



UNIVERSIDADE
E D U A R D O
MONDLANE

FACULDADE DE VETERINÁRIA

Departamento de Para Clínicas

Dissertação de Mestrado

**Ocorrência de aflatoxina B₁ em fígados e moelas de frangos de
corte produzidos em Maputo**

Alberto Romão Sineque

Maputo, Abril de 2017



UNIVERSIDADE
E D U A R D O
MONDLANE

FACULDADE DE VETERINÁRIA

Departamento de Para Clínicas

Dissertação de Mestrado

**Ocorrência de aflatoxina B₁ em fígados e moelas de frangos de
corte produzidos em Maputo**

Alberto Romão Sineque

Supervisora: Prof^ª Doutora Custódia Lina Macuamule

Co-Supervisora: Prof^ª Doutora Filomena Rosa Dos Anjos

Maputo, Abril de 2017

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DO PROJECTO

Declaro que esta dissertação nunca foi apresentada para a obtenção de qualquer grau ou num outro âmbito e que esta constitui, o resultado do meu labor individual. Esta dissertação é apresentada em cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Segurança de Alimentos pela Faculdade de Veterinária, Universidade Eduardo Mondlane.

Maputo, Abril de 2017



(Alberto Romão Sineque)

[Telefone: 826459243](tel:826459243)/[E-mail: sinequear@gmail.com](mailto:sinequear@gmail.com)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Romão Sineque (*in memorian*) e Augusta João Remédio (*in memorian*), pelo exemplo deixado em vida.

Aos meus tios Paulo Mutondo e Isabel João Remédio (*in memorian*), pelo apoio incondicional na minha formação acadêmica.

À minha esposa Charmila Mussagy, ao meu filho Yúhud Yves Lamar e aos meus irmãos João, Valdo, Amélia, Micaela e Aninha, pelo carinho, compreensão e apoio contínuo.

AGRADECIMENTOS

As minhas supervisoras (orientadoras), PhD Custódia Lina Macuamule e PhD Filomena Rosa Dos Anjos, pela paciência e dedicação, sobretudo por acreditarem nas minhas capacidades de concretização deste trabalho.

A todos meus colegas de turma, em especial Charmila Mussagy e José Sumbana, por auxiliarem de forma directa ou indirecta na realização deste trabalho, através de orientações, discussões científicas e momentos de descontração.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, que me apoiaram e não mediram esforços em compreender as minhas ausências, para estudar e concluir as actividades necessárias.

Ao Laboratório Nacional de Higiene de Águas de Alimentos (LNHAA) e aos seus colaboradores, em especial ao Eng. Amilcar, por viabilizar o desenvolvimento deste trabalho, pela concessão do estágio, discussões técnicas e momentos de descontração.

Ao Laboratório Química da Direção de Ciências Animais do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique e aos seus colaboradores, em especial a dra. Carla Menezes e Senhora Orpa, por viabilizar o desenvolvimento deste trabalho, pela concessão do estágio, discussões científicas e momentos de descontração.

À Faculdade de Veterinária, Universidade Eduardo Mondlane, e ao programa de Pós-Graduação em Segurança de Alimentos, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo docente.

À Direcção Científica, Universidade Eduardo Mondlane, pelo apoio financeiro através do fundo de investigação e pela concessão de recursos sob a forma de bolsa.

E a Deus, pela minha existência, e por mais esta oportunidade em minha vida.

MUITO OBRIGADO..!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Problema e Justificação do Estudo.....	2
2. OBJECTIVOS	5
2.1. Geral.....	5
2.2. Específicos.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Avicultura em Moçambique	6
3.2. Aflatoxinas.....	7
3.2.1. Estrutura química e propriedades físico-químicas	9
3.3. Aspectos Toxicocinéticos e Toxicodinâmicos das Aflatoxinas.....	12
3.3.1. Absorção e excreção.....	12
3.3.2. Biotransformação e mecanismos de toxicidade	14
3.3.3. Toxicidade e efeitos biológicos.....	17
3.4. Aflatoxinas em Alimentos	23
3.4.1. Aflatoxinas em alimentos de origem vegetal.....	23
3.4.2. Aflatoxinas em alimentos de origem animal	26
3.4.3. Legislação sobre aflatoxinas	29
3.4.4. Métodos de análise das aflatoxinas	32
3.4.5. Medidas preventivas da contaminação de alimentos por aflatoxinas..	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Colheita de amostras	41
4.2. Análise de Aflatoxina B ₁	42

4.2.1. Método de cromatografia em camada delgada.....	42
4.2.2. Método de ELISA	48
4.3. Análise de Dados	51
5. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	53
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas mais importantes..	10
Figura 2. Mecanismo de Biotransformação e excreção da aflatoxina B ₁	17
Figura 3. Esquema das principais etapas na análise de aflatoxinas..	34
Figura 4. Variação do peso das amostras de fígado entre as categorias de coloração nos dois sistemas de produção e abate de frangos.....	57
Figura 5. Relação entre o nível de contaminação por aflatoxina B ₁ e o peso das amostras positivas de fígado.....	65
Figura 6. Ilustração das categorias de coloração dos fígados de frango de corte amostrados nos dois sistemas de produção e abate de frangos.....	83
Figura 7. Esquema representativo de uma placa de cromatografia em camada delgada, de desenvolvimento unidimensional.....	83
Figura 8. Esquema representativo da distribuição de soluções-padrão, amostras contaminadas artificialmente e amostras de testagem numa placa de ELISA.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades químicas e físicas das principais aflatoxinas.	11
Tabela 2. Valores da dose média para a formação de tumores (DT ₅₀) após ingestão prolongada de aflatoxina B ₁ na dieta para diferentes espécies animais.	19
Tabela 3. Relação entre a ingestão de AFB ₁ (excluídas outras causas), e a incidência do carcinoma hepatocelular, em países da África e Ásia.	22
Tabela 4. Resíduos de aflatoxinas em alguns produtos vegetais e seus subprodutos.	24
Tabela 5. Resíduos de AFB ₁ e seus metabólitos após ingestão de dieta contaminada com 8 µg/g de AFB ₁	27
Tabela 6. Resíduos de aflatoxinas nos diferentes tecidos de galinhas após exposição à toxina, combinada ou não com ocratoxina A.	28
Tabela 7. Resíduos de aflatoxinas em alguns produtos de origem animal.	29
Tabela 8. Limites máximos de aflatoxinas permitidos em alimentos destinados ao consumo humano e animal nos diferentes países.....	31
Tabela 9. Número de fígados por categoria de coloração por grupo de amostras e sistema de produção de abate.	55
Tabela 10. Variação do peso de fígados entre os grupos amostrais por categorias de coloração.....	56
Tabela 11. Incidência e nível de contaminação de aflatoxina B ₁ nas amostras de fígado e moela dos dois sistemas de produção e abate de frangos.	60
Tabela 12. Níveis de contaminação das amostras de fígado por aflatoxina B ₁ entre as categorias de coloração.....	64

Tabela 13. Níveis de contaminação artificial das amostras de fígados e moelas por aflatoxina B ₁	81
Tabela 14. Distribuição das amostras positivas de fígado e moela tendo em conta os limites máximos estabelecidos nas legislações internacionais para alimentos de consumo humano.	81
Tabela 15. Médias das recuperações e coeficientes de variação obtidos dos fígados e moelas artificialmente contaminadas com aflatoxina B ₁	82
Tabela 16. Incidência de aflatoxina B ₁ nas amostras positivas de fígado e moela repetidas.....	82

RESUMO

Com o objectivo determinar a ocorrência de aflatoxina B₁ em fígados e moelas de frangos de corte produzidos em Maputo, foram colectadas 508 amostras (294 fígados e 214 moelas) nos sistemas de produção e abate de frango, industrial e local (comunitário). Os fígados foram primeiramente avaliados quanto à coloração e peso. A aflatoxina B₁ nas amostras foi determinada através dos métodos, de cromatografia em camada delgada modificada, e de ELISA (MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation).

Foi observado que 43,9% dos fígados amostrados apresentavam a coloração moderada, 38,8% a coloração normal e, 17,3% a coloração pálida, apresentando, respectivamente, um peso médio de 42,66±4,45 g, 40,06±5,07 g e 44,78±5,31 g, sendo estatisticamente diferente ($P<0,0001$).

A aflatoxina B₁ foi detectada em 39% das amostras de fígado e 13,8% de moela, sendo os níveis de contaminação, inferiores aos limites estabelecidos na legislação. O nível de contaminação por aflatoxina B₁ variou de 0,57 µg/kg a 3,80 µg/kg, com uma média de 1,54 µg/kg nos fígados e, 1,06 µg/kg nas moelas, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de amostra e os locais de amostragem ($P>0,05$). Foi observada uma relação linear negativa entre a ocorrência da aflatoxina B₁ nos fígados e os pesos.

As baixas concentrações de aflatoxina B₁ nas amostras de fígado e moela, pressupõe, que estes produtos não apresentam risco à saúde do consumidor. Mesmo assim, torna-se necessária a elaboração de programas de pesquisa de aflatoxinas tanto nas miudezas de frangos, como nas rações e, a optimização de métodos para a sua análise.

Palavras-chave: Aves de corte, miudezas, *Aspergillus*, aflatoxinas, legislação, Maputo.

ABSTRACT

This study aimed to determine the occurrence of aflatoxin B₁ in chicken livers and gizzards produced in Maputo. Five hundred and eight samples (294 livers and 214 gizzards) were collected from industrial and local (communitarian) boiler production and culling systems. Liver samples were initially evaluated in terms of color and weight. The aflatoxina B₁ was analyzed by modified thin layer chromatography method and ELISA (MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation).

It was found that 43.9% of livers presented moderate color, 38.8% normal and 17.3% pale, with weight mean, 42.66±4.45 g, 40.06±5.07 g and 44.78±5.31 g, respectively. Statistically differences between the livers colour and weight was found ($P<0.0001$).

The aflatoxin B₁ was detected, in 39% and 13.8% of the liver and gizzard samples, respectively. The contamination level was below the most maximum recommended levels. The aflatoxin B₁ mean contamination levels was 1.54 µg/kg for liver samples and 1.06 µg/kg for gizzard. The maximum and minimum level was respectively, 0.57 µg/kg and 3.80 µg/kg. Statistical differences were not found between sample type and the sampling locals ($P>0.05$). A negative linear relation between the livers weight and aflatoxin B₁ contamination level was founded.

The low levels of aflatoxin B₁ founded suggest that these products do not present any risk to the consumer. Although this, aflatoxin research programs are a needed in both chicken giblets and poultry feeds, and also, optimization methods for their analysis.

Key words: Poultry, giblets, *Aspergillus*, aflatoxins, legislation, Maputo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxiribonucléico
AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
AFL	Aflatoxicol
AFM₁	Aflatoxina M ₁
AFM₂	Aflatoxina M ₂
AFP₁	Aflatoxina P ₁
AFQ₁	Aflatoxina Q ₁
AFT	Aflatoxina Total
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais
ARN	Ácido Ribonucléico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CYP	Citocromo P-450
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAO	Organização Mundial para Alimentação
GA1	Grupo de amostras um (1)
GA2	Grupo de amostras um (2)
HBV	Vírus da Hepatite B
HIV	Vírus de Imunodeficiência Humana
IARC	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LNHAA	Laboratório Nacional de Higiene de Águas de Alimentos

MISAU	Ministério da Saúde
N ou n	Número de amostra
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTA	Ocratoxina A
p.c	Peso Corporal
PAI	Sistema de Produção e Abate Industrial
PAL	Sistema de Produção e Abate Local ou Comunitário
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

A avicultura de corte representa uma actividade de enorme importância ao nível mundial, incluindo Moçambique, visto que constitui uma das principais fontes de proteína animal, à disposição das populações (Nicolau *et al.*, 2011; Amaral e Mlay, 2012; FAO, 2013; Farrell, 2013ab). No entanto, a dieta das aves, composta basicamente por ingredientes de origem vegetal, especialmente, o milho e a soja, é susceptível de contaminação por micotoxinas, em particular as aflatoxinas, representando um sério risco à saúde animal e humana (Hussain *et al.*, 2010; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Ravindran, 2013ab; Ribeiro *et al.*, 2015).

As aflatoxinas são um grupo de metabólitos secundários tóxicos, produzidos predominantemente por fungos do género *Aspergillus*, principalmete, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (Dors *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Darsanaki *et al.*, 2013), em condições de temperatura e humidade específicas (Wu e Khlangwiset, 2010; Dors *et al.*, 2011; Tajkarimi *et al.*, 2008a). Dentre as diferentes aflatoxinas já identificadas, a aflatoxina B₁ (AFB₁), a aflatoxina B₂ (AFB₂), a aflatoxina G₁ (AFG₁) e a aflatoxina G₂ (AFG₂) são consideradas as aflatoxinas mais importantes (Dors *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Darsanaki *et al.*, 2013).

A AFB₁ constitui a principal aflatoxina produzida pelos fungos toxígenos e, a de maior preocupação, por ser altamente tóxica e carcinogênica (Wu e Khlangwiset, 2010; Rashid *et al.*, 2012; Darsanaki *et al.*, 2013), para além de mutagênica, teratogênica e imunossupressora (Hussain *et al.*, 2010; Dors *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). Devido a estas propriedades, a AFB₁ é considerada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como agente carcinogénico do Classe 1 (Oliveira e Germano, 1997; IARC, 2012).

A AFB₁ quando ingerida pelos animais, incluindo aves, pode ser metabolizada dando origem a aflatoxina M₁ (AFM₁), que possui propriedades, tóxicas semelhantes a original (Zaghini *et al.*, 2005; Dors *et al.*, 2011; El-Desouky *et al.*, 2014). Resíduos de AFB₁, assim como de AFM₁, podem estar presentes nos tecidos e ovos de aves,

quando estas são submetidas a dietas contaminada por 250-3310 µg/kg ou ppb de AFB₁ (Hussain *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2013; Herzallah *et al.*, 2014).

As aves, em especial os frangos de corte, são extremamente sensíveis à AFB₁ e apresentam uma elevada capacidade de retenção da mesma, resultante da sua eficiente biotransformação hepática em metabólitos altamente reactivos (Salle *et al.*, 2001; Salle *et al.*, 2002; Diaz e Murcia, 2011; El-Desouky *et al.*, 2014). Embora a retenção de AFB₁ nos órgãos animais seja influenciada por factores, como caso de níveis dietéticos de AFB₁, tempo de administração, idade e espécie, têm sido demonstrado por vários autores que esta toxina encontra-se em maior quantidade no fígado quando comparada com outros órgãos (Salle *et al.*, 2001; Salle *et al.*, 2002; Diaz e Murcia, 2011; Herzallah *et al.*, 2014).

Sendo a AFB₁ considerada um grande risco para a Saúde Pública, a incidência e o nível de contaminação desta toxina nos países desenvolvidos é continuamente monitorada em rações e em produtos de origem animal através de diferentes métodos cromatográficos e imunoenzimáticos (Salle *et al.*, 2001; Salle *et al.*, 2002; Vilar *et al.*, 2002; Alkhalaf *et al.*, 2010; Takino *et al.*, 2011; Rashid *et al.*, 2012; Pourelmi *et al.*, 2013; El-Desouky *et al.*, 2014). Nos países em desenvolvimento como é o caso de Moçambique, apesar do mesmo estar entre os países com elevadas incidências de contaminação de produtos agrícolas por aflatoxinas (Mondlane *et al.*, 2005; Augusto *et al.*, 2014), o seu controlo não é feito de forma sistemática e continuada.

Assim com presente trabalho pretendeu-se determinar a ocorrência de AFB₁ em fígados e moelas de frangos de corte, e verificar se estes produtos constituem risco para a saúde do consumidor.

1.1. Problema e Justificação do Estudo

A exposição do homem e de animais à aflatoxinas, em especial AFB₁, por ingestão de alimentos contaminados, pode causar diversos problemas, tanto de saúde como económicos (FAO, 2004; Freire *et al.*, 2007; IARC, 2012).

Em humanos, para além de aflatoxicose, uma intoxicação caracterizada pela má absorção e inibição enzimática a nível hepático, a AFB₁ pode levar ao

desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (cancro do fígado), devido a ligação do metabólito intermediário aflatoxina-8,9-epóxido, ao ADN (Geng-Sun, 1994; Wild e Gong, 2010; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). Para além disso, a AFB₁, assim como as outras aflatoxinas, têm sido associadas a vários problemas actuais de Saúde Pública nos países em desenvolvimento, como o caso da incidência de outros cancros (da mama, da próstata e do trato gastrointestinal) (Wild e Gong, 2010), da incidência da malnutrição proteico-energética em crianças (Oliveira e Germano, 1997; Cardwell, 2001), para além da progressão da infecção pelo vírus de imunodeficiência humana (HIV) (Cardwell, 2001; Paul *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011; Zacarias e Rubio, 2013).

Na avicultura, esta toxina pode causar aflatoxicose em frangos de corte, resultando frequentemente em enormes perdas económicas, associadas principalmente à diminuição significativa do peso corporal dos frangos (Santurio, 2000; Dos Anjos *et al.*, 2016) e à presença de lesões e alterações de coloração de suas vísceras comerciais, ou seja, miudezas (Salle *et al.*, 2001; Salle *et al.*, 2002; Herzallah *et al.*, 2014).

Em Moçambique, informação datada 1993 estimava uma exposição diária entre 20,3 e 183,7 ng/kg, com uma incidência entre 5,9 e 14 por cem mil habitantes por ano (Oliveira e Germano, 1997; IARC, 2012). No entanto, mesmo com estes pressupostos, nada se sabe sobre a ocorrência de aflatoxinas e seus metabólitos em produtos de origem animal, e especial avícola, produzidos e comercializados a nível nacional.

Recentemente no país, estudos feitos (Mondlane *et al.*, 2005; Warth *et al.*, 2012; Augusto *et al.*, 2014), demonstram, a presença de aflatoxinas em níveis acima dos recomendados pela legislação internacional. Warth *et al.* (2012) observou que 46% de amostras de milho tinham uma concentração média de 114 µg/kg de AFB₁. Num outro estudo, Augusto *et al.* (2014), verificaram que apenas, 10% e 20% de amostras de milho e amendoim, respectivamente, eram seguras para o consumo humano. Em 2005, Mondlane e colaboradores reportaram que 65% (n=45) das amostras de ração eram positivas para AFB₁, com uma concentração média de 31,1 µg/kg.

Esta elevada incidência de aflatoxinas e em níveis acima dos recomendados em rações para aves e seus ingredientes, no caso do milho, representa um potencial perigo para a saúde da população, visto que a avicultura constitui uma fonte acessível de proteína animal. Adicionalmente, o comércio dos produtos avícolas tem aumentado de forma significativa em Moçambique, principalmente em Maputo, onde os índices de produção e consumo são elevados (Nicolau *et al.*, 2011; Amaral e Mlay, 2012).

Tendo em conta estes pressupostos e a importância das aflatoxinas para a Saúde Pública, para além da falta de informação e estudos a nível nacional sobre a temática em produtos de origem animal, o presente estudo pretendeu de forma exploratória, responder as seguintes questões: (i) Qual é a situação de ocorrência de AFB₁ em os fígados e moelas de frango de corte produzidos em Maputo? e (ii) Será que os níveis de AFB₁ em os fígados e moelas de frango de corte produzidos em Maputo estão dentro dos limites máximos estabelecidos pela legislação internacional para alimentos destinados ao consumo humano?

Assim, espera-se que este estudo sirva de base científica para alertar sobre o risco de exposição as aflatoxinas, decorrentes do consumo de produtos de origem animal, em especial as vísceras. Deste modo contribuir-se-á para a elaboração ou melhoria das estratégias de controlo sanitário nas criações pecuárias, visando a segurança dos alimentos destinados ao consumo animal e humano.

2. OBJECTIVOS

2.1. Geral

- Determinar a ocorrência de aflatoxina B₁ em fígados e moelas de frangos de corte produzidos e abatidos em Maputo.

2.2. Específicos

- Detectar e quantificar a aflatoxina B₁ em fígados e moelas de frango de corte dos locais formais e informais em Maputo utilizando o método de cromatografia em camada delgada;
- Detectar e quantificar a aflatoxina B₁ em fígados e moelas de frango de corte dos locais formais e informais em Maputo utilizando o método de ELISA;
- Comparar os níveis de aflatoxina B₁ detectada nos fígados e moelas pelos dois métodos entre os locais formais e informais;
- Verificar se os níveis de aflatoxina B₁ encontrados nos fígados e moelas estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente para alimentos destinados ao consumo humano.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Avicultura em Moçambique

A actividade avícola de corte possui uma importância significativa na produção mundial de proteína animal (Nicolau *et al.*, 2011; Amaral e Mlay, 2012; Farrell, 2013), visto que a carne de frango, contribui com mais de 30% do total de proteína consumida no mundo (Farrell, 2013).

Em Moçambique, a actividade avícola, têm sido considerada como tendo um papel complementar à actividade agrícola, na sobrevivência das populações (Nicolau *et al.*, 2011; Amaral e Mlay, 2012; FAO, 2013). Contudo, nas últimas décadas, têm-se verificado, transformações no sector técnico-produtivo, tornando-a uma actividade vital na contribuição à nutrição, por representar para além de uma das alternativas mais rápidas e de menor custo de produção, uma das principais fontes de proteína animal, para o consumo, disponível para as populações (Nicolau *et al.*, 2011; Amaral e Mlay, 2012; FAO, 2013). Para além disso, esta constitui também um dos sectores da pecuária que mais contribui para a geração de emprego (Nicolau *et al.*, 2011; Amaral e Mlay, 2012; FAO, 2013).

O sistema de produção avícola caracteriza-se maioritariamente, por um arranjo comercial do tipo pequeno produtor-empresa de abate (Nicolau *et al.*, 2011), embora verifique-se, um aumento na distribuição dos frangos, para abate nas granjas e nos locais de abate comunitários, assim como para o mercado livre (Nicolau *et al.*, 2011; FAO, 2013).

No entanto, embora tenha havido transformações significativas no sector técnico-produtivo nesta actividade pecuária, principalmente, a nível dos pequenos e médios produtores, observam-se ainda, constrangimentos ligados especialmente a qualidade da matéria-prima base, utilizada na fabricação de rações, onde o milho, um dos produtos agrícolas mais susceptível a contaminação por micotoxinas, tem um papel importante (Amaral e Mlay, 2012; FAO, 2013; Ravindran, 2013ab; Dos Anjos *et al.*, 2016). Estudos realizados (Amaral e Mlay, 2012; Warth *et al.*, 2012; Augusto *et al.*, 2014) reportam que, os grãos de milho têm estado frequentemente contaminados

com *Aspergillus* spp. Estes fungos são capazes de produzir aflatoxinas, quando as condições, de produção, colheita, transporte e armazenamento, forem inadequadas (Warth *et al.*, 2012; FAO, 2013; Augusto *et al.*, 2014; Dos Anjos *et al.*, 2016).

3.2. Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por certos grupos de fungos, que geralmente colonizam os alimentos nos campos agrícolas ou durante o seu armazenamento (Freire *et al.*, 2007; Dawson *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2015). Embora estes metabólitos não possuam qualquer importância para a reprodução e sobrevivência dos fungos, são de enorme importância em Saúde Pública por serem altamente tóxicos, podendo causar doenças e até morte, quando presentes nos alimentos e ingeridas pelo Homem e os animais (FAO, 2004; Freire *et al.*, 2007; IARC, 2012).

A descoberta, assim como os primeiros estudos sobre as aflatoxinas iniciaram-se em 1960 quando ocorreu, na Inglaterra, um surto de uma doença denominada naquela altura de “Doença X dos perus”, que causou a morte de milhares de perus e patos, e centenas de outras aves domésticas (Borges, 2005; Kwiatkowski e Alves, 2007; Yunus *et al.*, 2011). A causa deste surto havia sido atribuída a uma substância tóxica presente no amendoim proveniente do Brasil, uma das matérias-primas da ração das aves. Após análises microbiológicas e químicas deste amendoim, foi detectada a presença de *Aspergillus flavus*, constatando-se posteriormente que esta espécie fúngica era produtora de um composto tóxico denominado “aflatoxina” (Borges, 2005; Kwiatkowski e Alves, 2007; Yunus *et al.*, 2011), nome resultante da combinação de outras três palavras: “a”, do género *Aspergillus*; “fla”, da espécie *flavus*; e “toxina”, que significa veneno (Yunus *et al.*, 2011; Feddern *et al.*, 2013).

Actualmente, sabe-se que as aflatoxinas são produzidas restritamente por espécies do género *Aspergillus*, e principalmente, por espécies da secção não Flavi, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013; Darsanaki *et al.*, 2013; Augusto *et al.*, 2014), sendo as duas primeiras espécies consideradas como mais importantes sob o ponto de vista económico (Borges, 2005;

Wu *et al.*, 2011; Feddern *et al.*, 2013; Wu, 2015; Pinotti *et al.*, 2016). Por outro lado, outras espécies não pertencentes a esta secção, como *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenus*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*, *Emericella venezuelensis* e *E. astellata*, podem produzir as aflatoxinas, porém, em menor frequência (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Augusto *et al.*, 2014).

Cerca de 18 tipos de aflatoxinas estão identificados e caracterizadas, sendo todas, originadas dos grupos “B e G”, referentes, respectivamente, as características a azul (“Blue”) e verde (“Green”), apresentadas quando submetidas a luz ultravioleta de ondas longas (Yunus *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013; Feddern *et al.*, 2013). Entre estas, as principais são a aflatoxina B₁ (AFB₁) aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂), conhecidas como contaminantes naturais de produtos agrícolas (Dors *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013; Feddern *et al.*, 2013), sendo a AFB₁ e AFG₁ as que ocorrem com mais frequência e em maior quantidade (Borges, 2005; Yunus *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013; Feddern *et al.*, 2013). A AFB₁ e AFB₂ são produzidas por cerca de 25% a 50% das estirpes de *A. flavus* e *A. pseudotamarii* (Dors *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.* 2011; Feddern *et al.*, 2013), enquanto, a maioria das estirpes de *A. parasiticus* e *A. nomius* produzem a AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (Lizárraga-Paulín *et al.* 2011; Feddern *et al.*, 2013).

Outras aflatoxinas relevantes incluem, são as aflatoxinas M₁ (AFM₁) e M₂ (AFM₂), que são respectivamente, metabólitos da AFB₁ e AFB₂, que podem ser encontradas no leite, urina e tecidos musculares de animais e humanos, expostos a uma dieta contaminada (Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013; Darsanaki *et al.*, 2013).

As aflatoxinas apresentam uma incidência relativamente alta nas regiões tropicais e subtropicais, por consequência da existência de condições ideais para o crescimento de *Aspergillus*, em especial os da secção Flavi (Borges, 2005; Kwiatkowski e Alves, 2007; Dors *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011; Augusto *et al.*, 2014; Wu, 2015; Pinotti *et al.*, 2016). O *Aspergillus* desenvolve-se preferencialmente numa faixa de temperatura entre 24°C a 35°C, tolerando temperaturas entre 12°C e

40°C, com humidade relativa entre 80-85% (FAO, 2004; Borges, 2005; Kwiatkowski e Alves, 2007; Tajkarimi *et al.* 2008a; Wu e Khlangwiset, 2010).

Para além dos factores arrolados, em Moçambique, tal como em outros países da região tropical, a dificuldade verificada para a colheita dos cereais e grãos no estágio correcto de humidade e maturação, e com integridade física intacta, constitui um dos pontos críticos para a produção de aflatoxinas pelos fungos (FAO, 2004; Wu *et al.*, 2011; Oliveira, 2010; Augusto *et al.*, 2014; Pinotti *et al.*, 2016). Por outro lado, o transporte destes produtos com altos teores de humidade por longas distâncias e períodos prolongados, propiciam a formação de um microclima, que, aumenta ainda mais as condições para o desenvolvimento dos fungos (FAO, 2004; Oliveira, 2010; Wu e Khlangwiset, 2010; Wu *et al.*, 2011; Pinotti *et al.*, 2016). Assim, para que seja possível a intervenção visando a diminuição na produção de micotoxinas e sua ocorrência nos alimentos, torna-se fundamental, a compreensão dos factores que influenciam a produção de micotoxinas.

3.2.1. Estrutura química e propriedades físico-químicas

Biossinteticamente, as aflatoxinas são consideradas difuranocumarinas, compostos heterocíclicos altamente oxigenados, com estruturas químicas intimamente relacionadas entre si (Borges, 2005; Yunus *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013), conforme representado na Figura 1.

As aflatoxinas são agrupadas em duas importantes séries estruturais químicas: a série difurocumarociclopentanona, e a série difurocumarolactona (Bbosa *et al.*, 2013). A primeira série, representada pelas aflatoxinas tipo “B” (AFB₁ e AFB₂) e “M” (AFM₁ e AFM₂), apresenta na sua estrutura, como o próprio nome indica, um anel ciclopentano, enquanto, a segunda série, representada pelas aflatoxinas tipo “G” (AFG₁ e AFG₂), possui um anel lactona insaturada (6-pentanona) (Borges, 2005; Bbosa *et al.*, 2013). Por outro lado, na sequência biossintética das aflatoxinas, a AFB₂ e a AFG₂ são respectivamente, dihidroderivados de AFB₁ e AFG₁ (Borges, 2005; Feddern *et al.*, 2013), e a AFM₁ e a AFM₂ são respectivamente, metabólitos monohidroxilados de

AFB₁ e AFB₂ (Dors *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Feddern *et al.*, 2013; Darsanaki *et al.*, 2013).

A presença de um anel de lactona na estrutura das aflatoxinas confere a característica essencial para a sua fluorescência, constituindo então, a base de muitas das técnicas de detenção e quantificação dessas micotoxinas (Borges, 2005; Yunus *et al.*, 2011). Esta fluorescência varia entre as aflatoxinas, na intensidade de emissão. Por exemplo, no grupo de aflatoxinas tipo B, a AFB₂ possui uma fluorescência oito vezes maior que da AFB₁, enquanto, a AFM₁ e AFM₂, apresentam uma fluorescência três vezes mais que das AFB₁ e AFB₂ (Borges, 2005; Yunus *et al.*, 2011).

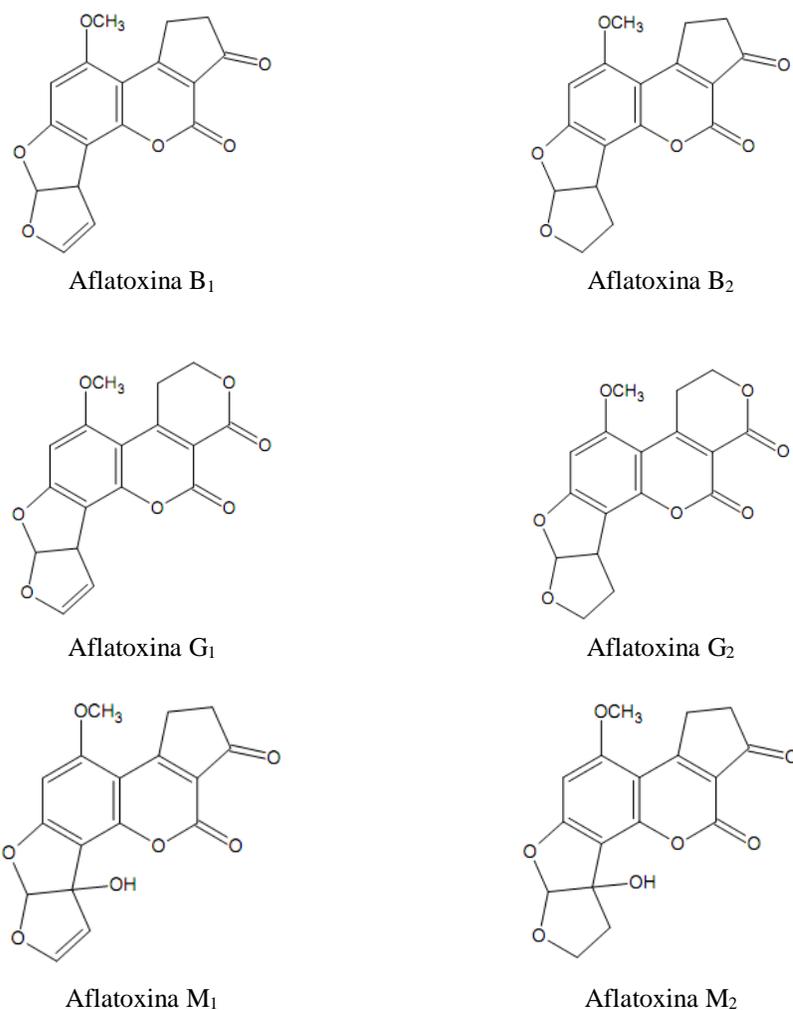


Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas mais importantes. Yunus *et al.* (2011).

As aflatoxinas apresentam baixo peso molecular e hidrossolubilidade reduzida, sendo, bastante solúveis em solventes de polaridade intermédia como clorofórmio, metanol, acetona e dimetilsulfóxido, podendo facilmente sofrer recristalização (Feddern *et al.*, 2013). Por outro lado, estas apresentam pontos de fusão elevados, sendo que no seu estado puro, são extremamente termoestáveis a, resistindo bastante às condições normais de cozimento e de pasteurização de alimentos, quando presentes nestes, ao ponto de ocorrer pequena ou nenhuma destruição (Feddern *et al.*, 2013; Trombete *et al.*, 2013). Tabela 1 apresenta as propriedades químicas e físicas das aflatoxinas mais importantes.

Tabela 1. Propriedades químicas e físicas das principais aflatoxinas.

Série	Aflatoxina	Fórmula molecular	Peso molecular	Ponto de fusão (°C)	Absorção UV máx [ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)], metanol	
					265 nm	360-362 nm
Série DcP	AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	12 400	21 800
	AFB ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	12 100	24 000
	AFM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	14 150	21 250 ^b
	AFM ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12 100 ^a	22 900 ^b
Série DL	AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	328	244-246	9 600	17 700
	AFG ₂	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	330	237-240	8 200	17 100

DcP - Difurocumarociclopentanona; DL - Difurocumarolactona; *a* - Absorção no comprimento de onda de 264 nm; *b* - Absorção no comprimento de onda de 357 nm. Borges (2005) e Bbosa *et al.* (2013).

No entanto, quando se encontram em solventes polares, aflatoxinas são relativamente sensíveis à luz, particularmente radiação ultravioleta, decompondo-se facilmente quando expostas ao ar (Borges, 2005). Andrellos e colaboradores, citados por Borges (2005) estudaram a fotodecomposição de aflatoxinas em soluções metanólicas sob acção de luz ultravioleta, tendo verificado, que por cada hora, 8 a 10% da aflatoxina em metanol decompunha-se, quando comparadas a soluções de clorofórmio e benzeno, que tendem a ser estáveis durante anos, quando conservadas no escuro e sob refrigeração. Por outro lado, segundo os mesmos autores, esta

decomposição pode interferir na sua identificação e quantificação por comparação visual das fluorescências, sendo mais rápida em sílica gel que em soluções.

3.3. Aspectos Toxicocinéticos e Toxicodinâmicos das Aflatoxinas

3.3.1. Absorção e excreção

Devido ao seu baixo peso molecular e sua lipossolubilidade, a AFB₁ assim como as outras as aflatoxinas, são rapidamente absorvidas no trato gastrointestinal e distribuídas aos diferentes órgãos no organismo, como os músculos, rins e tecido adiposo (Salle *et al.*, 2001; Salle *et al.*, 2002; Borges, 2005; Oliveira, 2010; Yunus *et al.*, 2011; Tessari e Cardoso, 2012). Estudos feitos, demonstraram em ratos que praticamente toda aflatoxina, neste caso a AFB₁, administrada oralmente é absorvida (Coulombe e Sharma, 1985; Yunus *et al.*, 2011; Tessari e Cardoso, 2012), seguida de uma intensa biotransformação, ou seja, metabolização, principalmente no fígado, resultando em metabólitos (Acosta *et al.*, 1989; Borges, 2005; Yunus *et al.*, 2011; Tessari e Cardoso, 2012).

No entanto, excreção da AFB₁ assim como as outras as aflatoxinas do organismo tende a ser mais lenta, em comparação com o caso de outras micotoxinas (Yunus *et al.*, 2011; Tessari e Cardoso, 2012; Bbosa *et al.*, 2013). De acordo com Salle *et al.* (2002) e Borges (2005), cerca de 90% de AFB₁ ingerida é geralmente eliminada do organismo no período de 24 horas, podendo os outros 10% permanecer nos tecidos durante vários dias. As principais vias de excreção das aflatoxinas e seus metabólitos incluem, as vias, urinária e fecal (Feddern *et al.*, 2013), embora também considere-se a secreção láctea como uma das vias, pela excreção da AFM₁ (Acosta *et al.*, 1989; Borges, 2005; Tajkarimi *et al.* 2008a).

Vários estudos têm sido feitos (Mabee e Chipley, 1973; Sawhney *et al.*, 1973; Wolzak *et al.*, 1986; Hussain *et al.*, 2010) para avaliar a capacidade de retenção de AFB₁ e seus metabólitos nos tecidos de animais, constatando-se que a retenção de resíduos da toxina tende a aumentar, a medida que a concentração dietética da toxina aumenta, porém, diminuindo a medida que a exposição é prolonga ou com o aumento da idade, no caso de aves.

Mabee e Chipley (1973) investigando o metabolismo de AFB₁ em galinhas poedeiras durante uma exposição contínua da toxina por 14 dias consecutivos, constataram após 5 horas da administração da última dose de AFB₁ marcada com radiocarbono (¹⁴C), que a radioactividade total nas galinhas foi aproximadamente igual à dose diária da toxina. Por outro lado, os autores verificaram que a maior parte da AFB₁ administrada durante os primeiros 13 dias foi excretada antes da administração da dose final no 14º dia, sugerindo então, que a excreção da AFB₁ é mais rápida quando a exposição for contínua.

Sawhney *et al.* (1973), utilizando também AFB₁ marcada com radiocarbono (¹⁴C) em galinhas poedeiras, observaram uma taxa de recuperação de apenas 28% da dose de AFB₁ administrada durante as primeiras 24 horas e, 71% após 7 dias. Estes também constataram, maior acumulação de radioactividade no fígado e órgãos reprodutivos, sugerindo então que estes órgãos, constituíam os principais locais de retenção de AFB₁ e/ou de seus metabólitos.

Wolzak *et al.* (1986), num estudo sobre a retenção e eliminação de aflatoxinas em tecidos de frangos, verificaram que a concentração dos resíduos de aflatoxinas foi elevada no rim, na moela e no fígado, após uma exposição dos frangos a uma mistura de AFB₁ e AFB₂ durante 4 semanas. Constataram também que 7 dias após a remoção da ração contaminada, os resíduos de aflatoxina não poderiam ser detectados nos tecidos analisados.

Estudos recentes em aves também indicam que a excreção de AFB₁ tende a aumentar com exposições prolongadas à toxina. Hussain *et al.* (2010) alimentaram pintos de frangos de corte com rações contendo 0, 1,6, 3,2, e 6,4µg de AFB₁/kg durante 7, 14 e 28 dias de idade, tendo verificado que após 2 a 3 dias de exposição, a AFB₁ poderia ser detectada no fígado dos frangos expostos a 1,6µg de AFB₁/kg, assim como aos níveis dietéticos mais elevados. Também constataram que 10 dias após a remoção da ração contaminada, a concentração dos resíduos de AFB₁ no fígado, assim como nos músculos dos frangos, incluindo dos expostos a níveis mais elevados da toxina, diminuiu para níveis bem inferiores. Os autores concluíram que resíduo de AFB₁ em tecidos aumenta, com o aumento da concentração dietética da toxina, porém,

diminui com o aumento da idade (ou depois de uma exposição mais longa) dos frangos de corte, sugerindo então que a eliminação de AFB₁ dos tecidos tende a ser rápida em aves mais velhas do que em aves mais jovens.

Resultados similares têm sido descritos em outros animais. Acosta *et al.* (1989), administraram a cabras 100µg/kg de AFB₁ por endovenosa, e verificaram uma taxa de excreção AFM₁ no leite, após conversão de AFB₁, de 2,09 a 3,67%, percentagens, segundo os autores, semelhantes as descritas para bovinos. Também constataram que o nível máximo de eliminação ocorreu 16 horas após a administração de AFB₁, e passadas 96 horas, a AFM₁ não foi detectada no leite.

3.3.2. Biotransformação e mecanismos de toxicidade

As aflatoxinas, especialmente, da AFB₁, a de maior significância toxicológica, apresentam vias de biotransformação, que variam entre as espécies animais (Borges, 2005; Oliveira, 2010; Diaz e Murcia, 2011). A biotransformação da AFB₁, assim como de outras aflatoxinas, ocorre em sua maior parte, no fígado, pela acção de oxidases de função mista (Acosta *et al.*, 1989; Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011), que são enzimas microsossomais do citocromo P-450 (CYP), localizadas no retículo endoplasmático liso e no citoplasma celular (Oliveira, 2010; Yunus *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013).

De acordo com Yunus *et al.* (2011) e Bbosa *et al.* (2013), dos diferentes tipos de CYP já identificados em animais, pelo menos três (CYP1A2, CYP3A4 e CYP2A6) constituem os principais responsáveis pela activação da molécula de AFB₁. A presença ou ausência de um ou mais desses citocromos, assim como o seu grau de actividade, podem determinar a susceptibilidade da espécie animal à AFB₁ (Yunus *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013).

Para além do fígado, um dos órgãos que possuem participação activa na desintoxicação de aflatoxinas, são os rins, estando juntos, entre os órgãos onde são detectadas maiores concentrações dos resíduos de aflatoxina (Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Yunus *et al.*, 2011).

A biotransformação da AFB₁ caracteriza-se por ser um processo complexo, no qual envolvem de quatro mecanismos, representados basicamente, por reacções de epoxidação, hidratação, hidroxilação e O-dimetilação (desmetilação) (Borges, 2005; Oliveira, 2010; Diaz e Murcia, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013), conforme representado na Figura 2. Nestas reacções, originam-se numa primeira fase, compostos com tendência a tornar-se mais hidrófilos, e na segunda fase, estes compostos produzidos inicialmente são conjugados a substâncias endógenas, como os sulfatos, grupos metil e acil, e posteriormente, excretados (Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013).

A biotransformação da AFB₁ é activada através da reacção de epoxidação da dupla ligação de carbonos 8 e 9, formando o AFB₁-8,9-epóxido, que é um composto intermediário altamente reactivo, capaz de interagir com macromoléculas nucleofílicas, tais como, ácido desoxirribonucléico (ADN) ácido ribonucléico (ARN) e proteínas (Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013; Feddern *et al.*, 2013). Estas ligações originam a formação de adutos, que representam a primeira lesão bioquímica causada pela AFB₁, assim como outras aflatoxinas (Dhanasekaran *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013). No entanto, a ligação AFB₁-8,9-epóxido com o ADN, origina os mecanismos básicos de iniciação de processos mutagênicos e carcinogênicos (Wild e Gong, 2010; Wu e Khlangwiset, 2010; Diaz e Murcia, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013; Feddern *et al.*, 2013).

A AFB₁ e a AFB₁-8,9-epóxido podem sofrer hidrólise, resultando respectivamente, na formação de aflatoxina B_{2a} (AFB_{2a}) e aflatoxina B₁-8,9-dihidro-8,9-dihidroxi (AFB₁-dihidrodiol), que reagem com grupos amino primários das proteínas, originando os adutos denominados bases de “Schiff” (Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013). As bases de “Schiff”, em conjunto com o ARN e proteínas, podem promover alterações químicas que levam a disfuncionalidade desses componentes celulares, relacionados à toxicidade aguda da AFB₁ tais como, a inibição da síntese proteica e redução da actividade enzimática

(Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013; Feddern *et al.*, 2013), interferindo no metabolismo de carboidratos e lípidos (Wu e Khlangwiset, 2010; Diaz e Murcia, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011). Por outro lado, uma outra via importante de detoxificação da AFB₁-8,9-epóxido consiste na sua conjugação com a glutatona reduzida (Borges, 2005; Dhanasekaran *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013).

A AFB₁ também pode ser reduzida por acção catalítica de um sistema de redutase citoplasmático dependente de NADPH, resultando na formação do aflatoxicol (AFL) (Dhanasekaran *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013), composto de menor toxicidade que a AFB₁, contudo, podendo actuar como reservatório da AFB₁, devido a característica de reversibilidade desta reacção (Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011). Ainda, através da reacção de hidroxilação, a AFB₁ origina as aflatoxinas M₁ e Q₁ (AFQ₁), enquanto, na desmetilação produz-se a aflatoxina P₁ (AFP₁), que podem ser conjugados a substâncias endógenas e excretados, principalmente através da urina e bile nas fezes (Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Bbosa *et al.*, 2013). Segundo Tajkarimi *et al.* (2008a), Diaz e Murcia (2011) e Lizárraga-Paulín *et al.* (2011), embora a formação desses derivados constitua parte do processo de detoxificação da AFB₁, alguns destes, como a AFM₁, também apresenta uma toxicidade semelhante à da AFB₁, pelo que, foi incluída pela IARC (1993) na classe 2B, como sendo possivelmente carcinogénico para humanos.

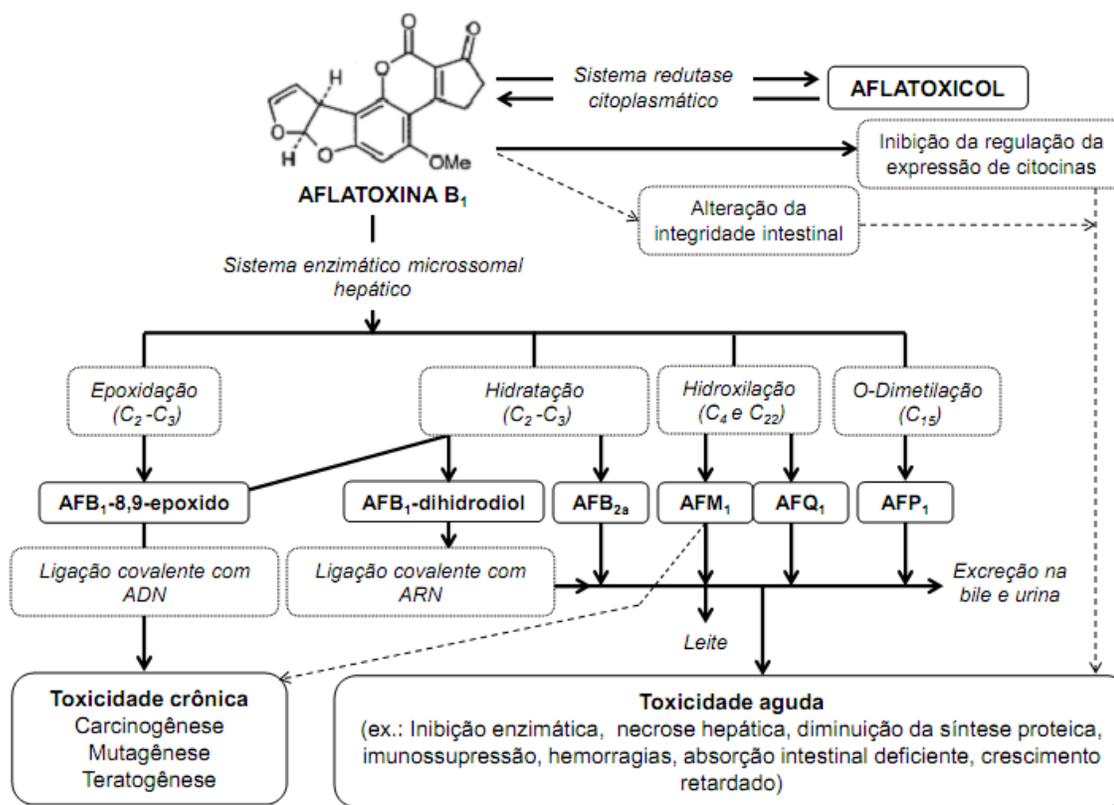


Figura 2. Mecanismo de Biotransformação e excreção da aflatoxina B₁. A ceta tracejada indica uma possível relação. Adaptado de: Diaz e Murcia (2011), Dhanasekaran *et al.* (2011) e Wu *et al.* (2011).

3.3.3. Toxicidade e efeitos biológicos

Desde a descoberta das aflatoxinas, seus efeitos negativos sobre a saúde animal, incluindo humana tem sido o foco activo, como objecto de pesquisa científica, sendo sujeita a revisões contínuas. A exposição por ingestão de aflatoxinas pelos animais e humanos leva ao desenvolvimento de aflatoxicoses, que podem ser, agudas ou crónicas, representando respectivamente, resultado das toxidades, aguda e crónica (Borges, 2005; Oliveira, 2010; Diaz e Murcia, 2011; Wu *et al.*, 2011; Tessari e Cardoso, 2012).

A toxicidade das aflatoxinas, assim como os seus efeitos biológicos nos animais, varia de acordo com a espécie animal, idade, sexo, estado nutricional, tempo de exposição à toxina, e principalmente, com a dose ingerida (Oliveira e Germano,

1997; Salle *et al.*, 2002; Borges, 2005; Oliveira, 2010; Diaz e Murcia, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011). Dentre os efeitos tóxicos decorrentes desta exposição, destacam-se as lesões hepáticas, imunossupressão, carcinogenicidade, mutagenicidade e teratogênicidade (Oliveira e Germano, 1997; Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011).

Segundo Borges (2005), Oliveira (2010) e Diaz e Murcia (2011), as diferenças de susceptibilidade às aflatoxinas entre as diferentes espécies animais, estão relacionadas às variações nos padrões toxicocinéticos, especialmente nos processos de distribuição, biotransformação e excreção dessas tóxicas no organismo destas espécies.

3.3.3.1. Toxicidade

A comparação quantitativa da toxicidade, ou seja, a capacidade carcinogênica das aflatoxinas em animais, principalmente a AFB₁, considerada como a mais tóxica (Dors *et al.*, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Tessari e Cardoso, 2012; Darsanaki *et al.*, 2013), é realizada, através dos valores da dose média para a indução da formação de tumores (DL₅₀). Estes valores de DL₅₀ são determinados pelo método proposto por Gold *et al.*, citado por Oliveira e Germano (1997), expressando-se em micrograma por quilograma de peso corporal, por dia (µg/kg p.c./dia).

A Tabela 2 apresenta os valores da DT₅₀ após ingestão prolongada de aflatoxina B₁ na dieta para diferentes espécies animais. Entre os animais, os suínos são consideradas as espécies mais sensíveis às micotoxinas no geral (Borges, 2005; Oliveira, 2010), enquanto, as aves são descritas como sendo espécies extremamente sensíveis a AFB₁, com o valor de DT₅₀ entre 6-30 µg/kg (Oliveira e Germano, 1997; Borges, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Tessari e Cardoso, 2012). Nos roedores, os ratos machos mostram-se sensíveis aos efeitos da AFB₁ em níveis a partir de 5 µg/kg na dieta, enquanto, fêmeas de ratos e certas linhagens de camundongos são relativamente resistentes aos efeitos agudos e crônicos desta toxina, não apresentando, respectivamente, nenhuma resposta em doses de até 12-17 µg/kg (Borges, 2005) e 70

µg/kg (Coulombe e Sharma, 1985; Oliveira e Germano, 1997), pois, devido a sua rápida excreção. Entre os mamíferos, os macacos por exemplo, são relativamente sensíveis aos efeitos agudos da AFB₁ e mais resistentes aos efeitos crônicos (Oliveira e Germano, 1997; Borges, 2005).

Tabela 2. Valores da dose média para a formação de tumores (DT₅₀) após ingestão prolongada de aflatoxina B₁ na dieta para diferentes espécies animais.

Espécie animal	DT50 (µg/kg p.c./dia)
Rato (fêmea)	17,9
Rato (macho)	5,5-5,8
Coelho	0,3
Pato	0,36
Peru	0,34-0,56
Porco	0,6
Ovelha	2,0
Galinha (Pinto)	6,5-16,5
Macaco <i>Rhesus</i>	156
Camundongo	> 70

Adaptado de: Oliveira e Germano (1997) e Borges (2005).

A comparação da toxicidade em função do sexo, têm evidenciado que na maioria das espécies animais, a sensibilidade é acentuadamente maior nos machos que nas fêmeas (Gurtoo e Motycka, 1976; Coulombe e Sharma, 1985; Oliveira e Germano 1997). Gurtoo e Motycka (1976) avaliaram a capacidade de biotransformação da AFB₁, entre ratos machos, machos castrados (tratados com testosterona) e fêmeas, não tratados e tratadas com testosterona, tendo observado que, os machos, machos castrados (tratados com testosterona) e fêmeas tratadas com testosterona, apresentaram maiores taxas de biotransformação da AFB₁, quando comparados com as fêmeas, não tratados. Estudos *in vivo*, realizados pelos mesmos autores, demonstraram que a ligação da AFB₁ ao ADN hepático e proteínas em machos e fêmeas tratadas com testosterona ocorre com maior frequência quando comparadas com fêmeas não tratadas, sugerindo então, que os machos são mais sensíveis à acção das aflatoxina.

Em contrapartida, relativamente a idade, verifica-se que os animais mais jovens são geralmente mais sensíveis aos efeitos tóxicos das toxinas, uma vez que os seus sistemas enzimáticos hepáticos, responsáveis pela sua biotransformação, ainda não estão completamente desenvolvidos (Coulombe e Sharma, 1985; Oliveira, 2010).

3.3.3.2. Efeitos biológicos

Os efeitos das aflatoxinas de maior significância em animais e humanos incluem, os resultantes da toxicidade crónica, como o caso da carcinogénese hepática, mesmo quando ingerida em concentrações muito baixas (Oliveira e Germano, 1997; Diaz e Murcia, 2011; Wu *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011; IARC, 2012; Tessari e Cardoso, 2012). Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de cancro em outros órgãos como o pâncreas e intestino pode ocorrer (Oliveira e Germano, 1997; Oliveira, 2010; Wu *et al.*, 2011; IARC, 2012; Zacarias e Rubio, 2013).

Nos animais, em particular os domésticos, os efeitos da ingestão de AFB₁ são semelhantes, caracterizando-se geralmente, em depressão, anorexia, perda de peso, hemorragia gastrointestinal, edema pulmonar e lesões hepáticas, como também, a supressão da resposta de imunológica (Oliveira, 2010; Diaz e Murcia, 2011; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011), resultando em enormes perdas económicas devido a diminuição do crescimento e da qualidade da carne e o aumento da incidência de doenças (Wu *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011; Herzallah *et al.*, 2014). Também têm sido verificadas, alterações semelhantes, embora em menor proporção, principalmente a nível dos rins, em casos de ingestão de AFM₁ (Oliveira, 2010).

Em humanos, embora apresentem uma certa resistência as aflatoxinas, particularmente os adultos (Oliveira, 2010; Wu *et al.*, 2011), verifica-se em casos de aflatoxicose aguda, associada a doses extremamente elevadas de aflatoxina, a presença de hemorragia, edema, lesões no fígado, e até morte (Oliveira e Germano, 1997; Oliveira, 2010; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação positiva entre a ocorrência das aflatoxinas, particularmente a AFB₁ na dieta de populações e a

incidência do carcinoma hepatocelular, que apresenta, porém, uma acentuada variação geográfica, com predomínio de países da África, Ásia e ilhas do Pacífico, conforme ilustrado na Tabela 3 (Oliveira e Germano, 1997; Williams *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011). Entre os países com maior incidência do carcinoma hepatocelular destacam-se Moçambique, Zimbabwe, Etiópia, China (costa sudoeste) e Taiwan, enquanto, os com incidência intermediária incluem a Swazilândia, o Japão e os da parte central e sudoeste da Europa (Geng-Sun, 1994; Oliveira e Germano, 1997; Williams *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011).

As elevadas diferenças, observadas na incidência do carcinoma hepatocelular entre os diversos países, resultam para além das aflatoxinas, de outros factores, sendo o de maior importância, a incidência do Vírus da Hepatite B (HBV), que de forma sinérgica com as aflatoxinas, aumentam a progressão da doença (Geng-Sun, 1994; Oliveira e Germano, 1997; Williams *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011).

Para além de induzir o carcinoma hepatocelular, a exposição crónica, das aflatoxinas podem ocasionar supressão imunológica (Oliveira, 2010; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011) e problemas de absorção nutricional (Cardwell, 2001; Williams *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011), originando deficiências nutricionais e/ou propiciando a progressão da infecção pelo Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV) (Williams *et al.*, 2004; Oliveira, 2010; Wu *et al.*, 2011).

Tabela 3. Relação entre a ingestão de AFB₁ (excluídas outras causas), e a incidência do carcinoma hepatocelular, em países da África e Ásia.

País	Ingestão de AFB ₁ (µg/kg p.c./dia)	Incidência do CHC (por 100.000/ano)
Quênia	3,5	1,2
	5,9	2,5
	10,0	4,0
Moçambique	20,3	5,9
	38,6	5,0
	77,7	12,1
	86,7	9,0
	87,7	15,5
	131,4	17,7
	183,7	14,0
Swazilândia	11,4	5,7
	14,3	2,9
	18,6	6,1
	32,9	11,1
	38,6	5,7
	40,0	9,2
	42,9	19,6
	72,9	23,7
China	127,1	22,4
	158,6	24,9
	21,0	175,4
	157,0	182,2
Transkey	1232,0	288,5
	3545,0	613,5
	5,1	5,3
Transkey	18,0	3,2
	19,6	9,0
	23,2	10,3

AFB₁ - Aflatoxina B₁; p.c - Peso Corpóreo; CHC - Carcinoma hepatocelular. Oliveira e Germano (1997) e Wu *et al.* (2011).

3.4. Aflatoxinas em Alimentos

A ocorrência de aflatoxinas em alimentos representa para o mundo todo, não só uma questão de Saúde Pública, mas também, um problema na economia, pois, a exposição animal e humana a estas toxinas, causa para além de doenças, perdas económicas advindas de custos investidos na produção agro-pecuária, assim como no tratamento de doenças.

3.4.1. Aflatoxinas em alimentos de origem vegetal

Mais de 25% de produtos agrícolas no mundo, incluindo uma boa percentagem de seus subprodutos, como rações e outros alimentos para animais, estão significativamente contaminados por micotoxinas, especialmente aflatoxinas (Freire *et al.*, 2007; Pinotti *et al.*, 2016). Entre os produtos agrícolas, o milho, trigo, amendoim, arroz e a mandioca, têm sido descritos como os mais susceptíveis a contaminação por *Aspergillus* e a consequente produção de aflatoxinas (Wild e Gong, 2010; Wu *et al.*, 2011; Augusto *et al.*, 2014), possivelmente, por apresentarem alto teor de carboidratos (Alam *et al.*, 2012).

Estudos feitos nos países em desenvolvimento (Okoli *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Saleemi *et al.*, 2010; 2007; Alemu *et al.*, 2008; Diaz *et al.*, 2009; Ghiasian *et al.*, 2011; Rashid *et al.*, 2012), incluindo Moçambique (Mondlane *et al.*, 2005; Warth *et al.*, 2012; Augusto *et al.*, 2014), têm sido frequente, o isolamento de *Aspergillus*, assim como, da AFB₁, em alimentos como o amendoim e milho, incluindo os seus subprodutos, como as rações. Para além de apresentar elevadas incidências, a AFB₁, têm sido encontrada em níveis elevados, estando acima dos limites propostos pelas legislações aplicadas (Rodriguez-Amaya e Sabino, 2002; Mondlane *et al.*, 2005; Oliveira, 2010; Zacarias e Rubio, 2013; Augusto *et al.*, 2014).

Uma revisão feita por Rodriguez-Amaya e Sabino (2002) no Brasil mostrou uma significativa variabilidade entre os resultados de contaminação de produtos vegetais e seus derivados por aflatoxinas (Tabela 4), com maior parte dos valores acima dos níveis permitidos pela legislação Brasileira (20 µg/kg). Por exemplo, pode-

se observar que os níveis de contaminação por aflatoxinas atingem cerca de 906 µg/kg no milho, e nos alimentos destinadas a alimentação animal, a contaminação alcançou níveis até 287 µg/kg para AFB₁.

Tabela 4. Resíduos de aflatoxinas em alguns produtos vegetais e seus subprodutos.

Produto	Aflatoxina	Positivas/Total de amostras	Concentração ¹ (µg/kg)
Milho	AFT	76/246	2-906
Milho	AFB ₁	97/292	2-89
Milho	AFB ₂	33/292	1-17
Subprodutos de milho	AFB ₁	3/39	30-163
Subprodutos de milho	AFB ₁	1/47	48
Milho para ração	AFB ₁	1/115	10
Ração	AFB ₁	14/96	11-287

1 - Concentrações médias e/ou mínimas e máximas; AFT - Aflatoxina total (B₁+B₂+G₁+G₂). Rodriguez-Amaya e Sabino (2002).

Oliveira *et al.* (2006) encontraram em 480 amostras de ração avícola, colectadas no estado de Rio de Janeiro durante um ano, uma incidência de contaminação por *A. flavus* de 25%, e níveis de AFB₁ entre 1,2 a 17,5 µg/kg.

No Paquistão, Saleemi *et al.* (2010) analisaram a microbiota fúngica e o potencial aflatoxigênico de espécies de *Aspergillus*, em 119 amostras de ração de frangos, tendo encontrado *Aspergillus* em 73,58% das amostras, sendo que em 83,33% destas, isolaram *A. flavus* e *A. parasiticus* com potencial aflatoxigênico entre 0,00095 a 1,9807 µg/g.

Anjum *et al.* (2012), num total de 487 amostras (77 de ingredientes de ração e 410 de ração para aves) provenientes de várias partes do país, encontraram uma incidência de 60% e 44,39 % de AFB₁, nos ingredientes de rações e rações, respectivamente. Nos ingredientes, o nível médio e máximo de contaminação por AFB₁ foi de 37,62 e 56 µg/kg, respectivamente, enquanto, nas rações foi de 23,75 e 78 µg/kg, respectivamente.

Alam *et al.* (2012), analisaram um total de 216 amostras de ingredientes para rações de aves, tendo encontrado um nível máximo de AFB₁ de 191,65 µg/kg, para além, de 86,85 µg/kg para AFB₂, 167,82 µg/kg para AFG₁ e 89,80 µg/kg para AFG₂.

Rashid *et al.* (2012), também em rações para aves, encontraram presença de AFB₁ em 91,66% das amostras analisadas, com níveis entre 10 a 166 µg/kg, sendo que 82,30% estavam acima dos níveis recomendados.

No Irão, estudo feito por Ghiasian *et al.* (2011) mostrou 58,3 a 80% de contaminação por AFB₁, num total de 51 amostras de milho destinadas a alimentação animal e ao consumo humano, provenientes de províncias potencialmente produtoras, apresentando níveis até 15600 µg/kg de AFB₁.

No sul da Etiópia, Alemu *et al.* (2008), encontram contaminações de AFB₁ em amostras de milho com níveis até 22,72 µg/kg.

Em Moçambique, Mondlane *et al.* (2005), analisaram 69 amostras de rações para aves, provenientes de quatro fábricas de Maputo (A, B, C e D), tendo encontrado 65% (n=45) das amostras positivas para *A. flavus* e AFB₁, distribuindo-se da seguinte maneira: A (4%), B (82,3%), C (8,7%), D (50%). O nível médio de AFB₁ encontrado foi respectivamente de 0,031 e 0,012 mg/kg, para amostras positivas e negativas para *A. Flavus*.

Por outro lado, Warth *et al.* (2012) observaram que 46% de amostras de milho tinham uma concentração média de 114 µg/kg de AFB₁. Em 2014 Augusto e colaboradores, verificaram que apenas, 10% e 20% de amostras de milho e amendoim, respectivamente, eram seguras para o consumo humano.

A alta incidência de contaminação por aflatoxinas nos produtos de origem vegetal, verificada nos países em desenvolvimento, deve-se principalmente às práticas tradicionais, muitas vezes impróprias, de colheita, secagem e armazenamento utilizadas pelos produtores (Oliveira e Germano, 1997; Mondlane *et al.*, 2005; Okoli *et al.*, 2006; Saleemi *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Zacarias e Rubio, 2013; Augusto *et al.*, 2014). Para além destes factores, uma particularidade verificada nas rações, é a prática da mistura de rações de origens diferentes, por parte de produtores pecuários, especialmente os pequenos e médios, que também, aumenta as possibilidades de

contaminação nestes subprodutos (Okoli *et al.*, 2006; FAO e IFIF, 2010; Saleemi *et al.*, 2010).

3.4.2. Aflatoxinas em alimentos de origem animal

A presença de micotoxinas, em especial as aflatoxinas, nos alimentos destinados alimentação animal, pode representar um perigo na cadeia alimentar humana, uma vez que níveis detectáveis destas toxinas, assim como de seus metabólitos, podem estar presentes em produtos comestíveis, como carnes (incluindo vísceras comestíveis), ovos e leite, provenientes de animais expostos a elas (Tabela 6 e 7), mesmo em doses não letais (Salle *et al.*, 2001 e 2002; Saeed *et al.*, 2003; Borges, 2005; Hussain *et al.*, 2010; Oliveira, 2010; Yunus *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2013; Pourelmi *et al.*, 2013; Herzallah *et al.*, 2014). Por outro lado, resíduos de aflatoxinas também podem ser detectados em carnes e vísceras, quando estes são contaminados pelo *Aspergillus* durante o processamento e/ou armazenamento (Morshdy *et al.*, 2015; Darwish *et al.*, 2016).

No entanto, de acordo com Rodriguez-Amaya e Sabino (2002) e Biswas *et al.* (2010), nos tecidos musculares de muitos animais, em especial as aves, os resíduos de aflatoxinas, principalmente a AFB₁, são raramente encontrados, em virtude de sua presença em níveis baixos e, muitas vezes abaixo dos limites de detecção dos métodos utilizados, mesmo após a exposição dos animais a doses elevadas de AFB₁. Referem também os mesmos autores que, os altos níveis de resíduos de AFB₁ são comumente encontrados no fígado, no qual, também verifica-se um aumento no teor de lípidos em três vezes mais, quando cerca de 20 mg/kg aflatoxina é incorporado na ração de frangos.

Em contrapartida, Salle *et al.* (2001 e 2002), referem que as aves são um dos grupos de animais com maior capacidade de retenção de aflatoxinas, podendo por exemplo, reter a décima parte da dose de AFB₁ administrada, que se distribui pelo organismo da seguinte forma: 11% no sangue, 9,8% no fígado, 4,3% no coração, 12,5% na moela, 31,7% nos músculos peitorais e 30,6% nas coxas.

Muitos estudos experimentais têm sido realizados para analisar a distribuição dos níveis residuais de AFB₁, incluindo seus metabólitos nos diferentes tecidos de aves. Trucksess *et al.* (1983) alimentaram galinhas com uma dieta de arroz em pó contaminada com 8 µg/g de AFB₁ durante 7 dias, e posteriormente, com dieta livre da toxina também por mais 7 dias, e encontraram resíduos de AFB₁ e seus metabólitos, como aflatoxicol (AFL) e aflatoxina M₁ (AFM₁), nos rins, músculo, no fígado, sangue e nos óvulos (Tabela 5). Os autores observaram presença de AFL e AFB₁ em todas as amostras de galinhas sacrificados imediatamente antes da retirada da dieta contaminada. Após a retirada da dieta contaminada, a AFB₁ foi encontrada em uma das nove amostras de fígados e AFL em oito dos nove músculos analisados.

Tabela 5. Resíduos de AFB₁ e seus metabólitos após ingestão de dieta contaminada com 8 µg/g de AFB₁.

Tecido	Aflatoxinas e metabólitos (ng/g)		
	AFB ₁	AFL	AFM ₁
Óvulo	0,24	0,25	ND
Rins	0,25	0,10	0,05
Fígado	0,46	0,20	ND
Músculos	ND	0,08	ND
Sangue	0,05	ND	0,10

ND - Não detectada; AFL - Aflatoxicol; AFB₁ - Aflatoxina B₁; AFM₁ - Aflatoxina M₁. Trucksess *et al.* (1983).

Zaghini *et al.* (2005) submeteram poedeiras de 44 semanas de idade a uma dieta contendo 2,5 mg/kg de AFB₁ por três semanas, e encontraram resíduos desta toxina no fígado, músculos e ovos (Tabela 6). Observaram também, para além de uma redução no peso da casca de ovo, alteração na coloração da gema, sugerindo, uma interferência negativa da AFB₁ no metabolismo lipídico e na deposição de pigmentos na gema. Numa outra vertente, Hassan *et al.* (2012) avaliaram o efeito da AFB₁, combinada ou não com ocratoxina A (OTA) em galinhas, tendo observado, que a ingestão simultânea de micotoxinas reduz a capacidade de retenção de uma ou outra nos tecidos (Tabela 6). Por exemplo, resíduos de AFB₁ foram mais elevados no fígado

e músculos peitorais na ingestão de apenas AFB₁, quando comparados com os da ingestão concomitante de OTA e AFB₁.

Tabela 6. Resíduos de aflatoxinas nos diferentes tecidos de galinhas após exposição à toxina, combinada ou não com ocratoxina A.

Aflatoxinas	Dose de exposição	Tecidos analisados	Nível dos resíduos (µg/kg)	Referência
AFB ₁	2,5 mg/kg ^a	Músculos	0,08	Zaghini <i>et al.</i> (2005)
		Ovos	0,24	
			0,25	
		Fígado	4,13	
OTA+AFB ₁	0 + 0 (mg/kg)	Fígado, músculos e rins	ND + ND	Hassan <i>et al.</i> (2012)
	0 + 5 (mg/kg)	Músculos	ND + 0,03	
		Rins	ND + 0,25	
		Fígado	ND + 1,44	
	3 + 5 (mg/kg)	Músculos	0,34 + 0,02	
		Rins	2,80 + 0,27	
		Fígado	1,98 + 0,26	
	5 + 5 (mg/kg)	Músculos	0,51 + 0,02	
		Rins	2,81 + 0,27	
		Fígado	2,21 + 0,11	

^a - Dose na ração administrada durante quatro semanas; OTA - Ocratoxina A; ND - Não detectada.

Por outro lado, um estudo de revisão realizado no Brasil, por Rodriguez-Amaya e Sabino (2002), mostrou uma variabilidade de contaminação entre os resultados dos produtos de origem animal, incluindo leite cru ou processado, por aflatoxinas (Tabela 7). O estudo mostrou que entre os produtos de origem animal, a incidência de aflatoxinas em amostras de ovos e tecidos de suínos e aves foi baixa, quando comparada a de amostras de fígado de frango, onde 50% das amostras testadas foram positiva, porém, com níveis relativamente baixos. Para além dos fígados, constatou-se também que embora as incidências tenham sido baixas, o leite pasteurizado e em pó, representavam algum problema.

Tabela 7. Resíduos de aflatoxinas em alguns produtos de origem animal.

Produto	Aflatoxina	Positivas/Total de amostras	Concentração¹ (µg/kg)
Ovos	AFB ₁	2/210	2-5
Ovos	AFM ₁	0/210	-
Fígado de suíno	AFB ₁	1/43	27
Fígado de galinha	AFB ₁	3/6	1,2-3,2
Fígado de aves	AFB ₁	0/40	-
Rins de suíno	AFM ₁	0/43	-
Rins de aves	AFM ₁	1/40	Traço
Leite cru	AFM ₁	0/144	-
Leite pasteurizado e em pó	AFM ₁	0/86	-
Leite pasteurizado	AFM ₁	4/52	0,07-0,37 ^a
Leite em pó	AFM ₁	33/300	0,10-1,00 ^a

1 - Concentrações médias e/ou mínimas e máximas; AFs - Aflatoxinas; *a* - Concentração em mg/L. Rodriguez-Amaya e Sabino (2002).

3.4.3. Legislação sobre aflatoxinas

Diversos países têm estabelecido legislação, com o objectivo de proteger os consumidores contra os efeitos nocivos das micotoxinas, principalmente aflatoxinas, em alimentos *in natura* e processados, assim como rações para animais de abate, incluindo os seus ingredientes.

A determinação dos limites máximos permitidos e regulamentados para aflatoxinas, assim como de outras micotoxinas, leva em conta uma série de factores. Fazem parte destes factores, a disponibilidade de informações toxicológicas, a disponibilidade de informações de exposição às micotoxinas, o conhecimento da distribuição das micotoxinas nos alimentos e, a disponibilidade e limitações inerentes as metodologias analíticas (FAO, 2004; Van Egmond e Jonker, 2004; Freire *et al.*, 2007). Para além dos aspectos de natureza científica, são também considerados aspectos de natureza política e socioeconómica, tais como, a legislação de países com os quais existem acordos e interesses comerciais, e os impactos na disponibilidade da

oferta de alimentos para a população (FAO, 2004; Van Egmond e Jonker, 2004, Freire *et al.*, 2007; Van Egmond *et al.*, 2007).

Segundo a FAO (2004), até o ano de 2003, pelo menos 99 países possuíam legislação para regulamentar os limites de micotoxinas em alimentos, rações e outros produtos agrícolas, representando um aumento de 30% em relação ao ano de 1995 (FAO, 2004; Van Egmond e Jonker, 2004; Freire *et al.*, 2007). Nesta legislação, maior parte dos limites referiam-se a AFB₁ ou aflatoxina total (a soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂), e alguns, para outras micotoxinas, destacando-se a AFM₁ no leite (FAO, 2004; Freire *et al.*, 2007). No entanto, falta nesta legislação, referência à regulamentação de limites de micotoxinas em produtos de origem animal, como carnes e vísceras comestíveis.

Por outro lado, verificava-se já em 2003, uma tendência de harmonização dos limites de micotoxinas entre as diferentes comunidades de países (Van Egmond e Jonker, 2004, Freire *et al.*, 2007; Van Egmond *et al.*, 2007). Por exemplo, a maioria dos países da União Europeia (UE), estabeleciam limites máximos nos alimentos, de 4 µg/kg para aflatoxina total e 2 µg/kg para AFB₁, enquanto, na América Latina, Ásia ou Oceânia e África, maior parte dos países, aplicavam 20 µg/kg e 5 µg/kg, para aflatoxina total e AFB₁, respectivamente (FAO, 2004; Freire *et al.*, 2007; Atici 2013).

A Tabela 8 apresenta os principais limites máximos de aflatoxinas permitidos em alimentos destinados ao consumo humano e animal em alguns países. Pode observar-se, que os limites mais baixos relativos a aflatoxinas encontraram-se consignados na legislação de países desenvolvidos, com especial menção aos países europeus, para além de países como o Canadá. Contrariamente a estes países, muitos países africanos, a semelhança de Moçambique, devido a falta de legislação para regulamentar os limites de micotoxinas em alimentos, rações e outros produtos agrícolas, têm aplicado os limites consignados nas normas do *Codex alimentarius* ou na legislação de países com os quais, existem acordos comerciais (Mondlane *et al.*, 2005; Augusto *et al.*, 2014).

Tabela 8. Limites máximos de aflatoxinas permitidos em alimentos destinados ao consumo humano e animal nos diferentes países.

Alimento	Limite máximo de aflatoxinas (ppb ou µg/kg)			Países
	AFT	AFB ₁	AFM ₁	
Cereais e amendoim, incluindo derivados processados destinados ao consumo humano	4	2	-	União Europeia
	0	0	-	Singapura Canadá Polónia
Todos alimentos destinados ao consumo humano, excepto leite e alimentos infantís	4	2	-	Alemanha
	5	-	-	Austrália Suécia
	10	-	-	Japão
		5	-	Africa do sul
	20	5	-	Brasil
		-	-	Estados unidos
	30	-	-	Índia
Leite e alimentos infantís destinados ao consumo humano	-	-	0	Canadá
	-	-	0,5	EUA
	-	-	0,05	União Europeia
Ração (<i>Excepções abaixo</i>)	-	50	-	União Europeia
Ração para suínos e aves	100	-	-	EUA
	-	20	-	União Europeia
Ração para animais imaturos	20	-	-	EUA
Ração para gado leiteiro	20	-	-	EUA
	-	5	-	União Europeia
Alimentos complementares (para o gado leiteiro, suínos e aves)	300	-	-	EUA
	-	30	-	União Europeia

AFT - Aflatoxina total. FAO (2004) e Freire *et al.* (2007).

Actualmente, em virtude do desenvolvimento de métodos de análise de alta sensibilidade e especificidade, assim como, do conhecimento dos efeitos dessas toxinas no Homem e nos animais, têm havido, na maior parte dos países desenvolvidos, uma tendência de redução dos limites máximos permitidos de aflatoxinas em alimentos (Freire *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011; Wu, 2015; Pinotti *et al.*, 2016). Esta tendência de redução tem apresentado segundo Wu (2015) e Pinotti *et al.* (2016) um impacto negativo nas trocas comerciais, uma vez que baixos limites podem

representar restrições de comercialização produtos no mercado internacional, para os países com condições limitadas de controlar ou rastrear as micotoxinas nos alimentos.

Em contrapartida, na maior parte do países em desenvolvimento, estes limites têm-se mantido, muitas vezes como resultado da insegurança alimentar, ou seja, disponibilidade insuficiente de alimentos para a população (Wu, 2015; Pinotti *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2011), o que ainda mais preocupante a situação de exposição destas populações a ingestão de aflatoxinas.

3.4.4. Métodos de análise das aflatoxinas

A detecção e quantificação de aflatoxinas nos alimentos, seja de origem vegetal ou animal, é de importância, para a realização atempada de medidas de prevenção de eventuais exposições do consumidor, a estas toxinas, salvaguardando assim a Saúde Pública e animal. No entanto, a detecção e quantificação de aflatoxinas constitui um processo difícil, pelo facto de numa matriz estarem para além das aflatoxinas, outros compostos orgânicos e em concentrações mínimas, isto é, concentrações a nível de microgramas (μg) ou miligramas (mg), por quilograma (kg) (Karunyavani, 1991; FAO, 1993).

Os métodos ou técnicas de detecção e quantificação de aflatoxinas são basicamente classificados em físicos-químicos e biológicos. Os métodos físico-químicos são considerados convencionais, destacando-se as cromatografias (de camada delgada ou fina, líquida de alta eficiência e gasosa), a fluorodensitometria e espectrofotometria (Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011). Os biológicos incluem, os imunoensaios (radioimunoensaio, colunas de afinidade e *Enzyme linked Immunosorbent Assay* - ELISA) e os bioensaios (cultura de microrganismos e tecidos) (Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011; Espinosa-Calderón *et al.*, 2011; Hussain, 2011; Darsanaki *et al.*, 2013).

Dentre os métodos mencionados, constituem os preferencialmente utilizados nas pesquisas actuais, a cromatografia de camada delgada (CCD), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), associadas ou não a imunoafinidade e os imunoensaios através de ELISA (Dors *et al.*, 2011; Espinosa-Calderón *et al.*, 2011;

Hussain, 2011). Estes métodos, especialmente os convencionais, são constituídos modo geral, pelas etapas de amostragem, preparação da amostra, extracção, purificação, detecção ou identificação, quantificação e confirmação da identidade química da toxina (Figura 3). Estas etapas, normalmente tornam estes métodos de execução demorada e complexa, para além de envolver meios dispendiosos, necessitando ainda de pessoal qualificado e devidamente treinado para os executar (Trucksess, 2001; AOAC, 2005; Dors *et al.*, 2011).

Para alimentos de origem vegetal, o procedimento de amostragem constitui uma das etapas críticas para o sucesso da detecção e quantificação de aflatoxinas, pois, estas apresentam uma distribuição bastante heterogénea e em concentrações muito baixas no alimento (FAO, 1993; Freire *et al.*, 2007; Dors *et al.*, 2011). Assim, a determinação do tamanho da amostra leva em consideração parâmetros relacionados com o objectivo do estudo, tipo de alimento e embalagem, tamanho do lote e, custo e condições de transporte até o laboratório (FAO, 1993).

A extracção de aflatoxinas nos alimentos é realizada utilizando-se solventes orgânicos, que geralmente incluem o metanol, clorofórmio, acetonitrila e acetona, ou por vezes, a combinação de um ou mais desses solventes com água (Stubblefield e Shotwell, 1981; Karunyavani, 1991; AOAC, 2005; Dors *et al.*, 2011), com auxílio de procedimentos físicos como a agitação durante um determinado tempo (Stubblefield e Shotwell, 1981; Karunyavani, 1991; AOAC, 2005).

Embora a extracção garanta a remoção de muitos compostos interferentes, torna-se necessária a submissão do extracto a um processo de purificação, realizada através de procedimentos como a partição líquido-líquido, partição sólido-líquido, precipitação de proteínas e, utilização de colunas cromatográficas e de imunoafinidade (Trucksess, 2001; AOAC, 2005; Dors *et al.*, 2011; Espinosa-Calderón *et al.*, 2011; Takino *et al.*, 2011). No entanto, na análise de aflatoxinas e seus metabólitos em produtos de origem animal no geral, os procedimentos, tanto de extracção e de purificação, têm sido exigentes, pois estes substratos apresentam uma característica complexa, constituída de açúcares, proteínas, lípidos e minerais, que podem ser removidos ligados às toxinas, dificultando assim, a sua detecção (Trucksess e Stoloff,

1979; Trucksess, 2001; Scussel *et al.*, 2003; Shundo *et al.*, 2004; Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011).

Após a extracção e, antes de proceder-se a detecção e quantificação das aflatoxinas, o extracto final obtido após a extracção e purificação, é concentrado, geralmente em rotavapor ou em banho de água sob corrente de nitrogénio (Karunyavanij, 1991; Scussel *et al.*, 2003; Shundo *et al.*, 2004; AOAC, 2005).

Os procedimentos de detecção e quantificação variam de acordo com o tipo do método, no entanto, é comum a utilização de padrões de aflatoxinas na quantificação (Karunyavanij, 1991; AOAC, 2005).

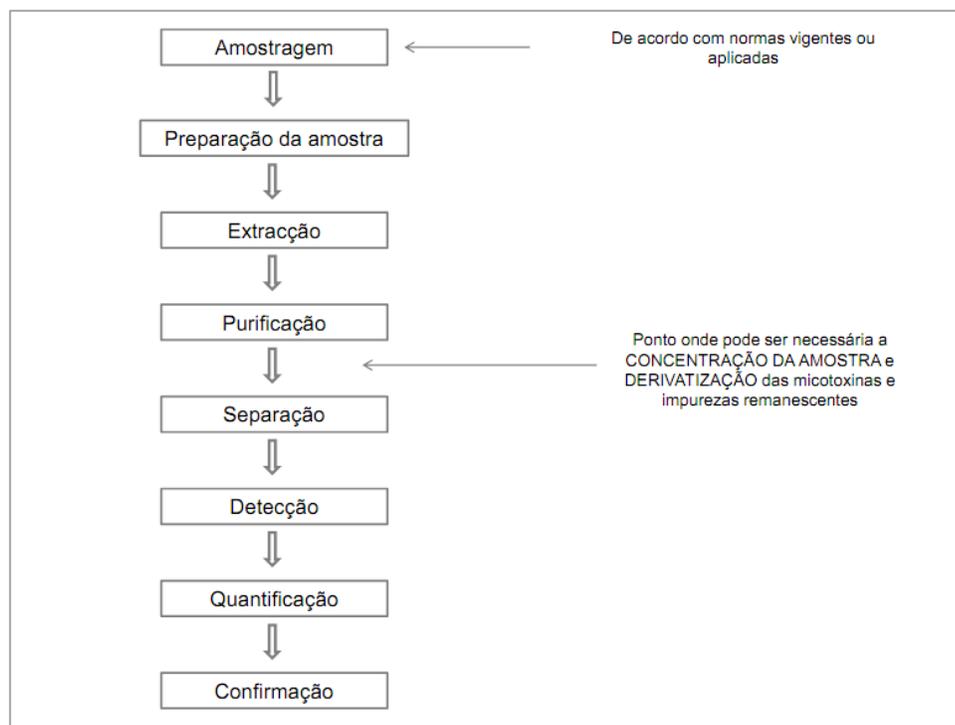


Figura 3. Esquema das principais etapas na análise de aflatoxinas. Adaptado de: AOAC (2005).

A Cromatografia de Camada Delgada (CCD) é um dos métodos mais utilizados na análise de aflatoxinas, devido a sua considerável sensibilidade, reprodutibilidade e baixo custo em relação aos outros métodos analíticos (Scussel *et*

al., 2003; Shundo *et al.*, 2004; Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011; Espinosa-Calderón *et al.*, 2011).

Este constitui um método de multidetecção, uma vez que permite a separação eficaz dos compostos, tornando-o muito útil na caracterização de aflatoxinas (Karunyavanij, 1991) e, de referência para a maioria dos laboratórios de países em desenvolvimento, sendo considerada pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) e pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), como um método oficial para validação de outros métodos analíticos para micotoxinas (Karunyavanij, 1991; Scussel *et al.*, 2003; Shundo *et al.*, 2004; Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011). A separação dos compostos é em função da distância que migram sobre uma matriz e com um solvente ou eluente específicos (Karunyavanij, 1991; AOAC, 2005).

Na CCD, a quantificação das aflatoxinas é realizada por comparação visual das intensidades de fluorescência entre o extracto e as diferentes concentrações padrão de cada toxina aplicada na placa cromatográfica sob luz ultravioleta ou por densitometria, sendo possível quantificar a partir de 2,5 µg/kg (Karunyavanij, 1991; Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) consiste em um método quase que totalmente automatizado, que apresenta uma elevada sensibilidade, especificidade e precisão, fazendo o uso de instrumentos sofisticados especiais, como o caso das colunas de eluição de fase móvel sob alta pressão (Scussel *et al.*, 2003; Shundo *et al.*, 2004; Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011; Espinosa-Calderón *et al.*, 2011). Trata-se de um método de alto custo, relativamente à aquisição e manutenção, para além de necessitar técnicos experientes e treinados (Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011; Takino *et al.*, 2011).

Os métodos biológicos de imunoensaios, como ELISA e colunas de afinidade com leitura por fluorimetria, constituem actualmente, os métodos mais utilizados, para o rastreio das aflatoxinas em amostras submetidas ao controlo de qualidade para importação e exportação (Borges, 2005). Apesar do método de ELISA não apresentar a especificidade de alguns métodos físico-químicos, é um método simples, rápido, de

elevada sensibilidade, com menores riscos de exposição a reagentes nocivos (Salle *et al.*, 2001 e 2002; Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011; Espinosa-Calderón *et al.*, 2011; Hussain, 2011; Darsanaki *et al.*, 2013). Também apresenta a possibilidade de automatização, análise de diferentes tipos de matrizes, incluindo o fígado e moela, e análise de um grande número de amostras ao mesmo tempo (Salle *et al.*, 2001 e 2002; Hussain, 2011; Darsanaki *et al.*, 2013). Por apresentar falsos positivos em alguns casos, tem havido a necessidade de confirmação dos resultados por métodos mais específicos (Salle *et al.*, 2001 e 2002; Vilar *et al.*, 2002; Stamford *et al.*, 2005), e muitas vezes caros, como o caso da CLAE (Méllote, 2004; Oliveira, 2010).

A imunoafinidade com leitura por fluorimetria é um dos mais recentes avanços na análise de aflatoxinas, caracterizada pela simplicidade e rapidez (Trucksess, 2001; Takino *et al.*, 2011; Darsanaki *et al.*, 2013). As colunas utilizadas são constituídas por anticorpos monoclonais específicos a cada aflatoxina, apresentando uma significativa especificidade, afinidade e reversibilidade (Trucksess, 2001; Borges, 2005; Dors *et al.*, 2011; Hussain, 2011; Takino *et al.*, 2011; Darsanaki *et al.*, 2013). Neste método, o extracto a ser analisado, é aplicado na coluna de imunoafinidade, para que a aflatoxina se ligue aos anticorpos específicos presentes na mesma, sendo de seguida, lavada com água ou solução tampão para a remoção de impurezas, procedendo-se então à eluição da toxina com solventes específicos como metanol e acetonitrila, e a sua posterior detenção e quantificação num fluorímetro (AOAC, 2005; Dors *et al.*, 2011; Hussain, 2011; Takino *et al.*, 2011).

Em Moçambique, a pesquisa de aflatoxinas é frequentemente realizada através do método CCD, utilizando os métodos convencionais (Mondlane *et al.*, 2005). Contudo, recentemente, em laboratórios privados, programas de rastreio e projectos de investigação, as aflatoxinas vem sendo analisadas através dos métodos de ELISA e de imunoafinidade com leitura por fluorimetria (Augusto *et al.*, 2014).

De acordo com Trucksess (2001) e Borges (2005), a escolha do método analítico para a determinação de aflatoxinas esta relacionada com factores como o tipo de matriz (substrato), sensibilidade da técnica, custo, disponibilidade de equipamentos, número de amostras e tempo necessário. Assim, uma vez que os métodos

convencionais não permitem a análise fácil de matrizes de origem animal, estes têm entrado em desuso, favorecendo optimização destes métodos, pela utilização de colunas de imunoafinidade (IAC) e outros procedimentos, de modo a melhorar a detecção de aflatoxinas nestes produtos (Stubblefield e Shotwell, 1981; Stubblefield *et al.*, 1982; Trucksess *et al.*, 1983; Shundo *et al.*, 2004; Stamford *et al.*, 2005; Takino *et al.*, 2011).

Por exemplo, Stubblefield e Shotwell (1981), optimizaram o método CCD para análise de AFB₁ e AFM₁ em tecidos animais (fígado, coração, músculos, rins e sangue), modificando o procedimento de extração da amostra, e verificaram coeficientes de recuperação entre 80 a 90%.

Shundo *et al.* (2004) optimizou o método CCD para análise de AFM₁ no leite de vaca, associando-se colunas de imunoafinidade e realizando pequenas modificações na fase de extração, tendo verificado maior eficiência do método, como limites de quantificação de 0,02 e 0,3 µg/L, repectivamente.

3.4.5. Medidas preventivas da contaminação de alimentos por aflatoxinas

Para salvaguardar a saúde humana e animal do risco de exposição por aflatoxinas, assim como de outras micotoxinas através dos alimentos, torna-se relevante a adopção de estratégias ou medidas visem eliminar ou reduzir significativamente até níveis aceitáveis, estas toxinas nos alimentos. Estas estratégias ou medidas devem abranger toda a cadeia do alimento, desde o plantio, colheita, transporte, armazenamento, até o processamento (Freire *et al.*, 2007; Dorner, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2008b; Wu e Khlangwiset, 2010; Feddern *et al.*, 2013).

Actualmente, as principais estratégias ou medidas preventivas contra a contaminação de alimentos e subprodutos por aflatoxinas e outras micotoxinas incluem: (1) A adopção de práticas agrícolas ou pecuárias correctas (Santurio, 2000; Freire *et al.*, 2007; Dorner, 2008; Feddern *et al.*, 2013); (2) A desintoxicação ou descontaminação de alimentos ou rações contaminados (Feddern *et al.*, 2013; Dos Anjos *et al.*, 2016); e (3) O controlo da contaminação dos alimentos e rações, pelas micotoxinas de maior relevância (Freire *et al.*, 2007; Feddern *et al.*, 2013).

3.4.5.1. Adopção de práticas agro-pecuárias correctas

A adopção de práticas correctas na produção agrícolas e pecuárias que visem prevenir o crescimento dos fungos, isto é, de *Aspergillus* spp., constitui, indubitavelmente, a melhor estratégia ou medida para controlar a contaminação de alimentos (dos grãos e cereais), incluindo rações por aflatoxinas (Dawson *et al.*, 2006; Dorner, 2008; FAO, 2013; Feddern *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2015). De acordo com Dorner (2008), Feddern *et al.* (2013) e Ribeiro *et al.* (2015), dentre as diversas práticas para o alcance dessa premissa, faz-se referência:

- a) A escolha de solos não infestados ou que não favorecem o crescimento de *Aspergillus*;
- b) A utilização de culturas resistentes a contaminação pelo *Aspergillus*;
- c) A utilização de técnicas e equipamentos de colheita, ajustados para operarem adequadamente, produzindo menor dano mecânicos ao produto;
- d) A colheita imediata do produto logo que atingir a maturidade;
- e) A secagem dos grãos e cereais até níveis seguros e aceitáveis de humidade, de modo a atingir uma actividade da água segura;
- f) A limpeza das sementes oleaginosas e grãos pela remoção ao da matéria orgânica e sementes danificadas; e,
- g) A limpeza dos locais de armazenamento dos grãos e cereais, assim como rações, e a sua protecção contra a entrada de insectos, roedores e influências climáticas, garantindo assim o nível de humidade adequado.

Por outro lado, constiuem também estratégias de prevenção, aplicadas com frequência nas rações, a utilização de inibidores do crescimento de *Aspergillus*; assim como outros fungos, sendo os principais, os ácidos orgânicos, como ácidos propiônico, acético, sórbico e benzóico e seus sais de cálcio, sódio e potássio (Santurio, 2000). Também é frequente a prevenção pela utilização de ingredientes de qualidade sanitária garantida para produção de rações e, a troca rápida das rações durante a alimentação animal, fazendo com que haja menos tempo para o crescimento de *Aspergillus* e a produção de toxinas (Freire *et al.*, 2007; Tajkarimi *et al.*, 2008b; Feddern *et al.*, 2013).

3.4.5.2. Descontaminação e desintoxicação dos alimentos e rações contaminadas

Embora haja esforços para a prevenção, o crescimento de *Aspergillus* nos cereais e grãos, incluindo rações, e a consequente produção de aflatoxinas é quase inevitável em países tropicais, pois, o período pós-colheita, coincide com grandes precipitações pluviométricas, favorecendo o crescimento destes fungos (Santurio, 2000; Dawson *et al.*, 2006).

Assim, recorre-se a descontaminação e desintoxicação, que constituem medidas correctivas ou seja, tratamentos pós-colheita, físicos ou químicos, utilizados para remover, reduzir ou atenuar os efeitos tóxicos das aflatoxinas (Santurio, 2000; Dorner, 2008; Gowda e Ledoux, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2008b; EFSA, 2009; Liu *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2015). No entanto, na maioria das situações, a utilização de alguns destes métodos não é aplicável para a redução significativa dos níveis de aflatoxinas em alimentos, pois, para além de apresentarem um elevado custo para o seu emprego, provocam alterações sensoriais e/ou nutricionais nestes alimentos (Dawson *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2015).

Assim, actualmente, a remoção e redução de aflatoxinas nos alimentos e rações, assim como a atenuação dos efeitos das aflatoxinas, principalmente nas aves, é realizada através de adsorventes, substâncias inertes com a capacidade de ligar-se às aflatoxinas, reduzindo a sua absorção no trato gastrointestinal (Dawson *et al.*, 2006; Gowda e Ledoux, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2008b; EFSA, 2009; Liu *et al.*, 2011; Feddern *et al.*, 2013; Dos Anjos *et al.*, 2016; Fowler *et al.*, 2015).

Dentre os adsorventes mais comuns utilizados em dietas de animais destacam-se os aluminossilicatos, produzidos sinteticamente ou extraído das minas de argila (Gowda e Ledoux, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2008b; EFSA, 2009; Liu *et al.*, 2011; Feddern *et al.*, 2013). Destes, o mais usado é o hidratado aluminossilicato de cálcio e sódio (HSCAS) (Gowda e Ledoux, 2008; EFSA, 2009; Feddern *et al.*, 2013), embora outros tipos, como o caso bentonites de sódio ou cálcio e zeólitos têm sido utilizados (EFSA, 2009; Feddern *et al.*, 2013; Dos Anjos *et al.*, 2016; Fowler *et al.*, 2015). Outros adsorventes com esta aplicação incluem o glucomanano esterificado (EGM), o

carvão activado, para além do uso de probióticos e alguns extratos de plantas (Dawson *et al.*, 2006; Feddern *et al.*, 2013).

A utilização destas substâncias têm trazido, uma significativa melhoria da produção e saúde animal, proporcionando uma maior segurança para os consumidores de produtos de origem animal (Dawson *et al.*, 2006; EFSA, 2009; Liu *et al.*, 2011; Feddern *et al.*, 2013).

3.4.5.3. Controlo dos alimentos e rações

O controlo da contaminação dos alimentos e rações, em relação à contaminação pelas principais micotoxinas é fundamentalmente garantido através de estudos de rastreio e aplicação ou implementação dos regulamentos (FAO, 2004). Por outro lado, para melhor fazer cumprir esta premissa, torna-se necessária a disposição de métodos analíticos confiáveis, pois com isso, garante-se que os alimentos estejam perfeitamente aptos ou não para o consumo humano e animal.

Existem mais de quarenta métodos de análise para micotoxinas, já validados por estudos interlaboratoriais de validação de métodos, sendo na sua maioria, métodos físico-químicos, destacando-se as cromatografias de camada delgada ou fina, líquida de alta eficiência e gasosa (FAO, 2004; AOAC, 2005). Estes métodos tendem a aumentar em número, com as recorrentes optimizações ano pós ano, especialmente, as que envolvem a utilização de colunas de imunoafinidades (Scussel *et al.*, 2003; FAO, 2004; Shundo *et al.*, 2004; AOAC, 2005).

No entanto, em alguns domínios, como o caso da produção industrial, por necessidade de utilizar-se métodos que possibilitem a avaliação rápida de produtos, é comum, a utilização de imunoensaios, como o caso fluorimetria de afinidade e *kits* de ELISA (Trucksess, 2001; Dors *et al.*, 2011; Darsanaki *et al.*, 2013). Nesta vertente, tornam-se necessárias, amostragens e análises periódicas, uma vez que é imprescindível a decisão de aceitação ou rejeição de lotes destes produtos, seja na recepção da matéria-prima ou retirada dos produtos processados (Santurio, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Colheita de amostras

Um total de quatro colheitas sistemáticas de fígados e moelas, foram realizadas em quatro locais (A, B, C e D) referentes a dois sistemas de produção e abate de frangos, nomeadamente, o industrial ou formal (PAI) e local (comunitário) ou informal (PAL) em Maputo. Para cada colheita, foram realizadas duas (2) subcolheitas, em dias de abate de frangos, numa semana do mês, sendo as primeiras duas colheitas, realizadas nos meses de Fevereiro e Março, e as outras duas, nos meses de Maio e Junho. Estas colheitas foram denominadas respectivamente, de Grupo de Amostas 1 (GA1) e Grupo de Amostas 2 (GA2).

A diferenciação da amostragem nos dois sistemas de produção e abate de frangos foi feita com base nas características de produção e manejo alimentar, que são diferentes entre os dois sistemas anteriormente mencionados. PAI foram incluídos dois matadouros, identificados como sendo “A” e “B”, que constiuem os principais produtores e fornecedores de frango de corte industrial em Maputo (principalmente, nas cidades de Maputo e Matola). Por outro lado, no sistema PAL, foram incluídos dois mercados informais, identificados como sendo “C” e “D”, que correspondem a alguns dos principais locais informais de abate e de comercialização de frangos produzidos a nível comunitário e/ou caseiro.

Portanto, foram colhidos nestes locais, um total de 294 fígados (sem visícula biliar) e 214 moelas limpas, consideradas aptas para a comercialização, ou seja, para o consumo humano. Destas amostras, pertenciam ao GA1, 194 fígados e 134 moelas, sendo, 140 fígados e 80 moelas provenientes do sistema PAI, enquanto os restantes 54 fígados e moelas cada, do sistema PAL. E ao GA2, pertenciam, 100 fígados e 80 moelas, dos quais, 70 fígados e 50 moelas eram do sistema PAI, e os restantes 30 fígados e moelas cada, do sistema PAL.

Durante a colheita amostras de fígado, foram pesadas usando uma balança digital (1 - 3000 g, Brinox, Brasil) e, avaliadas quanto a coloração, categorizando-as em “Normal” (cor vermelho escura), “Pálida ou amarela” e “Moderada” (Cerca de 2/3

da área pálida ou amarela), segundo os critérios utilizados pela USDA (2008) e por Dos Anjos *et al.* (2016). Posteriormente, as amostras recolhidas, foram colocadas em sacos plásticos estéreis (*Ziploc*), identificadas e imediatamente transportadas sob condições de refrigeração (2-8°C) em caixa isotérmica para o Laboratório Nacional de Higiene de Alimentos e Águas (LNHAA), Ministério de Saúde (MISAU) e o Laboratório de Química da Direcção de Ciências Animais (DCA), conforme o grupo de amostras, onde foram mantidas a uma temperatura de -10°C em congeladores Defy e Marconi (RC-330D, Brasil), respectivamente, até o momento da realização das análises.

4.2. Análise de Aflatoxina B₁

As análises laboratoriais para a detecção e quantificação de AFB₁, nas amostras fígado e moela foram diferenciadas para os dois grupos de amostras (GA1 e GA2), em relação ao método analítico utilizado. A detecção e quantificação de AFB₁ nas amostras do GA1 (de Fevereiro e Março) foram realizadas no LNHAA, empregando-se o método cromatografia em camada delgada (CCD), enquanto, para as amostras do GA2 (de Maio e Junho), foram realizadas no Laboratório de Química da DCA, empregando-se o método de ELISA (MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation, U.S.A.).

4.2.1. Método de cromatografia em camada delgada

A preparação, extracção e purificação das amostras, foram feitas de acordo com o método descrito por Stubblefield e Shotwell (1981), que apresenta um limite de detenção de 0,1 µg/kg para AFB₁. Para a detecção e quantificação, utilizou-se o método de referência nº 993.17 da AOAC (2005).

Os fígados e as moelas, foram agrupadas em amostras de peso entre 100 à 250g, a partir de um determinado número de amostras elementares seleccionadas aleatoriamente, conforme os princípios descritos pela FAO (1993) e pelo Regulamento

nº 401 da Comissão Europeia (2006). Assim, foram submetidas a análise pelo método CCD, 84 amostras, sendo, 46 amostras de fígado e 38 de moela.

4.2.1.1. Material e equipamentos

Todo o material utilizado para as análises, foram lavados com detergente e enxaguados usando água destilada. A Lista de material e equipamentos (aparelhos) usado para este fim era constituída por:

- Agitador magnético (Stuart-SB 162, UK);
- Balança analítica (Stuart);
- Coluna de vidro para cromatografia, de 150 ml de capacidade, com 22 mm de diâmetro interno, 200 mm de comprimento e, com lã de vidro e torneira de Teflon (MBL, UK);
- Espátulas;
- Espectrofotómetro, com lâmpada UV para medições no ultravioleta, a 365 nm (CAMAG UV Cabinet II, Germany);
- Frascos de Erlenmeyer de 250 e 500 ml, munidos de rolhas (Schott Duran, Germany);
- Funis plásticos;
- Papel de filtro, de diâmetro entre 12 e 24 cm (Whatman®);
- Pipeta automática de 100-1000µl (Brand, Germany);
- Placas de cromatografia em camada fina, Sílica gel 60 F₂₅₄, de vidro, com tamanho de 100 mm x 200 mm (HX821547, Merk, Germany);
- Rotavapor, com balão de fundo redondo de 500 ml de capacidade (Buchi® Waterbath-B-480, Germany);
- Seringas microlítricas de 5 e 10µl (1701, Hamilton Company, USA);
- Tina de vidro para cromatografia;
- Triturador e misturador (Geepas®, Índia);
- Tubos graduados de 10, 50 e 100 ml de capacidade (MBL, UK);
- Vareta de vidro de 30 cm de comprimento;

- Vidros de relógio.

4.2.1.2. Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados na análise de aflatoxina B₁ foram de grau puro, conforme as recomendações da AOAC (2000).

- Acetona (Merk, SA);
- Acetonitrilo (Alpha Chemika, Índia);
- Ácido acético glacial (Alpha Chemika, Índia);
- Ácido cítrico a 20% (Alpha Chemika, Índia);
- Água destilada;
- Benzeno (Merk, SA);
- Clorofórmio (Alpha Chemika, Índia);
- Diclorometano (GCC Diagnostics, UK);
- Éter dietílico, anidro (Alpha Chemika, Índia);
- Gel de sílica 60 de granulometria de 0,04 mm a 0,20 mm para cromatografia em coluna (Fluka, Germany);
- *n*-hexano (68-69°C) (GCC Diagnostics, UK);
- Solução de ácido sulfúrico a 50% (Oxford, Índia);
- Soluções-padrão de aflatoxina B₁ de 2,0 µg/mL e 0,5 µg/mL (06061B-Biopure GmbH, Austria), em acetonitrilo e na mistura de benzeno e de acetonitrilo, respectivamente;
- Sulfato de sódio anidro, granulado (Merk, SA);
- Terra de infusórios (diatomáceas) BDH, Chemicals, UK);
- Tolueno (Oxford, Índia).

4.2.1.3. Avaliação do desempenho do método

Antes de se proceder as análises, foram realizados ensaios de recuperação de AFB₁ através da contaminação artificial de um grupo de amostras de fígado e moela, com o objectivo de avaliar o desempenho da metodologia analítica utilizada, sob condições

locais. Esta avaliação foi feita através da obtenção de seus coeficientes de recuperação e de variação, e limite de quantificação, tomando em conta, o limite máximo de AFB₁ permitido nos alimentos para consumo humano, conforme descrito pela directiva nº 657 da Comissão Europeia (2002).

O coeficiente de recuperação, representado em percentagem (%), corresponde a proporção da quantidade da toxina, adicionada na amostra teste, que é extraída e passível de ser quantificada, conferindo, a exactidão do método. Esta foi obtida através da Equação 1. O coeficiente de variação (CV) é obtido em condições de repetibilidade, conferindo, a precisão do método. O limite de quantificação corresponde a menor concentração de AFB₁ que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exactidão (Comissão Europeia, 2002; Borges, 2005; Oliveira, 2010).

$$\text{Coeficiente de recuperação (\%)} = \left(\frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração adicionada}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Assim, tendo em conta que o limite de AFB₁ permitido nos alimentos para consumo humano, aplicado na União Europeia, e muitas vezes adoptado em Moçambique, é de 4 µg/kg (ppb), adicionou-se em três grupos de quatro (4) fígados e de três (3) moelas cada, alíquotas da solução-padrão de AFB₁ (2,0 µg/mL), de modo a obter amostras contaminações em níveis de 2,0, 4,0, e 6,0 µg/kg (Tabela 13, Anexo I). Uma vez que não houve a comprovação dos grupos de fígados e moelas contaminados, como realmente materiais em branco, isto é, negativos para AFB₁, foi incluído um grupo de 2 fígados e moelas cada, não contaminados (0,0 µg/kg), como controlo, de modo a analisar eventuais discrepâncias.

A análise destas amostras foi realizada em equivalência a 100 g, pela mistura de 30 g de cada amostra contaminada, com 70 mL de água destilada num Erlenmeyer de 500 mL, para posterior recuperação, ou seja, determinação da toxina pelos procedimentos descritos a posterior.

4.2.1.4. Preparação das amostras, extração e purificação

As amostras foram trituradas e misturadas utilizando o triturador e misturador (Geepas®, Índia). Pesou-se 100 g da amostra e colocou-se no Erlenmeyer de 500 mL. Adicionou-se 10 mL de solução de ácido cítrico a 20% (preparada pela dissolução de 200 g de monohidrato de ácido cítrico em 1 litro de água destilada) e misturou-se bem com uma vareta de vidro. Após 5 minutos, adicionou-se 20 g de terra de infusórios e misturou-se novamente. Adicionou-se de seguida 200 mL de diclorometano e submeteu-se o frasco a agitação num agitador magnético durante 30 minutos. Transferiu-se a mistura por filtração¹ em papel de filtro para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 g de sulfato de sódio. Após a obtenção de um volume máximo do filtrado, filtrou-se novamente em papel de filtro para um outro Erlenmeyer de 250 mL e registou-se o volume. Em seguida, recolheu-se filtrado num Erlenmeyer de 250 mL e submeteu-se à evaporação (à $\pm 60^{\circ}\text{C}$) no rotavapor, em banho-maria, quase até à secura e levou-se o extracto para purificação em coluna cromatográfica.

A coluna de separação foi preparada adicionando-se 70 ml de diclorometano (metade da capacidade da coluna) e 2,0 g de gel de sílica ao solvente. Adicionou-se de seguida, 4 mL de diclorometano para remover o resto de sílica depositado nos lados da coluna, aumentando assim a compactação da camada de sílica. Juntou-se 2 g sulfato de sódio, deixando-se depositar acima da camada de sílica, e drenou-se o solvente até atingir a superfície superior da camada de sulfato de sódio. Misturou-se o extracto recolhido na extração com 25 mL de diclorometano, e passou-se quantitativamente a mistura para a coluna. Lavou-se o frasco do extracto com diclorometano e passou-se para a mistura na coluna, e drenou-se o líquido até atingir a superfície superior da camada de sulfato de sódio. De seguida, lavou-se a coluna, sequencialmente, com 25 mL de tolueno-ácido acético (9+1), 25 mL de *n*-hexano e 25 mL de *n*-hexano-éter-acetonitrilo (6+3+1), drenando-se os líquidos até atingir a superfície superior da camada de sulfato de sódio e descartando-os. Durante estas operações manteve-se o débito de líquido de 8 a 12 mL por minuto, não deixando secar a coluna. Eluiu-se as

¹ Durante as filtrações, tapou-se o funil com um vidro de relógio para evitar a evaporação do solvente.

aflatoxinas com 40 mL de diclorometano-acetona (4+1) e evaporou-se o eluato (à $\pm 60^\circ\text{C}$) no rotavapor em banho-maria, quase até à secura, e guardou-se o resíduo para CCD.

4.2.1.5. Detecção, quantificação e confirmação da aflatoxina B₁

A detecção da AFB₁ realizou-se em placas cromatográficas de vidro com desenvolvimento unidimensional, utilizando-se como sistema móvel, a mistura de clorofórmio-acetona (90+10). Para tal, dissolveu-se com clorofórmio o resíduo da amostra obtido na purificação até perfazer 250 μL . Em seguida, colocou-se pontualmente, sobre a placa cromatográfica, volumes aleatórios e não próximos, de 5 e 10 μL para o extracto da amostra e, 2, 5, 10 e 20 μL para a solução-padrão de AFB₁ (0,5 $\mu\text{g/mL}$), a uma distância de 1,5 cm em relação a margem inferior e entre os mesmos, conforme ilustrado na Figura 7, Anexo II. Colocou-se a placa na tina com sistema móvel (mistura de clorofórmio-acetona) e deixou-se correr na placa cromatográfica durante 1 hora.

Após o desenvolvimento, retirou-se a placa e deixou-se em repouso, ao abrigo da luz por 5 minutos, para garantir a evaporação dos solventes. Em seguida examinou-se a placa em câmara escura no espectrofotómetro (CAMAG UV Cabinet II, Germany), sob luz ultravioleta de ondas longas (365 nm).

A quantificação da AFB₁ foi efetuada através da comparação visual das intensidades de fluorescência (das manchas azuis) entre os padrões e os extractos da amostra, com coeficientes de retenção (Rf) semelhantes. A concentração da AFB₁ ($\mu\text{g/kg}$ ou ppb) foi calculada utilizando-se a equação 2 indicada abaixo (Karunyavani, 1991; AOAC, 2005). A confirmação da identidade da AFB₁ foi realizada através da pulverização das placas com ácido sulfúrico (a 50%), resultando na mudança de coloração da fluorescência das manchas sob luz ultravioleta (365 nm), de azuis para amarelas.

$$\text{AFB}_1 (\mu\text{g/kg}) = \frac{S_x Y_x V}{W_x V} \quad (2)$$

Onde: Y e X: Correspondem respectivamente aos volumes em microlitros (μL) da solução-padrão de AFB₁ e do extracto, com fluorescências de intensidade e Rf semelhantes; **S:** Concentração da solução-padrão de AFB₁ em micrograma por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$); **V:** Volume final do extracto em microlitros (μL), após última evaporação, tendo em conta as eventuais diluições; **W:** Peso, em gramas (g), da quantidade da amostra de ensaio correspondente ao volume de extracto submetido a evaporação antes da purificação em coluna.

4.2.2. Método de ELISA

4.2.2.1. Material e equipamentos

Todo o material utilizado para as análises, foram lavados com detergente e enxaguados em água destilada. A Lista de material e equipamentos (aparelhos) usado para este fim era constituída por:

- Agitador vórtex (Stuart-SA8, UK);
- Almofariz metálico;
- Balança analítica (Stuart, UK);
- Centrífuga (5804 R, Eppendorf);
- Espátula;
- Computador (Dell Inc., Austin, U.S.A.) com o programa de leitura de ELISA Gen5 (BioTek[®], Winooski, U.S.A.);
- Leitor de ELISA com medições a 450 nm (EL-800, BioTek[®], Winooski, U.S.A.);
- Micropipetas multicanais: 50-300 μL (Finnpipette[™], Thermo Scientific);
- Micropipetas unicanais: 20, 100 and 1000 μL (Finnpipette[™], Thermo Scientific);
- Papel toalha;
- Placas de ELISA de 96 poços, coatadas com anticorpo de aflatoxina B₁ (1055-04, MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation, U.S.A.);
- Pontas de pipetas: 200-1000 μL ;
- Tubos de centrifugação (Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.);
- Tubos graduados de 50 e 500 mL de capacidade (MBL, UK).

4.2.2.2. Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados na análise de aflatoxina B₁ foram, preparados e conservados, conforme as recomendações do fabricante do *kit*.

- Água destilada;
- Conjugado de aflatoxina B1-HRP (1055-04, MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation, U.S.A.);
- Soluções-padrão de aflatoxina B₁ de 0,00 ng/mL (controlo negativo), 0,02 ng/mL, 0,06 ng/mL, 0,2 ng/mL, 0,6 ng/mL, 1,5 ng/mL e 1000 ng/mL (1055-04, MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation, U.S.A.);
- Solução C (mistura de 70 µL de metanol a 100% com 230 µL do tampão de extracção 1X);
- Solução de lavagem 1X (1055-04, MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation, U.S.A.);
- Substrato TMB (1055-04, MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation, U.S.A.);
- Tampão de extracção 10X (1055-04, MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation, U.S.A.);
- Tampão de extracção 1X (mistura de 10 mL do tampão de extracção 10X com 18 mL de água destilada);
- Tampão de inibição de reacção (1055-04, MaxSignal[®], Bioo Scientific Corporation, U.S.A.).

4.2.2.3. Preparação das amostras e extracção de aflatoxina B₁

A preparação das amostras de fígado e moela de frango e a extracção da AFB₁ foram feitas de acordo com as recomendações do fornecedor do *kit*. As amostras (fígado e moela, incluindo as contaminadas artificialmente) foram trituradas individualmente num almofariz e misturadas usando uma espátula. Pesou-se numa balança analítica, 2 g da amostra usando um tubo de centrifugação de 15 mL, adicionou-se 8 mL de

metanol a 87,5% e agitou-se no vórtex por 3 minutos. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, diluiu-se 300 µL sobrenatante de cada amostra com 900 µL da Solução C (mistura de 70 µL de metanol a 100% com 230 µL do tampão de extracção 1X) e agitou-se no vórtex por 1 minuto, conforme o estabelecido pelo fabricante do *kit*.

Tal como no método CCD, foi feita avaliação do desempenho do método, neste caso, usando duas contaminações artificiais a níveis de 5 e 10 ng/mL. Para tal, utilizou-se extratos de duas amostras do GA1, negativas pelo método CCD e a solução-padrão de AFB₁ de 1000 ng/mL (*spiking*). As contaminações foram preparadas de acordo com a equação 3 a seguir.

$$\text{Volume da solução-padrão } \textit{spiking} \text{ de AFB}_1 = \frac{V_a \times N_c}{S_c} \quad (3)$$

Onde: **V_a:** Corresponde ao volume de amostra a contaminar, neste caso foram 200 µL; **N_c:** Nível de contaminação pretendido (ng/mL); **S_c:** Concentração da solução-padrão de contaminação (*spiking*).

4.2.2.4. Detecção e quantificação de aflatoxina B₁

A detecção de AFB₁ foi feita através do método de ELISA competitivo, utilizando-se o *kit* comercial MaxSignal® (1055-04, MaxSignal®, Bioo Scientific Corporation, EUA), com placas de 96 poços previamente coatadas com anticorpos monoclonais.

Para tal, adicionou-se em duplicado, 50 µL de cada solução-padrão (em sequência ascendente de concentração, de 0,0 a 1,5 ng/mL) e cada amostra, incluindo as contaminadas artificialmente, conforme representado na Figura 8, Anexo II. Posteriormente adicionou-se em cada um dos poços da placa, 100 µL do conjugado de aflatoxina B₁-HRP, agitou-se a placa manualmente por 1 minuto, e deixou-se a incubar por 30 minutos, a temperatura ambiente do laboratório (20 - 25 °C).

Após a incubação, despejou-se completamente o conteúdo da placa, lavou-se a placa três vezes com 250 µL da solução de lavagem 1X em cada lavagem e, secou-se

batendo varias vezes em uma camada de papel toalha. De seguida, adicionou-se em cada um dos poços da placa, 100 µL do substrato TMB, agitando novamente a placa manualmente por 1 minuto, e deixou-se a incubar por 15 minutos (contados a partir da primeira adição do substrato), a temperatura ambiente do laboratório (20 - 25 °C). Após a incubação, 100 µL do tampão de inibição de reacção enzimática e, imediatamente, procedeu-se a leitura da placa num leitor de ELISA (EL-800, BioTek®, Winooski, U.S.A.), a um comprimento de onda de 450 nm.

A quantificação de AFB₁ nas amostras, assim como a construção da curva-padrão, foi efectuada numa folha de cálculo do Excel, com programa de análise MaxSignal® ELISA (Bioo Scientific Corporation, EUA), a partir das médias densidades ópticas relativas obtidas na leitura, considerando-se um coeficiente de variação (%) inferior a 15%. Contudo, para garantir a qualidade necessária dos resultados, algumas amostras positivas foram submetidas a uma repetição. Para amostras repetidas que tiveram o mesmo resultado que o inicial, isto é, positivas para AFB₁, considerou-se como níveis de contaminação conclusivos ou definitivos, os da quantificação inicial.

4.3. Análise de Dados

Foram feitas através do programa estatístico SPSS (versão 20.0, Chicago, SPSS, Inc. 2011), tabelas cruzadas de frequências e percentagens da contagem de fígados por categorias de coloração e, da contaminação das amostras por AFB₁. A significância das diferenças entre os sistemas de produção e abate foi analisada usando o teste Qui-quadrado e o teste exacto de Fisher, respectivamente.

Para os pesos dos fígados, assim como, para os níveis de contaminação dos fígados e moelas por AFB₁, foram feitas, no programa estatístico Prism GraphPad (versão 7.0, San Diego, 2015), análises descritivas, tendo em conta os sistemas de produção e abate, e as categorias de coloração, para o caso dos fígados. Os pesos, assim como, os níveis de contaminação dos fígados por AFB₁, entre as categorias de coloração, foram comparados através da análise de variância (ANOVA) e do teste múltiplo de Tukey. Por outro lado, a comparação dos níveis de contaminação de

AFB₁, entre os tipos de amostra, e entre os sistemas de produção e abate de frangos, foi feita através do teste *t* de student. Todas análises foram realizadas a um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 0,05, considerando-se diferenças estatisticamente significativas para valores de $P < 0,05$.

Analizou-se também a relação entre os níveis de contaminação dos fígados por AFB₁ e os respectivos pesos, através de um gráfico de dispersão, com equação e coeficiente de correlação. A existência de correlação positiva foi considerada para valores de $R^2 > 5$.

5. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Durante a realização do estudo verificaram limitações importantes relativas as amostras e aos procedimentos analíticos.

Em relação a amostras verificou-se, a dificuldade de obtenção do mesmo ou semelhante número de amostras entre os sistemas produtivos estudados. Devido ao modelo de comercialização no mercado informal, o número das amostras de fígado e moela do sistema de produção e abate local (PAL) foi consideravelmente diminuído. Por outro lado, a amostragem realizada pode ser considerada um factor limitante, tendo em vista, o facto de a selecção dos locais de amostragem não ter sido aleatória, assim como por estes, principalmente os de produção e abate local (comunitário) não serem representativos.

Sobre os procedimentos analíticos, pesa o facto de não ter sido possível a análise paralela das amostras pelos dois métodos utilizados, conforme previamente previsto.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Actualmente é frequente em vários países, a utilização das características macroscópicas, como a coloração (cor), consistência e o volume, para além do odor, como parâmetros de avaliação de fígados e outras vísceras comestíveis de aves, para a sua selecção e comercialização *in natura*.

A Tabela 9 apresenta a distribuição dos fígados avaliados nos dois sistemas de produção e abate industrial ou formal (PAI) e local ou informal (PAL) de frangos, entre as categorias de coloração. Dos 294 fígados amostrados, a maioria apresentava uma coloração moderada (43,9%), seguida da coloração normal (38,8%) e coloração pálida ou amarela (17,3%), conforme mostra Figura 6, Anexo II.

Por outro lado, entre os grupos de amostras, o GA1 apresentou maior maior contagem e percentagem de fígados nas três categorias de coloração em comparação com o GA2. No entanto, a distribuição dos fígados entre as categorias de coloração mostrou-se estatisticamente diferente apenas para o GA2 ($P=0,007$).

No grupo de amostras GA1 observou-se para sistema PAI maior percentagem de fígados moderados (49,2%), e para sistema PAL, maior percentagem de fígados normais (38,9%). No grupo de amostras GA2, as amostras provenientes do sistema PAI apresentaram maior percentagem de fígados normais (50%), enquanto, as do sistema PAL apresentaram maior percentagem de fígados normais e moderados (40%). Não foram observadas diferenças estatísticas da distribuição dos fígados entre os sistemas PAI e PAL por categorias de coloração, nos dois grupos amostrais ($P<0,05$).

De acordo com Ito *et al.* (2002) e USDA (2008), a coloração normal do fígado de frangos de corte apresenta-se na escala entre o vermelho-profundo ao castanho-escuro. Esta escala de coloração tem sido utilizada para a aprovação ou rejeição de fígados para comercialização *in natura* (Palmeira-Borges, 2006; USDA, 2008), mesmo sabendo-se que esta varia com a idade e o tipo de alimentação dos frangos de corte (Ito *et al.*, 2002; Barcelos *et al.*, 2006; Palmeira-Borges, 2006; Oliveira *et al.*, 2014).

Tabela 9. Número de fígados por categoria de coloração por grupo de amostras e sistema de produção de abate.

Grupos de amostras	Proveniência	Coloração			P (*)
		Normal	Moderada	Pálida	
GA1	PAI	32,9% (n=46) ^a	49,2% (n=69) ^a	17,9% (n=25) ^a	0,293
	PAL	38,9% (n=21) ^b	37,0% (n=20) ^b	24,1% (n=13) ^b	
GA2	PAI	50,0% (n=35) ^a	40,0% (n=28) ^a	10,0% (n=7) ^a	0,007
	PAL	40,0% (n=12) ^b	40,0% (n=12) ^b	20,0% (n=6) ^b	
Total		38,8% (n=114)	43,9% (n=129)	17,3% (n=51)	

PAI - Produção e abate industrial; GA1 - Grupo de amostras 1; GA2 - Grupo de amostras 2; Produção e abate local; (*) - Valor calculado pelo teste qui-quadrado; Os valores indicados pela mesma letra (*a* ou *b*) não diferem estatisticamente entre si pelo teste qui-quadrado ($P < 0,05$).

Assim, tendo em conta os resultados de coloração encontrados, cerca de 61,2% (n=180) do total de fígados amostrados seriam rejeitados, ou seja, considerados impróprios para a comercialização, por apresentarem a coloração pálida ou amarela na maior parte das suas áreas (dois terços ou mais), o que em parte, resultaria em perdas económicas para os produtores.

Em relação ao peso dos fígados, observou-se de numa análise geral, um peso médio de $42,03 \pm 5,13$ g, com um máximo de 61,0 g, observado nos fígados de coloração pálida ou amarela e, um mínimo de 23,8 g, observado nos fígados de coloração normal. Entre as categorias de coloração, o peso mostrou-se superior nos fígados de coloração pálida ou amarela, seguido dos de coloração moderada e normal, com médias de $44,78 \pm 5,31$ g, $42,66 \pm 4,45$ g e $40,06 \pm 5,07$ g, respectivamente, sendo estas, estatisticamente diferentes ($P < 0,0001$), tanto pelo teste de ANOVA, como pelo teste de Tukey.

A Tabela 10 mostra a variação do peso das amostras de fígado entre grupo de amostras por categoria de coloração. Tal como na análise geral, nos grupos amostrais (GA1 e GA2), o peso foi superior nos fígados de coloração pálida ou amarela, seguido dos de coloração moderada e normal. Diferenças estatísticas do peso dos fígados entre

os grupos amostrais foram observadas apenas nos fígados de coloração normal e moderada ($P < 0,05$).

Tabela 10. Variação do peso de fígados entre os grupos amostrais por categorias de coloração.

Coloração	Grupo de amostras	Peso (g)			P ^(*)
		Mínimo-Máximo	Média±DP	IC95%	
Normal	GA1	34,20 - 49,90	42,64±3,24	41,85 - 43,44	< 0,0001
	GA2	23,80 - 46,80	36,44±4,98	34,97 - 37,90	
Moderada	GA1	25,50 - 49,70	43,26±4,10	42,40 - 44,12	0,0201
	GA2	30,20 - 49,70	41,30±4,96	39,72 - 42,89	
Pálida	GA1	34,20 - 61,00	45,12±5,23	43,40 - 46,84	0,4368
	GA2	36,20 - 50,20	43,78±5,61	40,39 - 47,17	

GA1 - Grupo de amostras 1; GA2 - Grupo de amostras 2; DP - Desvio-padrão; IC95% - Intervalo de confiança de 95% para a média; (*) - Valor calculado pelo teste *t* de student.

Entre os sistemas de produção e abate, observou-se também peso superior nos fígados de coloração pálida ou amarela, seguindo-se os de colorações moderada e normal, para todos os sistemas nos dois grupos de amostras (Figuras 4a, 4b e 4c), com exceção do sistema PAL do GA2, que apresentou média de peso superior para coloração moderada, seguida da pálida ou amarela, e normal (Figura 4d). Diferenças estatísticas das médias de peso entre as categorias de coloração ($P < 0,05$) pelo teste de ANOVA foram observadas apenas nos sistemas PAI e PAL do GA2.

Os resultados observados, de coloração, assim como de peso dos fígados, podem ser devidos aos efeitos primários das aflatoxicose, assim como de outros factores inerentes aos sistemas produtivos e de abate de frangos, que incluem para além da idade do abate dos frangos, tempos prolongados de jejum antes do abate (Whitehead, 1979; Ito *et al.*, 2002; Saeed *et al.*, 2003; Trampel *et al.*, 2005; Palmeira-

Borges, 2006; Oliveira *et al.*, 2014; David Ledoux², em comunicação electrónica, 2016), distúrbios circulatórios, doenças infecciosas e outras toxicoses (Ito *et al.*, 2002; Barcelos *et al.*, 2006; Palmeira-Borges, 2006; Krishnamoorthy *et al.*, 2007; Sarkarati e Doustar, 2012; Oliveira *et al.*, 2014), e exposição de frangos a temperaturas ambientais elevadas (Aengwanich e Simaraks, 2004).

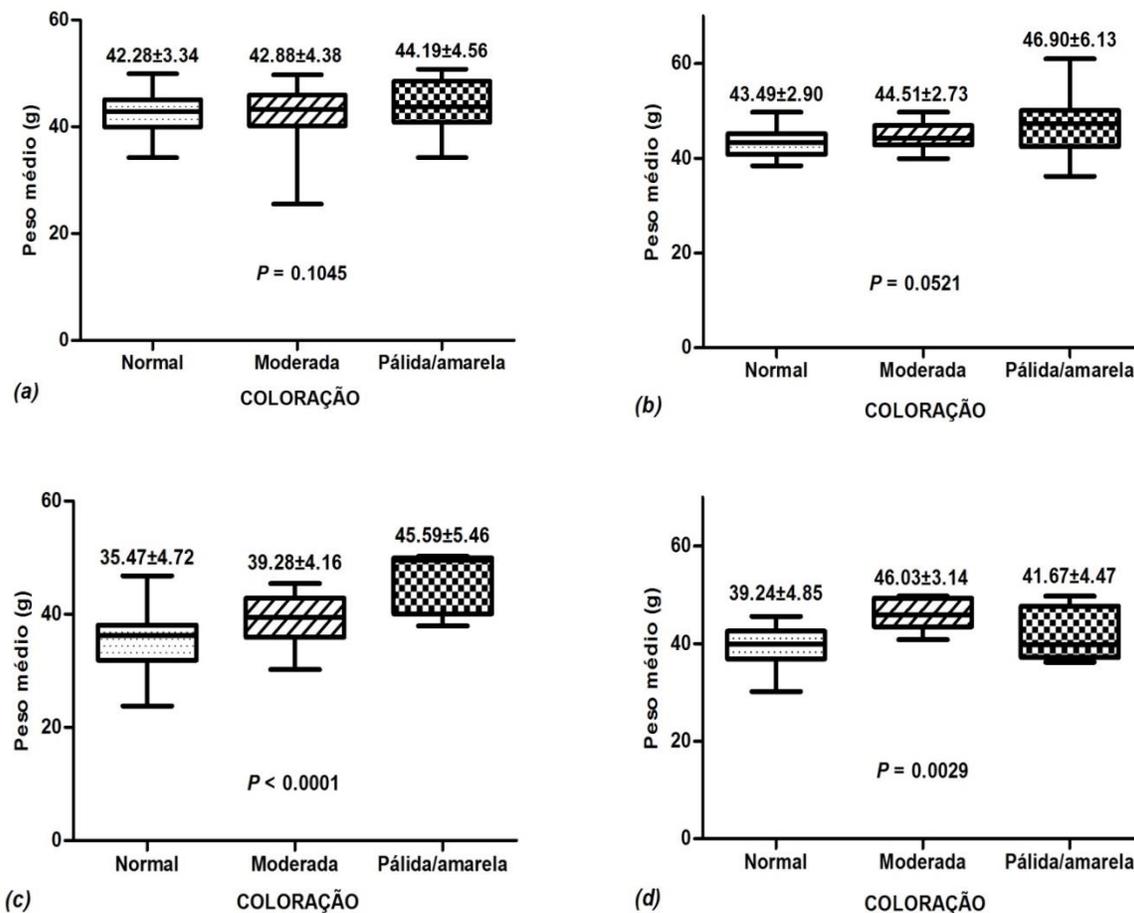


Figura 4. Variação do peso das amostras de fígado entre as categorias de coloração nos dois sistemas de produção e abate de frangos: (a) Sistema industrial (PAI) do Grupo de amostras 1 (GA1); (b) Sistema local (PAL) do Grupo de amostras 1 (GA1); (c) Sistema industrial (PAI) do Grupo de amostras 2 (GA2); (d) Sistema local (PAL) do Grupo de amostras 2 (GA2).

² Professor Emérito, Centro de Pesquisa em Ciências Animais, Universidade de Missouri, Columbia, EUA.

Embora as alterações hepáticas, macroscópicas, não sejam específicas quanto a sua etiologia, são comumente observadas durante as aflatoxicose, onde, o aumento no tamanho e a presença de palidez ou cor amarela, constituem as primeiras alterações a serem observadas (Santurio, 2000; Saeed *et al.*, 2003; Stamford *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2014; Dos Anjos *et al.*, 2016). Para além destas, alterações na textura ou consistência e a presença de lesões também podem ser observadas (Vilar *et al.*, 2002; Saeed *et al.*, 2003; Stamford *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2014; Dos Anjos *et al.*, 2016).

Estas características têm sido reportadas em vários estudos (Vilar *et al.*, 2002; Stamford *et al.*, 2005; Barcelos *et al.*, 2006; Sarkarati e Doustar, 2012). Vilar *et al.* (2002) e Stamford *et al.* (2005), em fígados provenientes de diferentes matadouros, classificados como condenados (impróprios para o consumo), observaram alterações no tamanho ou volume, cor e consistência, apresentando respectivamente, 68% de aumento, coloração amarelada ou pálida e consistência friáveis, como resultado de aflatoxicose. No estudo de Vilar *et al.* (2002) estas características foram observadas em 50% (n=36) das amostras condenadas. Barcelos *et al.* (2006) observaram em 100 fígados colectados numa linha de inspecção num matadouro, alterações na cor, forma, tamanho e consistência em 47 de 90 fígados condenados, dos quais, 24 estavam amarelados ou pálidos, e com outras alterações associadas. Sarkarati e Doustar (2012), também em 384 amostras de fígado proveniente de diferentes matadouros, observaram, para além de outras alterações, 6% de fígados amarelados.

A Tabela 11 apresenta os resultados da incidência e nível de contaminação de AFB₁ em amostras de fígado e moela, colhidas nos dois sistemas de produção e abate de frangos (industrial e local). A AFB₁ não foi detectada em nenhuma das 84 amostras de fígado e moela do GA1, analisadas pelo método de CCD, ao passo que, nas 180 amostras do GA2, analisadas pelo método de ELISA, esta foi detectada em 39% (n=39) das amostras de fígado e 13,8% (n=11) de moelas. Assim, a incidência de AFB₁ nas 264 amostras analisadas através dos dois métodos, foi de 18,9% (n=50).

Os níveis de contaminação por AFB₁ encontrados foram inferiores aos limites estabelecidos para alimentos de consumo humano, pelo *Codex Alimentarius* (10

$\mu\text{g/kg}$), assim como pela legislação de alguns países, como o caso de Brasil e África do Sul ($5 \mu\text{g/kg}$). Contudo, em algumas amostras de fígado ($n=9$) e moela ($n=1$), os níveis de contaminação por AFB_1 foram relativamente superiores ao limite estabelecido na União Europeia ($2 \mu\text{g/kg}$), conforme ilustrado na Tabela 14 (Anexo I).

Entre os sistemas de produção e abate de frangos, a incidência, ao contrario do nível de contaminação das amostras por AFB_1 mostrou-se estatisticamente diferente ($P<0,05$). A AFB_1 foi detectada em 20% e 19% do total dos fígados, provenientes dos sistemas de produção e abate local ou informal de frangos (PAL) e industrial ou formal de frangos (PAI), respectivamente. Os fígados apresentaram uma contaminação média de $1,54 \mu\text{g/kg}$, sendo, $1,73 \mu\text{g/kg}$ para o sistema PAL e $1,34 \mu\text{g/kg}$ para o sistema PAI. O mesmo foi observado nas moelas, com uma incidência de 11,2% do total das moelas, para o sistema PAL e 2,5% para o sistema PAI. A média de contaminação foi de $1,06 \mu\text{g/kg}$, sendo $1,04 \mu\text{g/kg}$ para o sistema PAL e $1,07 \mu\text{g/kg}$ para o sistema PAI. Por outro lado, os níveis, mínimo e máximo de contaminação, foram respectivamente, de $0,57 \mu\text{g/kg}$ e $3,80 \mu\text{g/kg}$, ambos observados em amostras de fígado do sistema PAL.

Estes resultados estão de acordo com Karunyavanij (1991) e Biswas *et al.* (2010) que referem, que nos produtos de origem animal, espera-se encontrar níveis consideravelmente baixos ($0,02$ a $10 \mu\text{g/kg}$) de AFB_1 , muitas vezes abaixo dos limites de detecção dos métodos analíticos, mesmo em casos de exposição dos animais a doses elevadas de AFB_1 . Por outro lado, segundo Rodriguez-Amaya e Sabino (2002) e Biswas *et al.* (2010), que referem que nas aves, níveis altos de resíduos de AFB_1 são comumente encontrados no fígado, em relação a outros órgãos, por ser o principal órgão responsável pela biotransformação destas toxinas.

A diferença de resultados observados entre os métodos de CCD e de ELISA pode ser reflexo do baixo desempenho apresentado pelo método CCD, uma vez que, os coeficientes de recuperação encontrados foram baixos, isto é, não satisfatórios (59,2 à 66%) (Tabela 15, Anexo I). De acordo com a directiva nº 657 da Comissão Europeia (2002), Borges (2005) e Oliveira (2010), na análise de aflatoxinas, as taxas de recuperação são consideradas aceitáveis ou satisfatórias para valores entre 70 a 120%.

Tabela 11. Incidência e nível de contaminação de aflatoxina B₁ nas amostras de fígado e moela dos dois sistemas de produção e abate de frangos.

Amostra	Grupo de amostras e Proveniência	Nº de Amostras Positivas para AFB ₁ ^I	Incidência (%)	Média±DP (µg/kg)	Mínimo-Máximo (µg/kg)
Fígado	GA1-PAI	ND/28 ^a	0,0	-	-
	GA1-PAL	ND/18 ^a	0,0	-	-
	GA2-PAI	19/70 ^{bc}	27,1	1,34±0,57 ^d	0,61 - 2,48
	GA2-PAL	20/30 ^{bc}	66,7	1,73±1,09 ^d	0,57 - 3,80
Moela	GA1-PAI	ND/20 ^a	0,0	-	-
	GA1-PAL	ND/18 ^a	0,0	-	-
	GA2-PAI	2/50 ^{bc}	4,0	1,07±0,37 ^d	0,81 - 1,34
	GA2-PAL	9/30 ^{bc}	30,0	1,04±0,44 ^d	0,68 - 2,12

I - Número de amostras positivas do total de amostras analisadas; GA1-PAI - Grupo de amostras 1 do sistema de produção e abate industrial; GA1-PAL - Grupo de amostras 1 do sistema de produção e abate local; GA2-PAI - Grupo de amostras 2 do sistema de produção e abate industrial; GA2-PAL - Grupo de amostras 2 do sistema de produção e abate local; *ND*: Não detectada; *a* - Amostras (constituídas de um grupo de amostras elementares) analisadas pelo método de cromatografia em camada delgada; *b* - Amostras analisadas pelo método de ELISA; *c* - Os valores não diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste exacto de Fisher; *d* - Os valores não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) pelo teste *t* de student.

No entanto, podem estar por detrás destes baixos coeficientes de recuperação, tal como nas diferenças de resultados, factores relacionados com os procedimentos analíticos e a natureza do método. Em relação aos procedimentos, Trucksess e Stoloff (1979), Borges (2005) e Oliveira (2010), referem que a utilização de solventes extractores como o diclorometano e clorofórmio para a extracção de aflatoxinas em fígados “*in natura*”, sem a inclusão de um agente precipitante de proteínas, como o acetato de chumbo, resulta muitas vezes, na ineficiência da metodologia na extracção de aflatoxinas, devido a geleificação da amostra e retenção de uma fracção de solvente.

Por outro lado, Sabino *et al.* (1995) e Trucksess (2001), referem que nos ensaios de recuperação de aflatoxinas deve-se também considerar ou reconhecer que a

toxina adicionada ao substrato não se comporta da mesma maneira que o endógeno, ou seja, que em casos de ocorrência natural. É também crucial neste aspecto, o conhecimento e a experiência do analista sobre o método (Karunyavanij, 1991). No caso do presente estudo, apesar da experiência comprovada dos analistas do Laboratório de Referência, esta análise tem-se limitado a produtos de origem vegetal.

Em relação a natureza do método, Vilar *et al.* (2002), Salle *et al.* (2001 e 2002), Méllote (2004) e Darsanaki *et al.* (2013), mencionam que o método de ELISA apresenta uma elevada sensibilidade em comparação ao método de CCD, embora, apresente algumas vezes, incidência de resultados falso-positivos, para além da variabilidade de resultados (30 a 300%), baixa reprodutibilidade e possibilidade de resultado falso-negativo. No presente estudo, a ausência de resultados falso-positivos foi garantida através da repetição de pelo menos 30% (n=15) das amostras positivas, para além de considerar-se um coeficiente de variação (%) para cada densidade óptica em duplicado, inferior a 15%. Neste procedimento, a AFB₁ foi detectada em todas as amostras (Tabela 16, Anexo I), inferindo-se então que não houve incidência de resultados falso-positivos nos resultados iniciais.

Baixos resultados de contaminação de fígados e outros órgãos comestíveis de frangos por AFB₁ têm sido reportados em vários estudos (Kalantari *et al.*, 2000; Salle *et al.*, 2001; Rodriguez-Amaya e Sabino, 2002; Stamford *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2013; El-Desouky *et al.* (2014). No Brasil, Salle *et al.* (2001) utilizando o método de ELISA, encontraram em amostras de fígado de frangos de corte, níveis de AFB₁ de 0,54 µg/kg a 2,41 µg/kg. Rodriguez-Amaya e Sabino (2002), num estudo de revisão, encontraram uma variabilidade na incidência de AFB₁ em amostras de fígado de frango, com contaminações entre 0 à 50% das amostras testadas e níveis relativamente baixos, de 0 µg/kg a 3,2 µg/kg. Ainda no Brasil, Stamford *et al.* (2005), utilizando o método de ELISA e CCD encontraram em fígados provenientes de diferentes matadouros, contaminação por AFB₁ em níveis de 0,54 a 2,41 µg/kg, níveis estes, inferiores a 5 µg/kg, estabelecido na legislação como limite máximo de aflatoxina nos alimentos para o consumo humano.

No Paquistão, Khan *et al.* (2013) analisaram a presença de AFB₁ em 264 de tecidos (fígado, rins e músculos) de aves, tendo encontrado nas aves saudáveis positividade em 75,9%, 44,7% e 21,6% das amostras de fígados, rins e músculos, com níveis máximos de 2,0, 0,99 e 0,49 µg/kg, respectivamente. Nas aves doentes a positividade foi de 89,2% 70,8% e 55,4%, com níveis máximos de 7,99 3,99 e 1,99 µg/kg, respectivamente, para amostras de fígados, rins e músculos.

No Egito, El-Desouky *et al.* (2014) analisaram a presença de AFB₁ e AFM₁ em 60 amostras de fígado, moela e coração de frangos de corte cada, pelo método de CLAE, e encontraram 45%, 32% e 25% de contaminação por AFB₁ e, 33%, 25% e 22% por AFM₁, respectivamente, com nível máximo global de 2,24 µg/kg.

Kalantari *et al.* (2000) em 100 amostras de fígado colectadas em vários produtores avícolas no Irão, encontraram através do método CCD 43% de contaminação por aflatoxinas, e níveis máximos de 0,71 µg e 1,1 µg, por 100 gramas de amostra para AFB₁ e AFM₁, respectivamente, após quantificação em CLAE.

Por outro lado, os baixos níveis de contaminação observados, assim como as variações entre os grupos de amostras e entre sistemas de produção e abate podem ser avaliados pela variação natural da contaminação de ração e a consequente exposição dos frangos à AFB₁ nos locais estudados. De acordo com Hussain *et al.* (2010), Feddern *et al.* (2013) e Herzallah *et al.* (2014), a detecção de AFB₁ nos fígados e moelas, assim como outros produtos de origem animal, ocorre quando estes consomem ração ou alimentos contaminados com AFB₁, e geralmente, em níveis de 2,5 a 20 mg/kg (Zaghini *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2010). Esta contaminação das rações e alimentos apresenta muitas vezes tendências sazonais, resultantes das variações das condições climáticas que propiciam o crescimento dos fungos e a produção de aflatoxinas em uma dada região (Stamford *et al.*, 2005; Bintvihok e Davitayananda, 2002; Tajkarimi *et al.*, 2007; Tajkarimi *et al.*, 2008a; Feddern *et al.*, 2013; Morshdy *et al.*, 2015; Darwish *et al.*, 2016).

Portanto, é importante salientar, que nos locais estudados, particularmente nos do sistema de produção e abate industrial, verificaram-se condições e práticas adequadas de manejo alimentar e de armazenamento das rações, que consistiam no

armazenamento das rações em locais com boa aeração, sem evidências da presença de roedores e o rastreio da presença de fungos e aflatoxinas nas mesmas. Por outro lado, os pequenos criadores informais adquirem igualmente a ração nos grandes criadores e em quantidades para consumo imediato, facto que protege contra as más condições de armazenamento.

Para além da variação natural da contaminação das rações e outros alimentos, os baixos níveis de contaminação observados nos tecidos de aves pode estar associada, a rápida excreção apresentada pelas aves (Salle *et al.*, 2001 e 2002; Borges, 2005; Feddern *et al.*, 2013). Embora muitos dados disponíveis na literatura sejam contraditórios, Borges (2005) e Feddern *et al.* (2013), referem que cerca de 90% de AFB₁ ingerida pelos animais é geralmente eliminada do organismo no período de 24 horas, retendo apenas 10% nos tecidos.

Tem sido também reportado, que resíduos de AFB₁ são facilmente detectados tecidos de aves, quando as exposições são prolongadas, devido ao aumento da concentração, porém, diminuindo com o aumento da idade (Mabee e Chipley, 1973; Hussain *et al.*, 2010; Herzallah *et al.*, 2014). Por tanto, o facto de o ciclo de vida dos frangos de corte ser de 28 dias pode ser um factor de protecção contra o acúmulo de AFB₁. Por outro lado, há também evidências de que a exposição concomitante de aves por diferentes tipos de micotoxinas pode aumentar a excreção das toxinas, reduzindo assim a sua retenção (Hassan *et al.*, 2012).

A Tabela 12 apresenta os níveis de contaminação das amostras de fígado por AFB₁ entre as categorias de coloração. Os níveis de contaminação por AFB₁ não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as três categorias. A contaminação mostrou-se superior nos fígados de coloração pálida ou amarela, comparativamente aos de coloração moderada e normal, apresentado respectivamente, médias de 1,63 µg/kg, 1,59 µg/kg e 1,37 µg/kg. Os níveis de contaminação variaram de 0,57 µg/kg a 3,80 µg/kg, sendo ambos observados nos fígados de coloração normal. Entre os sistemas de produção e abate de frangos (PAI e PAL), níveis superiores entre as três categorias de coloração foram verificados no sistema PAL.

Tabela 12. Níveis de contaminação das amostras de fígado por aflatoxina B1 entre as categorias de coloração.

Proveniência	Coloração	Concentração de AFB ₁ (µg/kg) ^a		
		Mínimo-Máximo	Média±DP	IC95%
PAI	Normal	0,61 - 1,55	0,96±0,52 ^b	0,33 - 2,24
	Moderada	0,76 - 2,48	1,53±0,55 ^b	1,11 - 1,96
	Pálida	0,61 - 2,35	1,27±0,61 ^b	0,71 - 1,83
PAL	Normal	0,57 - 3,80	1,53±1,18 ^b	0,54 - 2,52
	Moderada	0,81 - 3,37	1,66±0,93 ^b	0,79 - 2,52
	Pálida	0,77 - 3,68	2,13±1,29 ^b	0,52 - 3,73
PAI+PAL	Normal	0,57 - 3,80	1,37±1,07 ^b	0,67 - 2,08
	Moderada	0,76 - 3,77	1,59±0,72 ^b	1,20 - 1,97
	Pálida	0,61 - 3,68	1,63±1,00 ^b	0,99 - 2,26

PAI - Sistema de produção e abate industrial ou formal de frangos; PAL - Sistema de produção e abate local ou informal de frangos; PAI+PAL - Sistemas de produção e abate industrial e local de frangos; DP - Desvio-padrão; IC95% - Intervalo de confiança de 95% para a média; ^a - Todas amostras pertenciam ao grupo amostras 2 (GA2), analisadas pelo método de ELISA; ^b - Os valores não diferem estatisticamente ($P>0,05$) pelos testes de ANOVA e Tukey.

Por outro lado, também foi avaliada a relação entre os níveis de contaminação e os pesos das amostras de fígado (Figura 6), na qual verificou-se uma correlação negativa, justificada pela linha de tendência linear, assim como pelo valor do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,013$).

Embora nenhuma relação estatística entre os níveis de contaminação por AFB₁ e as categorias de coloração dos fígados, assim como com os pesos, tenha sido evidenciada, as alterações hepáticas observadas são sugestivas de um quadro de aflatoxicose. Segundo, Stamford *et al.* (2005), Kumar e Balachandran (2009), Dos Anjos *et al.* (2015) e Fowler *et al.* (2015), é frequente numa aflatoxicose, observar-se a presença de palidez ou cor amarela e aumento de tamanho nos órgãos de aves, especialmente no fígado.

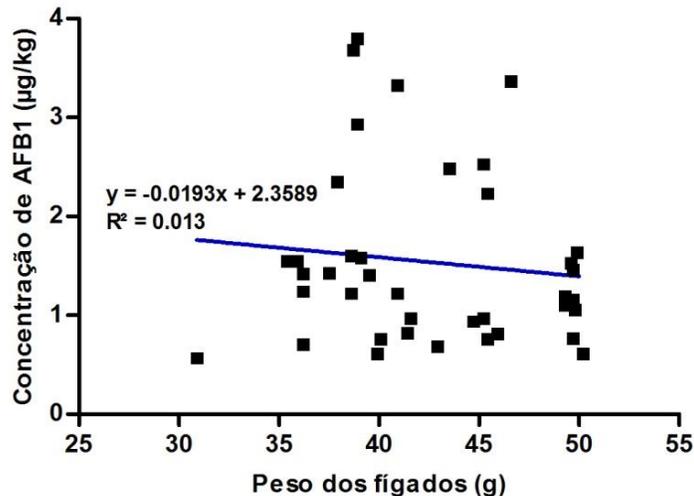


Figura 5. Relação entre o nível de contaminação por aflatoxina B₁ e o peso das amostras positivas de fígado.

Em estudos experimentais, Kumar e Balachandran (2009), observaram após a exposição de frangos de corte por aflatoxina total, fígados com aumento no volume e presença de palidez ou coloração amarelada, enquanto, Fowler *et al.* (2015) e Dos Anjos *et al.* (2016) observaram após exposição de frangos a AFB₁, as mesmas alterações no fígado e rins, para além de uma redução significativa no índice de produtividade dos frangos.

A palidez ou cor amarela e o aumento de tamanho no fígado de aves, resultam, de acordo com Bryden e Cumming (1980) e Santurio (2000), da dificuldade na síntese hepática de lípidos (gordura) pela acção da AFB₁, e respectivo transporte para outras partes do organismo. Esta interferência leva ao aumento dos hepatócitos e a uma generalizada proliferação de células nos ductos biliares, resultando no aumento do volume do fígado (Newberne e Butler, 1969). No entanto, nas aves, os efeitos da aflatoxicose variam de acordo com dose e o tempo de intoxicação das mesmas (Santurio, 2000; Salle *et al.*, 2002; Vilar *et al.*, 2002; Stamford *et al.*, 2005; Diaz e Murcia, 2011; Herzallah *et al.*, 2014).

Portanto, torna-se relevante fazer o rastreio de aflatoxinas e outras micotoxinas nos alimentos destinados a alimentação de frangos de corte, e a avaliação macroscópica do fígado ao nível dos locais de abate, pela sua relativa dimensão na

facilidade de oferecer a melhor observação sobre a condição ou modificação patológica nos frangos. Estas medidas permitirão não só a salvaguarda da saúde do consumidor, pela segurança de vísceras e/ou carnes de frango, mas também, a monitoria da saúde das aves, evitando possíveis perdas económicas resultantes do efeito destas toxinas.

7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A maior parte de fígados amostrados, apresentavam coloração moderada (43,9%), seguida da coloração normal (38,8%) e coloração pálida ou amarela (17,3%), com maior contagem para o sistema de produção e abate industrial (PAI), nas três categorias de coloração. O peso dos fígados mostrou-se para todos os sistemas de produção e abate de frangos, superior nos fígados de coloração pálida ou amarela, seguida da moderada e normal, com $44,78 \pm 5,31$ g, $42,66 \pm 4,45$ g e $40,06 \pm 5,07$ g, respectivamente.

A aflatoxina B₁ foi detectada em 18,9% (n=50) das 264 amostras de fígado e moela. O método CCD mostrou-se ineficiente na análise de aflatoxina B₁ em fígados e moelas, pois, apresentou coeficientes de recuperação não satisfatórios (59,2 à 66%). Todas as amostras positivas de fígado (39%) e de moela (13,8%) foram detectadas pelo método de ELISA, com maior parte das amostras provenientes do sistema de produção e abate local ou informal (PAL).

Os níveis de contaminação das amostras de fígado e moela por aflatoxina B₁, foram inferiores aos limites estabelecidos pelas normas do *Codex Alimentarius* e pela maioria das legislações internacionais, tendo apresentado uma média de 1,73 µg/kg e 1,04 µg/kg no sistema PAL e, 1,34 µg/kg e 1,07 µg/kg no sistema PAI, para fígados e moelas, respectivamente. Os níveis contaminação mínimo e máximo foram, respectivamente, de 0,57 µg/kg e 3,80 µg/kg, ambos observados em amostras de fígado do sistema PAL. Por outro lado, foi verificada uma relação linear negativa entre a ocorrência da aflatoxina B₁ nos fígados e os pesos dos mesmos.

Os baixos níveis de contaminação verificados nas amostras de fígado e moela pressupõem, que estes produtos não apresentam risco à saúde do consumidor. No entanto, sendo o presente estudo o primeiro relato científico no país sobre a ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos de origem animal, particularmente em miudezas de aves, torna-se evidente a necessidade da implantação de programas de pesquisa de resíduos de aflatoxinas, em tecidos ou partes comestíveis de frangos de corte, visto que, qualquer falha de manejo alimentar e/ou armazenamento de rações, pode resultar no desenvolvimento do *Aspergillus* e a consequente produção de aflatoxinas.

Assim, para além de se minimizar perdas de produção, servirão de subsídio científico para os órgãos governamentais, de modo a se implantar programas de monitoria contínua de aflatoxinas na produção avícola, assim como noutros seguimentos agro-pecuários. Por outro lado, dadas as limitações verificadas neste trabalho, há também a necessidade de realizar-se mais estudos de ocorrência de aflatoxinas nos alimentos de origem animal, integrando a optimização dos métodos de análise.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, A., Escobar, A., Margolles, E. e Mella, C. (1989). Dinámica de excreción de aflatoxina M₁ en leche de cabras. **Revista de Salud Animal**. 1: 208-211.
- Aengwanich, W. e Simarakas, S. (2004). Pathology of heart, lung, liver and kidney in broilers under chronic heat stress Songklanakarin. **Journal of Science and Technology**. 26: 417-424.
- Alam, S., Shah, H., Khan, H. e Magan, N. (2012). The effect of substrate, season, and agroecological zone on mycoflora and aflatoxin contamination of poultry feed from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. **Mycopathologia**, 174: 341-349.
- Alemu, T., Birhanu, G., Azerefgne, F. e Skinnnes, H. (2008). Evidence for mycotoxin contamination of maize in Southern Ethiopia: The need for further multidisciplinary research. **Cereal Research Communications**. 36: 337-339.
- Amaral, C.C. e Mlay, G. (2012). Análise de Custos e Rentabilidade da Produção Frangos no Sul de Moçambique: Estudo de caso na granja da Faculdade de Veterinária. Relatório preliminar de pesquisa. **Boletim do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM)**. nº 1. 26 p.
- Anjum, M.A., Khan, S.H., Sahota, A.W. e Sardar, R. (2012). Assessment of aflatoxin B₁ in commercial poultry feed and feed ingredients. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, 22: 268-272
- AOAC. (2005). Natural Toxins. Official method of analysis. 18th Edit., Association of Official Analytical Chemists. Arrington, Virginia. USA. pp. 11-12, 16-18.
- Atici, C. (2013). Food Safety Regulations and Export Responses of Developing Countries: The case of turkey`s and hazelnut exports. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Commodity and Trade Policy. Research Working Paper nº 39. pp. 1-14.
- Augusto, J., Atehnkeng, J., Akello, J., Cotty, P., e Bandyopadhyay, R. (2014). Prevalence and distribution of *Aspergillus* section Flavi in maize and groundnut fields and aflatoxin contamination in Mozambique. (Abstract)

- Phytopathology.** 104 (Suppl. 3): S3.10. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-104-11-S3.10>.
- Barcelos, A.S., Flôres, M.L., Kommers, G.D., Nascimento, V.P., Segabinazi, S.D., Antoniazzi, T. e Bassan, J.D.L. (2006). Gross, microscopic and bacteriologic evaluations of broiler chicken livers (*Gallus gallus*) condemned at slaughter. **Ciência Rural.** 36: 561-567.
- Bbosa, G.S., Kitya, D., Odda, J. e Ogwal-Okeng, J. (2013). Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. **Health.** 5: 14-34.
- Bintvihok, A. e Davitiyananda, D. (2002). Aflatoxins and their metabolites residues in chicken tissues from 5 parts (10 provinces) of Thailand. **Thailand Journal of Health Research.** 16: 37-50.
- Borges, M.B. (2005). Otimização de Métodos Analíticos para Determinação de Aflatoxinas em Rações e Leite de Cabra, e sua Ocorrência no Estado da Bahia. Dissertação. Universidade Federal da Bahia. Salvador, Brasil. p. 112.
- Bryden, W.L. e Cumming R.B. (1980). Observations on the liver of the chicken following aflatoxin B₁ ingestion. **Avian Pathology.** 9: 551-556.
- Cardwell, K.F. (2001). Mycotoxin contamination of foods in Africa: Anti-nutritional factors. **Food and Nutrition Bulletin.** 21: 488-492.
- Comissão Europeia (2006). Decisão da Comissão de 12 de Agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 221 de Agosto. 29 p.
- Comissão Europeia (2006). Regulamento (CE) N.º 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 70 de Março. 12 p.
- Coulombe, R.A. Jr. e Sharma, R.P. (1985). Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B₁ in the rat. **Food and Chemical Toxicology.** 23: 827-830.

- Darsanaki, R.K., Alikhani, F., Mohammadi, M. e Aliabadi, M.A. (2013). Biological Control of Aflatoxins. **Euroopean Journal of Experimental Biology**. 3: 162-166.
- Dawson, K.A., Evans, J. e Kudupoje, M. (2006). Understanding the Adsorption Characteristics of Yeast Cell Wall Preparations Associated with Mycotoxin Binding. In: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Lexington, Proceedings. Alltech. 22. pp.169-181.
- Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N. and Panneerselvam, A. (2011). Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. In. Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Guevara-Gonzalez, R.G. InTech. pp. 221-254.
- Diaz, G.J. e Murcia, H.W. (2011). Biotransformation of aflatoxin B1 and its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species. In. Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Guevara-Gonzalez, R.G. InTech Press. Rijeka. Croatia. pp. 3-20. ISBN: 978-953 307-395-8.
- Diaz, G.J., Lozano, M.C. e Acuna, A. (2009). Prevalence of *Aspergillus* species on selected Colombian animal feedstuffs and ability of *Aspergillus* section Flavi to produce aflatoxins. **World Mycotoxin Journal**. 2: 31-34.
- Dorner, J.W. (2008). Management and prevention of mycotoxins in peanuts. **Food Additives and Contaminants**. 25: 203-208.
- Dors, G.C., Caldas,S.S., Feddern, V., Bemvenuti, R.H., Hackbart, H.C.S., Souza, M.M., Oliveira, M.S., Buffon, J.G., Primel E.G. e Badiale-Furlong , E. (2011). Aflatoxins: Contamination, analysis and control. In. Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Guevara-Gonzalez, R.G. InTech. pp. 415-438. ISBN: 978-953-307-395-8,
- Dos Anjos, F.R., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E. e Chimonyo, M. (2016). Efficacy of Mozambican bentonite and diatomaceous earth in reducing the toxic effects os aflatoxins chicks. **World Mycotoxin Journal**. 9: 63-72.

- EFSA. (2009). Review of Mycotoxin-Detoxifying Agents Used as Feed Additives: Mode of action, efficacy and feed/food safety. Scientific Report. European Food Safety Authority (EFSA). Toulouse. CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01. 192 p.
- El-Desouky, T.A. Mohamed, S.R., Abou-Arab, A.A.K. e Salim, A-B. (2014). Occurrence of aflatoxin B₁ and M₁ in some Egyptian chicken organs and their affected by ozonated water. **Open Science Journal of Modern Physics**. 1: 24-30.
- Espinosa-Calderón, A., Contreras-Medina, L.M., Munoz-Huerta, R.F., Millan-Almaraz, J.R., Guevara-Gonzalez R.G. e Torres-Pacheco, I. (2011). Methods for Detection and Quantification of Aflatoxins. In. Aflatoxins: Detection, Measurement and Control. Ed. Torres-Pacheco, I. InTech. ISBN: 978-953-307-711-6.
- FAO. (1993). Planes de muestreo para análisis de aflatoxinas en maní y maíz. Estudio FAO: Alimentación y nutrición n°55. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Food Agricultural Organization. Roma, Italia.
- FAO. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos. Un compendio. Alimentación y nutrición. Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias (ESNS). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Food Agricultural Organization. Roma, Itália. pp. 1-45.
- FAO. (2013). Poultry Sector Mozambique. FAO Animal Production and Health Livestock Country Reviews. Food Agricultural Organization. N. 5. Rome.
- Farrell, D. (2013). The Role of Poultry in Human Nutrition. In. The Role of Poultry in Human Nutrition. Poultry Development Review. Food Agricultural Organization. ISBN 978-92-5-108067-2.
- Feddern, V., Dors, G.C., Tavernari, F.C., Mazzuco, H., Cunha Jr., A., Krabbe, E.L. e Scheuermann, G.N. (2013). Aflatoxins Importance on Animal Nutrition. InTech. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/51952>.

- Fowler, J., Wei, L. e Bailey, C. (2015). Effects of a calcium bentonite clay in diets containing aflatoxin when measuring liver residues of aflatoxin B₁ in starter broiler chicks. **Toxins**. 7: 3455-3464.
- Freire, F.C.O., Vieira, I.G.P., Guedes, M.I.F. e Mendes, F.N.P. (2007). Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos**. 110. ISSN 1677-1915.
- Geng-Sun, Q., Ronald, K.R., Mimi, C.Y., Jian-Min, Y., Yu-Tang, G., Brian, E.H., Gerald, N.W. e John, D.G. (1994). A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, people's Republic of China. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. 3: 3-10.
- Gowda, N.K.S. e Ledoux, D.R. (2008). Use of antioxidants in amelioration of mycotoxin toxicity: A review. **Animal Nutrition and Feed Technology**. 8: 1-11.
- Gurtoo, H.L. e Motycka, H.L. (1976). Effect of sex difference on the *in vitro* and *in vivo* metabolism of aflatoxin B₁ by the rat. **Cancer Research**. 36: 4663-4671.
- Hassan, Z.U., Khan, M.Z., Khan, A., Javed, I. e Hussain, Z. (2012). Effects of individual and combined administration of ochratoxin A and aflatoxin B₁ in tissues and eggs of White Leghorn breeder hens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 92 1540-1544.
- Herzallah, S., Al-Ameiri, N., Al-Dmoor, H., Masoud S. e Shawabkeh, K. (2014). Meat and organs quality of broiler chickens fed diet contaminated with B₁ Aflatoxin. **Global Veterinaria**. 12: 376-380. DOI: 10.5829/idosi.gv.2014.12.03.82344.
- Hussain, I. (2011). Aflatoxin Measurement and Analysis. In. Aflatoxins Detection, Measurement and Control. Ed. Torres-Pacheco, I. InTech Press. Rijeka. Croatia. pp. 367-396. ISBN: 978-953-307-711-6
- Hussain, Z., Khan, M.Z., Khan, A., Javed, I., Saleemi, M.K., Mahmood, S. e Asi, M.R. (2010). Residues of aflatoxin B₁ in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B₁ levels. **Food Chemical Toxicology**. 48: 3304-3307.

- IARC (2012). Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC monographs. **IARC Monographs, JO.** 51-72.
- Ito, T., Kobayashi, Y., Morita, T., Horimoto, T. e Kawaoka, Y. (2002). Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens. **Virus Research.** 84: 27-35.
- Kalantari, H., Zandmoqadam, A. e Abdolahi, L.S. (2000). Determination of aflatoxins B₁ and M₁ in chicken liver by HPLC. **Journal of Medical, Chemical, Biological & Radiological Defense.** 36: 1-5.
- Karunyavanij, S. (1991). Factors Affecting the TLC of Aflatoxins Analysis. In: Mycotoxin Prevention and Control in Foodgrains. Ed. Semple, R.L., Frio, A.S., Hicks, P.A. e Lozare, J.V. Bangkok, Thailand. FAO Corporate Document Repository. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036e00.HTM>. Acessado em: 09 de Junho de 2016.
- Khan, M.Z., Hameed, M.R., Hussain, T., Khan, A., Javed, I., Ahmad, I., Hussain, A., Saleemi, M.K. e Islam, Nu. (2013). Aflatoxin residues in tissues of healthy and sick broiler birds at market age in Pakistan: A one year study. **Pakistan Veterinary Journal.** 33. 423-427.
- Krishnamoorthy, P., Subbiah, V., Chidambaram B. and Bhakatavatsalam, M. (2007). Pathology of chlorpyrifos and T-2 toxin on broiler chicken. **Veterinarski arhiv.** 77: 47-57.
- Kumar, R. e Balachandran, C. (2009). Histopathological changes in broiler chickens fed aflatoxin and cyclopiazonic acid. **Veterinarski Arhiv.** 79: 31-40.
- Kwiatkowski, A. e Alves, A.P.F. (2007). Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **Revista Saúde e Biologia, Campo Mourão.** 2: 45-54.
- Liu, Y.L., Meng, G.Q., Wang, H.R., Zhu, H.L., Hou, Y.Q., Wang, W.J. e Ding, B.Y. (2011). Effect of three mycotoxin adsorbents on growth performance, nutrient retention and meat quality in broilers fed on mould-contaminated feed. **British Poultry Science.** 52: 255-263.

- Lizárraga-Paulín, E.G., Moreno-Martínez, E. e Miranda-Castro, S.P. (2011). Aflatoxins and Their Impact on Human and Animal Health: An Emerging Problem. In. Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Guevara-Gonzalez, R.G. InTech Press. Rijeka. Croatia. pp. 255-282. ISBN: 978-953 307-395-8.
- Mabee, M.S. e Chipley, J.R. (1973). Tissue distribution and metabolism of aflatoxin B₁-¹⁴C in broiler chickens. **Applied Microbiology**. 25: 763-769.
- Méllote, L. (2004). Survey on the analysis of mycotoxins. **Journal of the Institute of Brewing**. 110: 235-239.
- Mondlane, I.A.P, Capece, B.P.S. e Parruque, A.F. (2005). Relação entre a Ocorrência de Fungos e a Presença de Aflatoxinas B1 em Rações para Aves Fabricadas em Maputo. Boletim do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM). nº 3. 12 p.
- Newberne, P.M. e Butler, W.H. (1969). Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: A review. **Cancer Research**. 29, 236-250.
- Nicolau, Q.C., Borges, A.C.G. e Souza, J.G. (2011) Cutting poultry production chain from Mozambique: characterization and competitiveness. **Revista de Ciências Agrárias**. 1: 182-198.
- Okoli, I.C., Nweke, C.U., Okoli, C.G. e Opara, M.N. (2006). Assessment of the mycoflora of commercial poultry feeds sold in the humid tropical environment of Imo State, Nigeria. **International Journal of Environmental Science and Technology**. 3: 9-14.
- Oliveira, C.A.F. e Germano, P.M.L. (1997). Aflatoxins in foodstuffs: current concepts on mechanisms of toxicity and its involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma. **Revista de Saúde Pública**. 31: 417-424.
- Oliveira, F.R., Machado, F.M.E. e Coelho, H.E. (2014). Estudo anatomopatológico de fígados que levam a condenação total de carcaça, na linha de inspeção, durante o abate de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) na região do Triângulo

- Mineiro. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, Londrina.** 8: 0084-0229.
- Oliveira, G., Ribeiro, J., Fraga, M., Cavaglieri, L., Direito, G. e Keller, K. (2006). Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia.** 162: 355-362.
- Oliveira, M.S. (2010). Validação de Metodologia Analítica para Análise de Aflatoxina M1 e sua Ocorrência em Leite Bovino Comercializado no Sul do Brasil. Dissertação. Universidade Federal Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. p. 105.
- Palmeira-Borges, V. (2006). Principais Lesões Macro e Microscópicas em Frangos de Corte Condenados por Caquexia em Abatedouro: Contribuição ao diagnóstico. Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal. São Paulo, Brasil. p. 125.
- Paul, C.T., Andrew, C.C., Yin B.C., YunYun, G., Andrew, J.H., Andrew, M.P. e Christopher, P.W. (2007). Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. **International Journal of Epidemiology.** 36: 1119-1125.
- Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell’Orto, V. e Cheli, F. (2016). Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on cereal byproducts. **Toxins.** 8: 1-24.
- Pourelmi, M.R., Palizdar, M.H., Shirali, S. e Barami, A.R. (2013). Aflatoxin B₁ contamination in local and industrial eggs measured by ELISA technique in Mazandaran. **European Journal of Zoological Research.** 2: 89-92.
- Rashid, N., Bajwa, M.A., Rafeeq, M., Khan, M.A., Ahmad, Z., Tariq, M.M., Wadood, A. e Abbas, F. (2012). Prevalence of aflatoxin B₁ in finished commercial broiler feed from West Central Pakistan. **The Journal of Animal & Plant Sciences.** 22: 6-10.
- Ravindran, V. (2013a). Main Ingredients Used in Poultry Feed Formulations. In: Poultry Feed Availability and Nutrition in Developing Countries. Poultry

- Development Review. Food Agricultural Organization. ISBN 978-92-5-108067-2.
- Ravindran, V. (2013b). Animal Feed Safety. In. Poultry Feed Availability and Nutrition in Developing Countries. Poultry Development Review. Food Agricultural Organization. ISBN 978-92-5-108067-2.
- Ribeiro, C.L.N., Barreto, S.L.T. e Hannas, M.I. (2015). Micotoxinas encontradas em rações e alimentos utilizados na produção comercial de aves no Brasil. **Revista Eletrônica Nutritime**. 12: 3910-3924.
- Rodríguez-Amaya, D.B. e Sabino, M. (2002). Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**. 33: 1-11.
- Sabino, M., Purchio, A. e Milanez, T.V. (1995). Aflatoxins B₁, M₁ and aflatoxicol in tissues and urine of calves receiving aflatoxin. **Food Additives and Contaminants**. 12: 467-472.
- Saeed, A., Afzal, S., Hussain, M.W., Bokhari, S.Y.A., Shahzad, M.S., Qayyum, A. e Raza, M.H. (2003). Effect of aflatoxin B₁ on different body tissues of *Gallus domesticus*. **Journar of Animal and Veterinary Advances** 2. 2: 76-78.
- Saleemi, M.K., Khan, M.Z., Khan, A., e Javed, I. (2010). Mycoflora of poultry feeds and mycotoxins producing potential of *Aspergillus* species. **Pakistan Journal of Botany**. 42: 427-434.
- Salle, C.T.P., Lorenzini, G., Sfoggia, M., Cé, M.C., Guahyba, A.S., Moraes, H.L.S., Nascimento, V.P. e Salle, F.O. (2001). The presence of aflatoxins in field broiler livers. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**. 29: 101-106.
- Salle, C.T.P., Rodrigues, O., Bavaresco, A., Lorenzini, G., Moraes, H.L.S., Silva, A.B., Nascimento, V.P., Wendelstein, A.C. e Fallavena, L.C.B. (2002). Detecção de aflatoxina B₁ no organismo de frangos de corte através do emprego de anticorpos monoclonais medidos pelo ensaio imuno-enzimático (ELISA). **Acta Scientiae Veterinariae**. 30: 27-30.
- Santurio, J.M. (2000). Mycotoxins and mycotoxicosis in poultry. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. 2. *On-line* version. ISSN 1806-9061.

- Sarkarati, F. e Doustar, Y. (2012). The frequency of liver lesions of broilers slaughtered in Tabriz abattoir. **Annals of Biological Research**. 3: 3439-3443.
- Sawhney, D.S., Vadehra, D.V. e Baker, R.C. (1973). The metabolism of ¹⁴C aflatoxins in laying hens. **Poultry Science**. 52: 1302-1309.
- Scussel, V.M. (2003). Comparison of methods by TLC and HPTLC for determination of aflatoxin M₁ in milk and B₁ in eggs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 23: 46-52.
- Shundo, L., Ruvieri, V., Navas, S.A. e Sabino, M. (2004). Otimização da determinação da aflatoxina M₁ em leite, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em camada delgada. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 63: 43-48.
- Stamford, T.L.M. Vilar, E.A., Bastos, S.T.G. e Silva, C.G.M. (2005). Pesquisa micotoxicológica de produtos avícolas “in natura” e processados. **Boletim do CEPPA, Curitiba**. 23: 135-160.
- Stubblefield, R.D. e Shotwell, O.L. (1981). Determination of aflatoxins in animal tissues. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64: 964-968.
- Tajkarimi, M., Aliabadi-Sh, F., Nejad, A.S., Poursoltani, H., Motallebi, A.A. e Mahdavi, H. (2008a). Aflatoxin M₁ contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. **Food Control**. 19: 1033-1036.
- Tajkarimi, M., Riemann, H.P., Hajmeer, M.N., Gomez, E.L., Razavilar, V. e Cliver, D.O. (2008b). Ammonia disinfection of animal feeds: Laboratory study. **International Journal of Food Microbiology**. 122: 23-28.
- Takino, M., Tanaka, H. e Tanaka, T. (2011). Multi mycotoxin analysis in food products using immunoaffinity extraction. **Methods in Molecular Biology, Clifton**. 747: 259-266.
- Tessari, E.N.C. e Cardoso, A.L.S.P. (2012). Efeitos da aflatoxina sobre as aves: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. 18.

- Trampel, D.W., Sell, J.L., Ahn, D.U. e Sebranek, J.G. (2005). Preharvest feed withdrawal affects liver lipid and liver color in broiler chickens. **Poultry Science**. 84:137-142.
- Trucksess, M.W. (2001). Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. In. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at Turn of the Millennium*. Ed. Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. e Sabino, M. pp. 29-40.
- Trucksess, M.W. e Stoloff, L. (1979). Extraction, cleanup, and quantitative determination of aflatoxins B₁ and M₁ in beef liver. **Journal fo the Association of Official Analytical Chemists**. 62: 1080-1082.
- USDA. (2008). Giblets and Food Safety. Food Safety Information. Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture. 2 p.
- Van Egmond, H.P. e Jonker, M.A. (2004). Worldwide regulations on aflatoxins: The situation in 2002. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**. 23: 273-293.
- Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C. e Jonker, M.A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 389:147-157.
- Vilar, E.A., Oliveira, M.C.M. e Stamford, T.L.M. (2002). Pesquisa micotoxicológica em fígado de aves produzidas e comercializadas em Pernambuco. **Boletim do CEPPA, Curitiba**. 20: 335-346.
- Warth, B., Parich, A., Atehnkeng, J., Bandyopadhyay, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M., e Krska, R. (2012). Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 60: 9352-9363.
- Whitehead, C.C. (1979). Nutritional and metabolic aspects of fatty liver disease in poultry. **Veterinary Quarterly**. 1:150-157.
- Wild, C.P. e Gong, Y.Y. (2010). Mycotoxins and human disease: A largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**. 31: 71-82.

- Wolzak, A., Pearson, A.M. e Coleman, T.H. (1986). Aflatoxin carryover and clearance from tissues of laying hens. **Food and Chemical Toxicology**. 24: 37-41.
- Wu, F. (2015). Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. **World Mycotoxin Journal**. 8: 137-142.
- Wu, F. e Khlangwiset, P. (2010). Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa: Case studies in biocontrol and postharvest interventions. **Food Additives & Contaminants**. 27: 496-509.
- Wu, F., Narrod, C., Tiongco, M. e Liu, Y. (2011). The Health Economics of Aflatoxin: Global burden of disease. International Food Policy Research Institute. Washington. USA. Working Paper n°4. pp. 20.
- Yunus, A.W., Razzazi-Fazeli, E. e Bohm, J. (2011). Aflatoxin B₁ in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. **Toxins**. 3: 566-590.
- Zacarias, A. e Rubio N. (2013). USDA Supports Aflatoxin Mitigation Projects in Mozambique. Global Agricultural Information Network . USDA Foreign Agricultural Service. Gain Report. Pretoria.
- Zaghini, A.G., Martelli, G., Roncada, P., Simoli, M. e Rizzi, L. (2005). Mamanoligosaccharides and aflatoxin B₁ and M₁ residues in eggs and aflatoxin B₁ levels in liver. **Poultry Science**. 84: 825-832.

ANEXOS

Anexo I: Tabelas ilustrativas

Tabela 13. Níveis de contaminação artificial das amostras de fígados e moelas por aflatoxina B₁.

Amostra		Nível de contaminação por AFB ₁ (µg/mL)
Tipo	Quantidade	
Fígado	2 ^a	0,0 ^a
	4	2,0
	4	4,0
	4	6,0
Moela	2 ^a	0,0 ^a
	3	2,0
	3	4,0
	3	6,0

Legenda: a - Grupos de controlo.

Tabela 14. Distribuição das amostras positivas de fígado e moela tendo em conta os limites máximos estabelecidos nas legislações internacionais para alimentos de consumo humano.

Amostra	Grupo de amostras e Proveniência	Número de amostras abaixo			Número de amostras acima		
		CA (10 µg/kg)	UE (2 µg/kg)	Brasil (5 µg/kg)	CA (10 µg/kg)	UE (2 µg/kg)	Brasil (5 µg/kg)
Fígado	GA2-PAI	70	67	70	0	3	0
	GA2-PAL	30	24	30	0	6	0
Moela	GA2-PAI	50	50	50	0	0	0
	GA2-PAL	30	39	30	0	1	0

Legenda: CA - *Codex Alimentarius*; EU - União Europeia; GA2-PAI - Grupo de amostras 2 do sistema de produção e abate industrial; GA2-PAL - Grupo de amostras 2 do sistema de produção e abate local.

Tabela 15. Médias das recuperações e coeficientes de variação obtidos dos fígados e moelas artificialmente contaminadas com aflatoxina B₁.

Amostra	AFB ₁ adicionada (µg/mL)	Quantidade de AFB ₁ recuperada ¹ (µg/kg)	R (%)	DP	CV%
Fígado	0,0 ^a	ND	-	-	-
	2,0	1,184	59,2	0,167	2,8
	4,0	2,480	62,0	0,297	8,8
	6,0	3,960	66,0	0,208	4,4
Moela	0,0 ^a	ND	-	-	-
	2,0	1,249	62,44	0,186	3,5
	4,0	2,587	64,67	0,330	10,9
	6,0	3,953	65,89	0,287	8,2

Legenda: 1 - Valores médios das recuperações nos quatro fígados e três moelas de cada grupo; a - Grupos de controlo, constituídos de dois fígados e duas moelas, respectivamente; R (%) - Coeficiente de recuperação; DP - Desvio padrão da média das recuperações; CV (%) - Coeficiente de variação; ND - Não detectada.

Tabela 16. Incidência de aflatoxina B₁ nas amostras positivas de fígado e moela repetidas.

Amostra	Grupo de amostras e Proveniência	Nº de Amostras Positivas para AFB ₁ repetidas ¹	Incidência de AFB ₁ (%)
Fígado	GA2-PAI	5	100% (5/5)
	GA2-PAL	5	100% (5/5)
Moela	GA2-PAI	2	100% (2/2)
	GA2-PAL	3	100% (3/3)

Legenda: 1 - Número de amostras positivas para aflatoxina B₁, repetidas; GA2-PAI - Grupo de amostras 2 do sistema de produção e abate industrial; GA2-PAL - Grupo de amostras 2 do sistema de produção e abate local; AFB₁ - Aflatoxina B₁.

Anexo II: Figuras de esquemas e ilustrações

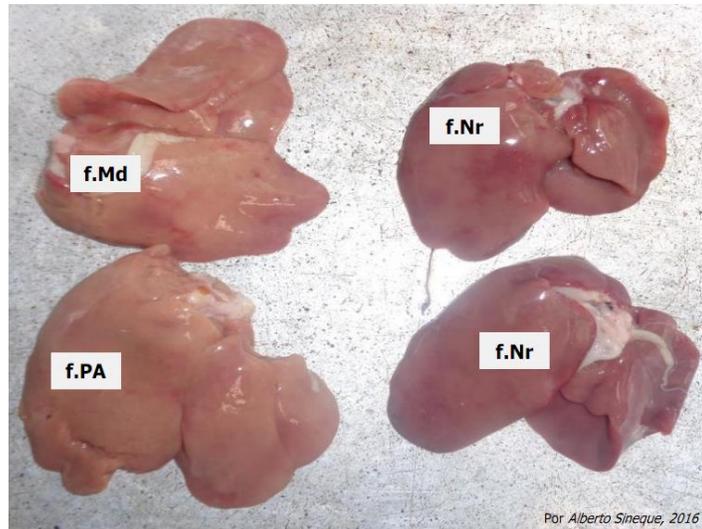


Figura 6. Ilustração das categorias de coloração dos fígados de frango de corte amostrados nos dois sistemas de produção e abate de frangos: f.Md - Fígado moderado; f.PA - Fígado pálido ou amarelo; f.Nr - Fígado normal.

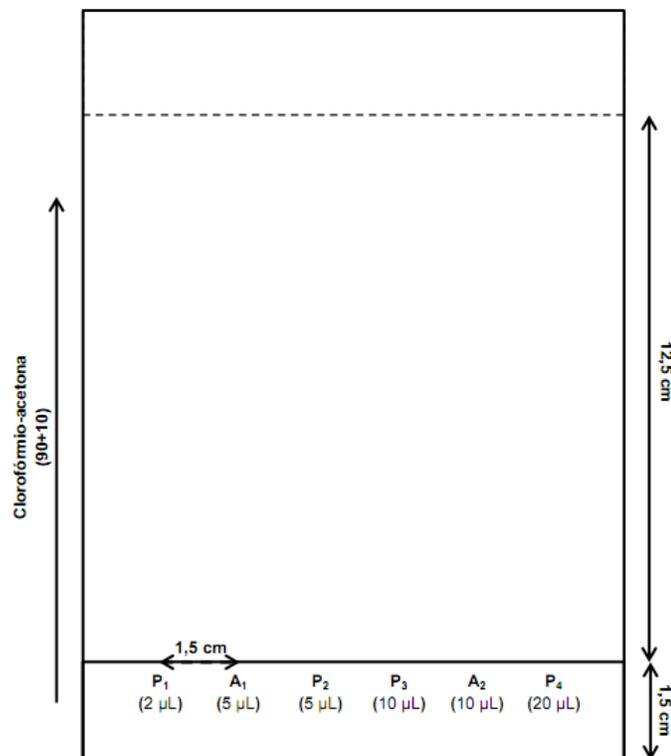


Figura 7. Esquema representativo de uma placa de cromatografia em camada delgada, de desenvolvimento unidimensional: P - Pontos de aplicação do padrão de AFB₁; A - Pontos de aplicação da amostra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	AT1	AT1	AT9	AT9	AT17	AT17	AT25	AT25	AT33	AT33
B	P2	P2	AT2	AT2	AT10	AT10	AT18	AT18	AT26	AT26	AT34	AT34
C	P3	P3	AT3	AT3	AT11	AT11	AT19	AT19	AT27	AT27	AT35	AT35
D	P4	P4	AT4	AT4	AT12	AT12	AT20	AT20	AT28	AT28	AT36	AT36
E	P5	P5	AT5	AT5	AT13	AT13	AT21	AT21	AT29	AT29	AT37	AT37
F	P6	P6	AT6	AT6	AT14	AT14	AT22	AT22	AT30	AT30	AT38	AT38
G	ACA1	ACA1	AT7	AT7	AT15	AT15	AT23	AT23	AT31	AT31	AT39	AT39
H	ACA2	ACA2	AT8	AT8	AT16	AT16	AT24	AT24	AT32	AT32	AT40	AT40

Figura 8. Esquema representativo da distribuição de soluções-padrão (P1 = 0,00 ng/mL; P2 = 0,02 ng/mL; P3 = 0,06 ng/mL; P4 = 0,2 ng/mL; P5 = 0,6 ng/mL; P6 = 1,5 ng/mL), amostras contaminadas artificialmente (ACA1 = 5 ng/mL; ACA2 = 10 ng/mL) e amostras de testagem (AT1-40) numa placa de ELISA.