxinas.

Hiperplasia biliar foi encontrada em perus alimentados com FB₁, 150 a 300mg.kg⁻¹ de peso corpóreo, e fumonisina foi incriminada em casos de encefalomalácia cerebral em perus (FICKEN *et al.*, 1993).

Em 1994, HENRY e WYATT estudaram a toxicidade da fumonisina B₁ purificada em frangos em crescimento. A toxina foi incorporada na dieta de pintinhos de 1 dia nas concentrações de 0, 20, 40 e 80ppm. Níveis de até 80ppm não alteraram o ganho de peso, conversão alimentar e consumo de água. Nenhuma diferença quanto ao peso dos órgãos (fígado, baço e rins) foi observada. Os autores concluíram que dietas com níveis de até 80ppm não alteram o desempenho de frangos. Entretanto, os autores salientam a necessidade de pesquisas sobre a interação das fumonisinas com outras micotoxinas.

Resultados obtidos por ESPADA *et al* (1994) indicam que baixas doses de FB₁ pura (10mg.kg⁻¹) e FB₁ de material cultivado de *Fusarium moniliforme* (30mg/kg) são tóxicas para frangos jovens. Comparativamente aos controles, frangos intoxicados exibiram diarreia, reduções no peso corpóreo e no peso absoluto do fígado, baço e bursa, um aumento relativo no peso do fígado e redução relativa no peso do baço. Triglicérides, níveis de ácido úrico e atividade da fosfatase alcalina diminuídos e gamaglutamil transferase, aspartato amino transferase, desidrogenase láctica, creatina cinase e colesterol mostraram-se aumentados.

Segundo LESSON *et al* (1995), a maioria das espécies de aves domésticas demonstra grande resistência frente às fumonisinas. Porém, LEDOUX *et al* (1996), utilizando metodologia semelhante à de WEIBKING *et al*

(1993), demonstrou que o consumo de 75ppm de fumonisina já demonstra toxicidade para perus jovens.

BERMUDEZ *et al* (1995) testaram, em perus, o consumo de 75mg de fumonisina B₁ por quilograma de alimento durante 18 semanas. Os resultados indicaram que a exposição crônica levou à redução do peso corporal, ao decréscimo na contagem total de células brancas sanguíneas, e na relação entre heterófilos e linfócitos. Este autor também demonstrou que patos alimentados com rações contendo FB₁ apresentaram uma redução dose dependente no consumo de alimentos e ganho de peso. O aumento dos níveis de FB₁ na ração foi associado com o aumento dos pesos orgânicos absolutos do fígado, coração, rins, pâncreas e proventrículo, e também foi observada hiperplasia hepatocelular branda a moderada em todos os patinhos alimentados com FB₁, apesar dos patos, assim como outras aves, serem relativamente resistentes aos efeitos tóxicos de FB₁.

PRATHAPKUMAR *et al* (1997) relataram a ocorrência natural de surtos de micotoxicoses em aves de postura, onde os animais apresentaram sinais como diarreia escura e viscosa, diminuição da ingestão de alimentos, 20% de redução na produção de ovos e 10% de mortalidade. Após a substituição da ração contaminada, os plantéis apresentaram melhoria evidente. A análise da ração indicou contaminação de 8,5mg.kg⁻¹ de FB₁ e de 100µg.kg⁻¹ de aflatoxina B₁, evidenciando a potencialização dos efeitos de ambas as toxinas.

KUBENA *et al* (1999) observaram poucos efeitos deletérios sobre o desempenho e a saúde de aves de postura adultas, quando submetidas à ração contendo 100 a 200mg.kg⁻¹ de FB₁ e 50 a 100mg.kg⁻¹ de moniliformina, por período de tempo prolongado (420 dias).

LI *et al* (1999) não observaram redução em ganho de peso ou aumento na conversão alimentar de frangos alimentados com 200 mg.kg⁻¹ de FB₁, porém, constataram diminuição na imunidade humoral e supressão de linfócitos.

ESPADA *et al* (1997), intoxicando pintos de 1 dia com 10mg.kg⁻¹ (ppm) de ração durante 6 dias, observaram que fumonisina B₁ pode contribuir para o aparecimento de petéquias, aumentando o tempo de coagulação sanguínea e diminuindo a concentração de albumina sérica. Desta forma, a toxicose por fumonisina B de frangos de corte, intoxicados com 30 ou 300mg de toxina isolada de cultura de *F. moniliforme* (ou 10mg de FB₁ em substância pura) por quilograma de alimento, foi caracterizada por uma redução no tempo de protrombina, um aumento no fibrinogênio plasmático e na atividade antitrombina III. Simultaneamente, uma redução na albumina do soro e um aumento nas globulinas do soro foram observados.

Apesar do consumo de 80mg.kg⁻¹ de FB₁ na dieta de frangos de corte não afetar adversamente o peso corpóreo, a eficiência alimentar ou o consumo hídrico e não alterar os pesos relativos do fígado, baço, rins, proventrículo e bursa de Fabricius, HENRY *et al* (2000) observaram que a concentração de esfinganina no fígado e a relação esfinganina / esfingosina estavam significativamente aumentadas em todos os grupos tratados, além destes exibirem significativamente mais altas relações de glutamato oxalacético amino transferase: aspartato amino transferase e altos níveis de esfinganina livre no soro.

Apesar dos patos aparentarem ser resistentes à toxicidade por FB₁ em termos de mortalidade, foi observada hepatotoxicidade quando uma dose de FB₁ de 5mg/kg/dia foi administrada durante 12 dias (BAILLY *et al.*, 2001).

2.4.7 Efeitos Biológicos das Fumonisinias

A fumonisina B₁ altera a morfologia celular (YOO *et al.*, 1992, HAREL *et al.*, 1993), interações intercelulares (RAMASAMY *et al.*, 1995), o comportamento de proteínas da superfície celular (HANADA *et al.*, 1993; FUTERMAN, 1995; MAYS *et al.*, 1995) e proteína cinases (HUANG *et al.*, 1995), o metabolismo de outros lipídeos (SMITH & MERRILL, 1995; WU *et al.*, 1995) e o crescimento e viabilidade celulares (YOO *et al.*, 1992; SCHROEDER *et al.*, 1994; NORRED *et al.*, 1992; CAWOOD *et al.*, 1994; GELDERBLOM *et al.*, 1995). Essas alterações não são completamente compreendidas e podem ter múltiplas causas, entretanto, uma vez que os esfingolipídios estão associados com cada um desses processos, a maioria dos efeitos celulares das fumonisinias é provavelmente consequência do rompimento do metabolismo destes esfingolipídios.

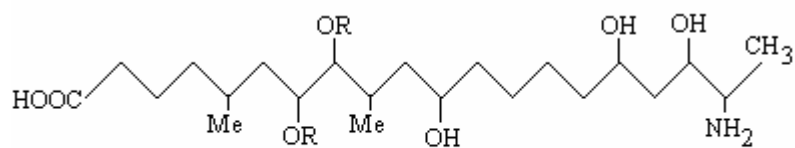
Os efeitos dos esfingolipídios sobre o crescimento celular são complexos. Bases esfingóides livres estimulam e inibem o crescimento celular (ZHANG *et al.*, 1990; GOODEMOTE *et al.*, 1995; PUSHKAREVA *et al.*, 1995) e, em concentrações maiores, são citotóxicas (STEVENS *et al.*, 1990). Desta forma, o acúmulo de esfinganina em células que receberam fumonisina B₁ provavelmente tem uma participação na alteração do crescimento e viabilidade celulares promovidos pela fumonisina.

Em estudos mais recentes foi descoberto que a toxicidade é parcialmente revertida pela adição de β-cloroalanina para inibir a primeira enzima desta via (palmitoil transferase do soro) e reduzir o acúmulo de bases esfingóides (YOO *et al.*, 1996).

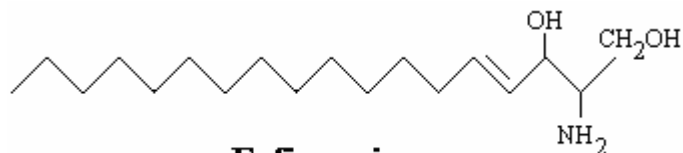
Apesar dos efeitos das fumonisinas sobre o metabolismo de esfingolipídios terem sido estudados predominantemente em cultura celular, os níveis de esfingolipídios no fígado, rins, pulmão e outros órgãos são alterados quando animais são alimentados com fumonisina B₁. As bases esfingóides são capazes de atravessar membranas celulares porque o pKa do grupo amino é relativamente baixo (MERRILL *et al.*, 1989). Assim, conforme os níveis intracelulares de bases esfingóides aumentam devido à inibição da ceramida sintase (N-acetil transferase), as quantidades de esfinganina (e algumas vezes esfingosina) no soro e na urina aumentam e podem ser usadas como biomarcadores para exposição de animais às fumonisinas.

2.4.8 Mecanismo de Ação das Fumonisin

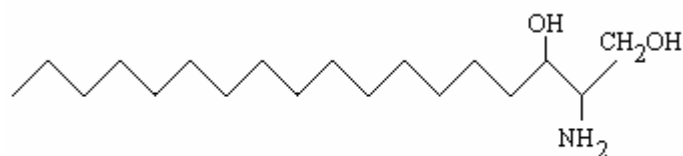
Fumonisin são caracterizadas como compostos citotóxicos e carcinogênicos aos animais. Seus mecanismos de ação, entretanto, não são completamente compreendidos. Estas micotoxinas e outros membros da série “B” são análogos da esfinganina (Fig. 03) e, portanto, inibidores potentes, competitivos, da ceramida sintase (N-acetil-transferase) (WANG *et al.*, 1991; MERRILL, *et al.*, 1993; D’MELLO *et al.*, 1997), a enzima que cataliza a acetilação da esfinganina na biossíntese dos esfingolipídios, e a reutilização da esfingosina derivada da renovação dos esfingolipídios.



Fumonisin B₁



Sfingosina



Sfinganina

Figura 03 - Semelhança estrutural entre a fumonisina B₁ e as bases esfingóides (esfingosina e esfinganina).

Os esfingolípídios são predominantes no sistema nervoso central e periférico, principalmente como lípídeos da mielina, estando localizados nos oligodendrócitos e células de schwann (WANG *et al.*, 1991). As fumonisinas inibem a ceramida sintase (N-acetil transferase) e bloqueiam a biossíntese destes esfingolípídios complexos, promovendo o acúmulo de esfinganina e esfinganina 1-fosfato. Estudos demonstraram que a fumonisina B₁ causa a ruptura do metabolismo de esfingolípídios através da inibição da esfingosina N-aciltransferase (ceramida sintase) em microssomos de fígado de ratos (WANG *et al.*, 1991) (fig. 05). Também foi demonstrado que a fumonisina B₁ inibe outras enzimas intracelulares incluindo fosfatases protéicas e arginosuccinato sintetase (JENKINS *et al.*, 2000). Portanto, FB₁ exerce sua citotoxicidade através da inibição do metabolismo dos esfingolípídios (substância importante para integridade da membrana celular e transporte iônico através das células), do

metabolismo protéico e o ciclo da uréia. Como uma conseqüência da inibição da ceramida sintase, a FB₁ causa o acúmulo de esfinganina (WANG *et al.*, 1991) e aumenta a formação de esfinganina 1-fosfato e a quebra do esqueleto de bases esfingóides em aldeídos graxos e etanolamina 1-fosfato (SMITH & MERRIL, 1995). O papel carcinogênico da FB₁ foi ligado ao acúmulo de bases esfingóides, que causa a síntese desprogramada de DNA (SCHROEDER *et al.*, 1994), alteração da sinalização por AMPc (HUANG *et al.*, 1995) e proteína cinase C (YEUNG *et al.*, 1996), e ruptura do ciclo normal da celular (RAMLJAK *et al.*, 2000).

A esfingosina é sintetizada no retículo endoplasmático através da combinação de palmitoyl-CoA e aminoácido serina, formando o 3-cetoesfingosina que é reduzido a esfinganina e esfingosina (fig. 04). Ceramida é formada por combinação ou de um ácido graxo livre ou acetil-CoA e esfingosina. Esfingomielina é formada quando a ceramida reage com CDP - colina ou fosfatidil colina. Para testar a hipótese de que a fumonisina age alterando a biossíntese de esfingolipídios, WANG *et al* (1991) examinaram os efeitos da FB₁ sobre a habilidade de hepatócitos de ratos em converter serina em esfingolipídios. Mostrou-se que FB₁ inibiu a biossíntese de esfingolipídios com uma K₅₀ de 0,1um.

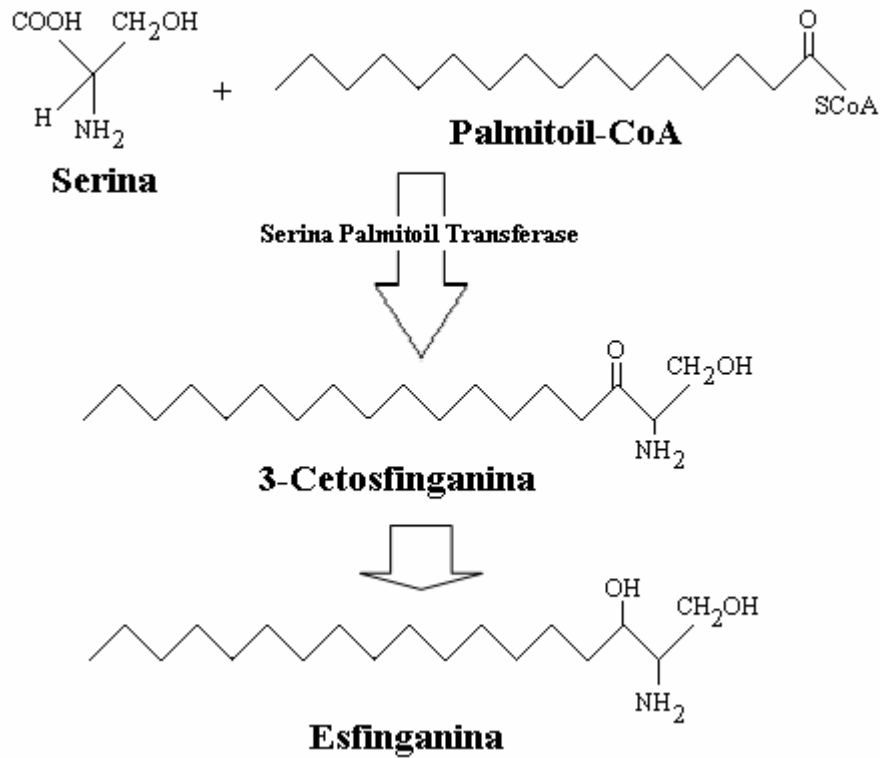


Figura 04 – Síntese da Esfinganina (MERRILL *et al.*, 1997).

O sítio específico de ação de FB_1 parece mesmo ser as enzimas esfinganina e esfingosina N-acetiltransferase. A inibição desta via metabólica resulta na depleção de esfingolipídios complexos, aumento intracelular de concentração de esfinganina livre (ou em menor grau de esfingosina livre) e um aumento dos produtos de clivagem (ABBAS *et al.*, 1993).

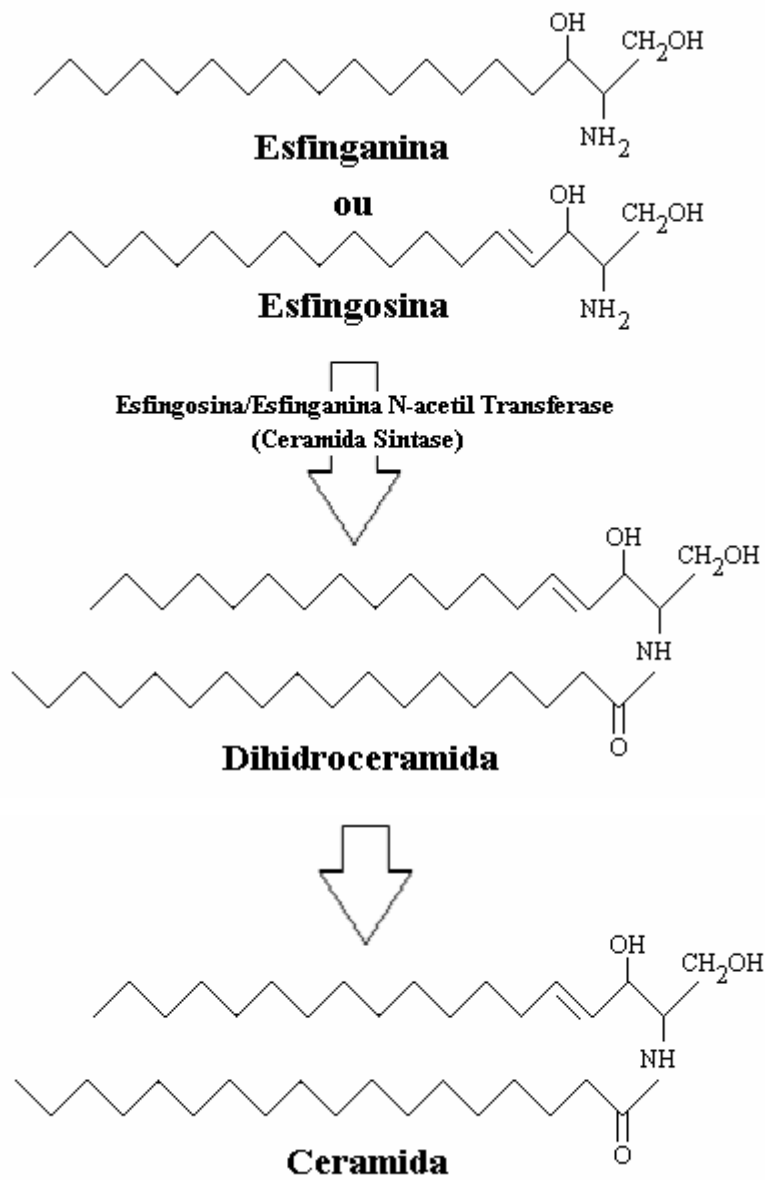


Figura 05 – Síntese da Ceramida.

Os plenos efeitos das fumonisinas, provavelmente envolvem muitos eventos bioquímicos. A elevação nas bases esfingóides também afeta a quantidade de outros lipídeos, incluindo os derivados 1-fosfatos e N-acetil de esfinganina. Além disso, o aminopentol de FB₁ (AP(1)) é um inibidor e substrato para a enzima ceramida sintase e a molécula resultante N-palmitoil AP(1) (PAP(1)) é um potente inibidor da enzima e dez vezes mais tóxica do que a FB₁ ou AP(1) para as células HT-29 em cultura (MERRILL *et al.*, 2001).

A multiplicidade de efeitos provavelmente contribui para a toxicidade e carcinogenicidade destas micotoxinas. Inibidores do metabolismo de esfingolipídios de ocorrência natural, tais como as fumonisinas, estão sendo comprovados como ferramentas poderosas para o estudo de diversos papéis dos esfingolipídios na regulação e doença celulares.

Estudos demonstram *in vitro* e *in situ* que a FB₁ bloqueia a biossíntese de esfingolipídios através da inibição específica da esfingosina (esfinganina) N-acetil transferase. A consequência desta inibição é o acúmulo de bases esfingóides no soro de pôneis, porcos e ratos alimentados com milho contaminado ou material de cultura de *F. moniliforme* contendo níveis conhecidos de FB₁. A alteração no metabolismo dos esfingolipídios pode ser monitorada, já que alguma esfinganina se acumula na célula podendo aparecer no sangue periférico (POZZI *et al.*, 2002). De fato as relações teciduais e sorológicas de esfinganina (Sa) para esfingosina (So) têm sido usadas como marcadores para indicar a exposição de animais a fumonisinas (D'MELLO, *et al.*, 1999).

2.4.8.1 Esfingolipídios

Esfingolipídios podem ser encontrados em todas as células eucarióticas, onde eles são especialmente abundantes na membrana plasmática e nas

membranas celulares relacionadas, como as membranas do Golgi e lisossomos.

Existem atualmente 300 esfingolípídios conhecidos, com grupos guia diferentes (BELL *et al.*, 1993). Todos contêm um esqueleto base de cadeia longa (esfingóide). Em células de mamíferos, a base esfingóide mais comum é D-eritro-esfingosina; entretanto, outras bases esfingóides (ex., esfinganina e 4-hidroxisfinganina) também são encontradas. Tipicamente, bases esfingóides livres estão presentes em concentrações muito baixas nas células, por causa da biossíntese da esfinganina que é rapidamente N-acilada com um ácido graxo de cadeia longa para formar N-acil-esfinganina (dihidroceramida) (Fig. 05). A adição subsequente de uma ligação dupla no carbono 4,5 – ligação de carbono do esqueleto de esfinganina resulta na formação de ceramida (N-acil esfingosina).

Esfingolípídios mais complexos são formados quando grupamentos de extremidade polar são adicionados na posição 1 da ceramida (por ex., esfingomiéline, gangliosídeo GM₃). Devido a isto, acredita-se que a presença de esfingosina livre nas células é derivada primariamente da renovação de esfingolípídios mais complexos ou de fontes dietéticas.

2.4.8.2 Determinação cromatográfica de esfingolípídios

Como mencionado anteriormente, as fumonisinas se mostraram como potentes inibidores da via de renovação dos esfingolípídios, através da inibição da enzima ceramida sintase (esfinganina N-acetil transferase) (WANG *et al.*, 1991). Essa enzima catalisa a formação da diidroceramida a partir da base esfingóide esfinganina (fig. 05). Essa inibição foi observada em diversas culturas de células, incluindo células renais (YOO *et al.*, 1992), neurônios cerebelares (MERRIL *et al.*, 1993) e hepatócitos primários de ratos

(GELDERBLOM *et al.*, 1995). Uma ruptura similar foi observada em diversas espécies animais após o consumo de alimentos contendo fumonisinas.

Elevação de esfinganina, e da proporção entre esfinganina / esfingosina, foram notadas no soro e urina de macacos (SHEPHARD *et al.*, 1996), pôneis (WANG *et al.*, 1992), galinhas (WEIBKING *et al.*, 1993) e ratos (RILEY *et al.*, 1994). Pelo fato das mudanças nas bases esfingóides ocorrerem antes de outros biomarcadores de lesões celulares pela exposição à fumonisina, como a elevação de enzimas hepáticas, foi proposto por RILEY *et al.* (1994), que a proporção entre esfinganina e esfingosina pudesse ser utilizada como biomarcador do consumo de alimentos contaminados por fumonisinas.

A determinação desta proporção tem sido baseada, geralmente, nos métodos originais propostos para determinação de esfingosina livre no tecido hepático por CLAE, os quais envolvem a extração lipídica com clorofórmio/metanol, hidrólise alcalina para clivar acilglicerolipídeos e hidrolisar lisosfingolipídeos e a determinação das bases esfingóides por derivatização com *o*-ftaldialdeído (OPA) usando a detecção por fluorescência (MERRILL *et al.*, 1988), mas esses métodos possuem a desvantagem de serem trabalhosos e longos (RILEY *et al.*, 1994).

O desenvolvimento de métodos mais curtos para a determinação desta proporção foi direcionado primeiramente para análise da urina usando tanto extração com acetato de etila (CASTEGNARO *et al.*, 1996, 1998), quanto à utilização de uma minicoluna para limpeza do extrato de clorofórmio (SOLFRIZZO *et al.*, 1997), atualmente esses métodos têm sido estendidos para a análise da proporção de esfinganina e esfingosina no soro.

2.5 O Gênero *Aspergillus*

O Gênero *Aspergillus* foi o que iniciou o processo de estudos a cerca das toxinas produzidas por fungos e incitou o desenvolvimento da área denominada micotoxicologia. No momento diversas são as espécies destes fungos conhecidas e isoladas, mas as espécies principais de interesse são *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger*, pela sua conhecida produção de micotoxinas (KURTZMAN *et al.*, 1987).

2.6 Ocorrência do Gênero *Aspergillus*

Diversos são os trabalhos que ilustram a ocorrência do gênero em diversas partes do mundo. A ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus*, bem como de suas toxinas em alimentos e rações animais, apresenta distribuição mundial, com predomínio nas regiões de clima tropical e subtropical. A contaminação dos produtos vegetais ocorre através do contato com esporos do fungo, presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem. A utilização de práticas agrícolas incorretas, que prolongam o contato dos produtos com o solo, as lesões na superfície dos grãos, provocadas por insetos, e o armazenamento inadequado, em locais úmidos e sem ventilação, são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxigênicos (CHU, 1991).

A. flavus demonstrou colonização ótima em temperaturas abrangendo de 35 a 35°C com atividade de água do substrato (A_w) sendo 0.90 (SMITH & MOSS, 1985; SMITH & ROSS, 1991). Num estudo mais recente (GQALENI *et al.*, 1997), entretanto, a produção de AF pelo *A. flavus* foi ótima a 30°C e A_w do substrato de 0.996.

2.7 Aflatoxinas

Estas micotoxinas do gênero *Aspergillus* são amplamente conhecidas como os mais potentes carcinógenos hepáticos conhecidos para uma ampla variedade de espécies animais, incluindo humanos (DRAGAN & PITOT, 1994).

Aflatoxinas (AFs) fazem parte de um grupo de toxinas produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* (KURTZMAN *et al.*, 1987).

Aflatoxinas são o grupo de micotoxinas mais estudadas (> 5000 publicações) e são produzidas por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Aflatoxinas são dihidrofuranos ou tetrahidrofuranos fundidos a um anel cumarínico (fig. 06). São conhecidos, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁, G₂ (COULOMBRE, 1991). As aflatoxinas, no entanto, apresentam diferentes graus de atividade biológica: a aflatoxina B₁, além de ser a mais freqüentemente encontrada em substratos vegetais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de G₁, B₂ e G₂ (LESSON *et al.* 1995).

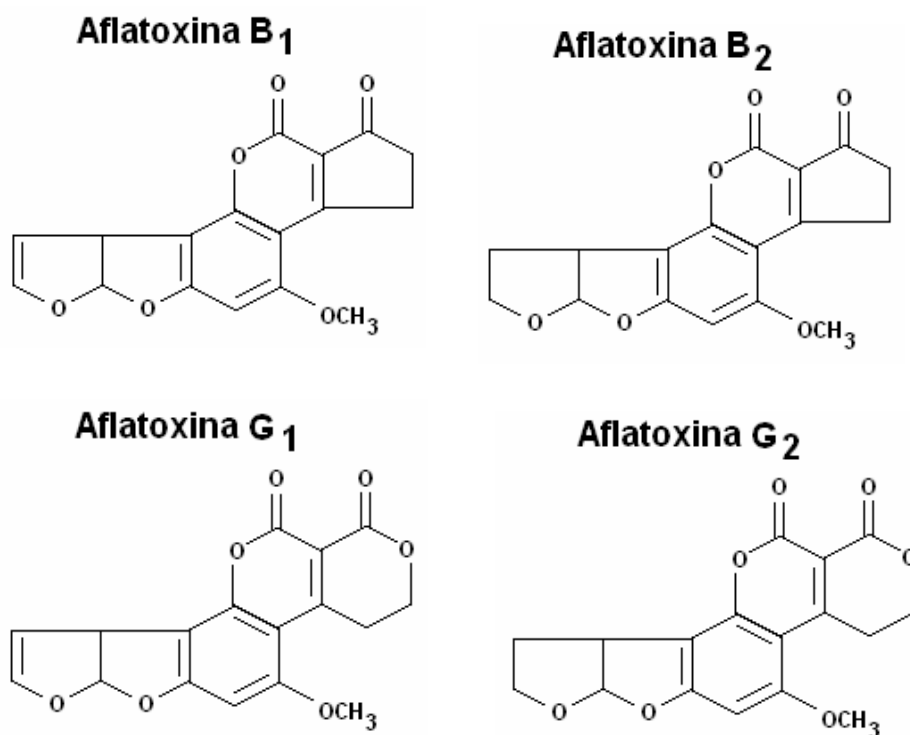


Figura 06 – Estrutura química de algumas aflatoxinas (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

2.7.1 Biossíntese das Aflatoxinas

Inicialmente, acetato e malonyl CoA são convertidos a uma unidade iniciadora hexanoyl por uma sintase de ácido graxo, que é então estendida por uma poliketídeo sintase para ácido norsonorínico, o primeiro precursor estável da via. O poliketídeo então sofre uma série de conversões enzimáticas (12-17), através de uma série de vias intermediárias.

Uma das ramificações da via forma AFB₁ e AFG₁ que contêm anéis dihidrobisfurânicos e são produzidas a partir da demetilsterigmatocistina; e outra das ramificações da via forma AFB₂ e AFG₂, que contêm anéis

tetrabisfurânicos e são produzidas a partir da dihidrodemetilsterigmatocistina (Fig. 07).

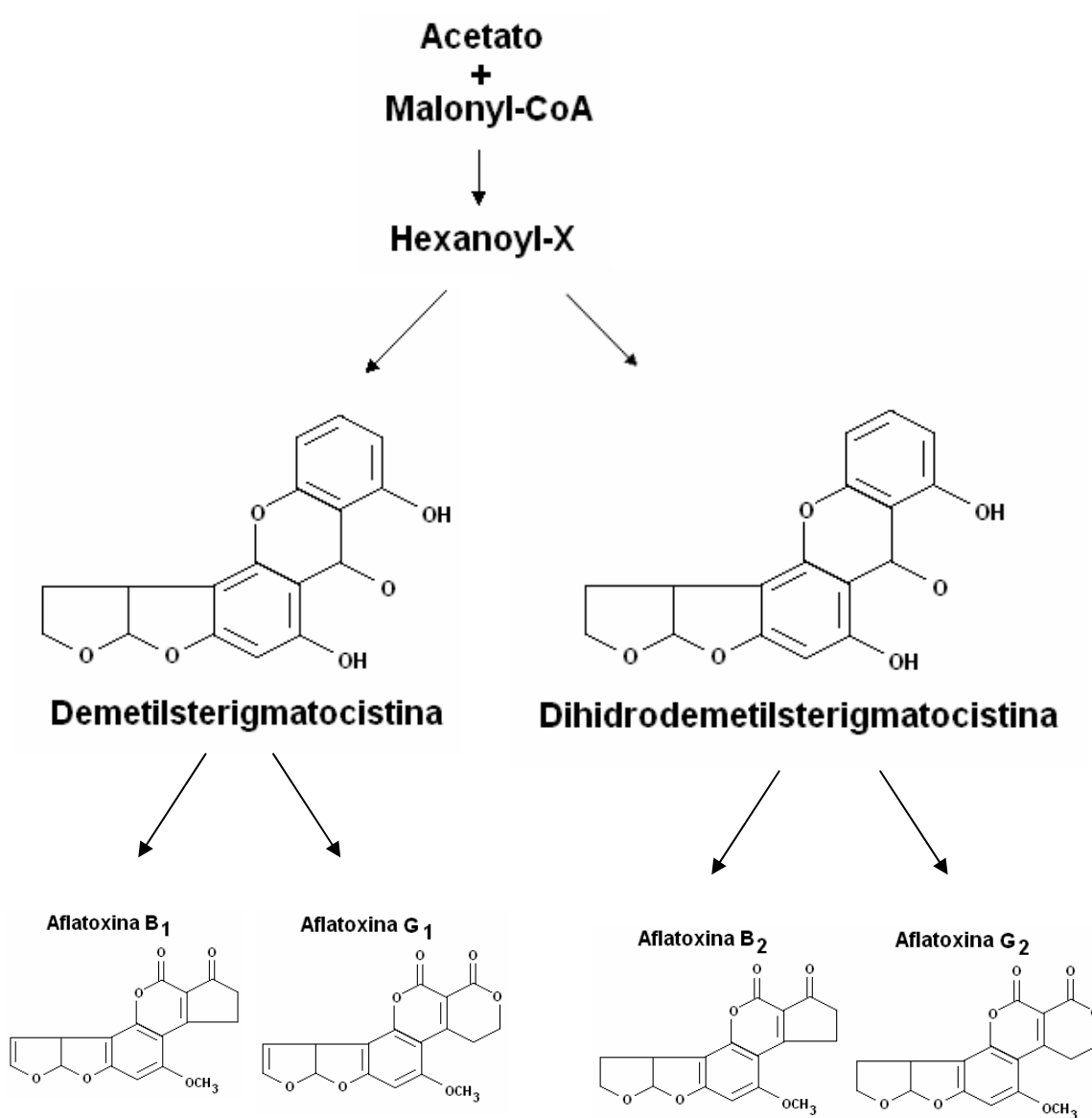


Figura. 07 – Via de biossíntese das aflatoxinas (SWEENEY & DOBSON, 1999).

2.7.2 Absorção das Aflatoxinas

Uma das causas das aflatoxinas serem extremamente tóxicas para aves é sua rápida absorção pelo trato gastrintestinal. Essa rápida absorção é evidenciada através do aparecimento de aflatoxina no soro logo após a ingestão da micotoxina (WYATT, 1991). Uma vez absorvida, a AFB₁ é imediatamente ligada, de forma reversível, à albumina e, em menor escala, a outras proteínas. Formas de AF ligadas e não-ligadas a proteínas séricas espalham-se pelos tecidos, especialmente o fígado.

2.7.3 Metabolismo das Aflatoxinas

Como nos testes de toxicidade, a maioria dos estudos focados no metabolismo de micotoxinas foi efetuada com as aflatoxinas. No geral, grande variação entre as espécies, e em alguns casos animais individuais, existem no que diz respeito ao metabolismo da aflatoxina. Fatores que influenciam o metabolismo da aflatoxina incluem espécie, sexo, idade, saúde e dieta. A forma pura da aflatoxina não é mutagênica e sua biotransformação em tecidos de mamíferos é primariamente efetuada pelas monoxigenases citocrômicas do citocromo P450.

Quatro caminhos metabólicos incluem O-dealquilação para AFB₁, cetoredução para aflatoxicol, epoxidação para AF-8,9-epóxido (agudamente tóxico, mutagênico e carcinogênico), e hidroxilação para AFM₁ (agudamente tóxica), AFP₁, AFQ₁ ou AFB_{2a} (todas relativamente atóxicas).

2.7.4 Distribuição das Aflatoxinas no Organismo

Após seu depósito no fígado, as AFs são biotransformadas pelo sistema microsomal hepático em metabólitos muito tóxicos, como AFB_{2a} e 9-epóxido

de aflatoxina. Esses metabólitos reativos têm a habilidade de se ligar de forma covalente com constituintes intracelulares, incluindo DNA e RNA, além de alterarem a síntese de proteínas no tecido hepático. Essas ligações de AFs com proteínas provocam mau funcionamento do fígado, levando a uma profunda alteração nas propriedades funcionais e na síntese das proteínas das aves (WYATT, 1991).

Aflatoxina B₁ pode ser transmitida tanto para as gemas como para as claras. TRUCKSSES *et al* (1983) encontraram AFB₁, AFM₁ e aflatoxicol nos ovos, 24 horas após o início do consumo de ração contaminada.

2.7.5 Excreção da Aflatoxinas

Estes compostos geralmente são rapidamente eliminados. Desta forma, algumas das toxicoses podem atingir resolução apenas pela remoção da micotoxina, mas subprodutos desta micotoxina podem ser encontrados em produtos alimentares de origem animal como no leite e ovos.

2.7.6 Efeitos Deletérios das Aflatoxinas em Animais

Várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos e carcinogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido (OSWEILER, 1990). As aflatoxinas são identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados (MCLEAN & DUTTON, 1995).

SOUTHERN e CLAWSON (1979) demonstraram que o consumo de AF total em 385 µg/kg de alimento se aproximou do nível de tolerância máxima para porcos em terminação. No seu estudo, a alimentação com dietas contendo diversos níveis (0.02, 0.385, 0.75 e 1.48 mg/kg de alimento) de AF

(principalmente AFB₁ com pequenas quantidades de AFG e AFB₂) redução na média de ganho de peso diário linearmente a 0.385mg.kg⁻¹ de alimento ou mais alta, enquanto a eficiência alimentar foi reduzida somente no nível mais alto. O peso dos fígados (como porcentagem do peso corporal) foi aumentado pela alimentação com AF a 0.385mg.kg⁻¹ de alimento ou mais alto, mas lesões hepatocelulares somente foram encontradas em porcos recebendo o nível mais alto de AF (1.48mg.kg⁻¹ de alimento).

O histórico de micotoxicoses e envenenamento em eqüinos foi revisto por ASQUITH (1991). Em um estudo de caso, cavalos maduros consumindo alimento contaminado por AFB₁ (58,4µg.kg⁻¹) tiveram perda de apetite e anorexia antes da morte (GREENE & OEHME, 1976). Os exames pós-mortem revelaram fígados aumentados, lesões renais e lesões de hiperplasia nos ductos biliares. Em outros casos a aflatoxicose eqüina foi caracterizada por depressão e morte. Exames pós-mortem revelaram hemorragia subcutânea e entérica, rins aumentados, fígados aumentados e necróticos, e lesões hepáticas renais e miocárdicas.

Os efeitos das micotoxinas em animais de companhia são severos e podem levar à morte. Em adição à hepatite e morte súbita em cães, os sintomas de aflatoxicose aguda em ambos, cães e gatos incluem vômitos, depressão, polidipsia, e poliúria. A morte geralmente ocorre em 3 dias com níveis de DL₅₀ de 0.5 a 1.0mg.kg⁻¹ em cães e 0.3 a 0.6mg.kg⁻¹ em gatos, dependendo da idade do animal (NEWBERNE *et al.*, 1969). Observações de necrópsia revelaram fígados aumentados, coagulação intravascular disseminada e hemorragia interna. Na aflatoxicose subaguda (a 0.5-1 mg.kg⁻¹ de alimento por 2-3 semanas), cães e gatos se tornaram letárgicos e anoréxicos (NEWBERNE *et al.*, 1969). Na aflatoxicose crônica (a 0.05-0.3mg.kg⁻¹ de alimento por 6-8 semanas), cães e gatos tiveram sinais clínicos similares àqueles para fase subaguda. A histopatologia dos animais com

aflatoxicose crônica revelaram fígados atrofiados com fibrose extensiva (NEWBERNE *et al.*, 1969; KETTERER *et al.*, 1975).

Em estudos iniciais, a DL₅₀ para AFB₁ foi estabelecida em ratos a vários níveis como 0.5-7mg.kg⁻¹ (BUTLER, 1964; WOGAN & NEWBERNE, 1967) e 6-18mg.kg⁻¹ (PATTERSON, 1973) dependendo do método de administração (intra venosa ou oral, respectivamente). Os resultados de necrópsia revelaram dano hepático (lesões, necrose e proliferação biliar) similar ao das outras espécies. Em outro estudo (NEWBERNE & BUTLER, 1969), a administração oral de AFB₁ a 5mg.kg⁻¹ por 9 semanas em ratos resultou em 100% de carcinomas hepatocelulares.

Aflatoxinas demonstraram afetar negativamente a produção, a função do sistema imune, e o metabolismo ruminal no gado. O aumento da AF no alimento do gado para níveis como 10, 26, 56.4, 81.1 e 108.5µg.kg⁻¹ demonstraram reduzir significativamente o consumo alimentar em cada nível de forma dose dependente (CHOUDHARY *et al.*, 1998).

2.7.6.1 Efeito Deletério das Aflatoxinas em Aves

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. Com relação às espécies exploradas na avicultura comercial, a susceptibilidade é maior em patos, seguidos de perus e gansos, faisões e frangos (MULLER *et al.*, 1970). Mesmo entre indivíduos da mesma espécie, a relação dose-resposta pode variar de acordo com a raça, sexo, idade e composição da dieta, entre outros fatores (COULOMBRE, 1991). Para muitas espécies, os machos são mais susceptíveis do que as fêmeas, ao passo que, em geral, a sensibilidade é acentuadamente maior nos jovens do que nos adultos (MCLEAN & DUTTON, 1995).

Os efeitos negativos das micotoxinas na performance de galinhas foram demonstrados em numerosos estudos. A alimentação com altos níveis (3.5mg.kg^{-1} de alimento) de uma mistura de aflatoxinas (79% AFB₁, 16% AFG₁, 4% AFB₂ e 1% AFG₂) a frangos de corte reduziu seu peso corporal e aumentou os pesos do fígado e rins (SMITH *et al.*, 1992). As aflatoxinas também aumentaram a uréia do sangue e reduziram os níveis de proteína total do soro, albumina, triglicérides e fósforo.

O impacto negativo da AF na resposta imune foi investigado *in vitro* (NELDON-ORTIZ & QURESHI, 1992). Neste estudo, macrófagos peritoneais de galinha foram expostos a vários níveis de AFB₁ sozinha ($5, 10$ e $20\mu\text{g.kg}^{-1}$ de meio de cultura) ou com mistura de oxidase microssomal funcional (níveis de AFB₁ foram de $0.01, 0.1, 0.5, 1$ e $5\mu\text{g.ml}^{-1}$) que ativou a AFB₁ para sua forma tóxica (AFB₁-epóxido).

GIAMBRONE *et al* (1985a) alimentaram frangos de corte por 35 dias, com rações contendo diferentes níveis de AFB₁, e observaram redução no ganho de peso e alterações histológicas no fígado, apenas nas aves que receberam diariamente rações com aflatoxina acima de $500\mu\text{g.kg}^{-1}$. Contudo, em outro experimento, GIAMBRONE *et al* (1985b) não constataram sinais de aflatoxicose em frangos alimentados com níveis até 800mg.kg^{-1} de AFB₁ por 5 semanas, porém perus submetidos aos mesmos tratamentos revelaram, além de baixos índices de ganho de peso e de conversão alimentar, um aumento na morbidade, por causas variadas, e na mortalidade. Os autores concluíram que níveis na ração de até $66\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁ são seguros na alimentação de frangos e perus. Os resultados obtidos por KAN *et al* (1989) corroboram esta afirmativa, pois ao alimentarem frangos de corte com rações contendo 50 e $100\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁, não observaram nenhuma diferença entre os tratamentos quando comparados com o grupo controle.

DOERR *et al* (1983) realizaram dois experimentos com frangos de corte, no experimento 1 encontraram significativa redução no peso vivo e eviscerado

dos animais expostos a rações contendo níveis de 75,225 e 675 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas, quando comparado ao grupo controle. Porém, no experimento 2, efetuado sob as mesmas condições do experimento 1, não houve diminuição significativa no peso vivo dos animais recebendo rações contaminadas com 300e 900 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas.

As aflatoxinas também exercem efeitos sobre o sistema imunitário. Entre os efeitos imunossupressores demonstrados em aves domésticas e outros animais de experimentação, destacam-se aplasia do timo e bursa de Fabricius, redução no número e na atividade de células T, diminuição da resposta de anticorpos, supressão da atividade fagocitária e redução dos componentes humorais, como complemento (C4), interferon e imunoglobulinas IgG e IgA (PESTKA & BONDY, 1990; PIER, 1992).

GHOSH *et al* (1990) observaram que 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁ na ração de frangos de corte produzem imunossupressão sem efeitos clínicos aparentes, podendo acarretar no plantes, morbidades e/ou mortalidades devido a infecções secundárias. Os sinais observados nos animais intoxicados incluíram diminuição significativa de linfócitos T, albuminas e globulinas.

2.7.7 Efeitos Biológicos das Aflatoxinas

Existem variações na magnitude de toxicidade entre as aflatoxinas. AFB₁ é a mais tóxica em ambas aflatoxicoses, aguda e crônica, enquanto AFM₁ (um metabólito do leite) é tão hepatotóxica aguda quanto a AFB₁, mas não é tão carcinogênica (CARNAGHAN *et al.*, 1963). Vários investigadores relataram a potência de diversas aflatoxinas em valores de DL₅₀ de 0.36, 0.78, 1.70 e 3.44 mg.kg^{-1} em patos consumindo AFB₁, AFG₁, AFB₂ ou AFG₂, respectivamente. Esses achados foram confirmados posteriormente *in vitro* (TERAO & UENO, 1978) e *in vivo* (COLE & COX, 1981).

AFB₁ reage com componentes celulares incluindo ácidos nucleicos, organelas e proteínas celulares e rompe os processos celulares. Os resultados incluem o rompimento da função de órgãos, carcinogênese, supressão do sistema imune, e possivelmente mutagênese e teratogênese (WOGAN, 1971). AFB₁ suprime a imunidade mediada por célula e a imunidade humoral e aparentemente interfere com a função celular B e componentes da fagocitose em outras espécies (PIER, 1991).

A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento 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 (OSWEILLER, 1990). Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens (LESSON *et al.*, 1995).

Esta patologia é de difícil diagnóstico, apesar de constituir a principal forma de intoxicação em condições naturais, o que ocasiona perdas econômicas consideráveis às criações animais (PIER, 1992).

2.7.8 Mecanismo de Ação das Aflatoxinas

É bem estabelecido que AFB₁ é tanto carcinogênica quanto citotóxica. A síntese de ambos, RNA e DNA foi inibida quando AF (5mg.kg⁻¹ de alimento) foi fornecida a ratos por um período de 6 semanas (BUTLER & NEAL, 1977). O metabólito ativado da AFB₁ (AFB₁-8-9-epóxido) forma uma ligação covalente com a guanina N7 (LILLEHOJ, 1991) e forma AFB₁-N7-guanina que se junta às células alvo (BAILEY, 1994). Os resultados são transversões G-T, reparo do DNA, lesões, mutações e formação de tumor subsequente (FOSTER *et al.*, 1983). Carcinomas hepatocelulares em humanos têm sido ligados à transversão G-T no códon 249 do gen supressor de tumores p53 (WANG & GROOPMAN, 1999).

No que diz respeito ao efeito citotóxico, AFB₁ demonstrou induzir a peroxidação lipídica em fígados de ratos levando ao dano oxidativo aos hepatócitos (SHEN *et al.*, 1995). Um estudo mais recente (BONSI *et al.*, 1999), demonstrou que AFB₁ pode inibir a atividade da nucleotídeo fosfodiesterase cíclica nos tecidos do cérebro, fígado, coração e rins.

2.8 Estratégias de Controle

A qualidade do alimento e o plano nutricional dos animais se relacionam com a severidade da doença. A deficiência protéica, desbalanço de aminoácidos e deficiência de antioxidantes (ex., vitamina E e selênio) aumentam a injúria da aflatoxicose (ROGERS, 1994). Otimizar a qualidade da dieta, com atenção particular às proteínas, vitaminas e elementos requeridos em pequena quantidade, auxiliará a recuperação, mas fará pouco aos danos ocorridos.

Diversas substâncias químicas têm sido testadas e usadas como inibidores de fungos (STEWART *et al.*, 1977). O principal grupo destes antifúngicos é classificado como ácidos orgânicos. Nesse grupo estão incluídas substâncias de estrutura simples como o ácido propiônico, acético, sórbico e benzóico e seus sais de cálcio, sódio e potássio. O ácido propiônico e seus derivados, os denominados propionatos, são eficientes inibidores fúngicos e têm sido usados há bastante tempo nas rações para aves com este objetivo (DIXON & HAMILTON, 1981; PASTER, 1979; KRABBE, 1994).

O uso de carvão ativado na ração obteve resultados poucos expressivos (KUBENA, 1990). Substâncias que obtiveram maior sucesso na tarefa de adsorver aflatoxinas quando adicionadas à ração são argilas de origem vulcânica: aluminossilicatos e montmorilonitas (SANTURIO *et al.*, 1994, 1999).

PHILLIPS *et al* (1988) demonstraram que um composto, o aluminossilicato de sódio e cálcio (ASSCA) tem uma alta afinidade *in vitro* por aflatoxina B₁.

As condições de cultivo e genótipos auxiliam no desenvolvimento de fumonisinas, notadamente o milho transgênico é mais resistente ao crescimento de *Fusarium* do que o milho tradicional. A redução do dano causado por insetos e doenças fúngicas reduz os níveis de fumonisina no milho.

Indubitavelmente, o melhor método para controlar a contaminação de micotoxinas em alimentos é prevenir o crescimento de fungos. É extremamente importante o uso de práticas, como o plantio de genótipos de plantas mais resistentes à contaminação por fungos de armazenagem. A prevenção pode ser assistida pelo desenvolvimento de variedades de grãos que sejam resistentes à infecção com cepas toxigênicas de fungos, tais genótipos estão sendo investigados (RHEEDER *et al.*, 1990a,b; DeLEON & PANDEY, 1989). Uma outra sugestão é o uso de agentes biocontroladores, onde grãos de milho são tratados com rizobactéria antagonista durante o plantio (BACON & WILLIAMSON, 1992).

Como a maior importância para o fazendeiro rural é assistir às práticas da fazenda para limitar a formação de micotoxinas durante o crescimento, colheita e estocagem, são essenciais os procedimentos para diminuição da umidade dos grãos colhidos, como a rotação de grãos, secagem ao sol dos grãos e a armazenagem dentro de padrões recomendados internacionalmente, através da construção de instalações para estocagem, seladas, simples, porém efetivas. O uso de inibidores de crescimento fúngico em grãos armazenados tem sido muito utilizado como um método preventivo. O controle da atividade dos fungos nas rações animais e seus componentes, tem como premícia básica conseguir matérias primas livres da produção de micotoxinas durante o processo de armazenamento (SMITH & HAMILTON, 1970).

Em geral, as taxas de ocorrência e níveis de fumonisinas, foram mais baixos no alimento para humanos do que nos grãos. As fumonisinas são resistentes à ruptura em solução (VISCANTI *et al.*, 1994) e pelo calor (ALBERTS *et al.*, 1990; DUPUY *et al.*, 1993), e assim, não são eliminadas pelo cozimento. No alimento, o uso de soluções alcalinas, baixa quantidade de água e alta temperatura reduziu a ocorrência de fumonisinas.

Uma vez que a contaminação dos grãos tenha sido estabelecida, existem opções disponíveis para limitar os efeitos adversos das micotoxinas aos animais e ao homem. Um método de redução de contaminação por FB se baseia na observação de que as amostras de milho geralmente contêm os níveis mais altos de fumonisina (COLVIN & HARRISON, 1992; WILSON *et al.*, 1992; MURPHY *et al.*, 1993). A adição de amônia foi demonstrada como capaz de degradar aflatoxinas e tem se tentado fazer o mesmo com o milho contaminado por fumonisina (NORRED *et al.*, 1991b; VOSS *et al.*, 1992), mas com pouco sucesso. A fermentação alcoólica é inefetiva na remoção de FB₁ com uma perda de 3 a 28% na planta em espiga, com níveis de até 0,95mg.L⁻¹ (SCOTT *et al.*, 1995). Entretanto, em temperaturas mais altas, PARK *et al.* (1992) demonstraram uma redução de FB₁ em cerca de 80%, sem compostos com propriedades mutagênicas terem sido encontrados, e SCOTT e LAWRENCE (1994) obtiveram um resultado semelhante com pressões ou temperaturas mais altas com milho úmido, sem amônia presente. Relatos da submissão dos grãos ao processo de moagem e outras formas de tratamento físico se mostraram eficientes na redução dos níveis de deoxilivalenol em até 75%. A segregação dos grãos por densidade é outra técnica que permite a separação dos grãos acometidos e também pode resultar em níveis reduzidos de micotoxinas como tricotecenos e zearalenona na porção residual. Devido ao fato de nenhuma fumonisina ter sido encontrada na farinha de tortilha, feita através do tratamento com hidróxido de cálcio, foi sugerido por SYDENHAM *et al.* (1991) que tratamentos químicos envolvendo monometilamino hidróxido de

cálcio degradam as fumonisinas, o milho tratado com hidróxido de cálcio 0,1M em temperatura ambiente por 24 horas perdeu a maior parte do seu conteúdo de FB₁ (75% e acima) como produto hidrolizado, em um processo seqüencial de duas etapas (SYDENHAM *et al.*, 1995a), ou através de uma mistura de monoésteres (SYDENHAM *et al.*, 1995b), bissulfeto de sódio ou amônia também foram testados, e apesar da sua efetividade em extensões diferentes, esses métodos físicos e químicos ainda não foram aplicados em situações comerciais.

A diluição dos grãos contaminados com outros componentes do alimento é uma outra opção, desde que as análises e o monitoramento sejam realizados antes da incorporação dos grãos aos alimentos compostos, para que conduzamos a diminuição da frequência com a qual constatamos análises efetuadas após o aparecimento dos efeitos deletérios sobre os consumidores, sejam eles humanos ou animais.

2.9 Perspectivas

A seleção de cultivares de plantas cereais resistentes aos patógenos fúngicos é atualmente vista como uma opção viável e sustentável para redução da contaminação dos grãos por micotoxinas (D'MELLO & McDONALD, 1997). É imprescindível que estratégias preventivas sejam mais efetivas do que medidas para remediar na redução do risco à saúde animal. Quando fungicidas são usados efetivamente para controlar doenças fúngicas de plantas de cereais, então o risco pode ser minimizado. Entretanto, a resistência ao fungicida, entre os patógenos *Fusarium*, tem sido registrada.

A descoberta de que as fumonisinas inibem a ceramida sintase ampliou a gama de doenças que reconhecidamente envolvem esfingolipídios, para incluir não apenas defeitos genéticos nas esfingolipídios hidrolases, mas

também uma ampla variedade de doenças causadas por toxinas fúngicas. Um desafio maior para pesquisa com esfingolipídios é identificar o iniciador que determina se as bases esfingóides são estimuladoras do crescimento, inibidoras do crescimento ou citotóxicas. A investigação do metabolismo dos esfingolipídios é uma área que pode prover oportunidades novas e interessantes no campo da toxicologia. Os esfingolipídios foram descobertos como mediadores dos passos da sinalização para regulação da homeostase celular de cálcio, progressão do ciclo celular e apoptose, portanto, carcinógenos e toxinas podem estar atuando através da iniciação ou inibição de algum destes passos. A ruptura do metabolismo dos esfingolipídios, por contaminantes de alimentos, foi implicada em diversas doenças animais e possivelmente no câncer humano. Muito pouco é conhecido sobre o papel dos esfingolipídios como componentes da dieta que podem contribuir ou proteger contra doenças (MERRILL *et al.*, 1997).

3 JUSTIFICATIVA

Avanços recentes em microbiologia analítica justificam a necessidade de compilação de novos dados. Testes de ELISA foram desenvolvidos para análise de micotoxinas de *Fusarium*, mas de forma geral, a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia à gás com espectrometria de massa emergiram no momento como os métodos de escolha, substituindo amplamente as técnicas anteriores, baseadas em cromatografia de camada delgada (WANG et al., 1995a,b; YAMASHITA et al., 1995). Tais avanços podem ainda ser aliados à necessidade evidente do desenvolvimento de um método rápido e eficaz para determinação do diagnóstico da exposição dos animais às fumonisinas, restringindo sensivelmente a gama de exames clínicos necessários para avaliação de perdas de produtividade em granjas de frangos de corte.

4 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- Avaliar o efeito da exposição às fumonisinas, de ocorrência natural, no perfil sorológico de esfingolipídeos de frangos de corte;
- Comparar o perfil de exposição dos animais infectados naturalmente com o perfil de exposição de animais infectados experimentalmente;
- Testar a eficácia da quantificação sorológica do biomarcador (esfinganina/esfingosina) como método diagnóstico para a exposição, de ocorrência natural, dos animais às fumonisinas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostras

Foram coletadas amostras de sangue de frangos de corte da raça Cobb com 45 dias de idade, no momento do abate, nos meses de novembro e dezembro de 2005, do plantel do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As amostras de sangue foram obtidas durante a sangria e mantidas sob refrigeração e congelamento até o momento da extração.

O número de amostras foi referente a 50% dos animais abatidos, perfazendo o total de 100 amostras.

5.2 Local

As amostras foram analisadas no Laboratório de Micologia e Micotoxicologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

5.3 Padrões

5.3.1 Esfingolipídeos

Os padrões de esfinganina (DL – eritrodihidroesfingosina) e esfingosina (D – esfingosina) foram obtidos da Sigma, St. Louis, MO.

5.3.2 Fumonisinias

O padrão de fumonisina F₁ foi obtido da Sigma, St. Louis, MO.

5.3.3 Aflatoxina

Os padrões de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram obtidos da Sigma, St. Louis, MO, e preparados segundo a metodologia da AOAC 2000.

5.4 Reagentes

5.4.1 Reativos para Derivatização

- O-ftaldialdeído (OPA) da Sigma, St. Louis, MO;
- 2-mercaptoetanol (Sigma).

5.4.2 Solventes

- Metanol (Merck);
- Metanol (CH₃OH) PA e LiChrosolv – Merck;
- Acetato de etila PA – Synth;
- Etanol absoluto (EtOH) – Merck;
- Água ultrapura (MilliQ – Millipore);
- Acetonitrila (Merck);
- Ácido acético (Merck);
- Clorofórmio (PA).

Todos com grau de pureza para cromatografia líquida.

5.4.3 Soluções

- Tampão borato, pH 10,5 (solução de ácido bórico 3%);
- KOH (1M);
- NaOH (1N);
- Solução de fosfato de potássio a 3%;
- Solução de cloreto de potássio a 4%.

5.5 Filtros e Membranas Filtrantes

- Papel de filtro Whatmann nº4;
- Papel de filtro Whatmann nº1;
- Membrana GVWPO01300 e HAWP 013 (22 μ) – (Millipore).

5.6 Equipamentos

5.6.1 Cromatógrafo Líquido

Equipado com uma bomba Waters, modelo 510, detector de fluorescência Agilent, modelo 1100 Series, injetor de *loop* fixo de 20 μ L (Rheodyne), colunas Microsorb MV D8, C18 5 μ , 15x4.4mm, Varian e Chemstation Plus da Agilent.

5.6.2 Centrífuga

IEC Model DPR – 6000, DAMON.

5.6.3 Balança Analítica

Modelo Branstwieta 4. 2000 Hamburg 11, Boeckel co Scientific Equipment.

5.6.4 Balança

Modelo Sartorius, KN W AAGEN Scientific Equipment.

5.6.5 Banho de Ultra-som

THORNTON

5.6.6 Agitador Orbital

Orbit Shacker Modelo 3520, Lab-Line Instruments.

5.6.7 Colunas

- Minicoluna contendo 500 mg de sílica de troca iônica (500 mg/10 mL – BondElut SAX, Varian);
- Colunas Microsorb MV D8, C18 5 μ , 15x4.4mm, Varian.

5.6.8 Bomba a Vácuo

Bomba a vácuo (Olidef-CZ).

5.6.9 pHmetro

pHmetro (Hanna-HI-8519).

5.7 Método para Determinação de Esfingosina e Esfinganina no Soro (CASTEGNARO *et al.*, 1998)

5.7.1 Extração

Depois do devido descongelamento do soro, 0,5mL do mesmo foi adicionado a 1,5mL da solução de cloreto de potássio e a 50 μ L da solução de hidróxido de potássio a 1M. Após homogeneização foram adicionados 4,0mL de acetato de etila, seguido de agitação suave por 20 minutos e centrifugação a 700g por 15 minutos. A fase superior foi coletada, armazenada em frasco âmbar e submetida ao aquecimento em banho (60°C) sob fluxo de N₂ até a secagem do resíduo. Os extratos foram armazenados a -10°C.

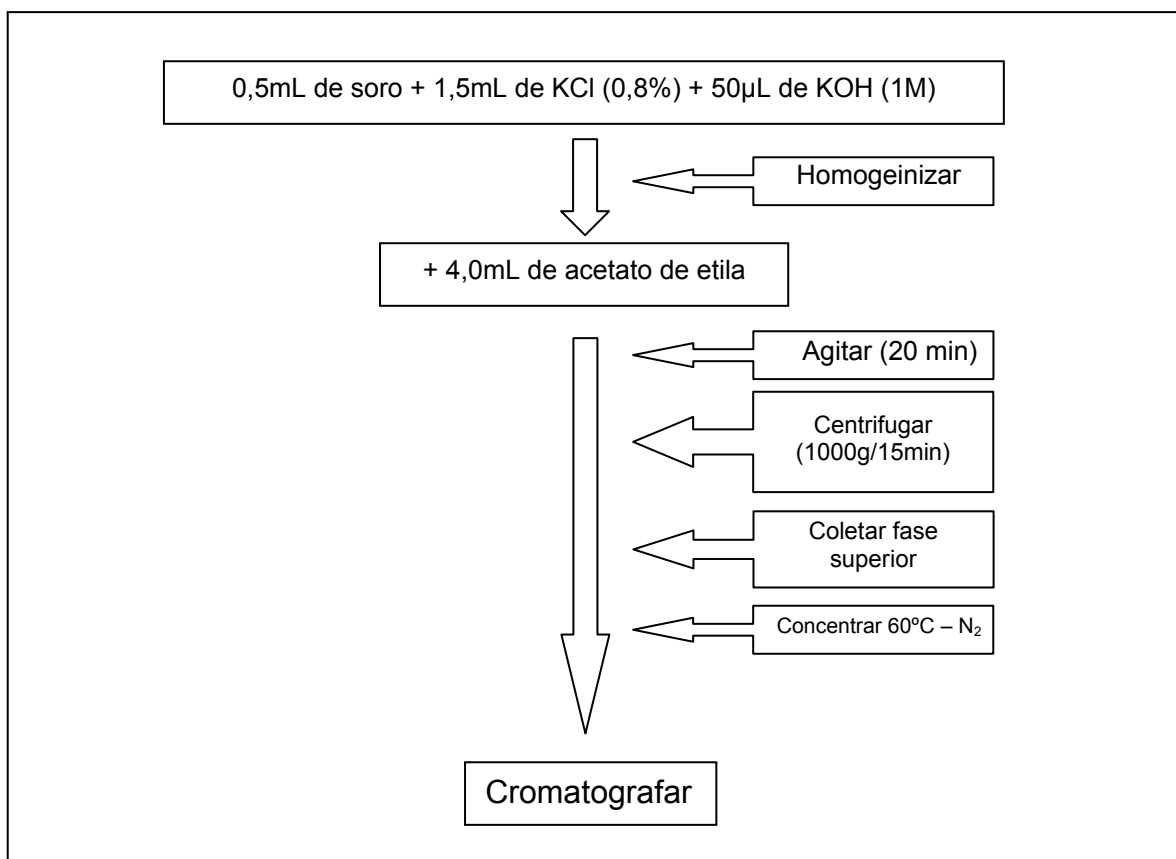


Figura 08 - Fluxograma do método utilizado para a extração de esfingosina e esfinganina do soro (Castegnaro *et al.* 1998).

5.7.2 Análise Cromatográfica

Os resíduos dos extratos foram redissolvidos com 250µL da solução metanol:água (9:1, v/v) e derivatizados com 50 µL de OPA (15 mg de ortoftaldeído – Sigma, dissolvidos em 0,5 mL de metanol – Merck, 15 µL de 2-mercaptoetanol – Sigma e 14,5 mL da solução de ácido bórico 3%). As análises foram realizadas em sistema isocrático, utilizando a fase móvel composta de metanol:água (9:1, v/v), eluída a 1 mL/minuto, proposta por SHEPHARD *et al.* (1998). Os 20µL da mistura da derivatização foram separados em coluna analítica de fase reversa (Microsorb MV C18, 5µ 150x4,6mm ID – Varian). A detecção por fluorescência foi obtida com excitação de 340nm e emissão de 455nm. A quantificação foi realizada pela comparação das áreas dos picos suspeitos com as obtidas nos picos padrões.

5.7.3 Cálculo das Concentrações de Esfinganina e Esfingosina Injetadas

O cálculo da concentração de esfinganina e de esfingosina injetadas foi baseado nas áreas dos picos detectados conforme a fórmula:

$$S = \frac{A \times E}{H}$$

Onde: S = quantidade de Sa ou So injetadas;

A = área do pico na amostra;

H = área do pico padrão;

E = quantidade do padrão injetado.

5.7.4 Cálculo da Concentração de Esfinganina e Esfingosina nas Amostras

O cálculo da concentração de esfinganina e de esfingosina nas amostras foi realizado através do cálculo:

$$C = \frac{V \times S \times W}{I \times Y}$$

Onde: C = concentração de Sa ou So nas amostras (ng/g ou ng/mL);

S = concentração de Sa ou So injetados;

I = Volume injetado (20µL);

W = quantidade de amostra (1,0g ou 1,0mL);

V = volume total da amostra derivatizada (250µL);

Y = quantidade inicial da amostra.

5.7.5 Cálculo da Proporção Sa/So

A partir dos valores absolutos de Sa e So das amostras a relação pode ser calculada pela fórmula:

$$Sa/So = \frac{Sa}{So}$$

Onde: Sa/So = proporção entre esfinganina e esfingosina;

Sa = valor absoluto de esfinganina;

So = valor absoluto de esfingosina.

5.8 Determinação de Fumonisinás nas Amostras de Ração

(SYDENHAM *et al.*, 1996)

5.8.1 Extração

Cinquenta gramas de milho triturado foram transferidos para um frasco de vidro e adicionados 100 mL da solução metanol:água (3:1, v/v) e homogeneizado no agitador por 30 minutos. O extrato foi filtrado em papel de filtro (Whatmann nº4) e seu pH foi corrigido para 5,8 a 6,5 com NaOH (1N), utilizando o pHmetro (Hanna-HI-8519). Uma alíquota de 10 mL do filtrado foi purificada em minicoluna contendo 500 mg de sílica de troca iônica (500 mg/10 mL – BondElut SAX, Varian), pré-condicionada com 5 mL de metanol e 5 mL de metanol:água (3:1, v/v). O cartucho foi lavado com 5 mL de metanol:água (3:1, v/v) e 3 mL de metanol. As fumonisinás foram eluídas com 10 mL de metanol:ácido acético (Merck) (99:1, v/v). Os procedimentos de condicionamento e lavagem das colunas foram realizados com fluxo inferior a 2 mL/minuto e a aplicação da amostra e eluição das toxinas com fluxo inferior a 1 mL/minuto, controlada pelo aparelho acoplado à bomba à vácuo (Olidef-CZ). Os extratos foram filtrados em membrana GVWPO-01300 (Millipore) e concentrados, a 60°C, até resíduo. As toxinas foram resuspendidas com 1 mL de acetonitrila:água (70:30, v/v) (Merck) e colocadas em frasco âmbar.

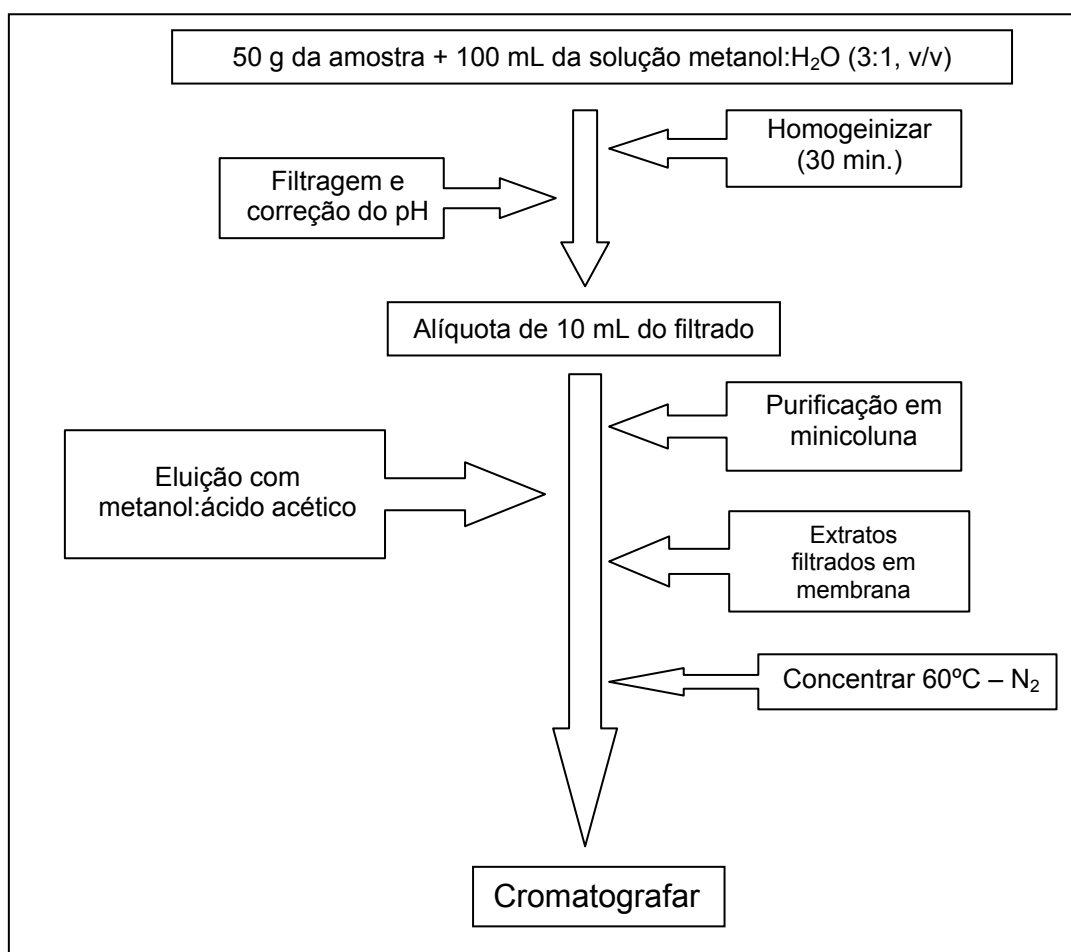


Figura 09 - Fluxograma do método utilizado para extração de fumonisina da ração (SYDENHAM *et al.*, 1996).

5.8.2 Análise Cromatográfica

A quantificação das fumonisinas foi realizada conforme metodologia preconizado por STACK & EPPLEY (1992) e SYDENHAM *et al.*, (1996). As amostras foram rediluídas com 200 μ l de acetonitrila:água (70:30, v/v) e filtrada em membrana GVWPO01300 – (Millipore). Desta solução foi retirada uma alíquota de 100 μ l e foram adicionados 200 μ l de OPA. Após 2 minutos, 20 μ l foram submetidos a cromatografia líquida.

A detecção das fumonisinas derivadas foi realizada sob fluorescência, com comprimentos de onda de 335 e 440 nm para excitação e emissão, respectivamente. O tempo de retenção para foi próximo de 7 min para FB₁. A quantificação foi realizada baseando-se na área dos picos correspondentes a cada toxina, comparando-as com o padrão.

5.8.3 Cálculo das Concentrações de Fumonisina na Ração

O cálculo das concentrações de fumonisina nas rações foi efetuado segundo a fórmula:

$$FB_1 \text{ (ng/g)} = (ABC)/(DE)$$

Onde:

A = área do pico correspondente a FB_1 da solução teste;

B = concentração de FB_1 (ng/ μ l) da solução padrão;

C = volume final da solução teste (μ l);

D = área do pico de FB_1 da solução padrão, e

E = peso da amostra representada pela solução em teste (g).

5.9 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Ração (SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989)

5.9.1 Extração

Para cada amostra de ração triturada foi pesado 50 g e adicionados 270 mL de metanol, 30 mL de cloreto de potássio a 4%. Após agitação de 30 minutos, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro Whatmann nº1 e uma alíquota de 150 mL foi transferida para um becker. Foi adicionado ao filtrado 150 mL de sulfato de amônio e 50 mL de terra de diatomácea. A suspensão foi filtrada em papel de filtro Whatmann nº1 e uma alíquota de 150 mL foi transferida para o funil de separação e adicionado 150 mL de água destilada e 20 mL de clorofórmio. A mistura foi agitada manualmente por 5 vezes e após a separação de fases, a camada inferior, a clorofórmica, foi extraída. A operação foi repetida novamente, e 20 mL de cada extrato foram recolhidos. O extrato foi submetido à secagem até resíduo em banho-maria a 60°C e armazenado sob temperatura de -10°C, até o momento da quantificação.

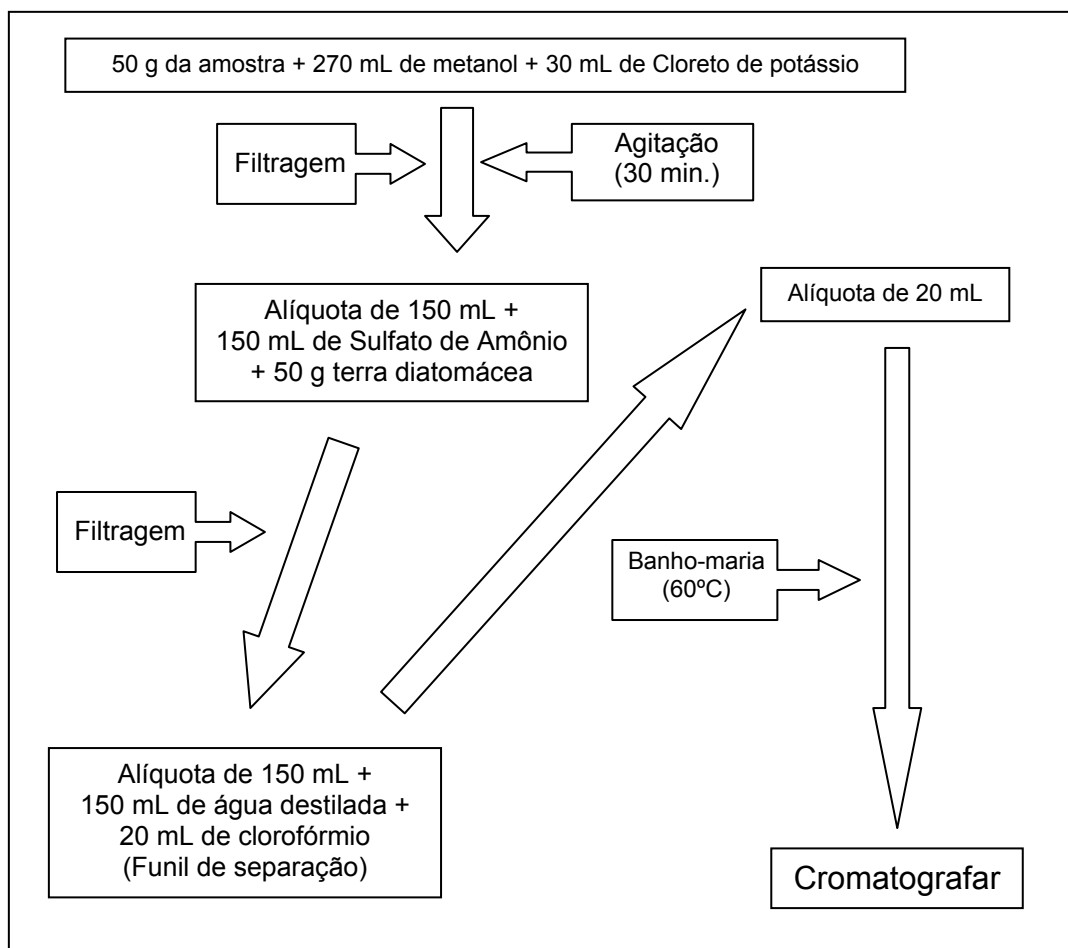


Figura 10 - Fluxograma do método de extração das aflatoxinas da ração (SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

5.9.2 Análise Cromatográfica

Foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters Associates[®], Inc., Miliford, M.A. – EUA) equipado com uma bomba Waters (modelo 510), injetor Rheodyne (Rheodyne[®], Cotati, Califórnia – EUA) com *loop* fixo de 20 μ L, detector de absorvância variável Merck-Hitachi (modelo L-4250), integrador registrador (modelo D2500). A detecção foi realizada a 360 nm em fase reversa utilizando como fase móvel uma mistura de metanol:água (1:1, v/v), sob fluxo de 0,8 ml/min.

A quantificação foi realizada baseando-se na área dos picos correspondentes a cada toxina, comparando-as com o padrão.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos relatos relacionados à intoxicação por fumonisina preconizam a proporção dos esfingolipídios (esfinganina/esfingosina) no soro dos animais, e a relação do consumo de diferentes concentrações da micotoxina com efeitos clínicos, pesos corporais e de órgãos, alterações em células sanguíneas e alterações bioquímicas sorológicas (LEDOUX et al., 1992; BROWN et al., 1992; WEIBKING et al., 1993;).

LEDOUX e colaboradores (1992) relataram que o consumo de fumonisina em dietas contendo níveis de 0, 100, 200, 300 ou 400ppm de FB₁, em frangos jovens, pode causar alterações clínicas como redução do ganho de peso diário com o aumento dos níveis de FB₁, além de lesões histopatológicas indicativas de atrofia do timo, hiperplasia biliar e necrose hepática. BROWN e colaboradores (1992) observaram ainda, que o consumo de 300 mg.kg⁻¹ de FB₁ na dieta pode acarretar diarreia, redução no ganho de peso, aumento no peso do fígado e alterações histológicas, como necrose hepática multifocal, hiperplasia biliar, necrose de músculos e raquitismo. WEIBKING e colaboradores (1993) constataram lesões hepáticas em animais recebendo 225 mg.kg⁻¹ de FB₁ e redução no ganho de peso de animais recebendo 450 mg.kg⁻¹ de FB₁, enquanto animais tratados com 75 mg.kg⁻¹ de FB₁ apresentaram apenas redução na síntese de esfingolipídios. ESPADA e colaboradores (1994) indicam que baixas doses de FB₁ pura (10 mg.kg⁻¹) e FB₁ de material de cultivo de *Fusarium verticillioides* (30 mg.kg⁻¹) são tóxicas para frangos jovens, causando alterações no ganho de peso, peso dos órgãos e alterações bioquímicas séricas.

Este trabalho teve como premícia básica avaliar a quantificação dos biomarcadores (esfinganina/esfingosina), e da sua proporção, no perfil sorológico de animais como método de diagnóstico para intoxicação natural de frangos de corte com fumonisinas. Desta forma, as análises sorológicas foram conduzidas, e os perfis sorológicos avaliados, antes do processamento da ração para determinação da concentração de micotoxinas ingeridas.

6.1 Análise dos esfingolipídios no soro

Nenhuma alteração clínica, como perda de peso ou redução do consumo alimentar, foi constatada nos animais testados até o momento do abate, quando foram coletadas as amostras de sangue.

A análise do soro foi conduzida através do método proposto por (CASTEGNERO et al., 1998). Dos animais testados apenas 49% exibiram quantidades detectáveis de esfingolipídios no soro e, dentre estes, apenas 44,9% exibiram perfis detectáveis de ambos os esfingolipídios (esfinganina/esfingosina), 53,06% somente exibiram perfil detectável de esfingosina e 2,04% somente exibiram perfil detectável de esfinganina, como demonstrado no gráfico (fig. 11).

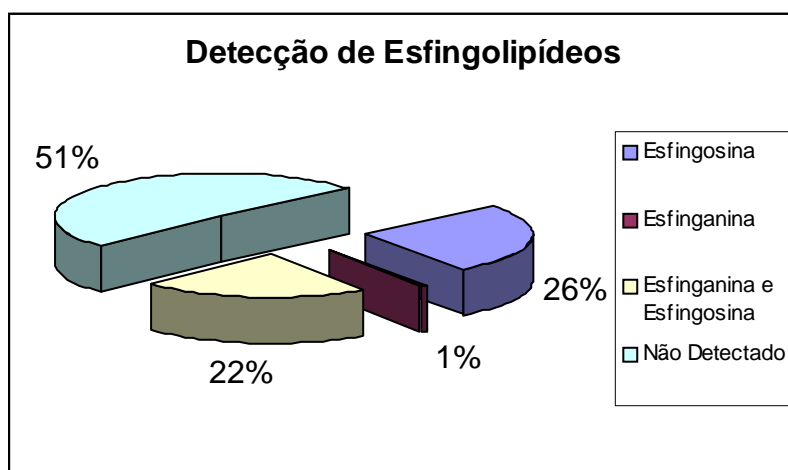


Figura 11 – Detecção de esfingolipídios nas amostras.

Em todas as amostras que apresentavam alteração dos níveis de esfingosina estes foram relativamente maiores do que os de esfinganina. Os valores obtidos indicam que os animais testados estavam sujeitos à intoxicação por micotoxinas, mas os perfis encontrados, quando comparados com perfis de

trabalhos experimentais de intoxicação programada, com elevações de esfinganina relativamente maiores que as de esfingosina (DIREITO, 2003), não poderiam ser considerados somente como perfis de exposição à fumonisina. Os perfis observados são compatíveis com os observados em casos experimentais de exposição por aflatoxinas (fig. 12). Dados que foram confirmados com as análises das micotoxinas na ração, descritas no item 6.1.

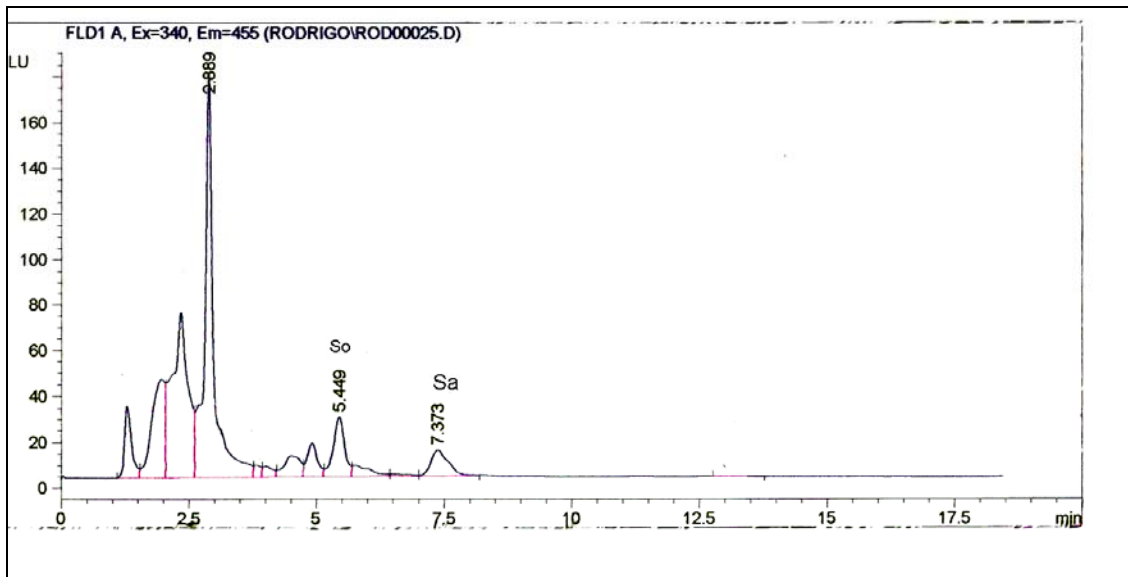


Figura 12 - Cromatograma do soro com perfil compatível com a intoxicação simultânea de FB₁ e aflatoxinas.

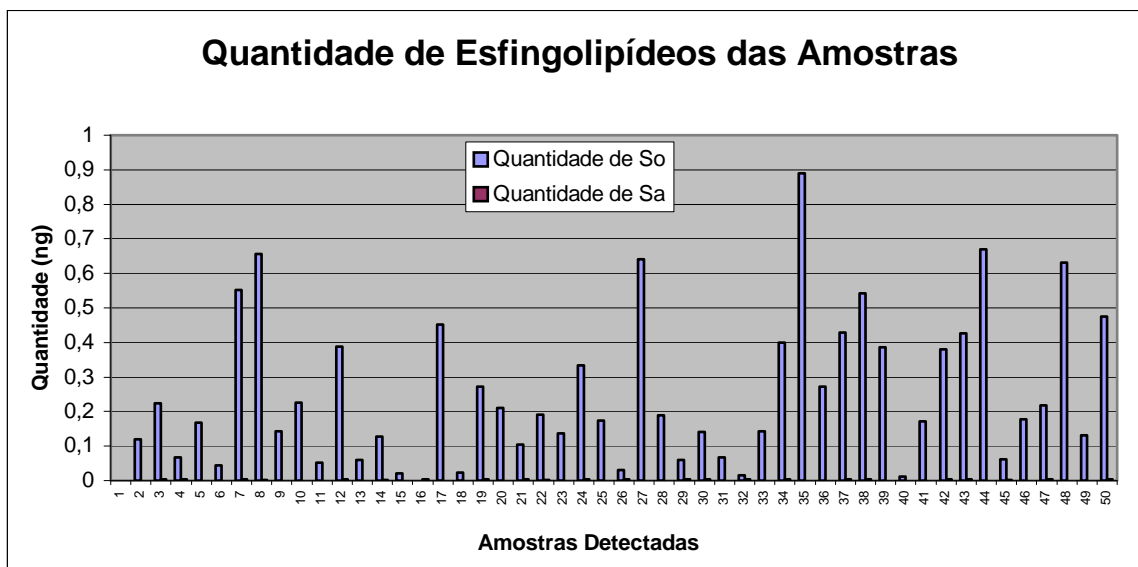


Figura 13 – Variações individuais nas amostras com elevação dos níveis de So e Sa.

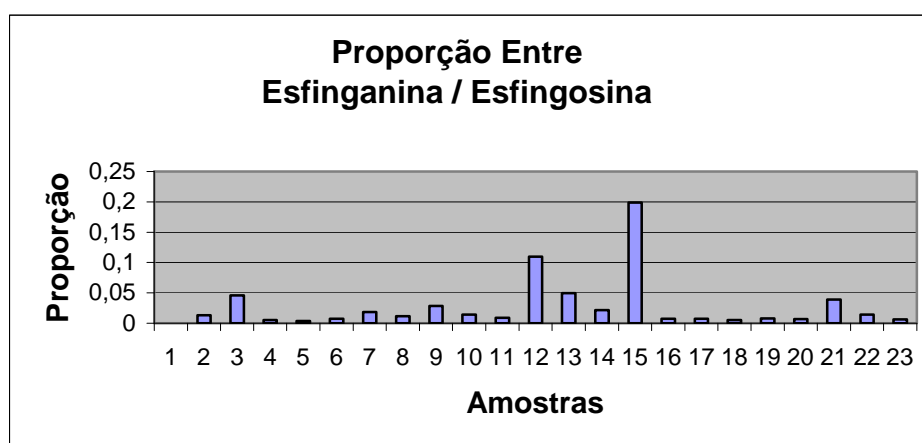


Figura 14 – Variação da proporção entre esfinganina e esfingosina nas amostras com elevação destes parâmetros.

A observação de diferenças consideráveis nos diversos perfis sorológicos de esfingolípídios analisados de animais, no mesmo plantel, provavelmente se deve à distribuição heterogênea da toxina na ração, desta forma os animais recebem quantidades diferentes mesmo tendo sido alimentados com a mesma ração. Tal heterogeneidade não ocorre nos

trabalhos experimentais com intoxicação programada, onde a quantidade de toxina fornecida é conhecida e controlada.

6.1 Análise de micotoxinas na Ração

A análise das rações foi efetuada através de métodos específicos, foram testadas quanto à presença de fumonisinas através do método proposto por SYDENHAM et al. (1996), e quanto à presença de aflatoxinas através do método proposto por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989). Os resultados encontrados fundamentam as alterações observadas tanto para So quanto para Sa e conseqüentemente para a proporção Sa/So.

A presença de FB₁ foi detectada nas amostras de ração na concentração de 374,92 µg.kg⁻¹ de ração, valores que, de acordo com a literatura consultada, não seriam capazes de causar alterações clínicas. Entretanto sabe-se que as alterações celulares mais precoces são detectadas pela proporção de Sa e So que neste estudo demonstraram variações muito baixas.

No que se refere à presença de aflatoxinas os resultados indicaram que as rações apresentavam níveis de toxina capazes de produzir intoxicação e alterações sanguíneas como o desequilíbrio na proporção de esfingolipídios. Diversos trabalhos ilustram os efeitos deletérios destas toxinas nos animais, apesar destes efeitos ou esta toxina não terem sido o foco principal deste trabalho.

Os níveis encontrados foram de 440,99 µg.kg⁻¹ de aflatoxina B₁, 169,92 µg.kg⁻¹ de aflatoxina B₂ e de 494,58 µg.kg⁻¹ de aflatoxina G₁. A quantidade total de aflatoxina foi de 1,10 mg.kg⁻¹ de ração (fig. 15).

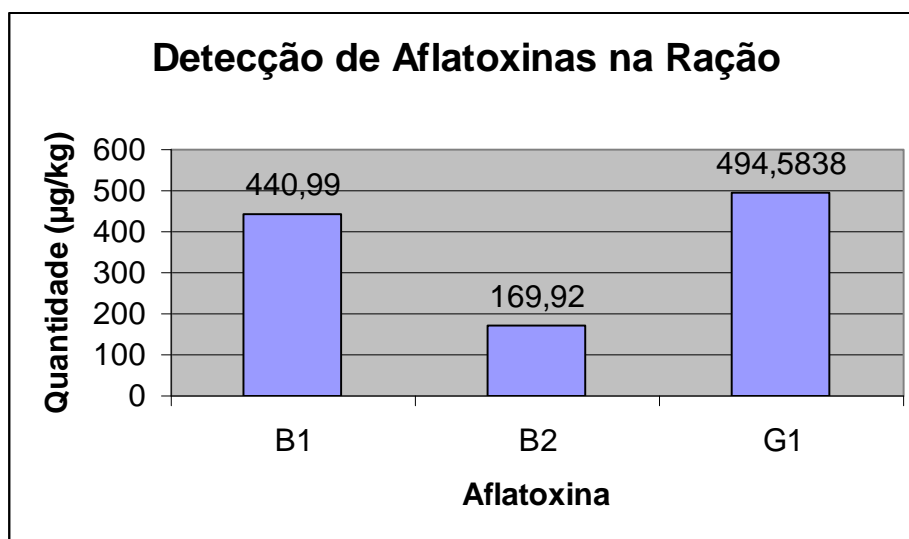


Figura 15 – Quantidade de aflatoxina detectada na ração.

Poucos são os trabalhos que enfatizam o efeito das fumonisinas associadas as aflatoxinas no metabolismo de esfingolipídios em animais, mas PRATHAPKUMAR e colaboradores (1997) relataram a ocorrência natural de surtos de micotoxicoses em aves de postura, onde os animais apresentaram sinais como diarreia escura e viscosa, diminuição da ingestão de alimentos, 20% de redução na produção de ovos e 10% de mortalidade. Após a substituição da ração contaminada, os plantéis apresentaram melhoria evidente. A análise da ração indicou contaminação de $8,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de FB_1 e de 100 µg.kg^{-1} de aflatoxina B_1 , evidenciando a potencialização dos efeitos destas toxinas.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível afirmar que:

- Foi possível determinar o perfil de Esfinganina e Esfingosina nas amostras analisadas;
- A proporção de Esfinganina e Esfingosina como biomarcador permite estabelecer parcialmente o grau de intoxicação do plantel avaliado;
- A sensibilidade do biomarcador (esfinganina / esfingosina) é afetada tanto pela concentração de fumonisina B₁ quanto pela presença das aflatoxinas;
- Há correlação entre as concentrações observadas de fumonisina B₁ e aflatoxinas e as variações dos níveis de esfinganina e esfingosina isoladamente;
- Pode-se estimar o grau de exposição de um grupo de animais pelo perfil de esfinganina e esfingosina detectado;
- A presença de aflatoxinas influencia os níveis séricos de esfinganina e esfingosina.

BIBLIOGRAFIA:

ABBAS, H.K., DUKE, S.O., TANAKA, T. Phytotoxicity of fumonisin and related compounds. **Journal of Toxicology – Toxin Reviews**, v.12, p.225-251, 1993.

AH SEO, J., WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1331-1334, 1999.

ALBERTS, J.F., GELDERBLOM, W.C., THIEL, P.G. *et al.* Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56(6), p.1729-1733, 1990.

ASQUITH, R.L. Mycotoxicoses in horses. In: **Smith, J.E., Anderson, R.A. (Eds.), Mycotoxins and Animal Foods. CRC Press, Boca Raton, FL**, p.679–688, 1991.

BACON, C.W., WILLIAMSON, J.W. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. **Mycopathologia**, v. 117, p.65-71, 1992.

BAILEY, G.S. Role of aflatoxin-DNA adducts in the cancer process. In: **Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.), The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance. Academic Press, San Diego, CA**, p.137–148, 1994.

BAILLY, J.D., BERNARD, G., JOUGLAR, J.Y. *et al.* Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ in ducks. **Toxicology**, v.163, p.11-22, 2001.

BELL, R.M., HANNUN, Y.A., MERRILL, A.H.JR. Advances in lipid research: sphingolipids and their metabolites, **Academic Press, Orlando, FL**, v.25-26, 1993.

BERMUDEZ, A.J., LEDOUX, D.R., ROTTINGHAUS, G.E. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducklings. **Avian Diseases**, 39, p. 879–886, 1995.

BEZUIDENHOUT, S.C., GELDERBLOM, W.C.A., GORSF-ALLMAN, C.P., *et al.* Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society. Chemical Communications**, p.743-745, 1988.

BONSI, P., AUGUSTI-TOCCO, G., PALMERY, M., *et al.*, Aflatoxin B1 is an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. **General Pharmacology**, v.32(5), p.615-619, 1999.

BRAGULAT, M.R., ABARCA, M.L., CASTELLA, G. *et al.* Fungi and mycotoxins in grain – implications for stored food products research. **Journal of Stored Products Research**, v.31, p.1-16, 1995a.

BRAGULAT, M.R., ABARCA, M.L., CASTELLA, G. *et al.* A mycological survey on mixed poultry feeds and mixed rabbit feeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.67, p.215-220, 1995b.

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.

BRYDEN, W.L., LOVE, R.J., BURGESS, L.W. Feeding grain contaminated with *Fusarium graminearum* and *Fusarium moniliforme* to pigs and chickens. **Australian Veterinary Journal**, v.64, p.225-226, 1987.

BUCCI, T.J., HANSEN, D.K., LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B1. **Natural Toxins**, v.4(1), p.51-52, 1996.

BUTLER, W.H. ACUTE TOXICITY OF AFLATOXIN B-1 IN RATS. **British Journal of Cancer**, v.18, p.756-762, 1964.

BUTLER, W.H., NEAL, G.E. Mode of action and human health aspects of aflatoxin carcinogenesis. **Pure and Applied Chemistry**, v.49, p.1747–1751, 1977.

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

CASTEEL, S.W., TURK, J.R., ROTTINGHAUS, G.E. Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.23(4), p.518-524, 1994.

CASTEGNARO, M., GARREN, L., GAUCHER, I. *et al.* Development of a new method for the analysis of sphinganine and sphingosine in urine and tissues. **Natural Toxins**, v.4(6), p.284-290, 1996.

CASTEGNARO, M., GARREN, L., GALENDO, D. *et al.* Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v.720(1-2), p.15-24, 1998.

CAWOOD, M.E., GELDERBLOM, W.C., ALBERTS, J.F. *et al.* Interaction of 14C-labelled fumonisin B mycotoxins with primary rat hepatocyte cultures. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32(7), p.627-632, 1994.

CHEN, J., MIROCHA, C.J., XIE, W. *Et al.* Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3928-3931, 1992.

CHOUDHARY, P.L., SHARMA, R.S., BORKHATARIA, V.N., *et al.*, Effect of feeding aflatoxin B1 on feed consumption through naturally contaminated feeds. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v.68, p.400–401, 1998.

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

CHULZE, S.N., RAMIREZ, M.L., FARNOCHI, M.C. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.2797-2801, 1996.

COLE, R.J., COX, R.H. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. **Academic Press, New York**, 1981.

COLVIN, B.M., HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, v.117, p.79-82, 1992.

COULOMBRE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. (Eds.) Mycotoxins and phytoalexins. **Boca Raton: CRC Press**, p. 103-143, 1991.

D'MELLO, J.P.F., MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.69, p.155-166, 1997.

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.

DeLEON, C., PANDEY, S. Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. **Crop Science**, v.29, p.12-17, 1989.

DESJARDINS, A.E., PLATTNER, R.D., PROCTOR, R.H. Linkage among genes responsible for fumonisin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* mating population A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62(7), p.2571-2576, 1996.

DIREITO, G.M. Efeitos da fumonisina B₁ e da aflatoxina B₁ no metabolismo dos esfingolípídeos em diferentes espécies animais. **Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo**, 2003.

DIXON, R.C., HAMILTON, P.B. Evaluation of some organic acids as mold inhibitors by measuring CO₂ production from feed and ingredients. **Poultry Science**, v. 60, p. 2183-2188, 1981.

DOERR, J.A., HUFF, W.E., WABECK, C.J. *et al.* Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 62, p. 1971-1977, 1983.

DRAGAN, Y.P., PITOT, H.C. Aflatoxin carcinogenesis in the context of the multistage nature of cancer. In: **The Toxicology of Aflatoxins (EATON, D.L., GROOPMAN, J.D., Eds.)**, Academic Press, London, p. 179-206, 1994.

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

DUTTON, M.F. Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. **Pharmacology & therapeutics**, v.70(2), p.137-161, 1996.

ERIKSEN, G.S., PETTERSON, H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.114, p.205-239, 2004.

ESPADA, Y., RUIZ DE GOPEGUI, R., CUADRADAS, C. *et al.* Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. **Avian Diseases**, v.38(3), p.454-460, 1994.

ESPADA, Y., RUIZ DE GOPEGUI, R., CUADRADAS, C. *et al.* Fumonisin mycotoxicosis in broilers: plasma proteins and coagulation modifications. **Avian Diseases**, v.41(1), p.73-79, 1997.

FICKEN, M.D., CUMMINGS, T.S., WAGES, D.P. Cerebral encephalomalacia in commercial turkeys. **Avian Diseases**, v.37, p.917-922, 1993.

FINCHAM, J.E., MARASAS, W.F., TALJAARD, J.J. *et al.* Atherogenic effects in a non-human primate of *Fusarium moniliforme* cultures added to a carbohydrate diet. **Atherosclerosis**, v.94(1), p.13-25, 1992.

FISHER, N.L., BURGESS, L.W., TOUSSOUN, T.A. *et al.* Carnation leaves as a substrate and for preserving *Fusarium* species. **Phytopathology**, v.72, p.151-153, 1982.

FISHER, N.L., MARASAS, W.F.O., TOUSSOUN, T.A. Taxonomic importance of microconidial chains in *Fusarium* section *Liseola* and effects of water potential on their formation. **Mycologia**, v.75, p.693-698, 1983.

FOSTER, P.L., EISENSTADT, E., MILLER, J.H. Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.80, p.2695-2698, 1983.

FUTERMAN, A.H. Inhibition of sphingolipid synthesis: effects on glycosphingolipid-GPI-anchored protein microdomains. **Trends in Cell Biology**, v.5(10), p.377-380, 1995.

GALTIER, P. Biotransformation and fate of mycotoxins. **Journal of toxicology. Toxin reviews**, v.18, p.295-312, 1999.

GELDERBLOM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O *et al.* Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p. 1806-1811, 1988.

GELDERBLOM, W.C., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F. *et al.* Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. **Carcinogenesis**, v.12(7), p.1247-1251, 1991.

GELDERBLOM, W.C., SNYMAN, S.D., VAN DER WESTHUIZEN, L. *et al.* Mitoinhibitory effect of fumonisin B1 on rat hepatocytes in primary culture. **Carcinogenesis**, v.16(3), p.625-631, 1995.

GHOSH, R.C., CHAUHAN, H.V.S., ROY, S. Immunosuppression in broiler under experimental aflatoxicosis. **The British Veterinary Journal**, v. 146, p. 457-462, 1990.

GIAMBRONE, J.J., DIENER, U.L., DAVIS, N.D. *et al.* Effects of purified aflatoxin on broiler chickens, **Poultry Science**, v. 64, p. 852-858, 1985a.

GIAMBRONE, J.J., DIENER, U.L., DAVIS, N.D. *et al.* Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. **Poultry Science**, v. 64, p. 1678, 1684, 1985b.

GOODEMOTE, K.A., MATTIE, M.E., BERGER, A. *et al.* Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the mitogenic signaling pathways of sphingosine 1-phosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270(17), p.10272-10277, 1995.

GQALENI, N., SMITH, J.E., LACEY, J., GETTINBY, G. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by na isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 1048-1053, 1997.

GREENE, H.J., OEHME, F.W. A possible case of equine aflatoxicosis. **Clinical Toxicology**, v.9, p.251–254, 1976.

HANADA, K., IZAWA, K., NISHIJIMA, M. *et al.* Sphingolipid deficiency induces hypersensitivity of CD14, a glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein, to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268(19), p.13820-13823, 1993.

HAREL, R., FUTERMAN, A.H. Inhibition of sphingolipid synthesis affects axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268(19), p.14476-14481, 1993.

HARRISON, L.R., COLVIN, B.M., GREENE, J.T. *et al.* Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.2(3), p.217-221, 1990.

HASCHEK, W.M., GUMPRECHT, L.A., SMITH, G. Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. **Environmental Health Perspectives**, v.109(2), p.251-257, 2001.

HENRY, M.H., WYATT, R.D., A review of fumonisin production by *Fusarium moniliforme* and fumonisin toxicoses in animals. **Journal of Applied Poultry Science**, v.2, 188-192, 1994.

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

HIROOKA, E.Y., YAMAGUCHI, M.M., AOYAMA, S. *et al.* The natural occurrence of fumonisin in Brazilian corn kernels, **Food Additives and Contaminants**, v.13, p.173-183, 1996.

HUANG, C., DICKMAN, M., HENDERSON, G. *et al.* Repression of protein kinase C and stimulation of cyclic AMP response elements by fumonisin, a fungal encoded toxin which is a carcinogen. **Cancer Research**, v.55(8), p.1655-1659, 1995.

HUSSEIN, H.S., BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans. **Toxicology**, v.167, p.101–134, 2001.

JAVED, T., RICHARD, J.L., BENNETT, G.A. *et al.* Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B₁ or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos. **Mycopathologia**, v.123(3), p.185-193, 1993a.

JAVED, T., BENNETT, G.A., RICHARD, J.L. *et al.* Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or with purified fumonisin B₁ and moniliformin. **Mycopathologia**, v.123(3), p.171-184, 1993b.

JENKINS, G.R., TOLLESON, W.H., NEWKIRK, D.K. *et al.* Identification of fumonisin B₁ as an inhibitor of argininosuccinate synthetase using fumonisin affinity chromatography and in vitro kinetic studies. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.14(6), p.320-328, 2000.

KAN, C.A., RUMP, R., KOSUTZKY, J. Low level exposure of broilers and laying hens to aflatoxin B₁ from naturally contaminated corn. **Archiv Gefluegelkd**, v.53, p. 204-206, 1989.

KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F., THIEL, P.G. *et al.* Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.57(4), p.269-275, 1990.

KETTERER, P.J., WILLIAMS, E.S., BLANEY, B.J., *et al.*, Canine aflatoxicosis. **Australian Veterinary Journal**, v.51, p.355–357, 1975.

KIDD, M.T., QURESHI, M.A., HAGLER, W.M.JR. *et al.* T-2 tetraol is cytotoxic to a chicken macrophage cell line. *Poultry Science*, v.76(2), p.311-313, 1997.

KLOTZ, L.V., NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A. A medium for enhancement of chlamydospore formation in *Fusarium* species. **Mycologia**, v.80, p.108-109, 1988.

KRABBE, E.L., PENZ, JR, A.M. LAZZARI, F.A. *et al.* Efeito da umidade e do ácido propiônico sobre as características bromatológicas e microbiológicas de grãos de milho. **In: Conferência 94 Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos**, p.27-28, 1994.

KUBENA, L.F., HARVEY, R.B., PHILLIPS, T.D. *et al.* Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated, sodium calcium aluminosilicate. **Poultry Science**, v. 69(5), p. 727-735, 1990.

KUBENA, L.F., HARVEY, R.B., BUCKLEY, S.A. *et al.* 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(11), 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 tamarii*. **Antonie Leeuwenhoek**, v.53, p. 147-158, 1987.

LEDOUX, D.R., BROWN, T.P., WEIBKING, T.S. *et al.* Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4(3), p.330-333, 1992.

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

LESSON, S., ATTEH, J.O. Utilization of fats and fatty acids by turkey poults. **Poultry Science**, v.74(12), p.2003-2010, 1995.

LESSON, S., DIAZ, G., SUMMERS, J.D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. **University Books, Guelph, Ontario**, 1995.

LESLIE, J.F., PEARSON, C.H.A.S., NELSON, P.E. *et al.* *Fusarium* spp. From corn, sorghum and Soybean fields in the central and eastern United States. **Phytopathology**, v.80, p.334-350, 1990.

LI, Y.C., LEDOUX, D.R., BERMUDEZ, A.J. *et al.* Effects of fumonisin B1 on selected immune responses in broiler chicks. **Poultry Science**, v.78(9), p.1275-1282, 1999.

LILLEHOJ, E.B. Aflatoxin: an ecologically elicited activation signal. In: **Smith, J.E., Anderson, R.A. (Eds.), Mycotoxins and Animal Foods. CRC Press, Boca Raton, FL**, p.119-139, 1991.

MARASAS, W.F., KELLERMAN, T.S., GELDERBLOM, W.C. *et al.* Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.55(4), p.197-203, 1988.

MAYS, R.W., SIEMERS, K.A., FRITZ, B.A. *et al.* Hierarchy of mechanisms involved in generating Na/K-ATPase polarity in MDCK epithelial cells. **The Journal of Cell Biology**, v.130(5), p.1105-1115, 1995.

MCLEAN, M., DUTTON, M.F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 65, p. 163-192, 1995.

MERRILL, A.H.JR., WANG, E., MULLINS, R.E. *et al.* Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.171(2), p.373-381, 1988.

MERRILL, A.H.JR., NIMKAR, S., MENALDINO, D. *et al.* Structural requirements for long-chain (sphingoid) base inhibition of protein kinase C in vitro and for the cellular effects of these compounds. **Biochemistry**, v.28(8), p.3138-3145, 1989.

MERRILL, A.H.JR., VAN ECHTEN, G., WANG, E. *et al.* Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268(36), p.27299-27306, 1993.

MERRILL, A.H.JR., SCHMELZ, E.M., DILLEHAY, D.L. *et al.* Sphingolipids – the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 142, p.208-225, 1997.

MERRILL, A.H.JR., SULLARDS, M.C., WANG, E. *et al.* Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environmental Health Perspectives**, v.109(2), p.283-289, 2001.

MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **Journal of Food Protection**, v.52, p.737-742, 1989.

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

MULLER, R.D., CARLSON, C.W., SEMENIUK, G., *et al.*, The response of chicks, ducklings, goslings, pheasants and poult to graded levels of aflatoxin. **Poultry Science**, v.49, p.1346-1350, 1970.

MULLER, H.M., SCHWADORF, K. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in a southwestern area of Germany. **Mycopathologia**, v.121, p.115-121, 1993.

MURPHY, P.A., RICE, L.G., ROSS, P.F. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.263-266, 1993.

NELDON-ORTIZ, D.L., QURESHI, M.A. The effects of direct and microsomal activated aflatoxin B₁ on chicken peritoneal macrophages in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.31, p.61–76, 1992.

NELSON, P.E., PLATTNER, R.D., SHACKELFORD, D.D. *et al.* Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58(3), p.984-989, 1992.

NELSON, P.E., DIGNANI, M.C., ANAÏSSE, E.J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7(4), p.479-504, 1994.

NEWBERNE, P.M., BUTLER, W.H. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. **Cancer Research**, v.29, p.236–236, 1969.

NORRED, W.P., VOSS, K.A., BACON, C.W. *et al.* Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. **Food and chemical toxicology**, v. 29, p.815-819, 1991b.

NORRED, W.P., PLATTNER, R.D., VESONDER, R.F. *et al.* Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.30(3), p.233-237, 1992.

NORRED, W.P. Fumonisin – mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.38, p.309-328, 1993.

ONO, E.Y., ONO, M.A., FUNO, F.Y. *et al.* Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants**, v.18(8), p.719-729, 2001.

ORSI, R.B., CORRÊA, B., POZZI, C.R. *et al.* Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v.36, p.75-87, 2000.

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

PARK, D.L., RUA, S.M., MIROCHA, C.J. *et al.* Mutagenic potential of fumonisin contaminated corn following ammonia decontamination procedure, **Mycopathologia**, v.117, p.105-108, 1992.

PASTER, N. A commercial scale study of the efficiency of propionic acid and calcium propionate as fungistats in poultry feeds. **Poultry Science**, v. 58, p. 572-576, 1979.

PATTERSON, D.S.P. Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species. **Food and Cosmetics Toxicology**, v.11, p.287–294, 1973.

PESTKA, J.J. BONDY, G.S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 68, p. 1009, 1016, 1990.

PHILLIPS, T.D., KUBENA, R.B., HARVEY, D.R. *et al.* Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity absorbent for aflatoxin. **Poultry Science**, v. 67, p. 234-247, 1988.

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

PIER, A.C. The influence of mycotoxins on the immune system. In: **SMITH, J.E., HENDERSON, R.S. (Eds.): Mycotoxins and Animal Foods. Boca Raton, FL, CRC Press**, p. 490-497, 1991.

POZZI, C.R., CORRÊA, B., GAMBALE, W. *et al.* Postharvest and stored corn in Brazil ; mycoflora interaction, abiotic factor and mycotoxins occurrence. **Food Additives and Contaminants**, v.12(3), p.313-319, 1995.

POZZI, C.R., ARCARO, J.R.P., ARCARO, I .JR. *et al.* Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, v.32(5), p.901-907, 2002.

PRATHAPKUMAR, S.H., RAO, V.S., PARAMKISHAN, R.J. *et al.* Disease outbreak in laying hens arising from the consumption of fumonisin-contaminated food. **British poultry science**, v.38(5), p.475-479, 1997.

PRELUSKY, D.B., TRENHOLM, H.L., SAVARD, M.E. Pharmacokinetic fate of ¹⁴C-labelled fumonisin B1 in swine. **Natural Toxins**, v.2(2), p.73-80, 1994.

PRELUSKY, D.B., SAVARD, M.E., TRENHOLM, H.L. Pilot study on the plasma pharmacokinetics of fumonisin B1 in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration. **Natural Toxins**, v.3(5), p.389-394, 1995.

PUSHKAREVA, M., CHAO, R., BIELAWSKA, A. *et al.* Stereoselectivity of induction of the retinoblastoma gene product (pRb) dephosphorylation by D-erythro-sphingosine supports a role for pRb in growth suppression by sphingosine. **Biochemistry**, v.34(6), p.1885-1892, 1995.

RAMASAMY, S., WANG, E., HENNIG, B. *et al.* Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.133(2), p.343-348, 1995.

RAMLJAK, D., CALVERT, R.J., WIESENFELD, P.W. *et al.* A potential mechanism for fumonisin B(1)-mediated hepatocarcinogenesis: cyclin D1 stabilization associated with activation of Akt and inhibition of GSK-3beta activity. **Carcinogenesis**, v.21(8), p.1537-15346, 2000.

RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., VAN WYK, P.S. Fungal association in corn kernels and effects on germination. **Phytopathology**, v.80, p.131-134, 1990a.

RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., VAN WYK, P.S. *et al.* Incidence of *Fusarium* and *Diplodia* and other fungi in infected grain of South African maize cultivars. **Phytophylactica**, v.22, p.97-102, 1990b.

RILEY, R.T., HINTON, D.M., CHAMBERLAIN, W.J. *et al.* Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. **The Journal of Nutrition**, v.124(4), p.594-603, 1994.

ROGERS, A.E. Nutritional modulation of aflatoxin carcinogenesis. In: **EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (Eds.). The toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance. New York, NY, Academic Press, p. 206-224, 1994.**

ROSMANINHO, J.F., OLIVEIRA, C.A.F., BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das micotóxicoses crônicas na produção avícola. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.68, p.107-114, 2001.

SANTURIO, J.M., MALLMANN, C.A., BALDISSERA, M.A., *et al.* Níveis de adsorção de aflatoxina B₁ *in vitro* de aluminossilicatos e bentonitas comercializados no Brasil. In: **I Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia, Rio de Janeiro**, p. 10-11, 1994.

SANTURIO, J.M., MALLMANN, C.A., ROSA, A.P. *et al.* Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. **British Poultry Science**, v. 40(1), p. 115-119, 1999.

SARGEANT, K., O'KELLY, J. CARNAGHAN, R.B.A. *et al.* The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. **Veterinary Record**, v. 73, p. 1219-1223, 1961.

SCHROEDER, J.J., CRANE, H.M., XIA, J. *et al.* Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. A molecular mechanism for carcinogenesis associated with *Fusarium moniliforme*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269(5), p.3475-3481, 1994.

SCOTT, P.M., LAWRENCE, G.A. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. **Journal of AOAC International**, v.77(2), p.541-545, 1994.

SCOTT, P.M., KANHERE, S.R., LAWRENCE, G.A. *et al.* Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. **Food Additives and Contaminants**, v.12, p.31-40, 1995.

SHEN, H.M., ONG, C.N., SHI, C.Y. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B₁-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. **Toxicology**, v.99, p.115–123, 1995.

SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W. *et al.*, Determination of the mycotoxin fu-monisin B₁ and identification of its partially hydrolysed metabolites in the faeces of non-human primates. **Food and Chemical Toxicology**, v.32, p.23–29, 1994.

SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W. *et al.* Toxicokinetics of the mycotoxin fumonisin B₂ in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.33(7), p.591-595, 1995.

SHEPHARD, G.S., VAN DER WESTHUIZEN, L., THIEL, P.G. *et al.* Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. **Toxicon**, v.34(5), p.527-534, 1996.

SHEPHARD, G.S., VAN DER WESTHUIZEN, L. Liquid chromatographic determination of the sphinganine/sphingosine ratio in serum **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v.710(1-2), p.219-222, 1998.

SILVA, J.B., POZZI, C.R., MALLOZZI, M.A. *et al.* Mycoflora and occurrence of aflatoxin B(1) and fumonisin B(1) during storage of Brazilian sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48(9), p.4352-4356, 2000.

SMITH, T.M., HAMILTON, P.B. Aflatoxicosis in the broiler chicken. **Poultry Science**, v.49, p.207-215, 1970.

SMITH, T.K., MOSS, M.O. Mycotoxins: formation, analysis and significance. **Wiley, Chichester**, 1985.

SMITH, J.E., ROSS, K. The toxigenic aspergilli. In: **SMITH, J.E., ANDERSON, R.A. (Eds.), Mycotoxins and Animal Foods. CRC Press, Boca Raton, FL**, p. 101-118, 1991.

SMITH, E.E., KUBENA, L.F., BRAITHWAITE, R.B. *et al.*, Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. **Poultry Science**, v.71, p.1136–1144, 1992.

SMITH, E.R., MERRILL, A.H.JR. Differential roles of de novo sphingolipid biosynthesis and turnover in the "burst" of free sphingosine and sphinganine, and their 1-phosphates and N-acyl-derivatives, that occurs upon changing the medium of cells in culture. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270(32), p.18749-18758, 1995.

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

SOLFRIZZO, M., AVANTAGGIATO, G., VISCONTI, A. Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v.692(1), p.87-93, 1997.

SOUTHERN, L.L., CLAWSON, A.J. Effects of aflatoxins on finishing swine. **Journal of Animal Science**, v.49, p.1006–1011, 1979.

STACK, M.F., EPPELEY, R.M. Liquid chromatographic determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn and con products. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v.75, p.834-837, 1992.

STEVENS, V.L., NIMKAR, S., JAMISON, W.C. *et al.* Characteristics of the growth inhibition and cytotoxicity of long-chain (sphingoid) bases for Chinese hamster ovary cells: evidence for an involvement of protein kinase C. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1051(1), p.37-45, 1990.

STEWART, R.G., WYATT, R.D., ASHMORE, M.D. The effect of various antifungal agents on aflatoxin production and growth characteristics of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in liquid medium. **Poultry Science**, v. 56(5), p. 1630-1635, 1977.

SWEENEY, M.J., DOBSON, A.D.W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.175, p.149-163, 1999.

SYDENHAM, E.W., GELDERBLUM, W.C.A., THIEL, P.G. *et al.* Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁ a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.2014-2018, 1991.

SYDENHAM, E.W., STOCKENSTROM, S., THIEL, P.G. *et al.* Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.43, p.1198-1201, 1995a.

SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., SHEPHARD, G.S. *et al.* Preparation and isolation of the partially hydrolyzed moiety of fumonisin B₁. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.43, p.2400-2405, 1995b.

SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v.79(3), p.688-96, 1996.

TERAO, K., UENO, Y. Morphological and functional damage to cells and tissues. In: **Uraguchi, K., Yamazaki, M. (Eds.), Toxicology, Biochemistry and Pathology of Mycotoxins. Wiley, New York**, p.189–210, 1978.

TORRES, A.M., REYNOSO, M.M., ROJO, F.G. *et al.* Fusarium species (section Liseola) and its mycotoxins in maize harvested in northern Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v.18(9), p.836-843, 2001.

TRUCKSSES, M.W., STOLOFF, L., YOUNG, K. *et al.* Aflatoxicol and aflatoxins B₁ e M₁ in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminates feed. **Poultry Science**, v. 62, p. 2176-2182, 1983.

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**, v.443(1-2), p.81-93, 1999.

VASANTHI, S., BHAT, R.V. Mycotoxins in foods--occurrence, health & economic significance & food control measures. **The Indian Journal of Medical Research**, v.108, p.212-224, 1998.

VIQUEZ, O.M., CASTELL-PEREZ, M.E., SHELBY, R.A. Occurrence of fumonisin B₁ in maize grown in Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.2789-2791, 1996.

VISCONTI, A., DOKO, M.B., BOTTALICO, C., *et al.*, Stability of fumonisins (FB1 and FB2) in solution. **Food Additives and Contaminants**, v.11(4), p.427-431, 1994.

VISCONTI, A. Fumonisins in maize genotypes grown in various geographic areas. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.392, p.193-204, 1996.

VOSS, K.A., NORRED, W.P., BACON, C.W. Subchronic toxicological investigations of *Fusarium moniliforme* contaminated corn, culture material and ammoniated culture material. **Mycopathologia**, v.117, p.97-104, 1992.

VUDATHALA, D.K., PRELUSKY, D.B., AYROUD, M. *et al.* Pharmacokinetic fate and pathological effects of 14C-fumonisin B1 in laying hens. **Natural toxins**, v.2(2), p.81-88, 1994.

WANG, E., NORRED, W.P., BACON, C.W. *et al.* Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266(22), p.14486-14490, 1991.

WANG, E., ROSS, F.P., WILSON, T.M. *et al.* Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **The Journal of Nutrition**, v.122, p.1706-1716, 1992.

WANG, D.S., LIANG, Y.X., CHAU, N.T. *et al.* Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B₁ in corn for feed in north Vietnam. **Natural Toxins**, v.3, p.445-449, 1995a.

WANG, D.S., LIANG, Y.X., IJIMA, K. *et al.* Co-contamination of mycotoxins in corn harvested in Haimen, a high risk area of primary liver cancer in China. **Mycotoxins**, v.41, p.67-70, 1995b.

WANG, J.S., GROOPMAN, J.D. DNA damage by mycotoxins. **Mutation Research**, v.424, p.167-181, 1999.

WEIBKING, T.S., LEDOUX, D.R., BROWN, T.P. *et al.* Fumonisin toxicity in turkey poult. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5(1), p.75-83, 1993.

WEIBKING, T.S., LEDOUX, D.R., BERMUDEZ, A.J. *et al.* Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Science**, v.72(3), p.456-466, 1993b.

WEIBKING, T., LEDOUX, D.R., BERMUDEZ, A.J. *et al.* Effect of turkey poult of feeding *Fusarium moniliforme* M-1325 culture material grown under different environmental conditions. **Avian Diseases**, v.39, p.32-38, 1995.

WILSON, T.M., ROSS, P.F., RICE, L.G. *et al.* Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2(3), p.213-216, 1990.

WILSON, T.M., ROSS, P.E., OWENS, D.L. *et al.* Experimental reproduction of ELEM. A study to determine the minimum toxic dose in ponies. **Mycopathologia**, v.117, p.115-120, 1992.

WOGAN, G.N., NEWBERNE, P.M. Dose-response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in the rat. **Cancer Research**, v.27, p.2370–2376, 1967.

WOGAN, G.N. Structure-activity relationship in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. **Cancer Res.**, v. 31, p. 1936-1942, 1971.

WU, W.I., MCDONOUGH, V.M., NICKELS, J.T.JR. *et al.* Regulation of lipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by fumonisin B1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270(22), p.13171-13178, 1995.

WYATT, R.D. Poultry. In: SMITH, J.E., HENDERSON, R.S., ed. *Mycotoxins and Animal Foods*, **CRC Press, Boca Raton**, p. 553-605, 1991.

YAMASHITA, A., YOSHIZAWA, T., AIURA, Y. *et al.* *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins from Southcast Asia. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.59, p.1804-1807, 1995.

YEUNG, J.M., WANG, H.Y., PRELUSKY, D.B. Fumonisin B1 induces protein kinase C translocation via direct interaction with diacylglycerol binding site. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.141(1), p.178-184, 1996.

YOO, H.S., NORRED, W.P., SHOWKER, J. *et al.* Fumonisin inhibition of de novo sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.114(1), p.9-15, 1992.

YOO, H.S., NORRED, W.P., SHOWKER, J. *et al.* Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factors in fumonisin-induced cytotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.138(2), p.211-218, 1996.

YOSHIZAWA, T., JIN, Y.Z. Natural occurrence of acetylated derivatives of deoxynivalenol and nivalenol in wheat and barley in Japan. **Food Additives and Contaminants**, v.12(5), p.689-694, 1995.

ZHANG, H., DESAI, N.N., MURPHEY, J.M. *et al.* Increases in phosphatidic acid levels accompany sphingosine-stimulated proliferation of quiescent Swiss 3T3 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265(34), p.21309-21316, 1990.