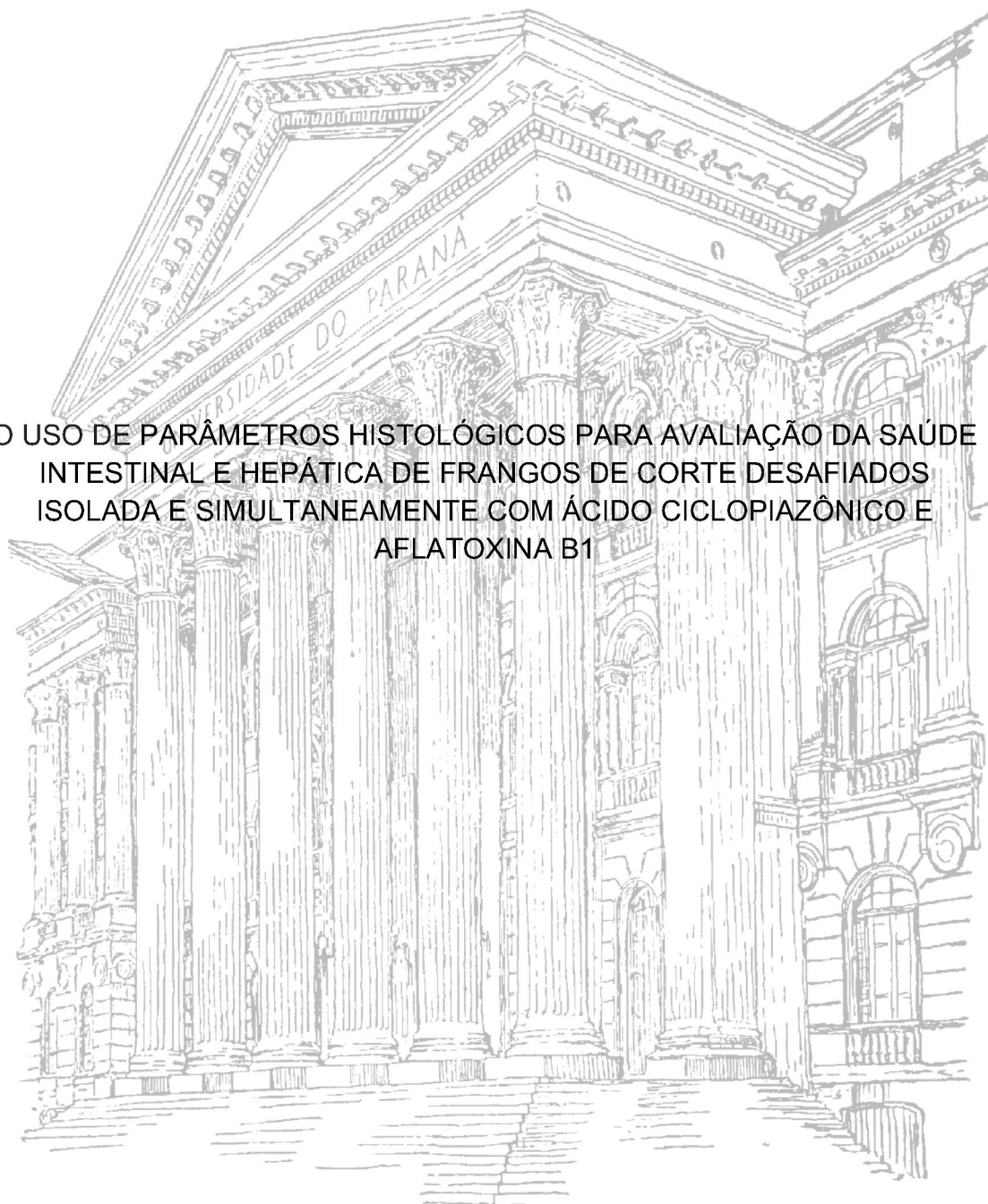


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSICA MARI DOMINGUES

O USO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DA SAÚDE
INTESTINAL E HEPÁTICA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS
ISOLADA E SIMULTANEAMENTE COM ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO E
AFLATOXINA B1



CURITIBA

2024

JESSICA MARI DOMINGUES

O USO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DA SAÚDE
INTESTINAL E HEPÁTICA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS
ISOLADA E SIMULTANEAMENTE COM ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO E
AFLATOXINA B1

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor
de Ciências da Saúde, Universidade Federal
do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner

CURITIBA

2024

Domingues, Jessica Mari

O uso de parâmetros histológicos para avaliação da saúde intestinal e hepática de frangos de corte desafiados isolada e simultânea com ácido ciclopiazônico e aflatoxina B1 [recurso eletrônico] / Jessica Mari Domingues – Curitiba, 2024.
1 recurso online : PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner

1. Micotoxinas. 2. Aflatoxina B1. 3. *Aspergillus flavus*. 4. Intestino delgado.
I. Wagner, Ricardo. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.9529



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JESSICA MARI DOMINGUES** intitulada: **O USO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DA SAÚDE INTESTINAL E HEPÁTICA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS ISOLADA E SIMULTANEA COM ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO E AFLATOXINA B1**, sob orientação do Prof. Dr. RICARDO WAGNER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 05 de Abril de 2024.

Assinatura Eletrônica
12/06/2024 08:46:41.0
RICARDO WAGNER
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
10/06/2024 16:02:18.0
KARINA BETTEGA FELIPE
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
10/06/2024 14:41:53.0
YANNA DANTAS RATTMANN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
12/06/2024 18:16:39.0
ADRIEN WILHELM DILGER SANCHES
Avaliador Externo (UFPR - DEPARTAMENTO DE MEDICINA
VETERINÁRIA)

DEDICATÓRIA

Agradeço e dedico este trabalho aos meus pais. Sem a confiança deles em minhas escolhas nada disso seria possível. Esta tese reforça que todo seu investimento e dedicação valeram a pena.

AGRADECIMENTOS

Impossível não começar agradecendo ao professor Ricardo Wagner. Sou extremamente grata por uma pessoa incrível como ele ter cruzado meu caminho. Com ele me desenvolvi, evolui e aprendi muito mais do que eu esperava. Com toda certeza, sempre será minha referência de professor.

Meus pais sempre me incentivaram a buscar meus objetivos, sempre acreditaram e me deixaram acreditar que sou capaz de fazer o que eu quiser. Minha mãe parece que sempre sabe que todos os meus caminhos estão certos e meu pai sempre me faz transformar o caminho que estou no certo. Então se hoje eu estou concluindo mais uma etapa, mais um caminho que escolhi percorrer, eu com certeza preciso agradecer ao meu porto seguro, meus pais.

Agradeço ao meu irmão que, do jeito Bruno Domingues de ser, sempre me apoia, me incentiva a ser melhor e acredita em mim.

Às minhas melhores amigas Bruna e Marcella, que me ajudam a passar por qualquer dificuldade, que me deram meus presentes mais preciosos que são meus afilhados Gabriel e Eduardo e deixam minha vida mais leve.

Obrigada Isabel, minha parceria de mestrado e doutorado. Com você a caminhada foi mais divertida.

Obrigada ao laboratório de Toxicologia, onde o professor Ricardo e a professora Madalena sempre me apoiaram, me ensinaram e me ajudaram de todas as formas possíveis. Inclusive, já estou com saudade das nossas conversas.

Obrigada ao laboratório de Microbiologia e Patologia de Aves do departamento de Medicina Veterinária. Fui muito bem recebida por todos e recebi muita ajuda. Em especial, agradeço a professora Elizabeth, a Bruna, a Barbara e o Adrien.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de me desenvolver e evoluir e a CAPES pela bolsa de doutorado disponibilizada durante a minha pesquisa.

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que contaminam principalmente cereais. Estes cereais, muitas vezes, são utilizados para a produção de ração e a presença destas substâncias neste material acaba contaminando os animais. Essas toxinas podem danificar órgãos vitais, como o fígado, bem como o tecido epitelial intestinal. Entre essas micotoxinas estão a aflatoxina B1 (AFB1) e o ácido ciclopiazônico (CPA), que podem ocorrer simultaneamente nos alimentos, pois podem ser produzidas pela mesma espécie fúngica, o *Aspergillus flavus*. Em frangos de corte, a micotoxicose tem um grande impacto econômico devido a diversos fatores, como baixa taxa de conversão alimentar, incidência de outras doenças e interferência na capacidade reprodutiva, podendo levar a um problema de saúde pública, uma vez que estes animais podem também ser alimento para o homem. O objetivo do presente estudo foi avaliar histologicamente, pelo método I See Inside (ISI), os efeitos deletérios no fígado, duodeno, jejuno e íleo de frangos na presença de AFB1 e CPA de forma isolada e simultaneamente. Os grupos desafiados com micotoxinas mostraram danos significativos tanto para os fragmentos do intestino quanto do fígado. Todos os grupos desafiados em todos os fragmentos prejudicaram os parâmetros analisados para o epitélio intestinal, sendo proliferação de enterócitos, infiltrado inflamatório no epitélio e proliferação de células caliciformes as principais alterações encontradas. No fígado, a AFB1 foi predominantemente prejudicial quando os parâmetros foram analisados separadamente, mas ao analisar o escore total do ISI, o CPA também se mostrou prejudicial a esse órgão. Outro ponto analisado foi a grande variação entre os pesos das aves contaminadas pela micotoxina enquanto o grupo controle negativo apresenta uma menor variação. Foi possível concluir que mesmo com o foco principal das pesquisas e da legislação ser direcionado para a presença de aflatoxina, o ácido ciclopiazônico também se mostra prejudicial à saúde dos frangos de corte, uma vez que encontramos alterações no intestino delgado e fígado dos grupos desafiados com as duas micotoxinas isoladas e simultaneamente.

Palavras-chave: histologia intestinal, aflatoxina B1, ácido ciclopiazônico, ISI, intestino delgado

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi that mainly contaminate agricultural commodities. These cereals are often used to produce feed and the presence of these substances in this material become contaminating animals. These toxins can damage vital organs, such as the liver, as well as intestinal epithelial tissue. Among these mycotoxins are aflatoxin B1 (AFB1) and cyclopiazonic acid (CPA), which can occur simultaneously in food, as they can be produced by the same fungal species, *Aspergillus flavus*. In broilers, mycotoxicosis has an economic impact due to several factors, such as low feed conversion rate, incidence of other diseases, and interference with reproductive capacity, all of which can lead to a public health problem, since these animals can also be food for man. The aim of the present study was to histologically assess, through the I See Inside (ISI) method, the harmful effects on broiler liver, duodenum, jejunum and ileum in the presence of AFB1 and CPA in isolated and simultaneously. Groups challenged with mycotoxins showed significant damage to both gut and liver fragments. All challenged groups in all fragments impaired the parameters analyzed for intestinal epithelium, with proliferation of enterocytes, inflammatory infiltrate in the epithelium and proliferation of goblet cells being the main changes found. In the liver, AFB1 was predominantly harmful when the parameters were analyzed separately, but when analyzing the total ISI score, CPA was also found to be harmful to this organ. The other point analyzed was the great variation between the weights of the birds contaminated by mycotoxin while the negative control group presents a lesser variation. It was possible to conclude that even with the focus of research and legislation being directed to the presence of aflatoxin, cyclopiazonic acid also proves to be harmful to the health of broiler chickens, since we found changes in the small intestine and liver of groups challenged with the two isolated and simultaneous mycotoxins.

Keywords: gut histology, aflatoxin B1, cyclopiazonic acid, ISI, small intestine

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química das AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 e AFM2.....	24
FIGURA 2- Biotransformação da aflatoxina B1.....	27
FIGURA 3- Áreas e populações de risco de exposição crônica à aflatoxina.....	33
FIGURA 4 - Estrutura química do ácido ciclopiazônico	34
FIGURA 5- Limite máximo mundial para aflatoxinas totais em alimentos	38
FIGURA 6 - Limite máximo mundial para aflatoxina B1 em alimentos	38
FIGURA 7 - Limite máximo mundial para aflatoxina M1 em leite	39
FIGURA 8 – Curva padrão CPA (a) e AFB1 (b)	48
Figura 9 - Escores totais de alteração histológica ISI no duodeno (a) e íleo (b).....	50
Figura 10 - Escores totais de alteração histológica ISI no jejuno.....	51
Figura 11- Fotomicrografias de cortes de jejuno de frango de corte	52
FIGURA 12 – Fotomicrografias de cortes de íleo de galinha corados com hematoxilina e eosina.....	54
FIGURA 13 – Escores totais do ISI para alterações histológicas do fígado em diferentes grupos	55
Figura 14 - Fotomicrografias de cortes de fígado de galinha corados com hematoxilina e eosina.....	56

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Fatores que influenciam na produção e nos níveis de micotoxinas em alimentos	22
QUADRO 2- Micotoxinas produzidas por espécies de <i>Aspergillus</i>	26
QUADRO 3 - Limite máximo de tolerância de aflatoxinas em alimentos	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições para análise por cromatografia líquida de alta eficiência	43
Tabela 2 - Concentrações testadas de aflatoxina B1 e Ácido Ciclopiazônico para a curva padrão.....	44
Tabela 3 - Escores de alterações histológicas do ISI avaliados no intestino e no fígado	46
Tabela 4 - Peso das aves obtido durante os 28 dias	49
Tabela 5 - Peso dos frangos de corte no dia 28	50
Tabela 6 - Resultados encontrados das alterações histológicas do ISI no epitélio intestinal nos grupos testados	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	–	Aflatoxina
AFB1	–	Aflatoxina B1
AFB2	–	Aflatoxina B2
AFG1	–	Aflatoxina G1
AFG2	–	Aflatoxina G2
AFM1	–	Aflatoxina M1
AFM2	–	Aflatoxina M2
ATA	–	Aleucia Tóxica Alimentar
ATP	–	Adenosina trifosfato
CLAE	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	–	Controle negativo
CPA	–	Ácido ciclopiazônico
CYP450	–	Citocromo P450
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
pH	–	Potencial hidrogeniônico
ISI	–	I See Inside

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	5
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 MICOTOXINAS.....	18
3.2 ALIMENTOS CONTAMINADOS POR MICOTOXINAS	20
3.3 MILHO	20
3.4 DERIVADOS DE ANIMAIS.....	21
3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS.....	21
3.6 AFLATOXINAS.....	23
3.6.1 Fungos produtores de aflatoxinas	25
3.6.2 Toxicocinética da aflatoxina.....	26
3.6.4 Relatos de casos de intoxicações agudas e crônicas por aflatoxinas.....	30
3.7 ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO	33
3.7.1 Toxicocinética do ácido ciclopiazônico	34
3.7.2 Toxicodinâmica do ácido ciclopiazônico.....	35
3.7.3 Relatos de casos de intoxicação por ácido ciclopiazônico	35
3.8 LEGISLAÇÃO	37
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 COMITE DE ÉTICA.....	41
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL, ANIMAIS E HABITAÇÃO	41
4.3 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES.....	42
4.4 ANÁLISE DAS MICOTOXINAS EM RAÇÃO	42
4.4.1 Extração das micotoxinas	42
4.4.2 Purificação dos extratos.....	43
4.4.3 Análise da ração por cromatografia líquida de alta eficiência.....	43
4.4.4 Curva padrão Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	43
4.5 DESAFIO DOS ANIMAIS	44
4.6 PESO.....	44
4.7 COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	44

4.8 MÉTODO I SEE INSIDE (ISI).....	45
FONTE: BELOTE <i>et al.</i> , 2018.....	47
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5 RESULTADOS	47
5.1 ANÁLISE DA RAÇÃO	48
FIGURA 8 – Curva padrão CPA (a) e AFB1 (b)	48
5.2 ANÁLISE DE GANHO DE PESO	49
5.3 ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE TECIDOS	50
5.3.1 Intestino.....	50
5.3.2 Fígado	54
6 DISCUSSÃO.....	57
6.1 Ganho de peso.....	57
6.2 Intestino.....	57
6.3 Fígado	59
7 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	62
ANEXO 66	

1 INTRODUÇÃO

Normalmente, os fungos que produzem micotoxinas como metabólito secundário se desenvolvem durante o armazenamento dos grãos em silos apresenta alto teor de umidade (MÁRCIA; LAZARRI, 1998). As doenças causadas por essas toxinas são chamadas de micotoxicoses e levam principalmente a lesões em órgãos como fígado e rins, além de lesões no tecido epitelial. Eles também podem atuar no sistema imunológico, seja como imunoestimulantes ou imunossupressores, dependendo do tipo de micotoxina (PETSKA; BONDY, 1990; OLIVEIRA; CORASSIN, 2014).

Entre as inúmeras micotoxinas existentes e conhecidas estão as aflatoxinas (AF). Existem mais de 20 aflatoxinas conhecidas, mas as mais importantes neste grupo são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. O AFB1 se destaca entre os principais AFs devido a sua atividade carcinogênica em animais (ZAIN, 2011).

O ácido ciclopiazônico (CPA) é conhecido por ser um metabólito secundário de várias espécies de *Penicillium*, mas as espécies de *Aspergillus*, conhecidas pela síntese de aflatoxinas, têm o CPA como um de seus principais metabólitos secundários. A toxicidade do CPA em muitas espécies animais tem sido estudada: causa perda de peso, diarreia, degeneração e necrose dos músculos e vísceras, bem como convulsão e morte em roedores, pássaros, cães e suínos (HAYASHI; YOSHIZAWA, 2005; MOLDES-ANAYA *et al.*, 2009; HEPERKAN *et al.*, 2012).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) descobriu que sessenta e um países têm limites regulamentados para a presença de aflatoxinas, enquanto não há leis que regulam os valores de CPA (FAO, 2004).

Em animais monogástricos, como frangos de corte, a micotoxicose é considerada um grande problema. Isso se deve ao impacto econômico ligado não apenas à mortalidade, mas também ao agravamento da conversão alimentar, aumento da incidência de outras doenças, danos a órgãos vitais e

interferência na capacidade reprodutiva. As consequências da micotoxicose levam a efeitos negativos na saúde pública, principalmente porque as aves são utilizadas como alimento, favorecendo a disseminação de micotoxinas e o aparecimento de micotoxicoses (AKANDE *et al.*, 2006; OLIVEIRA; CORASSIN, 2014).

A contaminação de animais por mais de uma micotoxina é possível devido à coocorrência dessas toxinas em alimentos, comprovada por pesquisas de monitoramento de coexposição (ALASSANE-KPEMBI *et al.*, 2017). Essa exposição simultânea pode ter efeitos antagônicos, aditivos ou sinérgicos.

Assim, este estudo visa evidenciar, por meio do método I See Inside (ISI), os danos causados pela aflatoxina B1 e ácido ciclopiazônico isolada e simultaneamente na histologia do intestino delgado, local de absorção das micotoxinas, e no fígado, órgão vital em frangos de corte, galinhas, e também o efeito no ganho de peso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo a pesquisa dos efeitos causados em frangos de corte por aflatoxina B1 e ácido ciclopiazônico de forma isolada e simultânea utilizando a metodologia I see inside (ISI).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o peso dos animais durante o período do experimento;
- Realizar as análises histopatológicas de fragmentos do intestino e fígado dos animais após a contaminação pelas micotoxinas;
- Determinar escores através da metodologia ISI para as lesões encontradas;
- Analisar estatisticamente as lesões comparando os grupos desafiados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICOTOXINAS

Toxinas são substâncias sintetizadas por plantas, animais ou micro-organismos como as micotoxinas que são metabólitos produzidos por fungos e que apresentam riscos a saúde humana e animal (TURNER *et al.*, 2009).

O termo micotoxina tem origem grega, onde a palavra *mykes* significa fungo e no latim *toxicum* refere-se à toxina ou fungo tóxico (BULLERMAN, 1999). Estas substâncias são diversos metabólitos de baixa massa molecular, produzidos por fungos, porém são estruturalmente diversas. Após a descoberta das aflatoxinas em amendoins na década de 1960, as pesquisas de micotoxinas em alimentos cresceram e então foram descobertos mais de 100 fungos toxigênicos e mais de 300 micotoxinas (SHENG *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 2009).

As micotoxinas apresentam diferentes efeitos biológicos. Elas podem ser carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, estrogênicas, hemorrágicas, imunotóxicas, nefrotóxicas, hepatotóxicas, dermatóxicas e neurotóxicas. As doenças causadas por estas substâncias são chamadas de micotoxicoses. A natureza global destas micotoxicoses é baseada em doenças humanas bem documentadas como o ergotismo na Europa, que é provavelmente a mais antiga micotoxicose conhecida, aflatoxicoses agudas no sul e leste da Ásia e aleucia tóxica alimentar (ATA) na Rússia (STEYN, 1995).

Em um importante trabalho publicado pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*), aflatoxinas, desoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxina e zearalenona foram consideradas as cinco micotoxinas que apresentam maior risco à saúde humana e animal (IARC, 1993).

Existem vários fatores que apresentam influência sobre a integridade do alimento, um exemplo comum é o clima. Esta influência climática pode apresentar impacto sobre a segurança do alimento desde a produção primária

até o consumo, por afetar todos os componentes da tríade epidemiológica, hospedeiro, agente e ambiente (TURNER *et al.*, 2009; TIRADO *et al.*, 2010).

Mesmo com o alto número de micotoxinas já conhecidas, apenas 20 são conhecidas por ocorrência em alimentos com níveis e frequência significativa para apresentar riscos à segurança alimentar. Existem cinco fungos que são os principais produtores destas micotoxinas: *Claviceps*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (STEYN, 1995).

Leveduras e fungos são encontrados em uma variedade de condições ambientais devido a sua capacidade de utilizar vários substratos e de tolerar valores baixos de pH, baixa atividade-água e baixas temperaturas, por isso a contaminação por micotoxinas pode ocorrer tanto em regiões temperadas como em tropicais, dependendo da espécie fúngica em questão. Os alimentos apresentam nutrientes essenciais para o crescimento fúngico, como os carboidratos, então é comum a contaminação destes, ocorrendo através da sua deterioração (GARCIA *et al.*, 2009; TURNER *et al.*, 2009).

Não é obrigatório que quando exista a presença de fungos no alimento exista também a ocorrência de micotoxina, pois nem todos os fungos são toxigênicos e nem sempre as condições do alimento são favoráveis para a produção da mesma. Existe ainda a produção por fungos de substâncias utilizadas em prol da saúde, como a penicilina, antibiótico muito utilizado na prática clínica (BINDER *et al.*, 2007).

As micotoxinas são quimicamente e estruturalmente diversas, porém a maioria é sintetizada por reações de biossíntese simples a partir de moléculas como acetato, piruvato e outros, após a fase de crescimento balanceado do fungo. Durante certo tempo este fato foi considerado estranho devido aos diversos efeitos tóxicos apresentados por micotoxinas (TURNER *et al.*, 2009). Existem evidências para indicar que quanto maior a complexidade do caminho de síntese de uma micotoxina, menor a quantidade de espécies capaz de produzir a mesma (D'MELLO *et al.*, 1997).

3.2 ALIMENTOS CONTAMINADOS POR MICOTOXINAS

Existem muitas micotoxinas já conhecidas, porém poucas são as encontradas regularmente em alimentos. Na dieta normal de humanos e animais, a exposição a diferentes micotoxinas é possível, principalmente em baixas concentrações e com certa frequência, o que muitas vezes apresenta danos mais graves a saúde do que uma intoxicação aguda. Existem vários alimentos passíveis de contaminação por micotoxinas, como grãos e cereais, que apresentam baixos níveis de contaminação, porém com frequência alta, favorecendo assim a intoxicação crônica, uma vez que estes alimentos são frequentemente consumidos pela população brasileira e também são base para a produção de ração animal. A FAO estimou que mais de 25% de alimentos no mundo são contaminados por micotoxinas. O risco de contaminação por micotoxinas é uma grande preocupação quanto à segurança alimentar, principalmente de grãos e outros produtos agrícolas (WHO, 1999; KUMAR, BASU; RAJENDRAN, 2008).

3.3 MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é um ótimo substrato para a produção de micotoxinas potencialmente perigosas para a saúde humana e animal (KPODO *et al.*, 2000). As espécies de *Aspergillus* são colonizadoras importantes em milho e dentre essas espécies as principais que crescem e produzem aflatoxinas são *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (GALATI; GIANNUZI; GINER, 2011).

Para produtos à base de milho, a primeira etapa de produção realizada é a moagem. Além de afetar o rendimento e a composição dos grãos devido à quebra física dos núcleos, a moagem também apresenta impacto sobre os níveis de micotoxinas, aumentando a contaminação (BURGER, 2013).

A primeira intoxicação por milho contaminado com AF foi relatada na Índia em 1975, quando os Bhils (segundo maior grupo tribal distribuído pelo país) estavam consumindo milho contaminado com *A. flavus*. Em torno de 400

pessoas foram afetadas durante este evento (KUMAR; BASU; RAJENDRAN, 2008).

Foi relatado também que as amostras de milho cultivadas em estações chuvosas apresentam uma maior incidência de AF do que as cultivadas em estações secas. Esta diferença entre as estações deve-se a dificuldade que os agricultores apresentavam de reduzir os níveis de umidade do milho para tornar o produto seguro, aumentando assim a probabilidade de contaminação por fungos (JANARDHANA *et al.*, 1999).

3.4 DERIVADOS DE ANIMAIS

Na criação de animais a contaminação por micotoxinas também pode ocorrer. Em animais monogástricos como frangos de corte, a micotoxicose é um problema considerado importante devido ao impacto econômico relacionado não só a mortalidade como também a baixa conversão alimentar, aumento da incidência de outras doenças, danos a órgãos vitais, interferência na capacidade reprodutiva e devido aos efeitos negativos na saúde pública (ABUBAKAR *et al.*, 2016).

Sabe-se que ruminantes possuem melhor capacidade de eliminar as micotoxinas, sendo mais tolerantes enquanto suínos e frangos são os animais mais afetados negativamente. Os danos causados pelas micotoxinas não ficam apenas nos animais, elas se concentram na carne, ovo e leite produzido pelos mesmos, produtos utilizados na alimentação básica dos seres humanos (ABUBAKAR *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2015).

3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS

Em relação à segurança dos alimentos, a única substância química que apresenta riscos aos alimentos são as micotoxinas (GARCIA *et al.*, 2009). A presença de fungos nos alimentos não implica necessariamente na presença de

micotoxinas, principalmente devido a fungos fazerem parte da microflora de alimentos e cultivos. Sabe-se que quase todos, ou todos os problemas relacionados à contaminação de alimentos por micotoxinas deve-se a interação entre as práticas agronômicas, a presença de fungo produtor de micotoxinas e a fatores biofísicos (BINDER *et al.*, 2007; TIRADO *et al.*, 2010). Os níveis de produção de micotoxinas vão depender de fatores físicos, químicos e biológicos durante as fases de cultivo, manuseamento e armazenamento do alimento conforme o QUADRO 1 (BRYDEN, 2012)

QUADRO 1 - Fatores que influenciam na produção e nos níveis de micotoxinas em alimentos

Fatores físicos	Fatores químicos	Fatores biológicos
Umidade	Dióxido de carbono	Variedade vegetal
Temperatura	Oxigênio	Estresse
Umidade relativa	Composição do substrato	Insetos
Danos mecânicos	Pesticidas e fungicidas	Quantidade de esporos

FONTE: BRYDEN (2012).

Existem vários fatores que apresentam influência sobre a integridade do alimento, um exemplo comum é o clima. Esta influência climática pode apresentar impacto sobre a segurança do alimento desde a produção primária até o consumo por afetar todos os componentes da tríade epidemiológica, hospedeiro, agente e ambiente. Comumente, alimentos que são armazenados por mais que alguns dias são possíveis alvos para o crescimento fúngico e contaminação por micotoxinas (TURNER *et al.*, 2009).

Leveduras e fungos são encontrados em uma variedade de condições ambientais devido a sua capacidade de utilizar vários substratos e de tolerar

valores baixos de pH, baixa atividade-água e baixas temperaturas, por isso a contaminação por micotoxinas pode ocorrer tanto em regiões temperadas como em tropicais, dependendo da espécie fúngica em questão, como o *Aspergillus*, que pode tolerar condições com menores taxas de atividade-água do que o *Fusarium*, e então é encontrado com maior frequência em alimentos contaminados. A presença de nutrientes essenciais nos alimentos, como os carboidratos, é essencial para o crescimento fúngico, então é comum a contaminação destes, ocorrendo assim a sua deterioração (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; BRYDEN, 2012).

Alimentos que são armazenados por mais que alguns dias geralmente são possíveis alvos para o crescimento fúngico e contaminação por micotoxinas, que podem ocorrer tanto em regiões temperadas como em tropicais, dependendo apenas da espécie fúngica. Isso ocorre devido ao maior tempo de exposição a condições consideradas de estresse em que estes alimentos ficam apresentando maior contato com estes fatores que favorecem a contaminação (TURNER *et al.*, 2009).

3.6 AFLATOXINAS

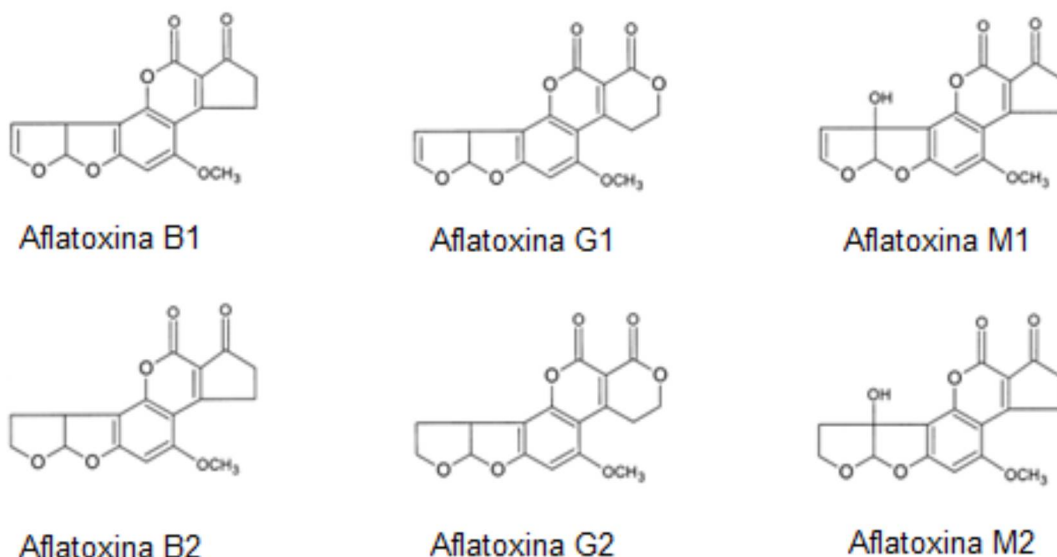
Em 1960, após a morte de mais de 100.000 perus com necrose aguda do fígado e hiperplasia do ducto biliar devido à contaminação por aflatoxinas, estas substâncias foram isoladas, caracterizadas e rastreadas em farelos de amendoim consumidos por esses animais e então foram identificadas como a causa da doença X do peru. Estas toxinas são produzidas principalmente por fungos da espécie *Aspergillus* e é baseado nisso que recebe o nome de aflatoxina, que significa A-flavus-toxins (D'MELLO *et al.*, 1997; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

As AFs são o grupo de micotoxinas mais estudados, com mais de 5000 publicações. Existem mais de 20 aflatoxinas já conhecidas, porém as de maior importância deste grupo são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. Destaca-se a AFB1 entre as principais AFs devido a sua atividade carcinogênica em animais.

Existem também as AFM, metabólitos hidroxilados das AFB encontradas primeiramente em tecidos animais e fluidos como leite e urina (HUSSEIN; BRASEL, 2001; RICHARD, 2007; ZAIN, 2011).

As propriedades biológicas das AFs estimulam constantes pesquisas para a elucidação de seus mecanismos molecular e celular, especialmente devido ao efeito carcinogênico. As AFs (FIGURA 1) são grupos diidrofurano ou tetraidrofurano fundidos a um anel de cumarina. Essas moléculas apresentam fluorescência sob a luz ultravioleta e são caracterizadas por esta propriedade. As AFB apresentam fluorescência azul enquanto as AFG apresentam fluorescência verde, e por isso são assim chamadas (STEYN, 1995; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

FIGURA 1 - Estrutura química das AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 e AFM2



FONTE: HUSSEIN; BRASEL (2001)

As aflatoxinas comumente contaminam commodities agrícolas e animais de produção, apresentando-se diretamente relacionadas ao aumento de mortalidade dos mesmos. Esta contaminação causa uma grande perda econômica por reduzir significativamente o valor dos grãos, dos animais e dos

produtos exportados e produzidos por eles, além de causar impacto sobre a saúde humana e animal (RODRIGUES *et al.*, 2009; ZAIN, 2011).

3.6.1 Fungos produtores de aflatoxinas

Os principais fungos produtores de aflatoxinas são os do gênero *Aspergillus*, características particulares quanto à taxonomia dividem este gênero em sessões. Entre essas sessões encontram-se *Fumigati*, *Circumdati*, *Nigri* e a sessão *Flavi* que apresenta os dois maiores produtores de aflatoxinas, o *A. flavus* e o *A. parasiticus* (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006).

É comumente aceito que *A. parasiticus* possui uma maior quantidade de cepas produtoras das 4 principais aflatoxinas enquanto cepas de *A. flavus* comumente produzem AFB1 e AFB2, porém ele também produz ácido ciclopiazônico, micotoxina encontrada junto as aflatoxinas nos amendoins que causaram a morte dos perus em 1960. Em ambas as espécies existem cepas não aflatoxigênicas (D'MELLO *et al.*, 1997).

Em 1965, Raper e Fennell alegaram que o *Aspergillus* sessão *flavi* é composto por nove espécies e duas variações baseando-se na coloração e organização dos conídios. Em 2006 verificou-se que três espécies apresentam conídios com coloração do amarelo ao ocre e 12 espécies contém conídios com cor do verde ao marrom, incluindo *A. flavus* e *A. parasiticus*. (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006).

Dentro da sessão *flavi*, o *A. nomius* também tem sido descrito como um potente produtor de aflatoxinas, porém encontrado com menor frequência. Esta dificuldade para identificar *A. nomius* pode ocorrer devido a sua forte semelhança com o *A. flavus*, podendo apresentar possíveis erros na diferenciação e classificação da espécie. A organização da parede dos conídios é considerada como fator primário para a diferenciação entre *A. parasiticus* e *A. flavus*. Os conídios de *A. parasiticus* são esféricos e com projeções na forma de espinhos enquanto os conídios de *A. flavus* possuem paredes relativamente delgadas e rugosas, e sua forma pode variar de esférica à elíptica. *A. nomius* apresenta

semelhança morfológica com o *A. flavus*, mas os conídios apresentam-se mais ásperos (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Junto a análise morfológica para a caracterização dos fungos em questão, devem-se realizar testes bioquímicos para identificar os metabólitos produzidos. Apesar dos três produzirem aflatoxinas, existe a produção de outras substâncias como ácido ciclopiazônico, ácido kójico e ácido aspergílico, conforme QUADRO 2 (MATELES; ADYE, 1965).

QUADRO 2- Micotoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus*

Espécies	Aflatoxinas		Ácido kójico	Ácido ciclopiazônico	Ácido aspergílico	Crisogina	Parasiticolídeo
	B	G					
<i>A. parasiticus</i>	+	+	+	-	+	-	+
<i>A. nomius</i>	+	+	+	-	+	+/-	-
<i>A. flavus</i>	+/-	-	+	+	+	-	-

FONTE: SAMSON; HONG; FRISVAD (2006).

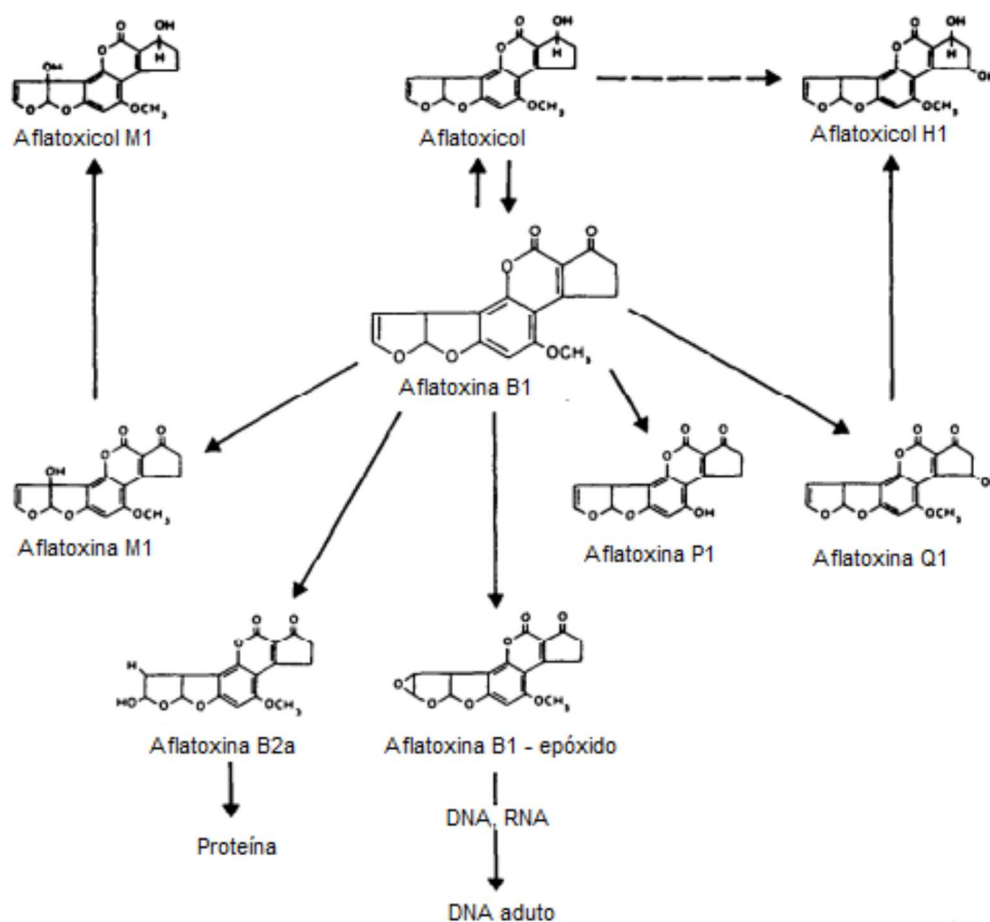
3.6.2 Toxicocinética da aflatoxina

Devido ao baixo peso molecular, as aflatoxinas apresentam certa facilidade em serem absorvidas após a ingestão por via oral. Elas são absorvidas por difusão passiva no intestino delgado sendo que no duodeno existe maior absorção. As aflatoxinas estão sujeitas a processos de biotransformação já na mucosa do trato gastrointestinal devido à presença de CYP450 3A4 no intestino delgado, formando principalmente 8,9-epóxido, o dihidrodiol e a aflatoxina B2α (GUENGERICH *et al.*, 1998; MACHINSKI JUNIOR, 2008)

Após a absorção, as aflatoxinas e os possíveis produtos da biotransformação chegam ao fígado através do sistema portal hepático, onde são concentradas devido à alta permeabilidade que esta toxina apresenta a membrana dos hepatócitos. No fígado elas são bioativadas (FIGURA 2) pelo

citocromo P450, etapa importante para o potencial carcinogênico que estas moléculas apresentam (CORCUERA, 2012). Através do citocromo P450, a AFB é ativada nos microsossomos por mono-oxigenases de função mista, utilizando NADPH e oxigênio molecular para formar o reativo carcinogênico 8,9-epóxido (McLEAN, 1995).

FIGURA 2- Biotransformação da aflatoxina B1



FONTE: McLEAN; DUTTON (1995).

É importante ressaltar que entre os epóxidos formados, apenas o isômero exo apresenta genotoxicidade, acredita-se que esta exigência ocorra devida a reação SN2 com o átomo N7 da guanina do DNA e também pela geometria favorável para a intercalação entre as bases. O CYP450 3A4 parece ser dominante na formação do isômero exo do AFB epóxido, mas o CYP450 1A2

também é capaz de formar este isômero e este parece apresentar grande afinidade pela AFB1 (GUENGERICH *et al.*, 1998).

Entre as proteínas plasmáticas, a única que se liga de forma significativa à AFB1 é a albumina. Ocorre uma ligação covalente entre a lisina da albumina e a AFB1, porém a conjugação que ocorre com maior frequência é com a glutathione (QUIAN *et al.*, 2013). A formação desse conjugado é mediada pela glutathione-S-transferase (GST) e ele é primeiramente excretado pela bile. Existem outras vias de detoxificação para o epóxido da AFB1, como a UDP-glucuronil-transferase, sulfotransferase e o sistema epóxidohidrolase (McLEAN, 1995). O sistema epóxidohidrolase ocorre com menor frequência que a hidrólise não enzimática. A reação enzimática apresenta uma velocidade limitada de acordo com um intermediário acil-enzima (GUENGERICH, 1998).

A AFB1 ou seus epóxidos podem ainda ser hidroxilados formando AFM1 e AFQ1 ou ainda ser desmetilada e formar AFP1. Os outros tipos de aflatoxinas, geralmente são conjugadas com sulfatos ou ácido glucurônico para serem excretados. A excreção das aflatoxinas e seus produtos de biotransformação do organismo ocorrem por diferentes vias, a principal forma de secreção é a biliar (58%), mas também existe a secreção urinária (35%). Existe também uma fração significativa de AFM secretada no leite em lactentes e animais com lactação (McLEAN, 1995; MACHINSKI JUNIOR, 2008).

3.6.3 Toxicodinâmica da aflatoxina

As aflatoxinas, em especial a AFB1, são importantes toxinas cancerígenas e genotóxicas. O câncer com maior ocorrência devido a exposição de aflatoxina é o câncer de fígado, sendo a AFB1 a substância hepatocarcinogênica mais potente experimentalmente conhecida. Liu e colaboradores (2012) constataram que 5-28% dos casos de hepatocarcinoma celular podem ser atribuídos a exposição do organismo a aflatoxinas.

O carcinoma hepatocelular representa aproximadamente 9,2% dos novos casos de câncer no mundo em 2013 e este número segundo projeções tende a aumentar a cada ano que passa. Este câncer é o quinto mais comum em homens e o sétimo em mulheres e ocorre principalmente em jovens e em regiões com recursos limitados. O tumor no fígado apresenta um grave prognóstico, pois é o terceiro câncer com maior taxa de mortalidade anual, e 93% dos pacientes morrem com 12 meses do início dos sintomas (KEW, 2013).

A real causa do hepatocarcinoma por exposição à AF é o produto gerado pela biotransformação realizada pelo CYP450, envolvendo as enzimas CYP450 3A4, 3A5, 3A7 e 1A2 (KAMDEM *et al.*, 2006). Este produto de biotransformação é o 8,9-exo-epóxido que é altamente reativo com DNA, RNA e proteínas, causando significativa inibição do RNA, de síntese de proteínas e também inibindo a atividade de enzimas metabolizadoras de drogas. Existe também o 8,9-endo-epóxido, porém este produto de biotransformação não possui a mesma capacidade que o 8,9-exo-epóxido de reação com estas moléculas (YANG, 1997; HABIB *et al.*, 2006; KEW, 2013).

Este produto de biotransformação reativo liga-se ao DNA para formar o promutagênico 8,9-dihidro-8-(N-7-guanil)-9-hidroxi AFB1 aduto (AFB1-N7-Gua), que também pode se transformar em duas substâncias secundárias, sendo umas delas a AFB1-formamidopirimidina aduto (AFB1-FABY) que é mais estável. Este adutos tem a capacidade de realizar uma mutação na terceira base do códon 249 do gene p53 (gene supressor de tumor), substituindo uma guanina por uma timina, então o códon é transformado de AAG para AAT. O aduto AFB1-FABY realiza a mutação de guanina para timina 6 vezes mais que o aduto AFB1-N7-Gua (GOUAS *et al.*, 2009; KEW, 2013).

O gene p53 é responsável pela regulação de vários componentes do controle de danos ao DNA e por promover o envelhecimento celular (senescência). A resposta a mutação no gene p53 depende principalmente do local e da natureza do ponto de mutação. Mutações nos códons 157, 248 e 273 são locais de formação de aduto para o agente cancerígeno benzo-a-pireno, encontrado na fumaça de cigarros, produto de ligação que está relacionado com câncer nos pulmões. Estas alterações no gene p53 causam uma condição de

estresse celular que vão induzir a expressão de genes que regulam a síntese e reparação de DNA, a possível parada do ciclo celular, a diferenciação celular e a apoptose (CHAN *et al.*, 2003; HABIB *et al.*, 2006).

3.6.4 Relatos de casos de intoxicações agudas e crônicas por aflatoxinas

Fungos produtores de aflatoxinas podem contaminar o produto em todas as fases da cadeia produtiva do alimento, desde o campo, durante a colheita, transporte, armazenamento e processamento de alimentos e rações. Neste processo produtivo desencadeia-se o crescimento fúngico e a produção das aflatoxinas. Uma vez produzida esta micotoxina ela é extremamente estável a altas temperaturas e processamento do alimento, desta forma permanece neste alimento até seu consumo pelos humanos ou animais (WU *et al.*, 2011).

Decorrentes desta estabilidade e do consumo destes alimentos, os efeitos adversos das aflatoxinas em animais (e presumivelmente em humanos) foram classificados em duas formas gerais:

A. **aflatoxicose aguda** que é produzida quando moderados a elevados teores de aflatoxinas são consumidos. Em episódios específicos agudos da doença pode acontecer hemorragia, dano agudo do fígado, edema, alteração na digestão, absorção e/ou metabolismo de nutrientes e, eventualmente, morte.

B. **aflatoxicose crônica** que é o resultado da ingestão de níveis baixos a moderados de aflatoxinas. Os efeitos são geralmente subclínicos e difíceis de reconhecer. Alguns dos sintomas comuns são prejudicados pelo consumo alimentar e taxas mais lentas de crescimento com ou sem a produção de uma síndrome de aflatoxina evidente (WU *et al.*, 2011).

Um dos relatos mais importantes da aflatoxicose em humanos foi feito em mais de 150 aldeias em distritos adjacentes de dois estados vizinhos, no noroeste da Índia, no outono de 1974. De acordo com um relatório deste surto, 397 pessoas foram afetadas e 108 pessoas morreram. Neste surto, milho contaminado foi o principal componente da dieta, e os níveis de aflatoxina

encontrados foram de 0,25 a 15 mg/kg-1-1. A ingestão diária de aflatoxina B1 foi estimada em pelo menos 55 ug kg⁻¹ de peso corporal durante um número indeterminado de dias. Os pacientes apresentaram febre alta, icterícia progressiva e rápida, edema dos membros, dor, vômitos e fígados inchados. Um investigador relatou uma característica peculiar e muito notável da epidemia: o aparecimento de sinais de doença em uma população da aldeia foi precedido por uma doença semelhante em cães domésticos, que era geralmente fatal. O exame histopatológico em humanos mostrou extensa proliferação do ducto biliar e fibrose periportal no fígado junto com hemorragias gastrointestinais. O acompanhamento durante dez anos do surto na Índia encontrou os sobreviventes totalmente recuperados, sem efeitos nocivos da experiência (FDA, 2013).

Um segundo surto de aflatoxicose foi relatado no Quênia em 1982. Havia neste momento 20 internações em um hospital com uma mortalidade de 60%. A ingestão diária de aflatoxina foi estimada como sendo pelo menos de 38 ug kg⁻¹ de peso corporal por um número indeterminado de dias (FDA, 2013).

Em fevereiro-março 2013 vários países europeus, incluindo a Romênia, a Sérvia e a Croácia relataram a contaminação de um grande lote de leite para consumo humano (e, possivelmente, de produtos derivados) com aflatoxinas. Os detalhes são escassos e o caso não foi divulgado pela mídia. Foi relatado em março de 2013, que alimentos originários da Sérvia e importados pela Holanda e Alemanha foram contaminados. Também foi relatado que os testes revelaram contaminação no leite produzido por duas fazendas holandesas. O leite na Alemanha também foi testado, mas não estava contaminado. No entanto, a Rússia anunciou que iria proibir as importações provenientes de fazendas alemãs que receberam ração contaminada dos países já citados. Em 20 de março, os agricultores romenos despejaram toda sua produção de leite em protesto depois que o governo proibiu o leite de cinco fazendas. A Danone da Romênia também retirou cerca de 75 toneladas de produtos lácteos das prateleiras.

O maior caso de intoxicação por aflatoxinas documentado mundialmente ocorreu no Quênia em 2004 e resultou em 317 pacientes e 125 mortes, conforme

relatado nas instalações médicas locais. Isto foi associado com o consumo de milho armazenado sob condições de umidade elevada (PRESS *et al.*, 1991; CDC, 2004; LEWIS *et al.*, 2005).

As aflatoxicoses agudas, associadas a doses extremamente elevadas de aflatoxina, caracterizam-se por hemorragias, dano agudo do fígado, edema e morte em seres humanos. Condições que aumentam a probabilidade de aflatoxicose aguda em humanos incluem a disponibilidade limitada de alimentos, as condições ambientais que favorecem o desenvolvimento de fungos nas lavouras e a falta de sistemas de regulação para o monitoramento de aflatoxinas e seu controle (WU *et al.*, 2011).

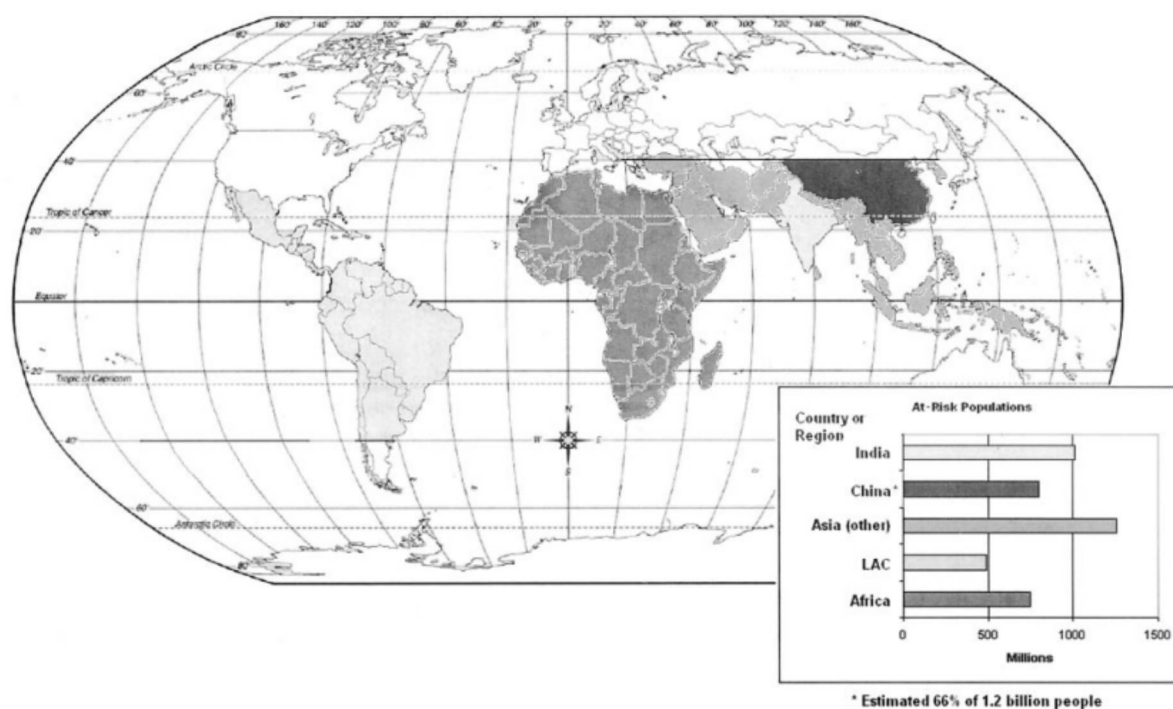
Mesmo os casos mais divulgados sejam referentes a intoxicações agudas não se pode descartar os casos de intoxicações crônicas que podem levar em casos mais graves ao carcinoma hepatocelular. O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) estima que mais de 4,5 bilhões de pessoas nos países em desenvolvimento estão cronicamente expostos a toxinas produzidas por vários fungos, mas principalmente aflatoxinas em suas dietas (CDC, 2004).

Segundo Williams e colaboradores (2004) a técnica mais utilizada ainda para se analisar a exposição crônica é a amostragem dos alimentos, tanto *in natura* como os alimentos processados e, desta forma, estabelecer qual o risco que a população está exposta ao consumir este tipo de alimentos contaminado com baixos teores de aflatoxinas.

Os dados sobre as condições de temperatura necessárias para a síntese das aflatoxinas; a vulnerabilidade dos alimentos à contaminação; os sistemas de produção de alimentos, armazenamento e comercialização e as falhas de regulação dos alimentos, indicam que há risco de exposição crônica aflatoxina entre 40° norte e sul do Equador nos países em desenvolvimento. Os dados populacionais do banco de dados da FAO indicam que são aproximadamente os 4,5 bilhões de pessoas vivem nesta zona, dados citados pelo CDC em 2004. A evidência de contaminação no mercado e amostras de alimentos e os dados dos biomarcadores humanos são indicadores de que a maior parte da população é

susceptível de ser exposta (FIGURA 3), mas geralmente há um nível menor do que a necessária para a doença aguda e morte direta.

FIGURA 3- Áreas e populações de risco de exposição crônica à aflatoxina



FONTE: WILLIAMS *et al.* (2004).

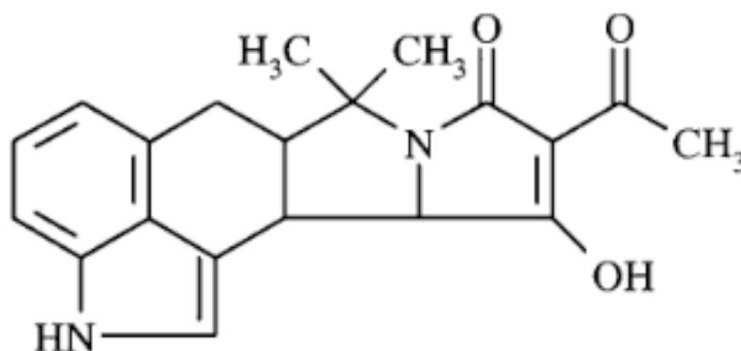
3.7 ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO

Em 1960, quando foram descobertas as aflatoxinas, junto com estas toxinas foi encontrado o ácido ciclopiazônico (CPA). Alguns efeitos tóxicos verificados nas aves não foram relacionados à aflatoxinas e acredita-se que estes efeitos podem ter ocorrido em consequência à contaminação pelo CPA. Efeitos neurológicos do CPA apresentam semelhança com efeitos observados nas aves que morreram neste incidente. Outra observação que favorece a participação do CPA como causa da doença X do peru é a concentração de 31mg kg⁻¹ nos amendoins contaminados que foram responsáveis pela doença (BAQUIÃO *et al.*, 2013; HEPERKAN *et al.*, 2012).

O ácido ciclopiazônico (FIGURA 4) é um ácido tetrâmicoindólico derivado biossinteticamente de mevalonato, triptofano e duas unidades de acetato isolado

e elucidado primeiramente de uma cultura de *Penicillium cyclopium* e é conhecido por ser metabólito secundário de várias espécies de *Penicillium*. Espécies de *Aspergillus*, conhecidas pela síntese de aflatoxinas, tem também como um dos seus principais metabólitos secundários o CPA (HAYASHI; YOSHIZAWA, 2005; MOLDES-ANAYA *et al.*, 2009).

FIGURA 4 - Estrutura química do ácido ciclopiazônico



FONTE: BURDOCK; FLAMM (2000).

Este ácido pode ser encontrado sozinho, porém desde a descoberta do CPA como metabólito do *Aspergillus flavus* ele foi encontrado em muitos produtos junto a aflatoxinas (HEPERKAN *et al.*, 2012).

A toxicidade de CPA, em muitas espécies animais, tem sido estudada. Esta micotoxina provoca perda de peso, diarreia, degeneração e necrose dos músculos e vísceras, e convulsão e morte em roedores, aves, cães e suínos (HAYASHI; YOSHIZAWA, 2005).

3.7.1 Toxicocinética do ácido ciclopiazônico

Norred *et al.* (1985), estudou a toxicocinética do ácido ciclopiazônico por via de administração intragástrica onde a micotoxina é rapidamente absorvida principalmente no intestino, apresentando picos de 10% de concentração plasmática após 6 horas de administração em ratos. O CPA é distribuído pelos

tecidos apresentando principalmente acúmulo no pulmão, coração, rim, fígado e músculo esquelético. A excreção é mais aparente nas fezes, porém também ocorre na urina.

3.7.2 Toxicodinâmica do ácido ciclopiazônico

Foi constatado que o CPA diminui a afinidade do ATP à bomba Ca^{2+} ATPase encontrada em diversos tecidos incluindo muscular esquelético, liso e cardíaco, tornando-se um inibidor específico e reversível da bomba.

Essa interferência no funcionamento da bomba Ca^{2+} ATPase nos tecidos musculares explica alguns sintomas conhecidos do CPA como fraqueza, falta de coordenação e letargia, uma vez que resulta em efeito inotrópico e cronotrópico negativo (NORRED *et al.*, 1985; BURDOCK; FLAMM, 2000).

3.7.3 Relatos de casos de intoxicação por ácido ciclopiazônico

Os relatos de intoxicação por CPA não são tão frequentes como os da aflatoxina, porém existem e apontam grandes prejuízos principalmente para a saúde animal.

O primeiro caso conhecido de intoxicação por CPA foi em 1960 na doença X do Peru, quando as aflatoxinas foram descobertas e muito estudadas, porém alguns sintomas, principalmente neurológicos, foram atribuídos a presença de outra micotoxina (colocar referência).

Casos de contaminação por CPA são mais conhecidos e estudados em animais, porém em 1985 ocorreu um estudo de intoxicação de humanos e gados por milho Koda onde a presença de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii* e CPA foram confirmadas e os sinais e sintomas como náuseas e vômitos foram parecidos com os já conhecidos pela intoxicação por CPA (RAO; HUSAIN, 1985).

Estudos em laboratório mostram que o CPA apresenta diferentes efeitos de acordo com a espécie animal desde acúmulo da micotoxina nos músculos e

ossos em ratos até a morte em cachorros. Outros animais como macacos, porcos e aves também apresentam pesquisas relacionadas aos efeitos do CPA.

3.8 LEGISLAÇÃO

A Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas constatou que sessenta e um países têm limites regulamentados para a presença de aflatoxinas, embora não existam leis que regulem os valores de ácido ciclopiazônico (FAO, 2004).

Entre os fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático está o consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas, portanto as aflatoxinas são consideradas um problema de saúde pública. Devido a isso, diversos países estabeleceram limites de aceitação de presença de aflatoxinas em produtos de consumo humano. Os limites estabelecidos para aflatoxinas são geralmente detalhados e específicos para diferentes gêneros de alimentos, e comumente são estabelecidos limites para aflatoxinas totais, aflatoxina B1 e aflatoxina M1 em leite e produtos derivados. A FAO realizou uma comparação entre os limites para micotoxinas em 1995 e 2003. O limite para aflatoxina totais (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) apresenta um maior número de países com valores regulamentados, totalizando 76 países, enquanto limites para aflatoxina B1 existem em 61 países e para aflatoxina M1 em leite existem em 60 países (FAO, 2004).

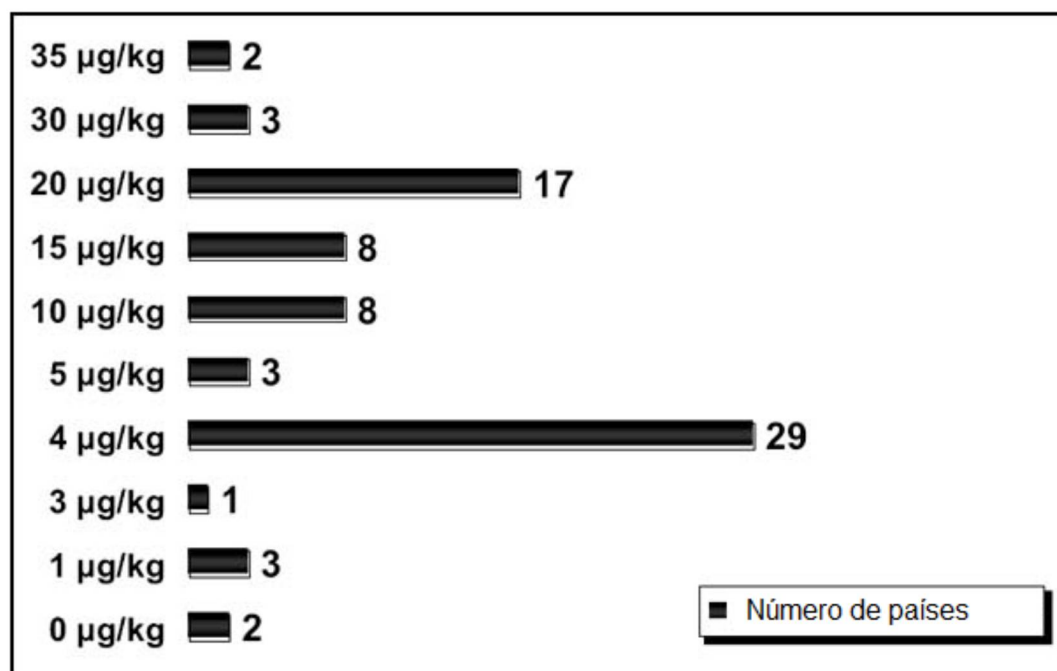
O limite de $4\mu\text{g kg}^{-1}$ para aflatoxinas totais é regulamentado em 29 países, e todos os países da União Europeia adotam este limite. Para os países da América Latina, o limite regulamentado é de $20\mu\text{g kg}^{-1}$, este valor é harmonizado pelo MERCOSUL, assim como os limites da União Europeia (FAO, 2004).

Os níveis de tolerância máxima para aflatoxina B1 não apresentaram grandes variações de 1995 para 2003, porém houve uma diminuição nos valores limites. Em 29 países (FIGURA 5) o valor limite é $2\mu\text{g kg}^{-1}$, a maioria destes países fazem parte da União Europeia, que apresenta limites regulamentados entre os países membros. O limite de $5\mu\text{g kg}^{-1}$ é determinado para 21 países (FIGURA 6), incluindo países da América Latina (FAO, 2004).

Para os limites de aflatoxina M1 em leite, o limite permitido com maior frequência é $0,05\mu\text{g kg}^{-1}$, valor estipulado por 34 países (FIGURA 7). O limite de $0,5\mu\text{g kg}^{-1}$

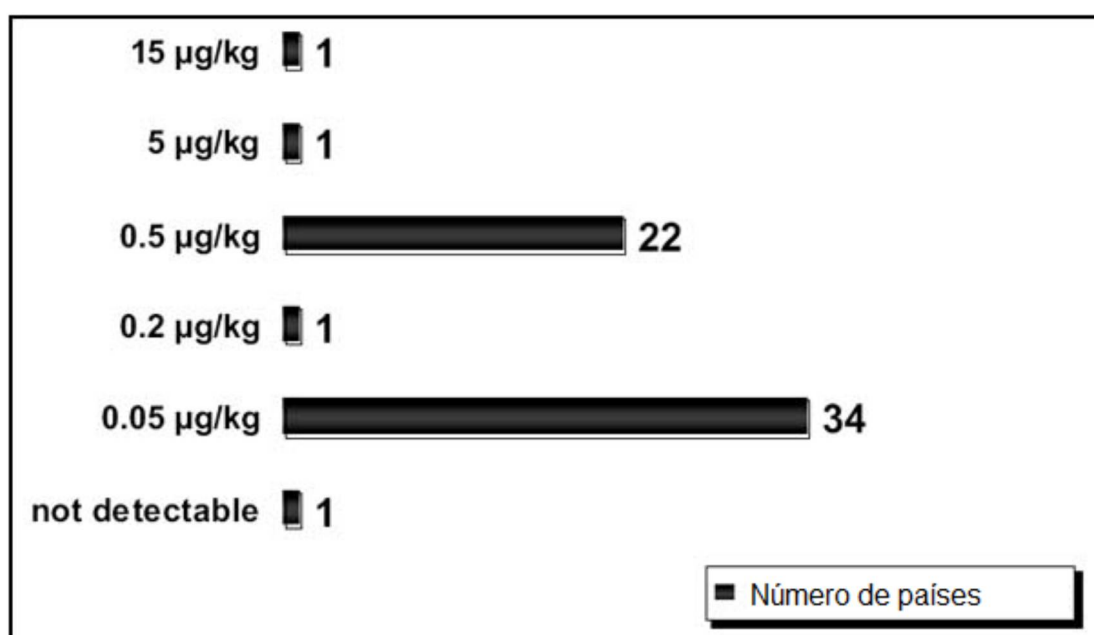
é adotado por 22 países, dentre eles estão os países do MERCOSUL (FAO, 2004).

FIGURA 5- Limite máximo mundial para aflatoxinas totais em alimentos



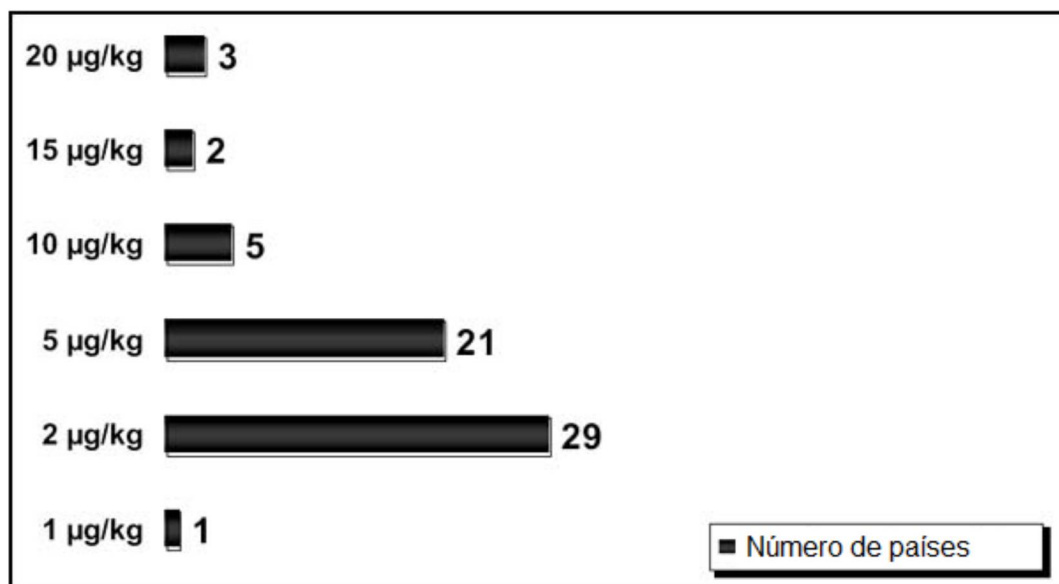
FONTE: FAO (2004).

FIGURA 6 - Limite máximo mundial para aflatoxina B1 em alimentos



FONTE: FAO (2004)

FIGURA 7 - Limite máximo mundial para aflatoxina M1 em leite



FONTE: FAO (2004).

No Brasil, 17 anos após a descoberta das aflatoxinas, se estabeleceu o limite de $30\mu\text{g kg}^{-1}$ para o total de AFB1 e AFG1 em produtos de consumo humano, conforme a Resolução n. 34/76 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1977). Após 19 anos, o Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária estabeleceu na portaria nº 183 de 1996, aprovada pela resolução n. 56/94, o limite de $20\mu\text{g kg}^{-1}$ para o total de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (BRASIL, 1996). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu o limite de $20\mu\text{g kg}^{-1}$ para aflatoxinas em amendoim, pasta de amendoim e milho e farinha de milho; $0,5\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina M1 em leite fluido e $0,5\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina M1 em leite em pó, através da RDC nº. 274 de 15 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002). Recentemente, a ANVISA através da RDC nº. 7 de 18 de fevereiro de 2011, estabeleceu novos limites máximos toleráveis para aflatoxinas em diferentes produtos de consumo humano conforme mostra o QUADRO 3 (BRASIL, 2011).

QUADRO 3 - Limite máximo de tolerância de aflatoxinas em alimentos

Micotoxinas	Alimento	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
AFM1	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiber officinale</i> (gengibre) <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20

FONTE: BRASIL (2011).

4 METODOLOGIA

4.1 COMITE DE ÉTICA

Este ensaio foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Patologia Aviária da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Estado do Paraná, Brasil. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal do Paraná e registrado sob o número 23075.139283/2016-86.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL, ANIMAIS E HABITAÇÃO

O experimento foi desenvolvido considerando a importância do programa 3R, reconhecido internacionalmente, que visa reduzir o número de animais em experimentos, refinar as pesquisas para diminuir o desconforto e a dor dos animais e substituir os testes *in vivo* quando possível (CAZARIN *et al.*, 2004).

Um total de 20 frangos de corte Cobb 500 foram alojados de 1 a 28 dias de idade em salas de pressão negativa previamente desinfetadas e distribuídas aleatoriamente em gaiolas contendo manilha esterilizada a 121°C por 15 minutos. A temperatura e a luz foram controladas para um ambiente confortável de acordo com a idade da ave e sua linhagem. Água e comida foram fornecidas à vontade durante todo o período. A dieta era comercial de acordo com as necessidades da ave, sem nenhum antibiótico anticoccidiano ou promotor de crescimento.

As aves foram divididas em 4 tratamentos, com 5 aves em cada gaiola, que foram divididas da seguinte forma: **grupo 1)** controle negativo (**NC**), sem desafio; **grupo 2)** grupo desafiado com ácido ciclopiazônico (**CPA**); **grupo 3)** grupo desafiado com aflatoxina B1 (**AFB1**); e **grupo 4)** grupo desafiado com ácido ciclopiazônico e aflatoxina B1 (**CPA + AFB1**).

4.3 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

Os padrões utilizados neste estudo foram ácido ciclopiazônico (lote 0449585-4, Cayman Chemical, Michigan, EUA) e aflatoxina B1 (lote 0460083-28, Cayman Chemical, Michigan, EUA). As micotoxinas testadas foram solubilizadas em solução de metanol a 0,5%, que também foi a solução administrada ao grupo controle negativo. As concentrações das soluções de AFB1 e CPA foram 20µg/mL e 120µg/mL, respectivamente. Esses valores foram determinados através de pesquisa em artigos científicos e com o objetivo de trazer uma baixa quantidade das micotoxinas. A concentração de aflatoxina B1 é menor do que os limites aceitos pela legislação e não aumentam conforme o peso do animal para entendermos se esses limites são realmente seguros.

4.4 ANÁLISE DAS MICOTOXINAS EM RAÇÃO

4.4.1 Extração das micotoxinas

Para certificar que não houvesse interferência de micotoxinas provenientes da ração, a mesma foi analisada e para a extração de AFB1 e CPA das rações destinadas a frangos de corte foi realizada a extração sólido-líquido.

Em erlenmeyers de 250 mL pesou-se 10 gramas da ração, adicionou-se 10 mL de clorofórmio sendo deixados sob agitação por 5 minutos. As amostras foram filtradas por papel filtro e então adicionou-se novamente 10 mL de clorofórmio, agitou-se durante 5 minutos e filtrou-se novamente. O filtrado foi levado ao banho-maria fervente até completa evaporação da fase clorofórmica, obtendo-se o extrato com as micotoxinas.

4.4.2 Purificação dos extratos

Para a purificação dos extratos diluiu-se os mesmos em 10 mL de metanol e verteu-se para um funil de separação. Adicionou-se 5 mL de cloreto de sódio 4% e 5 mL de hexano. Agitou-se a mistura por 5 minutos e o hexano foi descartado. Adicionou-se 10 mL de clorofórmio, agitou-se e, posteriormente, o clorofórmio foi lavado com 2 porções de água. Filtrou-se o clorofórmio em papel filtro com sulfato de sódio anidro e posteriormente evaporou-se o clorofórmio em banho maria fervente, obtendo-se o extrato purificado.

4.4.3 Análise da ração por cromatografia líquida de alta eficiência

Os extratos foram analisados por CLAE em equipamento Varian Prostar, utilizando-se as condições descritas na TABELA 1 (BARBAS, 2005).

Tabela 1 - Condições para análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Coluna	Microsorb-MV C18 4,6mm x 250mm x 5µm
Fase móvel	água:metanol:acetonitrila 5:4:1 (v:v)
Fluxo	0,8 mL/min
Temperatura	21°C
Detector	Fluorescência $\lambda_{ex}=365\text{nm}$ e $\lambda_{em}= 455\text{nm}$
Volume de injeção	10µL

4.4.4 Curva padrão Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para a realização da curva padrão foram utilizados os mesmos padrões da solução para inoculação dos animais ácido ciclopiazônico (lote 0449585-4, Cayman Chemical, Michigan, EUA) e aflatoxina B1 (lote 0460083-28, Cayman Chemical, Michigan, EUA) e as condições estabelecidas para a análise da ração com diferentes volumes de injeções conforme a TABELA 2.

Tabela 2 - Concentrações testadas de aflatoxina B1 e Ácido Ciclopiazônico para a curva padrão

Injeção (µL)	Concentração CPA (µL/mL)	Concentração de AFB1 (µL/mL)
5	0,25	0,125
10	0,5	0,25
15	0,75	0,375
20	1	0,5
25	1,25	0,625

4.5 DESAFIO DOS ANIMAIS

Do 1º ao 28º dia, as aves foram intoxicadas diariamente via gavagem com as soluções feitas a partir dos padrões de acordo com seus tratamentos: **grupo 1)** 0,5mL de metanol 0,5%; **grupo 2)** 0,5mL de CPA 120µg mL⁻¹; **grupo 3)** 0,5mL de AFB1 20µg mL⁻¹; e **grupo 4)** 0,5 mL de 120µg mL⁻¹ CPA e 0,5mL de 20µg mL⁻¹ AFB1.

4.6 PESO

Para a análise do ganho ou perda de peso as aves foram pesadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 do experimento. Os valores foram expressos por grupo de aves e não individualmente.

4.7 COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Aos 28 dias de idade, cinco aves por tratamento foram eutanasiadas por deslocamento cervical. Amostras de duodeno, jejuno, íleo e fígado foram coletadas para avaliação histológica. Para cada fragmento intestinal coletado, foram realizados cinco cortes histológicos; para cada fragmento de fígado

coletado, três cortes histológicos foram realizados para amostragem de órgãos maiores.

Todas as amostras foram coletadas e fixadas em Davidson (100mL de ácido acético glacial, 300mL de etanol 95%, 200mL de tampão neutro de formalina 10% e 300mL de água destilada) por pelo menos 24h. Todas as amostras foram desidratadas, infiltradas e incluídas em parafina, seguindo a rotina histológica comum. Os blocos foram cortados em seções de 5µm e corados com hematoxilina e eosina associada a Alcian Blue para coloração de células caliciformes (RAPP; WURSTER, 1978). Para a morfologia intestinal e hepática, uma adaptação da metodologia descrita por Kraieski *et al.*, (2017) e Belote *et al.* (2018) foi realizado. Para as análises intestinais foram analisadas 10 vilosidades por corte, totalizando 50 vilosidades por ave. As vilosidades foram observadas com ampliação de 10x (usando ampliação de 40x para confirmar as alterações). Para a morfologia hepática, foram analisados cinco campos de três cortes, totalizando 15 campos para cada ave. Os campos foram observados com ampliação de 10x (usando ampliação de 40x para confirmar as alterações). Ambas as avaliações foram realizadas em microscopia de luz (Eclipse E200, Nikon).

4.8 MÉTODO I SEE INSIDE (ISI)

A metodologia ISI em processo de patente (INPI BR 1020150036019) é baseada em uma pontuação numérica de alteração. Nesta metodologia, é definido um fator de impacto (FI) para cada alteração na análise macroscópica e microscópica, de acordo com a redução da capacidade funcional do órgão, com base no conhecimento prévio da literatura de campo e pesquisa de fundo (a necrose tem o maior FI porque a capacidade das células afetadas é completamente perdida). O FI varia de 1 a 3, com 3 significando o maior impacto na função do órgão. Além disso, a extensão de cada lesão (intensidade) ou a frequência observada em relação a um órgão não afetado é avaliada em cada órgão/tecido com pontuação (S) variando de 0 a 3: pontuação 0 (ausência de lesão ou frequência), escore 1 (alteração de até 25% da área ou frequência observada), escore 2 (alteração varia de 25 a 50% da área ou frequência

observada) e escore 3 (alteração estende-se a mais de 50% da área ou frequência observada). Para obter o valor final do índice ISI, multiplica-se o FI de cada alteração pelo respectivo número de pontuação, conforme apresentado na TABELA 3.

Tabela 3 - Escores de alterações histológicas do ISI avaliados no intestino e no fígado

Órgão	Alteração	Fator de Impacto (IF)		Escore (S)	Escore Final	Escore Máximo ¹
Duodeno	Espessura da lâmina própria	2	X	3	6	45
Jejuno	Espessura epitelial	1	X	3	3	45
Íleo	Proliferação de enterócitos	1	X	3	3	45
	Infiltração de célula plasmática epitelial	1	X	3	3	
	Infiltração de células inflamatórias na lâmina própria	3	X	3	9	
	Proliferação de células caliciformes	2	X	3	6	
	Congestão	2	X	3	6	
	Presença de oocistos	3	X	3	9	
Fígado	Congestão	1	X	3	3	42
	Vacuolização celular	2	X	3	6	
	Proliferação de ductos biliares	2	X	3	6	

	Infiltração de células imunológicas	1	X	3	3	
	Necrose	3	X	3	9	
	Pericolangite	3	X	3	9	
	Agregado linfocitário	2	X	3	6	

FONTE: BELOTE *et al.*, 2018

¹A pontuação máxima representa a soma de todas as alterações de acordo com a fórmula $ISI = \sum(IF * S)$, onde IF = fator de impacto (previamente fixado) e S = Escore (observado), considerando o S máximo observado. Por exemplo, a espessura da lâmina própria tem IF = 2; esse número será multiplicado pelo escore observado (variando de 1 a 3); se em uma vilosidade a pontuação S = 3, o escore final será 6.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A unidade experimental para cada órgão foi a seção analisada. Inicialmente, a normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) one-way seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$) para dados paramétricos. Todas as análises foram realizadas pelo Past for Windows.

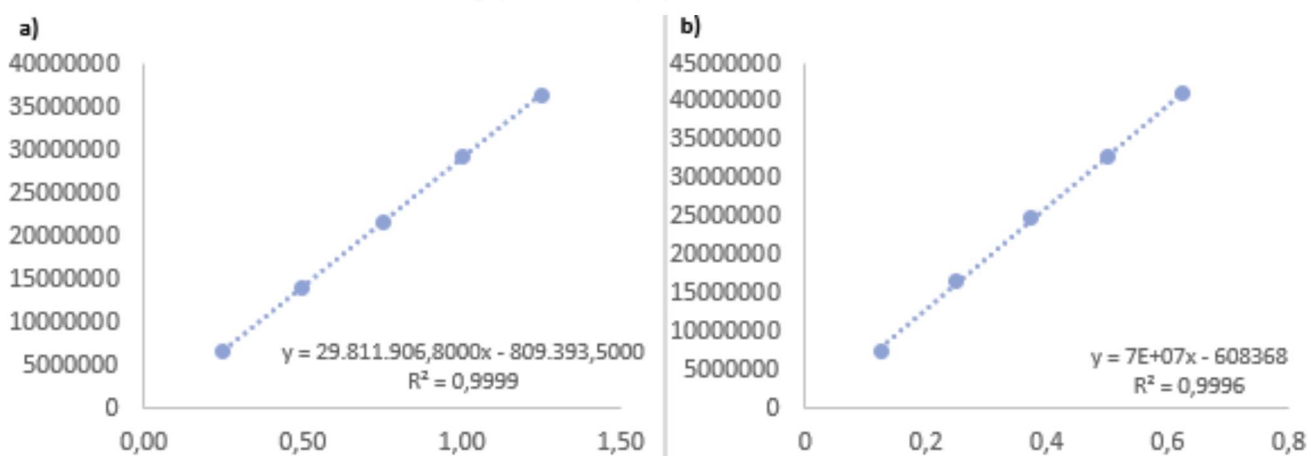
5 RESULTADOS

Neste estudo, as aves foram desafiadas com CPA e AFB1 por 28 dias. Após o período de tratamento, foi possível avaliar os danos causados pela presença de micotoxinas nos três fragmentos intestinais avaliados e no fígado. Os resultados não sofreram interferência da ração uma vez que a mesma foi testada e não apresentou presença de aflatoxina B1 e ácido ciclopiazônico.

5.1 ANÁLISE DA RAÇÃO

Para a análise da presença de AFB1 e CPA na ração utilizada durante o experimento construiu-se uma curva padrão (FIGURA 8) a partir dos padrões ácido ciclopiazônico (lote 0449585-4, Cayman Chemical, Michigan, EUA) e aflatoxina B1 (lote 0460083-28, Cayman Chemical, Michigan, EUA).

FIGURA 8 – Curva padrão CPA (a) e AFB1 (b)



a) Curva padrão ácido ciclopiazônico b) Curva padrão aflatoxina B1

Para identificar se a correlação é significativa entre as variáveis x e y, utiliza-se o coeficiente de correlação (r^2). Quando o valor de r^2 é igual a 1, existe uma relação linear perfeita (SINKO, 2008). O r^2 calculado para a curva padrão do ácido ciclopiazônico foi de 0,9999 e para a aflatoxina B1 foi 0,9996, e por ser valores próximos a 1, a curva apresenta uma relação confiável entre as variáveis. Com a construção das duas curvas, pudemos constatar que as amostras da ração utilizada para a alimentação dos animais estavam livres de contaminação por CPA e AFB1P.

Os resultados não foram apresentados, pois devido a um roubo do HD externo onde estavam guardados os resultados e ao final não puderam ser repetidos, uma vez que todo o estoque de padrões foi utilizado no desafio dos frangos. Mas ressalta-se que as análises foram feitas e mostraram que a ração

administrada aos frangos não continha nem AFB1 nem CPA e, desta forma, demonstrando que os efeitos observados foram decorrentes apenas da dose de micotoxinas que foram administradas aos frangos.

5.2 ANÁLISE DE GANHO DE PESO

Os pesos obtidos durante os 28 dias do experimento estão apresentados na TABELA 4. Nos primeiros dias de vida dos frangos foi possível notar que o grupo contaminado com CPA apresentou ganho de peso significativamente menor que o grupo CN.

Tabela 4 - Peso das aves obtido durante os 28 dias

	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Grupo	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)
CN	160	401	821	1335
CPA	138*	370	753	1224
AFB1	159	404	868	1405
CPA+AFB1	165	406	788	1272

* Valores com diferença significativa em relação ao CN ($p < 0.05$)

Ao pesar as aves no dia 28, foi possível perceber através do coeficiente de variação (CV) e do desvio padrão (DP) (TABELA 5) que dentro de cada grupo contaminado há uma grande variação entre os pesos das aves enquanto o o grupo controle negativo apresenta menor variação. Assim, verifica-se que as micotoxinas estudadas apresentam interferência no peso dos animais, diminuindo a uniformidade no ganho de peso.

Tabela 5 - Peso dos frangos de corte no dia 28

28 dias			
Grupo	Peso (g)	CV	DP
CN	1335	5.54	74.0
CPA	1224	11.93	146
AFB1	1405	8.97	126
CPA+AFB1	1272	9.87	125

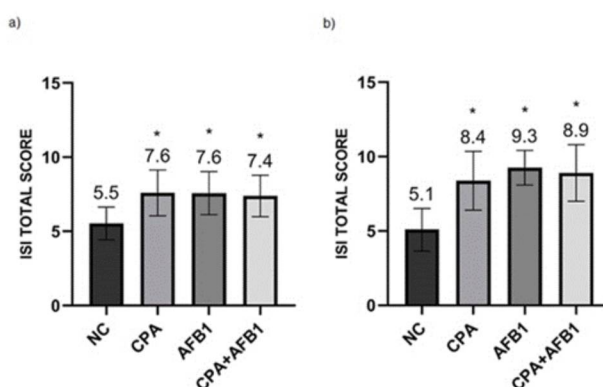
5.3 ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE TECIDOS

5.3.1 Intestino

Tanto nos fragmentos de duodeno quanto de íleo, os grupos desafiados (CPA, AFB1 e CPA + AFB1) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle negativo (CN). No entanto, quando comparado a outro grupo desafiado, a diferença é ausente (FIGURA 9).

Nos fragmentos de jejuno, o tratamento CPA apresentou maior número total de ISI do que todos os outros tratamentos, enquanto os grupos AFB1 e CPA + AFB1 foram maiores que o CN (FIGURA 10).

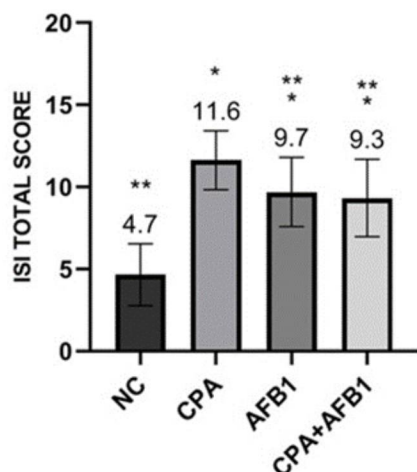
Figura 9 - Escores totais de alteração histológica ISI no duodeno (a) e íleo (b)



* Não apresentou diferença significativa entre os grupos $p > 0,0$

As barras de erro representam o erro padrão da média. NC: grupo não desafiado, CPA: desafio com ácido ciclopiazônico, AFB1: desafio com aflatoxina B1 e CPA+AFB1: desafio com ácido ciclopiazônico e aflatoxina B1

Figura 10 - Escores totais de alteração histológica ISI no jejuno



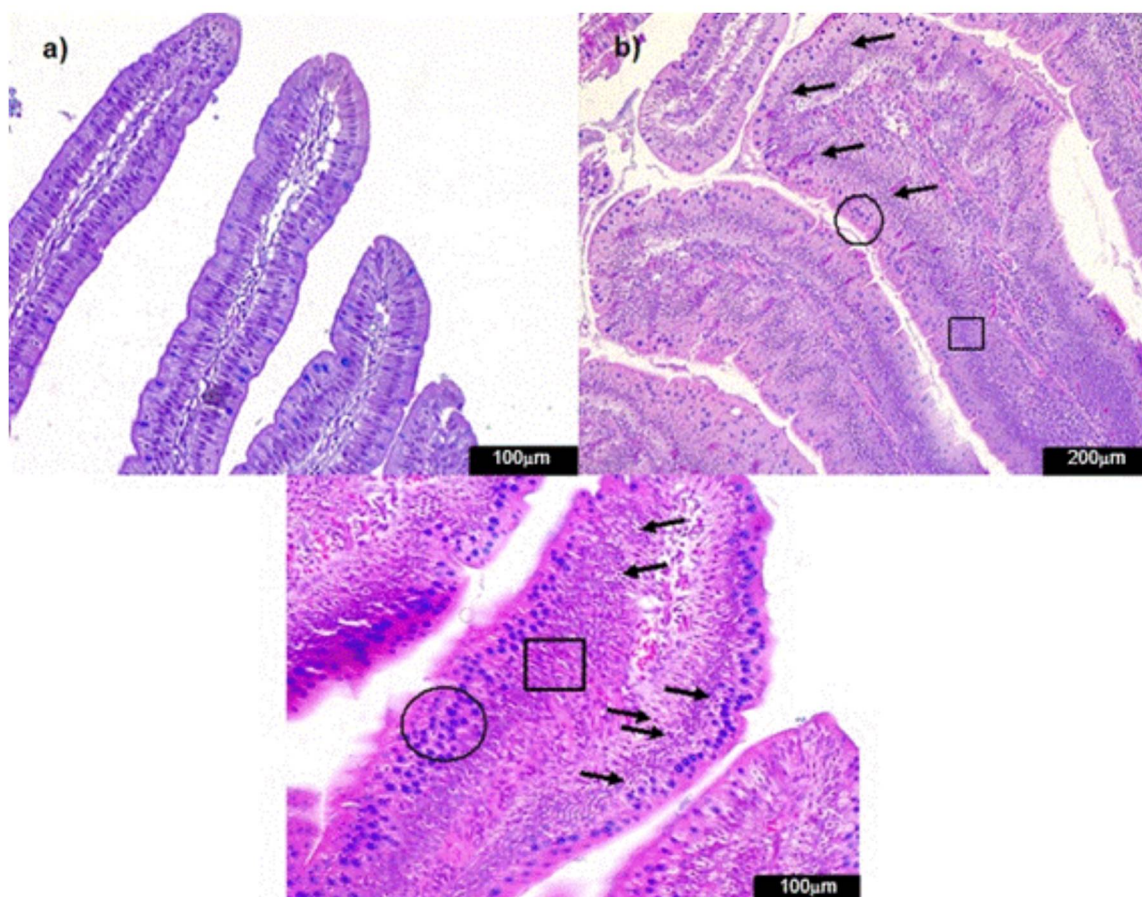
* Não apresentou diferença significativa entre os grupos $p > 0,05$

** Não apresentou diferença significativa entre os grupos $p > 0,05$

As barras de erro representam o erro padrão da média. NC: grupo não desafiado, CPA: desafio com ácido ciclopiazônico, AFB1: desafio com aflatoxina B1 e CPA+AFB1: desafio com ácido ciclopiazônico e aflatoxina B1.

A proliferação de enterócitos, infiltrado inflamatório no epitélio e proliferação de células caliciformes (FIGURA 11) demonstram as alterações sofridas pelo epitélio intestinal dos três fragmentos com a presença de CPA e AFB1 analisados (TABELA 6).

Figura 11- Fotomicrografias de cortes de jejuno de frango de corte



Os fragmentos foram corados com hematoxilina e eosina. Alcian Blue foi usado para corar as células caliciformes. a) Estrutura histológica normal do grupo não desafiado CN (200x); b) Células de infiltração inflamatória epitelial (seta), proliferação de células caliciformes (círculo) e proliferação de enterócitos (quadrado) no grupo desafiado CPA+AFB1 (200x).

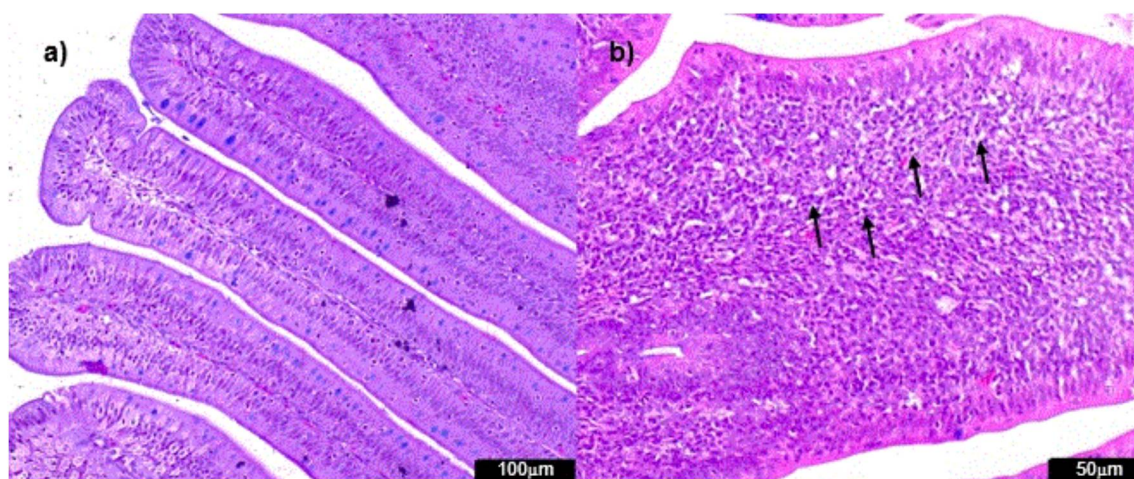
Tabela 6 - Resultados encontrados das alterações histológicas do ISI no epitélio intestinal nos grupos testados

Tratamentos	Espessura epitelial	Proliferação de enterócitos	Infiltração de células inflamatórias no epitélio	Proliferação de células caliciformes
Duodeno				
CN	21.2	19.1	14.5	24
CPA	28.1*	23.6*	24.2*	41.2*
AFB1	26.2*	23.1*	26.9*	45.8*
CPA + AFB1	25.6*	23*	27.5*	44.4*
Jejuno				
CN	11.8	19.1	6.2	15
CPA	28.1*	23.6*	24.2*	37*
AFB1	25.1*	23.1*	28.2*	33.6*
CPA+AFB1	25.6*	23*	27.5*	33.4*
Íleo				
CN	17	14.3	6.1	21.4
CPA	22.8*	21.7*	17.6*	32*
AFB1	25*	22.6*	19.7*	42.4*
CPA+AFB1	23*	21.4*	16.5*	38.6*

* Valores com diferença significativa em relação ao CN ($p < 0.05$)

Em relação à lâmina própria, no duodeno, as micotoxinas não apresentaram diferença entre os grupos desafiados e os NC. No jejuno, todos os grupos desafiados apresentaram altos escores de espessura e também infiltração inflamatória na lâmina própria, sendo que o tratamento CPA apresentou o maior número ISI para ambos os parâmetros, diferindo significativamente dos grupos AFB1 e CPA + AFB1. No íleo, os grupos desafiados apresentaram valores elevados de espessura da lâmina própria, mas apenas o grupo CPA + AFB1 apresentou diferença significativa para infiltrado inflamatório quando comparado ao CN (FIGURA 12). Não foram encontrados oocistos ou valores significativos de congestão em nenhum tratamento.

FIGURA 12 – Fotomicrografias de cortes de íleo de galinha corados com hematoxilina e eosina.



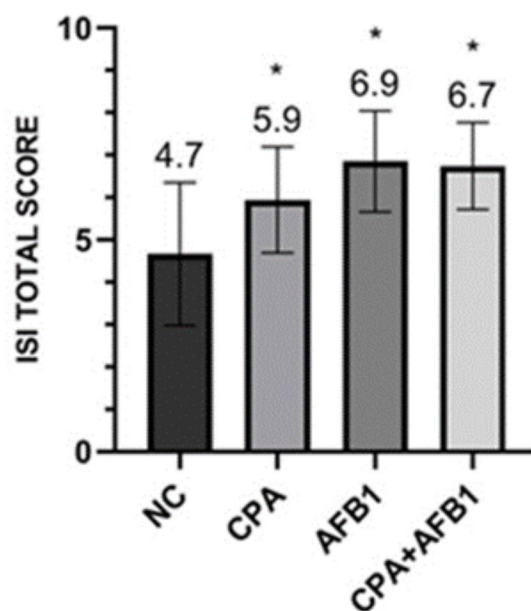
Alcian Blue foi usado para corar as células caliciformes. A) Estrutura histológica normal do grupo não desafiado CN (200x); b) células de infiltração inflamatória da lâmina própria (seta) no grupo desafiado CPA+AFB1 (400x).

5.3.2 Fígado

Neste estudo, por meio da metodologia ISI, observou-se que todos os grupos desafiados apresentaram lesão hepática, porém os tratamentos contendo AFB1 apresentaram maior lesão orgânica do que os demais tratamentos (FIGURA 13).

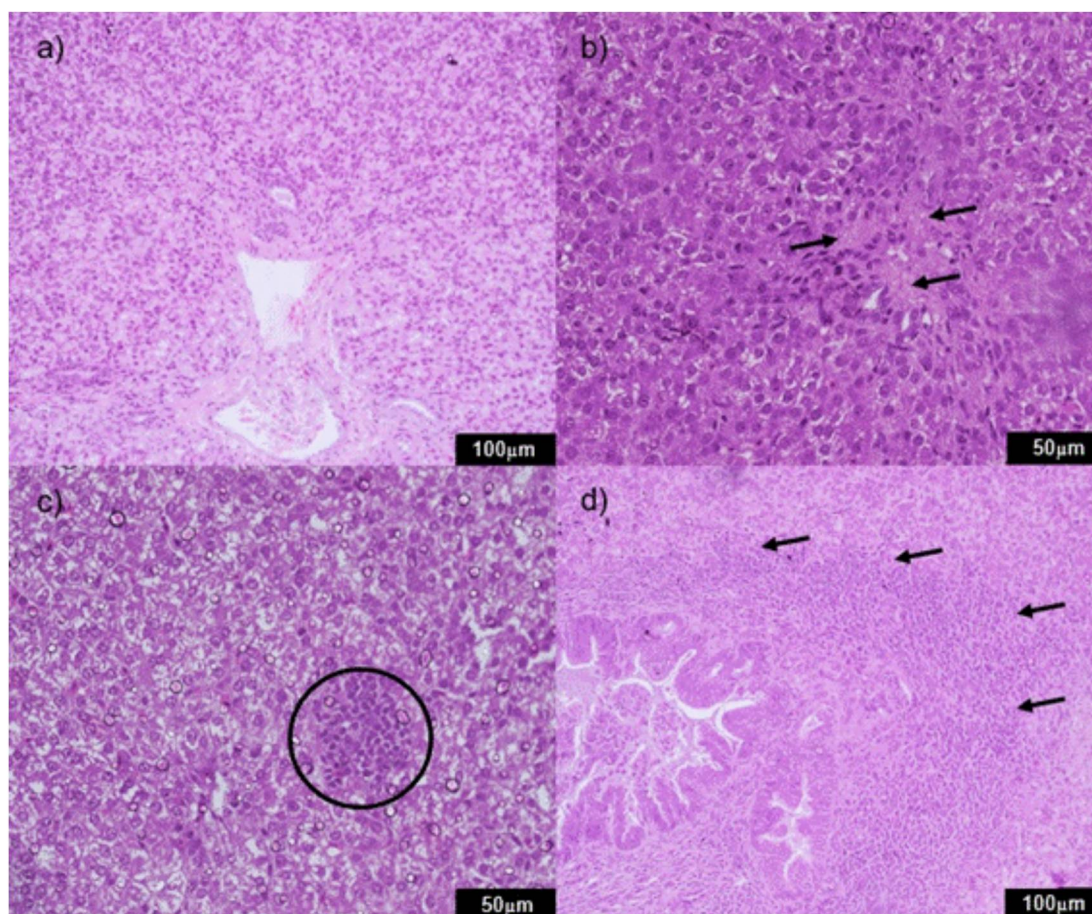
Os grupos desafiados com aflatoxina B1 apresentaram maior dano ao fígado devido aos parâmetros de proliferação do ducto biliar, infiltrado inflamatório, necrose e pericolangite (FIGURA 14).

FIGURA 13 – Escores totais do ISI para alterações histológicas do fígado em diferentes grupos



As barras de erro representam o erro padrão da média. CN: grupo não desafiado, CPA: desafio com ácido ciclopiazônico, AFB1: desafio com aflatoxina B1 e CPA+AFB1: desafio com ácido ciclopiazônico e aflatoxina B1.

Figura 14 - Fotomicrografias de cortes de fígado de galinha corados com hematoxilina e eosina



a) Estrutura histológica hepática normal do grupo NC não desafiado (100x); b) necrose (seta) no grupo desafiado AFB1 (400x) c) infiltração de células inflamatórias (círculo) no grupo desafiado AFB1 (400x); d) pericolangite (seta) no grupo desafiado AFB1 (100x).

6 DISCUSSÃO

6.1 Ganho de peso

O menor ganho de peso realizado nos primeiros dias de vida do frango corrobora com Hayahi e Yoshizawa (2005), que indica esse efeito da CPA em diferentes espécies animais.

Essa interferência causada pelas micotoxinas apresenta prejuízos tanto para a saúde do animal quanto para seus produtores. O frango de corte é um alimento consumido e comercializado mundialmente, seu crescimento desregulado pode interferir na programação de suas criações, gerando maiores gastos para o desenvolvimento da ave.

6.2 Intestino

A mucosa do trato gastrointestinal (TGI) é um elo entre o ambiente externo e o ambiente interno das aves. Assim, a mucosa atua como uma barreira seletivamente permeável que permite a absorção de substâncias importantes – como os nutrientes – e a exclusão de substâncias nocivas – como as toxinas (PERRY, 2016).

Vários estudos relatam os efeitos das micotoxinas na morfologia das vilosidades intestinais. As vilosidades aumentam a absorção superficial de água e nutrientes através da parede intestinal e, por conta disso, anormalidades em sua morfologia podem comprometer a saúde do animal (GRENIER; APPLGATE, 2013).

As lesões encontradas no epitélio estão de acordo com o estudo de Akinrinmade *et al.* (2016) que, ao expor camundongos à AFB1, encontraram proliferação de enterócitos, células inflamatórias e outras alterações estruturais no epitélio. Roberto *et al.* (2017) apontam as micotoxinas como indutoras de patologia durante seu percurso no TGI, o que pode resultar em distúrbio da

função epitelial como barreira intestinal. A espessura epitelial aumenta como resultado do aumento das células caliciformes e da proliferação de enterócitos.

Os enterócitos e o muco produzidos pelas células caliciformes são responsáveis pela absorção de água e nutrientes (LIEW; MOHD-REDZWAN, 2018), mas também funcionam como uma barreira física aos antígenos presentes no trato digestivo. Assim, podemos supor que os altos valores de ISI desses parâmetros indicam um mecanismo de defesa do intestino contra a presença de micotoxinas.

Muller *et al.* (2005) pode corroborar pontuações ISI elevadas para infiltração epitelial inflamatória mostrada por grupos desafiados. Segundo os autores, o intestino é um órgão que possui componentes da imunidade adquirida denominado tecido linfóide associado ao intestino (GALT). A presença de células M no epitélio intestinal transporta o antígeno presente no lúmen para as células dendríticas presentes na placa de Peyer, onde ocorre a ativação das células de defesa contra esse antígeno. Após essa ativação, as células GALT produzem plasma e células T maduras que se espalham por toda a mucosa intestinal.

De acordo com Olkowski *et al.* (2006) e Belote *et al.* (2018), como consequência da exposição das aves a antígenos, a lâmina própria fica hiperêmica e infiltrada com inúmeras células inflamatórias. Alterações significativas são encontradas principalmente na interface do domínio basal do enterócito e da lâmina própria, que causam danos à integridade do intestino. Neste estudo, os fragmentos se comportaram de forma diferente em relação à espessura e infiltração inflamatória na lâmina própria devido à exposição às micotoxinas. O duodeno não apresentou diferença entre os grupos desafiados e NC enquanto no jejuno, todos os grupos desafiados apresentaram altos escores de espessura e também infiltração inflamatória, e no íleo, os grupos desafiados apresentaram valores elevados de espessura da lâmina própria, mas apenas o grupo CPA + AFB1 apresentou diferença significativa para o infiltrado inflamatório quando comparado ao CN.

Akinrinmade *et al.* (2016) realizaram um estudo morfológico do intestino na presença de AFB1. Os autores encontraram não apenas alterações no epitélio intestinal, mas também infiltrado inflamatório na lâmina própria, resultado

que concorda com os achados deste estudo. A aflatoxina B1 é considerada a micotoxina com maior risco à vida, mas sua toxicidade intestinal pode ser comparada a outras micotoxinas (LIEW; MOHD-REDZWAN, 2018). Devido a isso, os resultados encontrados neste estudo mostraram toxicidade semelhante entre CPA e AFB1 na mucosa intestinal.

6.3 Fígado

As micotoxinas apresentam diversos efeitos biológicos prejudiciais à saúde animal, incluindo hepatotoxicidade. Os efeitos da necrose e proliferação do ducto biliar encontrados neste estudo foram identificados anteriormente na década de 1960, quando as aflatoxinas foram isoladas e caracterizadas (D'MELLO *et al.*, 1997). Devido a isso, muitos estudos relacionados ao dano hepático da AFB1 foram realizados.

AFB1 é conhecida por ser mutagênica e carcinogênica em intoxicações crônicas e seus efeitos agudos também foram previamente estudados (STEYN, 1995). A forma ativa da AFB1 é o metabólito identificado como AFB1-epóxido que é o responsável pelas lesões bioquímicas causadas pela micotoxina. Este composto é altamente eletrolítico e capaz de reagir rapidamente com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas, o que causa danos graves ao organismo (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). O ácido ciclopiazônico não apresenta essa variedade de estudos e seus efeitos hepatotóxicos ainda carecem de esclarecimento.

Jaskiewicz *et al.* (1988) desafiaram primatas não humanos com AFB1 e CPA, separadamente e simultaneamente. Ao analisar o fígado dos animais do grupo CPA, não foi encontrada necrose. No entanto, houve necrose de hepatócitos nos grupos contendo AFB1 isolado e em associação com o CPA. Neste estudo, esse resultado se repetiu. Portanto, como trabalhamos com outra espécie animal, os achados mostraram que a AFB1 também é responsável pela necrose celular em tecidos hepáticos de frangos de corte.

Os resultados encontrados para a aflatoxina B1 estão de acordo com os relatados por Ortatatli e Oguz (2001) e Saleemi *et al.* (2020), em que são identificados sinais de necrose e proliferação de ductos biliares. Todos os parâmetros, quando analisados separadamente, não indicaram diferença significativa entre o grupo PCA e o grupo CN, mas quando somados para gerar o número total de ISI para o fígado, o grupo PCA foi alterado significativamente ($p < 0,05$). Antony *et al.* (2003) identificaram o CPA como potencialmente hepatotóxico testando-o em ratos, o que corrobora os resultados encontrados.

Segundo Oliveira e Corassin (2014), a sensibilidade das aves ao AFB1 se deve à rápida absorção da micotoxina pelo TGI. Após essa absorção, a AFB1 liga-se rapidamente à albumina e é distribuída aos tecidos, principalmente ao fígado.

7 CONCLUSÃO

Foi possível perceber que 60 μ g de ácido ciclopiazônico por dia, 10 μ g de aflatoxina B1 por dia ou as duas micotoxinas administradas nessa dosagem simultaneamente durante 28 dias apresentaram efeitos nocivos no intestino delgado e no fígado das aves.

Concluiu-se também que as micotoxinas se comportam de forma diferente nos fragmentos do intestino delgado analisados (duodeno, jejuno e íleo). Quando analisados os parâmetros de espessura e infiltrado inflamatório misto da lâmina própria, os escores foram diferentes entre os grupos desafiados de acordo com cada fragmento.

O método ISI provou ser uma ferramenta que pode mostrar quais parâmetros sofreram mais danos de acordo com os desafios realizados. Assim, demonstra a capacidade das micotoxinas testadas em afetar diferentes áreas do intestino e do fígado, sendo prejudicial para a saúde do animal.

Pelo exposto, este estudo contruibui com a necessidade de uma reavaliação quantos aos limites de exposição para AFB1 estabelecidos na

legislação, uma vez que mesmo com uma concentração considerada aceita pela lei, os animais apresentaram danos na saúde, e que esse cuidado se estenda ao CPA, pois a micotoxina também causou danos às aves contaminadas no intestino delgado e no fígado.

REFERÊNCIAS

BAQUIÃO, A. C.; OLIVEIRA, M. M. M.; REIS, T. A., ZORZETE, P.; ATAYDE, D. D.; CORREA, B. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food Chem.** v.139, p.1127-1132, 2013.

BARBAS, C.; DAMS, A.; MAJORS, R. E. Separation of Aflatoxins by HPLC. **Agilent Technologies**. Estados Unidos, 2005. Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-3634EN.pdf>

BINDER, E. M.; TAN, L. M.; CHIN, L. J.; RICHARD, J. World wide occurrence of mycotoxins in commodities, feed sand feed ingredients. **Anim. Feed Sci. and Technol.** Amsterdam, v.137, n.3-4, p.265-282, 2007.

BULLERMAN, L. B. Mycotoxins-Classification. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Oxford: Elsevier, p.1512-1520, 1999.

BURDOCK, G. A., FLAMM, W. G. Safety Assessment of the Mycotoxin Cyclopiazonic Acid. **Int. J. Toxicol.** v.19, n.3, p.195-218, 2000.

D`MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Anim. Feed Sci. Technol.** Amsterdam, v.69, n.1-3, p.155-166, 1997.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. 2004. Available at: <http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>

GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Predicting mycotoxins in foods: A review. **Food Microbiol.** London, v.26, n.8, p.757-769, 2009.

GONÇALVES, B. L.; ROSIM, R. E.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. The *in vitro* ability of different *Saccharomyces cerevisiae*: based products to bind aflatoxin B1. **Food Control.** v.47, p. 298-300, 2015.

HAYASHI, Y.; YOSHIZAWA, T. Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method. **Food Chem.** v.93, p.215-221, 2005.

HEPERKAN, D.; SOMUNCUOGLU, S.; KARBANCIOGLU-GÜLER, F.; MERCIK, N. Natural contamination of cyclopiazonic acid in dried figs and co-occurrence of aflatoxin. **Food Control.** Vurrey, v.23, p.82-86, 2012.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology.** Amsterdam, v.167, n.2, p.101-134, 2001.

IARC – International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v.100F, 2012.

MÁRCIA, B. A.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 18, n. 4. Campinas, 1998.

MOLDES-ANAYA, A. S.; ASP, T. N.; ERIKSEN, G. N.; SKAAR, I., RUNDBERGET, T. Determination of cyclopiazonic acid in food and feeds by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** v. 1216, n. 18, p. 3812-3818, 2009.

NORRED, W. P.; MORRISSEY, R. E.; RILEY, R. T.; COLE, R. J.; DORNER, J. Distribution, excretion and skeletal muscle effects of the mycotoxin [14C]cyclopiazonic acid in rats. **Food Chem. Toxicol.** v.23, p.1069–1076, 1985.

OLIVEIRA, C. A.; CORASSIN, C. H. Aflatoxins. In: DUARTE, S. C.; PENA, A. L. S.; LINO, C. de M. **Mycotoxins and their implications in food safety**. Future Medicine: London, p. 6-19, 2014.

OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L; Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Rev. Saúde Pública.** v.31, p. 417-424, 1997.

PETSKA, J. J.; BONDY, G. S. Alteration of immune function following mycotoxin exposure. **Can J Physiol Pharmacol.** v.68, p.1009-1016, 1990.

RAO, B. L.; HUSAIN, A. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing 'kodua poisoning' in man and its production by associated fungi. **Mycopathologia.** v.89, p.177–180, 1985.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. **Int. J. Food Microbiol.** Amsterdam, v.119, n.1-2, p.3-10, 2007.

RODRIGUES, P.; VENANCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **Int. J. Food Microbiol.** Amsterdam, v.129, n.2, p.187-193, 2009.

STEYN, P. S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicol. Lett.** Amsterdam, v.82-83, p.843-851, 1995.

TIRADO, M. C.; CLARKE, R.; JAYKUS, L. A.; McQUATTERS-GOLLOP, A.; FRANK, J. M. Climate change and food safety: A review. **Food Res. Int.** Essex, v.43, n.7, p.1745-1765, 2010.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Anal. Chim. Acta.** Amsterdam, v.632, n.2, p.168-180, 2009.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **Am J Clin Nutr.** v.80, p. 1106-1122, 2004.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **J. Saudi Chem. Soc.** v.15, n.2, p.129-144, 2011.

ANEXO

Acta Toxicol. Argent. (2021) 29 (2): 67-76

The use of histological parameters to assess intestinal and liver health on broilers challenged isolatedly and simultaneously with cyclopiazonic acid and aflatoxin B1

El uso de parámetros histológicos para evaluar la salud intestinal y hepática en pollos de engorde desafiados de forma aislada y simultánea con ácido ciclopiazónico y aflatoxina B1

Domingues, Jéssica M.¹; Schreiner Spiassi, Bárbara²; Sanches, Adrien W.D.²; Belote, Bruna L.²; Santin, Elizabeth²; Wagner, Ricardo^{1*}.

¹Toxicology Laboratory, Department of Clinical Analysis, Federal University of Paraná. Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632. Jardim Botânico. CEP 80210-170, Curitiba, PR, Brazil. ²Microbiology and Avian Pathology Laboratory, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná. Rua dos Funcionários, 1540. Cabral, CEP 90035-050, Curitiba, PR, Brazil.

* ricardo.wagner@ufpr.br

Recibido: 22 de enero de 2021

Aceptado: 30 de junio de 2021

DOMINGUES, J. M.; SPIASSI B. S.; SANCHES A.W.D.; BELOTE B.L.; SANTIN E.; WAGNER R. The use of histological parameters to assess intestinal and liver health on broilers challenged isolatedly and simultaneously with cyclopiazonic acid and aflatoxin. **Acta Toxicol. Argent.** v. 29, n.2, p.11-20. 2021.

Disponível em: https://toxicologia.org.ar/wp-content/uploads/2022/03/Acta_29-2.ok_.pdf