

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO BIOMARCADOR (ESFINGANINA /
ESFINGOSINA) NA INTOXICAÇÃO POR FUMONISINAS
EM SUÍNOS**

JOSÉ MÁRCIO PIMENTEL MARTINS

2005



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

**AVALIAÇÃO DO BIOMARCADOR (ESFINGANINA /
ESFINGOSINA) NA INTOXICAÇÃO POR FUMONISINAS EM
SUÍNOS**

JOSÉ MÁRCIO PIMENTEL MARTINS

Sob a orientação da Professora

Glória Maria Direito

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

Seropédica, RJ
Julho de 2005

636.408959

M381a

T

Martins, José Márcio Pimentel,
1975-

Avaliação do biomarcador
(Esfinganina / Esfingosina) na
intoxicação por fumonisinas em
suínos / José Márcio Pimentel
Martins - 2005.

46f. : il.

Orientador: Glória Maria
Direito.

Dissertação (Mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Instituto de
Veterinária.

Bibliografia: f. 28-46.

1. Suíno - Doenças - Teses. 2.
Suíno - Toxicologia - Teses. 3.
Fusarium - Teses. 4. Toxicologia
veterinária - Teses. I. Direito,
Glória Maria Direito , 1961- . II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Instituto de
Veterinária. III. Título.

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

JOSÉ MÁRCIO PIMENTEL MARTINS

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/07/2005



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



Prof. Dr. Reinaldo Bolognini Orsi, Ph.D.
Universidade Paulista



Prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, Ph.D., L.D.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Marcelo Elias Fraga, Ph. D.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

DEDICATÓRIA

Agradeço a **Deus** por esta e por todas as conquistas que tens me proporcionado;

Aos meus pais José Maria Martins e Madalena Pimentel Martins pelo amor e dedicação;

Ao amigo José Eduardo dos Santos pela dedicação de um Pai;

Aos meus familiares e amigos pela convivência e solidariedade;

À Alessandra Moura Vieira pelo carinho, compreensão e motivação para novas conquistas.

AGRADECIMENTOS

- A professora Dra. Gloria Maria Direito do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do IV/UFRRJ pela orientação, confiança e constante incentivo na realização deste trabalho.
- Ao professor Dr. Marcelo Elias Fraga do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do IV/UFRRJ pelo constante incentivo.
- À Gerência do Matadouro de Suínos Lagoas, por permitir a colheita das amostras de sangue e urina, imprescindíveis para a realização deste trabalho.
- Ao serviço de Inspeção do Estado do Rio de Janeiro, por permitir o acesso ao matadouro de suínos.
- A coordenação do Curso de Mestrado em Microbiologia Veterinária pela atenção e disponibilidade.
- Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da IV/UFRRJ.
- À professora Dra. Djalva Maria da Nóbrega Santana do Departamento de Tecnologia de Alimentos do IT/UFRRJ pela atenção e auxílio nas análises de cromatografia líquida.
- Ao aluno de graduação do curso de Medicina Veterinária Robson Ernesto da Silva estagiário do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária pelo auxílio técnico.
- Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do IV/UFRRJ pelo auxílio técnico.
- À equipe técnica e administrativa do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da IV/UFRRJ.

BIOGRAFIA

José Márcio Pimentel Martins, filho de José Maria Martins e Madalena Pimentel Martins, nasceu em 14 de março de 1975 no bairro Campo Grande - Município do Rio de Janeiro/RJ.

Iniciou suas atividades escolares na Escola Santa Bárbara 1980, terminando-as em 1988, no Município de Rio de Janeiro - RJ.

Em 1989 iniciou o segundo grau no Colégio Estadual Prof. F. A. Raja Gabaglia e Concluiu no Educandário Monteiro Lobato em 1991, ambos no Município do Rio de Janeiro - RJ.

Em 1995, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), tendo se transferido para o curso de Medicina Veterinária da mesma universidade em 1998 e concluindo-o em 2001.

Estagiou na área de Micologia Veterinária, no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ em 1998.

Foi Monitor da disciplina de Micologia Veterinária, no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ em 1999.

Atuou como Médico Veterinário da Defesa Sanitária Animal da Secretaria Estadual de Agricultura Abastecimento Pesca e Desenvolvimento do Interior (SEAAPI) do Estado do Rio de Janeiro de abril de 2002 até julho de 2005.

No início de 2003 prestou seleção para o Curso de Mestrado em Microbiologia Veterinária da UFRRJ, tendo sido selecionado, iniciando suas atividades em março do mesmo ano.

Em 2004 prestou concurso para o cargo de Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura tendo sido aprovado e iniciou suas atividades em julho de 2005 no município de Videira – SC.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativa.....	1
1.2 Objetivos.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Suinocultura no Brasil e no Mundo	3
2.2 Micotoxinas	3
2.3 Produção de Micotoxinas	4
2.4 Fumonisinias.....	4
2.5 Ocorrência.....	5
2.6 Efeitos Biológicos	5
2.6.1 Leucoencefalomalacia equina (LEME)	6
2.6.2 Edema pulmonar e hidrotórax em suínos	6
2.6.3 Toxidez em aves.....	7
2.6.4 Toxidez em humanos.....	7
2.7 Esfingolipídios	7
2.8 Efeitos das Fumonisinias na Espécie Suína.....	9
2.9 Determinação de Esfingosina e Esfinganina	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Amostras.....	11
3.2 Local.....	12
3.3 Padrões de Esfingolipídios	12
3.4 Reagentes.....	12
3.4.1 Reativo para derivatização	12
3.4.2 Solventes	12
3.4.3 Soluções	12
3.5 Equipamentos.....	12
3.5.1 Cromatógrafo a líquido.....	12
3.5.2 Centrífuga	13
3.5.3 Balança analítica.....	13
3.5.4 Balança.....	13
3.5.5 Banho de ultra-som.....	13
3.5.6 Agitador orbital Orbit Shaker.....	13
3.6 Determinação de Esfingolipídios	13
3.6.1 Método I: Determinação de esfingosina e esfinganina na urina (CASTEGNARO et al., 1996).	13
3.6.2 Método II: Determinação de esfingosina e esfinganina no soro (CASTEGNARO et al., 1998)	15
3.7 Análise Cromatográfica.....	16
3.7.1 Condições cromatográficas	16
3.8 Quantificação	16
3.8.1 Cálculo da proporção Sa/So:.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Análise do Soro.....	19
4.2 Análise da Urina.....	23
5 CONCLUSÕES	27
6 REFERÊNCIAS-9 BIBLIOGRÁFICAS.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Interferência da FB ₁ na biossíntese dos esfingolípídios	8
2	Homologia estrutural da FB ₁ entre esfingosina e esfinganina	8
3	Obtenção das amostras de sangue por sangria.....	11
4	Obtenção das amostras de urina por punção vesical.....	11
5	Cromatógrafo a Líquido	13
6	Fluxograma do método utilizado para a extração de esfingosina e esfinganina da urina	15
7	Fluxograma do método utilizado para a extração de esfingosina e esfinganina do soro	16
8	Cromatograma de amostra de soro com efeitos da FB ₁ e da AFB ₁	18
9	Cromatograma de amostra de urina com efeitos da FB ₁ e da AFB ₁	19
10	Cromatograma de amostra de soro com efeitos da FB ₁ e da AFB ₁	20
11	Cromatograma de amostra de urina com alterações características da intoxicação por FB ₁	23
12	Cromatograma de amostra de urina com alterações características da intoxicação por FB ₁ e AFB ₁	24
13	Esvaziamento vesical em fêmeas	27

ÍNDICE DE TABELAS

1	Concentrações, em ng/ml, de Sa e So nas amostras de soro	21
2	Concentrações, em ng/ml, de Sa e So nas amostras de urina	25

ÍNDICE DE GRÁFICOS

1	Análise das amostras de soro.....	19
2	Máximos e mínimos de Sa e So nas amostras de soro.....	22
3	Análise das amostras de urina.....	23
4	Máximos e mínimos de Sa e So em amostras de urina.....	25

RESUMO

MARTINS, José Márcio Pimentel. **Avaliação do biomarcador (esfinganina / esfingosina) na intoxicação por fumonisinas em suínos**. Seropédica: UFRRJ, 2005. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

Fumonisinas são m grupo de micotoxinas produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, fungo de ampla distribuição mundial e com alta prevalência em grãos, principalmente no milho, que freqüentemente veiculam estas toxinas para subprodutos ou para alimentos destinados ao consumo humano e animal. As fumonisinas são inibidores específicos da síntese dos esfingolipídios, causando acúmulos de esfinganina (Sa) e esfingosina (So) nas células. A proporção entre Sa e So tem sido relatada como sendo eficaz biomarcador de intoxicação por fumonisinas em animais e humanos, podendo ser utilizada em levantamentos epidemiológicos sobre a exposição de uma determinada população às fumonisinas. Nos equídeos causam leucoencefalomalácia equina (LEME), edema pulmonar e hidrotórax em suínos, hepatotoxidez, hepatocarcinogenicidade e nefropatias em ratos, aves e coelhos, além de diversos efeitos no sistema imune. O principal ingrediente das rações utilizadas para suínos é o milho e seus derivados e por isso a pesquisa de micotoxinas, em especial fumonisinas nas rações utilizadas em suinoculturas é de vital importância devido às perdas econômicas acarretadas. Foram utilizadas amostras de sangue e urina de quatro granjas fornecedoras de um abatedouro de suínos, localizado no município do Rio de Janeiro. As amostras de sangue foram obtidas durante a sangria e as de urina por punção vesical, no momento da evisceração. Todas mantidas sob refrigeração e congelamento até a análise. O número de amostras coletadas foi referente a 10 % dos animais abatidos de cada propriedade / dia, perfazendo o total de 76 amostras, durante 60 dias. Para determinação de esfingolipídios foram utilizados os métodos propostos por CASTEGNARO *et al.* (1996, 1998), para análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados demonstraram que 17,77 % das amostras de soro tinham o perfil típico de intoxicação para fumonisinas, em 11,11 % apresentaram perfil sugestivo da influência de aflatoxinas. Em uma das propriedades 100 % dos animais avaliados apresentaram alterações típicas da ação das fumonisinas. Nas amostras de urina, 26 % indicaram a ação típica das fumonisinas e em 39,13 % as alterações indicaram a influência das aflatoxinas além das fumonisinas. A utilização deste biomarcador em condições naturais mostrou-se eficaz na detecção da exposição às fumonisinas, porém deve-se considerar o comportamento tanto da So quanto de Sa, que permitem uma avaliação mais abrangente.

Palavras chave: *Fusarium*, suínos, esfingolipídios.

ABSTRACT

MARTINS, José Márcio Pimentel. **The Evaluation of the biomarker (sphinganine / sphingosine) of the intoxication for fumonisin in swine.** Seropédica: UFRRJ, 2005. (Dissertation, Master's degree Veterinary Microbiology).

Fumonisin are a group of mycotoxins produced by species of the genus *Fusarium*, fungi of world wide distribution and with high prevalence in grains, mainly in corn, that frequently transmit these toxins to by-products or to foods destined to the human and animal consumption. The fumonisins are specific inhibitors of the synthesis of sphingolipids, causing sphinganine (Sa) and sphingosine (So) accumulations in the cells. The proportion among Sa and So has been told as being an effective intoxication biomarker for fumonisins in animals and humans. Could be used as a biomarker, in epidemic risings about the exhibition of a certain population to the fumonisins. In the equine it causes leukoencephalomalacia (ELEM), pulmonary edema in swine, liver toxicity, liver carcinogenicity and kidney disease in rats, poultry and rabbits, besides several effects in the immune system. The main ingredient of the rations used for swine is the corn and their derived and for that the mycotoxins research, especially fumonisins in the rations used in pigs farms is of vital importance due to the carted economical losses. There were used samples of blood and urine of four swine farms that provided swine to the slaughterhouse, in the municipal district of Rio de Janeiro. The samples of blood were obtained during the sangria and urine from vesical puncture. All samples were maintained under cooling and freezing until the analysis. The number of collected samples was regarding 10 % of the animals sloughed of each property / day, making the total of 76 samples, for 60 days. For the sphingolipids determination the methods used were proposed by CASTEGNARO *et al.* (1996, 1998), for analysis in liquid chromatograph of high efficiency. The results demonstrated that 17,77 % of the serum samples had the typical profile of intoxication for fumonisins, in 11,11 % it showed suggestive profile of the aflatoxins influence. In one of the properties 100 % of the appraised animals presented typical alterations of fumonisin action. For the urine samples, 26 % indicated the typical action of the fumonisins and in 39,13 % the alterations indicated the influence of the aflatoxins besides the fumonisins. Therefore the use of this biomarker for detecting fumonisin exposition in natural conditions was shown effective, however it should be considered the behavior as much of the Sa as So, allowing a deeper evaluation.

Key words: *Fusarium*, swine, sphingolipids.

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são substâncias com pouca ou nenhuma correlação entre si, produzidas pelo metabolismo secundário de fungos. São substâncias importantes porque algumas são responsáveis por doenças graves, causando danos à saúde humana e animal.

Cerca de 400 tipos de micotoxinas são conhecidos atualmente. Com frequência estão envolvidas com patologias em animais de produção, acarretando enormes prejuízos econômicos, decorrentes da utilização de alimentos contaminados por estas substâncias tóxicas. A ação das toxinas ocorre, predominantemente, por meio da ingestão de alimentos contaminados, sobretudo de cereais e subprodutos da indústria alimentícia utilizados na preparação de rações. Quando não provocam a morte dos animais em processos de intoxicação aguda, as micotoxinas causam efeitos mais sutis, geralmente promovem redução de peso, diminuição da postura, diminuição da conversão alimentar, problemas reprodutivos, aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas e parasitárias, entre outros.

Fumonisinias são um grupo de micotoxinas produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, fungo de ampla distribuição mundial e com alta prevalência em grãos, no milho principalmente, que freqüentemente veiculam estas toxinas para subprodutos ou para alimentos destinados ao consumo humano e animal.

As fumonisinias são inibidores específicos da síntese dos esfingolipídios, causando, desta forma, acúmulos de esfingonina (Sa) e esfingosina (So) nas células. A proporção entre Sa e So tem sido relatada como sendo eficaz biomarcador de intoxicação por fumonisinias em animais e humanos, podendo ser utilizada em levantamentos epidemiológicos sobre a exposição de uma determinada população.

O milho é a principal fonte de contaminação no que tange à forma de exposição por fumonisinias, já que este é o principal ingrediente das rações utilizadas para suínos. A pesquisa de micotoxinas ou de indícios da sua presença, em especial a de fumonisinias, nas rações utilizadas em suinoculturas é de vital importância devido à magnitude das perdas econômicas acarretadas por micotoxicoses nas granjas de suínos.

A possibilidade da ocorrência de micotoxicoses, derivadas da ingestão concomitante de duas ou mais toxinas, é perfeitamente possível. Estudos realizados com milho produzido no Brasil apontam a ocorrência simultânea de cepas toxígenas de *Fusarium* e *Aspergillus*, produtoras de fumonisinias e aflatoxinas, respectivamente.

No entanto, até o presente momento, pouco se sabe sobre os efeitos combinados entre micotoxinas, embora seja um problema mundial. Sabe-se que muitos efeitos biológicos podem ser desencadeados quando ocorrem combinações entre micotoxinas, as quais podem interagir no organismo, promovendo diversos sinais clínicos, de difícil identificação. A partir da descoberta das fumonisinias, começaram a surgir relatos sobre a co-ocorrência destas micotoxinas em diversos produtos agrícolas.

1.1 Justificativa

A presença freqüente de fumonisinias em amostras de milho caracteriza o risco de intoxicação que a espécie suína está exposta. Métodos que possibilitem a caracterização de intoxicação são sempre indicados, principalmente no caso de uma substância que não apresenta bioderivados e que a sua determinação em amostras de

alimentos, fluidos biológicos e tecidos envolvem a utilização de metodologias de análise não acessíveis a muitos laboratórios. Portanto a proposta do uso de biomarcador facilita em muito toda a rotina nos levantamentos epidemiológicos e em identificação de casos clínicos.

1.2 Objetivos

Testar a eficiência do biomarcador epidemiológico, pela detecção das bases esfingóides esfinganina e esfingosina, para monitoramento da exposição dos suínos a fumonisina;

Avaliação dos níveis de Sa e So em soro e urina de suínos abatidos em matadouro;

Fazer correlação entre os níveis de Sa e So e o grau de intoxicação natural por fumonisinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Suinocultura no Brasil e no Mundo

A carne suína é a mais industrializada, comercializada e consumida no mundo, considerada nas últimas décadas como importante fonte de proteína animal para a alimentação humana. Porém no Brasil seu consumo perde para as carnes de bovinos e frango. Dados fornecidos pelo departamento de agricultura dos Estados Unidos relatam que a China, a União Européia e os Estados Unidos serão responsáveis por cerca de 81,3 % da produção mundial, sendo a China o maior produtor com 43,3 milhões de toneladas em 2002, seguida pela União Européia com 17,8 milhões e os Estados Unidos com 8,9 milhões (CENTEC, 2004).

A suinocultura no Brasil é mais representativa nas regiões Sul com 15,6 milhões de cabeças, Sudeste com 5,6 milhões e Nordeste com 5,2 milhões. Estas regiões representam respectivamente 49,9 %, 18 % e 16,8 % do rebanho suíno brasileiro. No Brasil o consumo *per capita* de carne suína é de 11,23 kg/ano enquanto nos Estados Unidos e Dinamarca são respectivamente 30,1 e 64,2 kg/ano (CENTEC, 2004).

2.2 Micotoxinas

As micotoxinas são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos. Têm sido associadas à ocorrência de várias doenças em humanos e animais, causando, portanto, prejuízos econômicos incalculáveis no setor agropecuário e a saúde pública (STOLOFF, 1976; COULOMBE, 1991; YOSHISAWA *et al.*, 1996).

O primeiro relato de intoxicação por micotoxinas ocorreu na década de 60 na Inglaterra com o episódio conhecido como “Doença X dos Perus”, onde mais de 100.000 aves morreram após terem sido alimentadas com farelo de amendoim contaminado por *Aspergillus flavus*. Deste farelo de amendoim foi obtido um extrato clorofórmico que ao ser administrado em marrecos jovens, foi capaz de reproduzir lesões hepáticas semelhantes à doença original, sendo então a toxina denominada de *A. flavus* toxin ou aflatoxina (ALLCROFT *et al.*, 1961; ALLCROFT & CARNAGHAM, 1962). Desde a década de 60 muitas pesquisas têm sido realizadas e novas micotoxinas têm sido descobertas e também seus efeitos tóxicos nos organismos humanos e animais.

A contaminação pode ser direta quando o alimento é contaminado pelo fungo toxígeno e este produz toxina ou indireta quando a toxina está presente no alimento mesmo após a remoção do fungo produtor (SMITH *et al.*, 1995).

No Brasil, os relatos apontam, principalmente, a presença de aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, ocratoxina A e deoxinivalenol (RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002).

As micotoxicoses podem ser agudas ou crônicas. Na forma aguda ocorrem sinais clínicos típicos de cada toxina, com síndromes hepáticas e hemorrágicas, nefrites, necroses de epitélio oral e intestinal, síndromes do sistema nervoso central (SNC) e nos casos extremos a morte. Porém, na grande maioria, as micotoxicoses ocorrem de forma crônica onde os sinais clínicos não estão muito bem definidos e podem aparecer, nos animais de produção, como uma simples queda na produtividade (COULOMBE, 1991; VESONDER *et al.*, 1991; HUSSEIN & BRASEL, 2001).

Muitos dos efeitos biológicos podem ser desencadeados quando ocorrem combinações entre micotoxinas, as quais podem interagir no organismo, promovendo os mais diversos sinais clínicos, de difícil identificação (PIER et al., 1973; WILSON et al., 1981; SMITH & HENDERSON, 1991).

Embora os fungos *A. flavus* e *F. verticillioides*, possam invadir grãos de cereais (ALMEIDA et al., 2000, 2002), são poucos os trabalhos sobre a ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas e até o presente momento, pouco se sabe sobre os efeitos interativos entre estas micotoxinas (POZZI et al., 2000; ORSI, 2000; DIREITO, 2003; RIBEIRO, 2005).

A partir da descoberta das fumonisinas, começaram a surgir relatos sobre a ocorrência destas micotoxinas em diversos produtos agrícolas (CHAMBERLAIN et al., 1993; SHETTY & BATT, 1997; UENO, 1997). A ocorrência simultânea de fumonisinas e aflatoxinas foi inicialmente descrita por CHAMBERLAIN et al. (1993), ao analisarem amostras de milho destinado à alimentação animal, nos Estados Unidos. A concentração de AFB₁ foi 321 ppb, enquanto que a de FB₁ foi de 1,58 ppm, em uma mesma amostra. Pouco se sabe sobre os efeitos interativos de aflatoxinas e fumonisinas em diferentes espécies animais e continuam sendo objeto de preocupação na comunidade científica mundial (PITTET, 1998; D'MELLO et al., 1999).

Baseando-se em evidências toxicológicas, a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer – IARC (1993) definiu o potencial carcinogênico para humanos, classificando as aflatoxinas na categoria 1 (carcinogênica) e as fumonisinas na categoria 2B (provavelmente carcinogênica) (SHEPHARD et al., 1996).

2.3 Produção de Micotoxinas

A produção da micotoxina pode ocorrer no campo, no armazenamento, no transporte, na industrialização ou em qualquer momento da fase de consumo desde que as condições, principalmente de temperatura e umidade, sejam favoráveis (MALLOZZI & CORRÊA, 1997). Dependendo de fatores como: a susceptibilidade do substrato, fatores físicos, como temperatura do ambiente, umidade do substrato, umidade relativa do ar, aeração, danos mecânicos e tempo de armazenamento; e a fatores fisiológicos como a capacidade genética, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos, presença de insetos e ácaros (CIEGLER, 1978; CENTEC, 2004).

2.4 Fumonisinias

As fumonisinas foram isoladas pela primeira vez em milho colonizado por *F. verticillioides*, anteriormente denominado *F. moniliforme*, na ração de equinos com LEME (GELDERBLUM et al., 1988), no entanto outros fungos do gênero *Fusarium* têm sido caracterizados como produtores de fumonisinas, como o *F. proliferatum* (ROSS et al., 1990), *F. nygamai* (THIEL et al., 1992), *F. anthophilum*, *F. dlamini* e *F. napiforme* (NELSON, 1992), *F. subglutinans* (SCOTT, 1993), *F. polyphialidicum* (ABBAS & OCAMB, 1995), *F. oxysporum* (AH SEO & WON LEE, 1999). Também foi descrita a produção de fumonisinas por *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (CHEN et al., 1992).

As fumonisinas são moléculas estruturalmente relacionadas, isoladas e caracterizadas por BEZUIDENHOUT et al. (1988). Das fumonisinas identificadas até o momento a FB₁ é quase sempre a mais abundante, (CHU & LI, 1994), com efeitos biológicos dependentes da espécie animal afetada. Entretanto, em qualquer que seja a espécie animal, o fígado é órgão alvo desta toxina (VOSS et al., 1993). Em humanos, sua atuação ainda não está bem esclarecida, mas alguns autores associaram a elevada

incidência de câncer de esôfago com o consumo de alimentos contendo elevados níveis de fumonisinas (SYDENHAM et al., 1991; RHEEDER et al., 1992; CHU & LI, 1994;).

A espécie fúngica produtora de fumonisinas, que ocorre mais comumente no milho e em outros tipos de grãos, é o *Fusarium verticillioides*. Das fumonisinas identificadas até o momento FB₁, FB₂ e FB₃ são as mais isoladas em alimentos contaminados, sendo a FB₁ quase sempre a mais abundante, representando cerca de 70 % da concentração total das fumonisinas (SYDENHAM et al., 1991; THIEL et al., 1991; MURPHY et al., 1993; CHU & LI, 1994).

Levantamentos sobre a ocorrência natural de fumonisinas, principalmente em milho e derivados, revelam que a presença de FB₁ é elevada podendo chegar a até 100 % das amostras analisadas (THIEL et al., 1992; VISCONTI & DOKO, 1994; SHEPHARD et al., 1996; YOSHIZAWA et al., 1996; PITTET, 1998; KPODO et al., 2000; RODRÍGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002; ALMEIDA et al., 2002, HASSEGAWA, 2004).

2.5 Ocorrência

Diversos levantamentos vêm sendo realizados no país. Em 195 amostras de milho híbrido, colhidos em São Paulo, ORSI et al. (1995) detectaram a presença de fumonisinas, das quais 90,2 % eram FB₁ e 97,4 % eram FB₂. As concentrações determinadas foram, em média, de 9,72 µg/g e 7,67 µg/g de FB₁ e FB₂, respectivamente. Em outro estudo da microbiota presente em cultivares de milho de três regiões diferentes do estado de São Paulo, ALMEIDA et al. (2000) verificaram que *Fusarium verticillioides* foi a mais freqüente. Sendo que 40 cepas isoladas produziram fumonisinas, em concentrações que variaram de 20 µg/g a 2,168 µg/g FB₁ e 10 µg/g a 380 µg/g de FB₂.

A presença marcante da FB₁ no milho foi também constatada em levantamento realizado em 110 amostras provenientes de cultivares diferentes no estado de São Paulo. As análises revelaram que todas as amostras estavam contaminadas com as fumonisinas B₁ (1,15 a 43,8 µg/g) e B₂ (0,08 a 11,65 µg/g) (CAMARGOS, 2000). No Paraná, onde a situação é semelhante, foram analisadas amostras de milho recém-colhido que apresentaram contaminação com FB₁ e FB₂, em concentrações variando de 0,37 a 13,46 µg/g e 0,20 a 6,92 µg/g, respectivamente (ONO et al., 2000).

Os limites legais para contaminação por fumonisinas ainda não foram estabelecidos, porém o “Mycotoxin Committee of the American Association Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda valores de 5, 10, e 50 µg/g pra rações de eqüinos, suínos, bovinos e de aves, respectivamente (MUNNKVOLD & DESJARDINS, 1997). No caso dos produtos destinados ao consumo humano, a “Food and Drug Administration” (FDA) recomenda níveis de 2,0 mg/kg de fumonisinas para farelo de milho; 3,0 mg/kg para milho de pipoca e 4,0 mg/kg para milho destinado à produção de massas. No Brasil ainda não foi estabelecido nenhum limite legal de tolerância.

2.6 Efeitos Biológicos

Os efeitos adversos das fumonisinas são complexos e existem alguns mecanismos de ação alternativos, que ainda estão sendo investigados. A atuação pode diferir com as espécies envolvidas e com os órgãos atingidos (TURNER et al., 1999). Alguns mecanismos sugeridos, para a hepatotoxicidade e carcinogenicidade, incluem a interrupção da biossíntese dos esfingolipídios, destruição dos lipídios celulares, acúmulo de ácidos graxos, proliferação celular, peroxidação de lipídios e estresse oxidativo (GELDERBLUM et al., 1996).

Dentre estes mecanismos, a interrupção da biossíntese dos esfingolipídios é o que tem despertado maior interesse e considerado como um prático e sensível biomarcador da citotoxicidade das fumonisinas (MERRILL et al., 1996). Mecanismo que foi demonstrado por WANG et al. (1991), por ser a FB₁ um análogo estrutural das bases precursoras dos esfingolipídios.

Os diversos estudos realizados apontam a FB₁ como responsável pela síndrome neurotóxica, em eqüinos, a leucoencefalomalácia (LEME) (MARASAS et al., 1988), edema pulmonar e hidrotórax em suínos (HARRINSON et al., 1990) devido ao decréscimo da função cardiovascular (SMITH et al., 2000), hepatotoxicidade, hepatocarcinogenicidade e nefropatias em ratos e coelhos (GELDERBLUM et al., 1991; RILEY et al., 1994; GUMPRECHT et al., 1995; BONDY et al., 1996), além de diversos efeitos no sistema imune (MARTINOVA & MERRILL, 1995). São igualmente tóxicas para aves domésticas, como perus (WEIBKING et al., 1993b; KUBENA et al., 1995), patos (BAILLY et al., 2001) e pintos (WEIBKING et al., 1993a).

Pesquisas sobre a toxicidade das fumonisinas, em cultivos celulares, indicaram que as fumonisinas (FB₁ e FB₂) são potentes inibidores específicos da biossíntese de esfingolipídios. NORRED et al. (1992) utilizaram cultivos primários de hepatócitos e de células epiteliais renais de suínos (LLC – PK1) e observaram que ocorreu também a diminuição da proliferação celular. A administração de altas doses causou morte celular após três dias de exposição. Com base nas alterações observadas, os autores sugeriram a hipótese da capacidade das fumonisinas causarem leucoencefalomalácia e promoverem a formação de tumores.

Em cultivos celulares de neurônios de camundongos foi observado que a FB₁ inibiu a biossíntese dos esfingolipídios e diminuiu a concentração dos esfingolipídios complexos, afetando a síntese de esfingomiélin. Entretanto a inibição foi reversível e retornou ao normal após 48 h da retirada da FB₁ (MERRILL et al., 1993).

RILEY et al. (1994) mostraram a correlação entre o grau de lesões ultra-estruturais e a interrupção da biossíntese de esfingolipídios em ratos (Sprague-Dawley). Constataram que o rim é mais sensível que o fígado e o acúmulo de esfinganina livre na urina reflete a severidade das alterações ocorridas nos rins, uma vez que está diretamente ligada com a concentração de células na urina.

2.6.1 Leucoencefalomalácia eqüina (LEME)

É uma doença neurotóxica que se caracteriza por causar necrose liquefativa multifocal da substância branca do cérebro. Associada ao consumo de milho contaminado com as FB₁ e FB₂ produzidas especialmente pelo *F. verticillioides*, encontrado em alimentos contaminados em diversas partes do mundo. Os sintomas clínicos nos eqüinos aparecem de forma aguda e se caracterizam por apatia, sonolência aparente, paralisia do lábio inferior e língua, andar em círculos, ataxia, convulsões tetânicas e morte (RODRIGUEZ, 1945; RIET-CORRÊA et al., 1982; MARASAS et al., 1988).

2.6.2 Edema pulmonar e hidrotórax em suínos

Em suínos o consumo de alimentos contaminados com fumonisinas é caracterizado por severo edema pulmonar e hidrotórax (HARRISON et al., 1990; RIBONI et al., 1997; GUMPRECHT et al., 2001).

A morbidade desta enfermidade varia entre 5 e 50 % com uma mortalidade maior que 50 % com curso clínico de 1 a 2 dias. Os sintomas respiratórios ocorrem de 4

a 6 dias depois de iniciada a ingestão de alimento contaminado a uma concentração de FB₁ superior a 10 ppm (OSWEILER et al., 1992; ROOS, 1994).

2.6.3 Toxidez em aves

Em aves alimentadas com dietas contendo altos níveis de fumonisina (maior que 75 ppm) são observadas alterações como: diminuição do ganho de peso, diminuição da postura, necrose hepática multifocal, hiperplasia biliar, anormalidades esqueléticas (arqueamento das patas) e elevada mortalidade (WEIBKING et al., 1993ab; KUBENA et al., 1995; BAILLY et al., 2001).

2.6.4 Toxidez em humanos

A ocorrência natural de FB₁ foi descrita pela primeira vez por SYDENHAM et al. (1990), após a análise de milho mofado coletado na região de Transkei no sudeste africano, onde estudaram as relações entre a presença do fungo *F. verticillioides* em milho com o alto índice de câncer de esôfago em humanos.

Vários estudos têm demonstrado que FB₁ pode ser o principal responsável pelos casos de câncer esofágico em regiões cuja população possui baixo poder aquisitivo e que tem o milho como sua principal fonte de energia. Investigações têm sido realizadas para demonstrar se a relação esfinganina / esfingosina está alterada em humanos expostos à FB₁ na dieta e para definir se FBs podem ser detectadas em amostras de sangue e urina de humanos (NORRED et al., 1994; SHEPHARD et al., 1996). Também tem sido descrito alto índice de câncer esofágico em regiões da China e Itália, consideradas de alto risco devido ao grande consumo de alimentos a base de milho (FRANCESCHI et al., 1990; YOSHIZAWA et al., 1994; UENO et al., 1997).

2.7 Esfingolipídios

A primeira classe descrita foi denominada em função do tecido de onde foi isolada, a esfingomielina, dando a falsa impressão de estar presente unicamente no tecido nervoso. Atualmente existem mais de 300 tipos conhecidos e organizados em grupos distintos, porém todos possuem uma estrutura básica idêntica. Nos mamíferos a base esfingóide mais comum é a D-eritro-esfingosina, no entanto outras bases (esfinagangina e 4-hidro-esfinganina) também são encontradas (MERRILL et al., 1997).

Classificados como lipídios estruturais, são encontrados nas membranas das células eucarióticas. Por serem estruturais são mais complexos que os de reserva, e exercem papel fundamental na manutenção das membranas celulares (HUWILER et al., 2000).

Até recentemente eram considerados como componentes inertes nas células, porém após a sua identificação como moléculas bioativas, participantes dos processos de sinalização celular, são alvos de estudos dos mecanismos fisiológicos (RIBONI et al., 1997; MERRILL et al., 1997; SCHMELZ & MERRILL, 1998; VESPER et al., 1999; HUWILER et al., 2000; PRIESCHL & BAUMRUKER, 2000).

Algumas alterações patológicas podem ser explicadas em função do acúmulo de bases esfingóides de cadeia longa e a redução da concentração de esfingolipídios causados pela interferência das fumonisinas, como a neurotoxidez associada à leucoencefalomalácia, que é evidenciada pela degeneração dos neurônios (MERRILL, 1991).

A proposta do provável mecanismo de ação causador dos efeitos biológicos das fumonisinas surgiu em 1991 por WANG et al., que sugeriram a sua interferência na biossíntese dos esfingolipídios (Fig. 1).

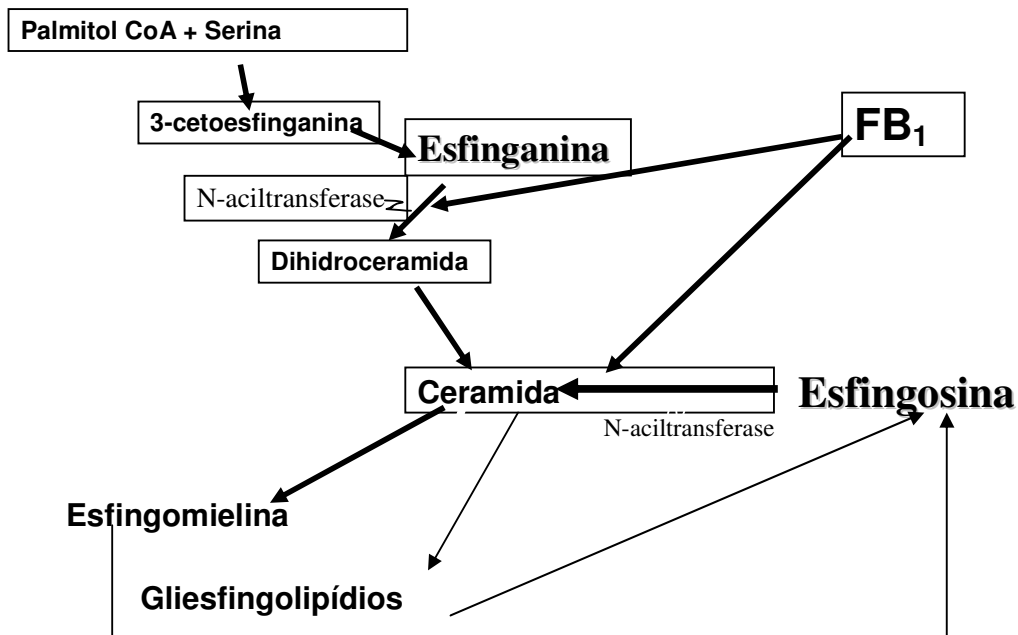


Figura 1: Interferência da FB₁ na biossíntese dos esfingolipídios (WANG et al., 1991).

A semelhança estrutural (Fig. 2) das fumonisinas com a esfingosina seria responsável pelo reconhecimento errôneo da esfinganina N-aciltransferase. Alterações na proporção sérica de esfinganina /esfingosina, foram observadas por WANG et al. (1992) em pôneis que receberam dieta contendo concentrações de 15 a 44 µg/g.

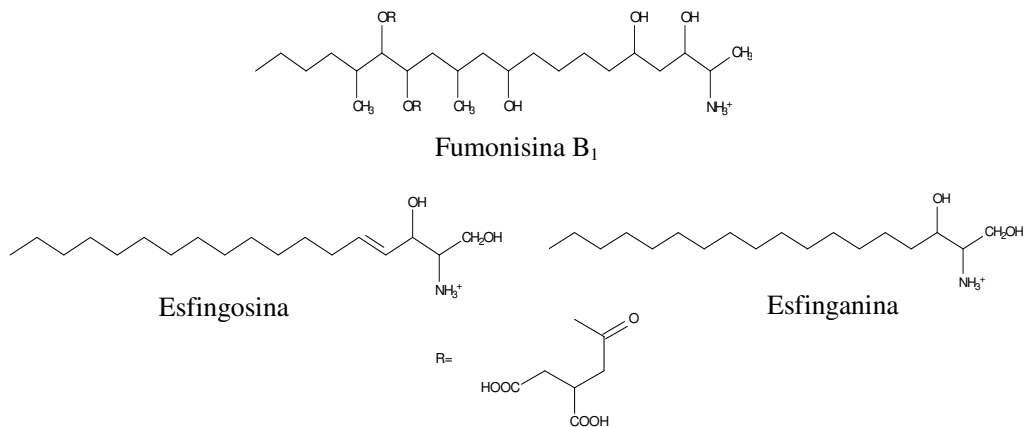


Figura 2: Homologia estrutural da FB₁ entre, as bases precursoras dos esfingolipídios, esfingosina e esfinganina (WANG et al., 1992).

2.8 Efeitos das Fumonisinias na Espécie Suína

Os suínos são animais sensíveis aos efeitos das micotoxinas, tanto que vêm sendo utilizados como modelo de experimentação em micotoxicologia, nos estudos sobre aflatoxinas (HARVEY et al., 1989) e fumonisinias (GUMPRECHT et al., 1998, 2001).

As alterações teciduais e séricas da taxa de esfinganina e esfingosina utilizadas como um biomarcador precoce da exposição a fumonisinias, foram estudadas inicialmente por RILEY et al. (1993). Neste estudo forneceram a suínos uma dieta contendo FB₁ e FB₂ em concentrações variando de 0 (< 0,1), 5, 23, 39, 101 e 175 ppm, durante 14 dias. Observaram ainda, que houve aumento da proporção de esfinganina / esfingosina em animais que receberam 5 ppm, e que nestes não foram observadas alterações nem nos parâmetros bioquímicos séricos nem na histopatologia. Em função da sensibilidade demonstrada pela proporção esfinganina / esfingosina os autores indicaram este parâmetro como um biomarcador eficiente para a exposição à fumonisina. Concluíram que a inibição da esfingosina (esfinganina) *N*-aciltransferase é fundamental para o desenvolvimento de patologias associadas com o consumo de fumonisinias.

Caracteristicamente estas bases estão presentes em concentrações baixas nas células, por integrarem o ciclo biossintético da ceramida, que em condições normais não permite que ocorra aumento das concentrações intracelulares. A concentração de esfingosina livre, em suínos é da ordem de nanomoles / grama de tecido, correspondendo de 3 a 5 vezes a concentração de esfinganina livre (RILEY et al., 1993).

A associação de FB₁ com deoxinivalenol (DON), administrada na dieta de leitões com cinco semanas de idade, acarretou potencialização dos efeitos tóxicos, no que se refere ao peso corporal, ao ganho de peso, ao peso absoluto do fígado e ao volume corpuscular médio de hemoglobina (HARVEY et al., 1996). Entretanto, na espécie suína, são poucas as pesquisas avaliando a interação de fumonisinias com outras toxinas.

Os efeitos da ação conjunta da FB₁ e AFB₁ foram descritos por HARVEY et al. (1995), que observaram aumento da atividade das enzimas AST, GGT e FA em leitões recém-desmamados que receberam dietas contendo 100 mg/kg de FB₁ e 2,5 mg/kg de AFB₁, durante 35 dias. Os animais também apresentaram redução nos pesos, absoluto e relativo, do fígado, lesões histológicas (hepatite necrótica e proliferação de ductos biliares), diminuição do ganho de peso e consumo de alimentos. Alterações semelhantes às obtidas com animais que receberam AFB₁ associada a ocratoxina A, deoxinivalenol (DON) e T₂ (HARVEY et al., 1989, 1990).

A alteração do perfil dos esfingolipídios em órgãos alvo da FB₁ foi observada pela primeira vez em suínos alimentados com milho contaminado com FB₁ e FB₂, nos quais ocorreu elevação gradual da concentração de Sa no fígado, rins e pulmões, demonstrando comportamento nitidamente dose-dependente. Quanto às concentrações de So, os resultados mostraram-se semelhantes aos da Sa, embora atingindo níveis inferiores. Conseqüentemente a proporção Sa/So elevou-se, tanto nos órgãos alvo quanto no soro, mesmo dos animais que receberam as menores doses da mistura de toxinas (5 ppm), e onde não foram notadas alterações na bioquímica sérica nem na histopatologia. Resposta semelhante foi observada em animais que receberam a FB₁ purificada. Baseados nestes resultados RILEY et al. (1993) confirmaram que a alteração da proporção Sa/So é um biomarcador sensível para esta espécie.

Ao analisar os níveis de Sa/So detectados no fígado, soro e urina de animais intoxicados experimentalmente com FB₁ e AFB₁, foi constatada pronunciada interferência da FB₁ no metabolismo dos esfingolipídios dos ratos, coelhos e suínos.

Nestas espécies, os níveis mais elevados da proporção Sa/So foram obtidos nos grupos intoxicados somente com FB₁. Nos suínos, entretanto, a associação FB₁ e AFB₁ foi capaz de elevar a proporção Sa/So, mas principalmente de estabelecer um padrão de alteração característico e distinto do obtido com a FB₁ isolada (DIREITO, 2003).

Existem diferenças de susceptibilidade em função do sexo, comprovado por ROTTER et al. (1996), em estudo com leitões. Os machos foram muito mais sensíveis aos efeitos da FB₁ do que as fêmeas apresentando redução do crescimento. Nesta mesma pesquisa observaram sinais clínicos e alterações teciduais com doses entre 0,1 e 10 ppm, todavia as alterações no biomarcador só foram detectadas com doses acima de 10 ppm.

HARVEY et al. (1996) verificaram que ao administrar doses de 50 ppm de FB₁, em suínos em fase de crescimento, causou severos danos no fígado e rins além de imunossupressão.

2.9 Determinação de Esfingosina e Esfinganina

A metodologia específica para a quantificação da esfingosina livre em tecidos biológicos foi desenvolvida por MERRILL et al. (1988). Extraídas com clorofórmio e metanol, seguido de hidrólise básica para remoção de lipídios interferentes. Os extratos de fígado foram derivados com o-ftaldialdeído e então analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. A separação das bases foi obtida em coluna de fase reversa C18 e eluídas com uma mistura de metanol: fosfato de potássio 5 mM (pH 7,0) (9:1, v/v). Na quantificação foi utilizada uma base de cadeia longa homóloga (C20) como padrão interno. Obtendo limite de detecção na faixa de picomoles.

A metodologia para a determinação, de esfingosina e esfinganina livres, em urina, soro sanguíneo e em outros tecidos foi adaptada e minuciosamente descrita por RILEY et al., (1994) do método proposto por MERRILL et al. (1988) com pequenas alterações nas etapas de extração de lipídios e derivação.

Embora os métodos propostos sejam eficientes são trabalhosos e consomem muito tempo em função das várias etapas a serem realizadas, SOLFRIZZO et al. (1997) desenvolveram um método mais simples para análise de esfingosina e esfinganina em urina humana e animal, com poucas etapas durante a extração e limpeza dos extratos, que consiste na utilização de uma minicoluna de sílica, extração com clorofórmio e derivatização com o-ftaldialdeído. Testaram amostras fortificadas com esfingosina e esfinganina em concentrações de 1,5 a 15 ng / ml e obtiveram 80 %, em média, de taxa de recuperação e com limite de detecção de 0,1 ng / ml.

CASTEGNARO et al. (1998) desenvolveram um novo método para a detecção de esfingosina e esfinganina em tecidos e urina que possibilita trabalhar com pequenos volumes de 0,3 a 0,5 ml, para urina de ratos ou 2 ml de urina humana. O método propõe a extração rápida e eficiente com acetato de etila, otimização de etapa de derivatização com o-ftaldialdeído e a utilização de gradiente, com a mistura de 0,07 M K₂HPO₄ : metanol (1:9) como solvente A e 100 % de metanol como solvente B. A detecção também é por fluorescência com 340 nm de excitação e 455 nm de emissão, e quantificação por padrão interno (C20). O método apresentou limite de detecção de 0,1 ng.

SHEPHARD & VAN DER WESTHUIZEN (1998) trabalhando com análise de esfinganina e esfingosina em soro de macacos expostos a fumonisina desenvolveram uma metodologia para extração de lipídios, limpeza em minicoluna de sílica e hidrólise alcalina antes da derivatização com o-ftaldialdeído. As determinações foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência e obtiveram boa reprodutibilidade, com menos de 10 % de desvio padrão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Coletaram-se amostras de sangue e urina, nos meses de maio, junho e setembro de 2004, de seis granjas produtoras de suínos que realizavam abate no Matadouro de suínos Lagoas, sob fiscalização do Serviço de Inspeção Estadual (SIE-RJ), no município do Rio de Janeiro.

As amostras de sangue foram obtidas durante a sangria (Fig. 3) e as de urina por punção vesical (Fig.4), no momento da evisceração. Todas mantidas sob refrigeração e congelamento até a extração.



Figura 3: Obtenção das amostras de sangue por sangria.



Figura 4 : Obtenção das amostras de urina por punção vesical.

O número de amostras coletadas foi referente a 10 % dos animais abatidos de cada propriedade/dia, perfazendo o total de 76 amostras.

3.2 Local

As amostras foram analisadas no laboratório do Núcleo de Micologia e Micotoxicologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ.

3.3 Padrões de Esfingolipídios

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

3.4 Reagentes

3.4.1 Reativo para derivatização

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

3.4.2 Solventes

Metanol, acetato de etila, etanol absoluto, todos com grau de pureza para cromatografia líquida. Água ultrapura (MilliQ) e 2 - mercaptoetanol.

3.4.3 Soluções

KOH 1M, tampão borato pH 10,5, solução de fosfato de potássio a 3 %.

3.5 Equipamentos

3.5.1 Cromatógrafo a líquido

Equipado com uma bomba Waters, modelo 510, detector de fluorescência Agilent, modelo 1100 Series, injetor loop fixo de 20 µL (Rheodyne), colunas Microsorb MV D8 e G8, C18 5 µ, 15x4,6 mm, Varian e Chemstation Plus da Agilent (Fig. 5).



Figura 5: Cromatógrafo a líquido equipado com: detector de fluorescência Agilent, modelo 1100 Series, injetor de loop fixo de 20 μ L (Rheodyne), coluna Microsorb MV, C18 5 μ , 15x4.6mm, Varian e Chemstation Plus da Agilent.

3.5.2 Centrífuga

IEC Model DPR – 6000, DAMON.

3.5.3 Balança analítica

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

3.5.4 Balança

Modelo Sartorius,KN WAAGEN Scientific Equipment.

3.5.5 Banho de ultra-som

THORNTON

3.5.6 Agitador orbital Orbit Shaker

Modelo 3520, Lab-Line Instruments.

3.6 Determinação de Esfingolipídios

Foram utilizados os métodos propostos por CASTEGNARO et al. (1996, 1998), para extração de esfingolipídios de soro e urina por análise em cromatografia líquida.

3.6.1 Método I: Determinação de esfingosina e esfinganina na urina (CASTEGNARO et al., 1996).

Isolamento das células

Submeter uma alíquota de 0,5 ml de urina homogeneizada à centrifugação a 2000 rpm por 5 min, descartar o sobrenadante e adicionar 2 ml de água destilada ao sedimento e mais 50 μ l de solução de hidróxido de potássio 1 M.

Extração dos esfingolipídios

Extrair por duas vezes com 2 ml de acetato de etila, após cada extração centrifugar a 700 g por 5 minutos, recolher a camada superior (acetato de etila). Misturar os dois extratos, evaporar o solvente até a secura, em banho-maria a 60 °C sob fluxo de nitrogênio.

Derivação

Preparo do reagente (OPA)

Para 12,5 mg de *o*-ftaldialdeído foram adicionados 250 µl de etanol, 12,5 µl de mercaptoetanol e completando o volume até 12,5 ml com uma solução de ácido bórico a 3 % pH 10,5. Este reagente foi mantido a 4° C ao abrigo da luz.

Reação de derivação

Os resíduos secos foram dissolvidos em 250 µl de metanol, submetidos ao ultrassom por 3 minutos e então derivados com 50 µl de OPA, aguardando 15 min para otimizar a reação, para então serem cromatografados.

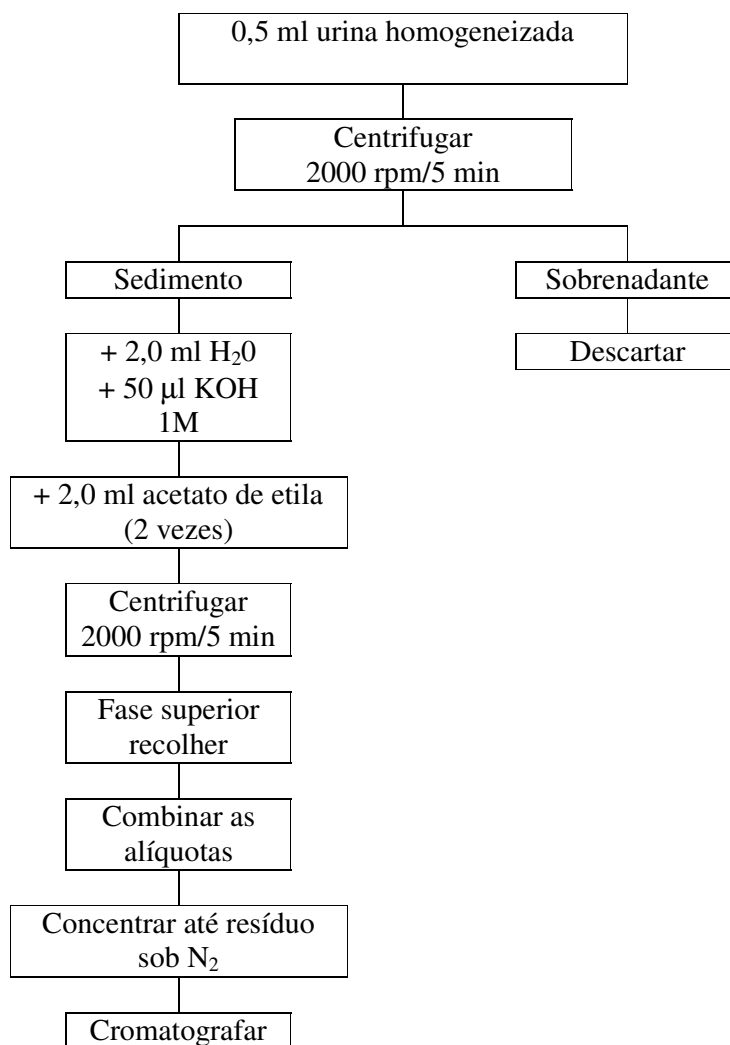


Figura 6: Fluxograma do método utilizado para a extração de esfingosina e esfinganina da urina (CASTEGNARO et al.,1996).

3.6.2 Método II: Determinação de esfingosina e esfinganina no soro (CASTEGNARO et al., 1998)

Extração

Em 0,5 ml de soro foram adicionados 1,5 ml da solução de cloreto de potássio e 50 µl da solução de hidróxido de potássio 1 M. Após homogeneização foram adicionados 4,0 ml de acetato de etila na mistura, seguida de agitação suave por 20 min e centrifugação a 700 g por 15 min. A fase superior foi coletada, armazenada em frasco âmbar e submetida a aquecimento (60° C) sob fluxo de N₂ até resíduo. Os extratos foram armazenados a 10° C.

Derivação

Os resíduos dos extratos foram redissolvidos com 250 µl da mistura metanol:água (9:1, v/v) e derivados como para urina.

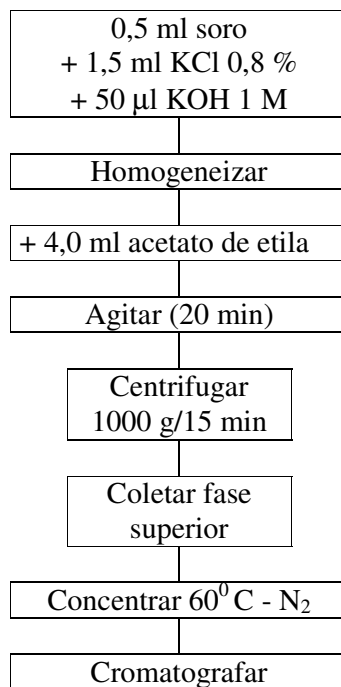


Figura 7: Fluxograma do método utilizado para a extração de esfingosina e esfinganina do soro (CASTEGNARO et al.,1998).

3.7 Análise Cromatográfica

3.7.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em sistema isocrático, utilizando a fase móvel composta de metanol:água (9:1, v/v), eluída a 1 ml / min, proposta por SHEPHARD et al. (1998). Os 20 µl da mistura da derivação foram separados em coluna analítica de fase reversa (Microsorb MV C18, 5 µ 150x4,6 mm ID – Varian). A detecção, por fluorescência, foi obtida com excitação de 340 nm e emissão de 455 nm. A quantificação foi realizada pela comparação das áreas dos picos suspeitos com as obtidas nos picos dos padrões.

3.8 Quantificação

O cálculo da concentração de esfinganina e de esfingosina no extrato foi baseado nas áreas dos picos detectados conforme a fórmula:

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

Onde:

- S = quantidade de Sa ou So injetados
- A = área do pico da amostra
- H = área do pico do padrão
- E = quantidade do padrão injetado

O cálculo da concentração de esfinganina e de esfingosina nas amostras foi realizado como se segue:

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

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

S= concentração de Sa ou So injetados

I = volume injetado (20 µL)

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

V= volume total da amostra derivada (250 µL)

Y= quantidade inicial da amostra

3.8.1 Cálculo da proporção Sa/So:

A partir dos valores absolutos de Sa e So das amostras a relação foi calculada:

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar do abate ser realizado no Município do Rio de Janeiro, os animais eram oriundos de Cachoeira de Macacu (RJ), Rio Bonito (RJ), Ponte Nova (MG) e Miradouro (MG). A diversidade na origem dos animais avaliados possibilitou uma estimativa mais abrangente e não vinculada à realidade de uma pequena região. Além das diferenças na origem é possível que existam muitas diferenças no tipo de alimentação consumida.

Considera-se que a maior probabilidade deste tipo de intoxicação afetar animais de produção, de forma crônica, é através da ingestão de alimento contaminado durante um período prolongado (WEIBKING et al., 1994; KUBENA et al., 1995; CARLSON et al., 2001; CASADO et al., 2001), causando danos celulares discretos e de difícil percepção. Portanto a possibilidade da utilização de um biomarcador precoce de intoxicação permite localizar tentar prevenir quadros mais graves (WAG et al, 1992; RILEY et al, 1994).

A ausência de dados sobre o tipo de alimentação dos animais avaliados, bem como a impossibilidade de análise do alimento consumido por eles não permitiu estabelecer relações entre a quantidade ingerida de toxina e os níveis alcançados pelo biomarcador. Entretanto a função do biomarcador claramente foi alcançada, possibilitando estimar o grau e o tipo de exposição (RILEY et al, 1993; DIREITO, 2003; RIBEIRO, 2005).

Nos dois tipos de amostras foi possível perceber que alguns animais apresentaram perfil cromatográfico de intoxicação, demonstrando, portanto que estão sendo expostos à fumonisinas e outros apresentam perfil característico de intoxicação concomitante por fumonisinas e aflatoxinas (Fig. 8 e 9).

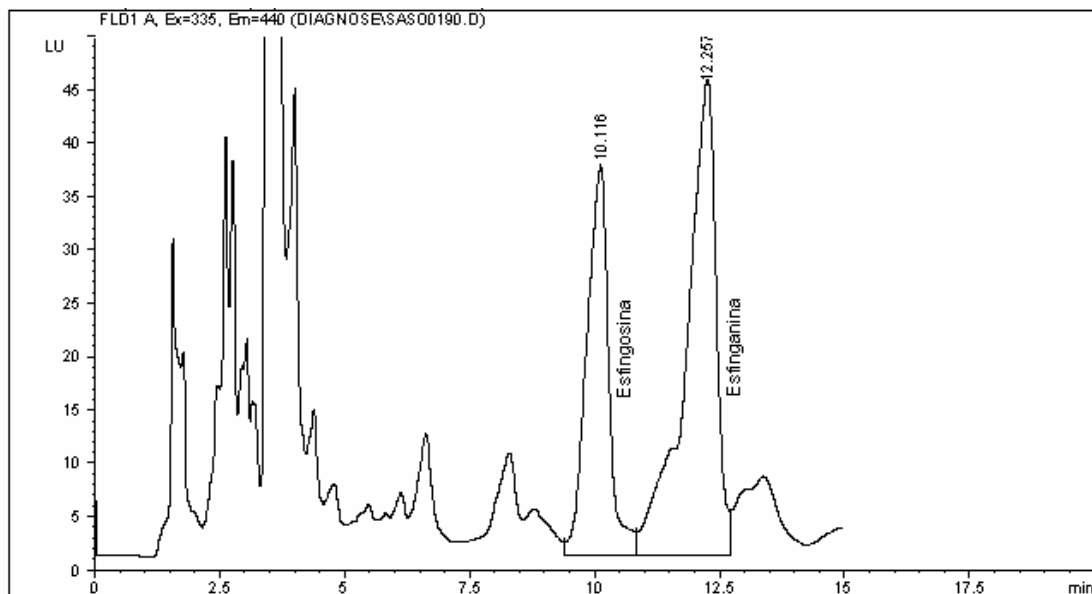


Figura 8: Cromatograma de amostra de soro com efeitos da FB₁ e da AFB₁. Apresentando So = 46,94 ng/mL e Sa = 78,40 ng/mL, obtidos com a coluna Microsorb D8 C18, a 335 nm de excitação e 440 nm de emissão, com a fase móvel metanol:água (9:1, v/v).

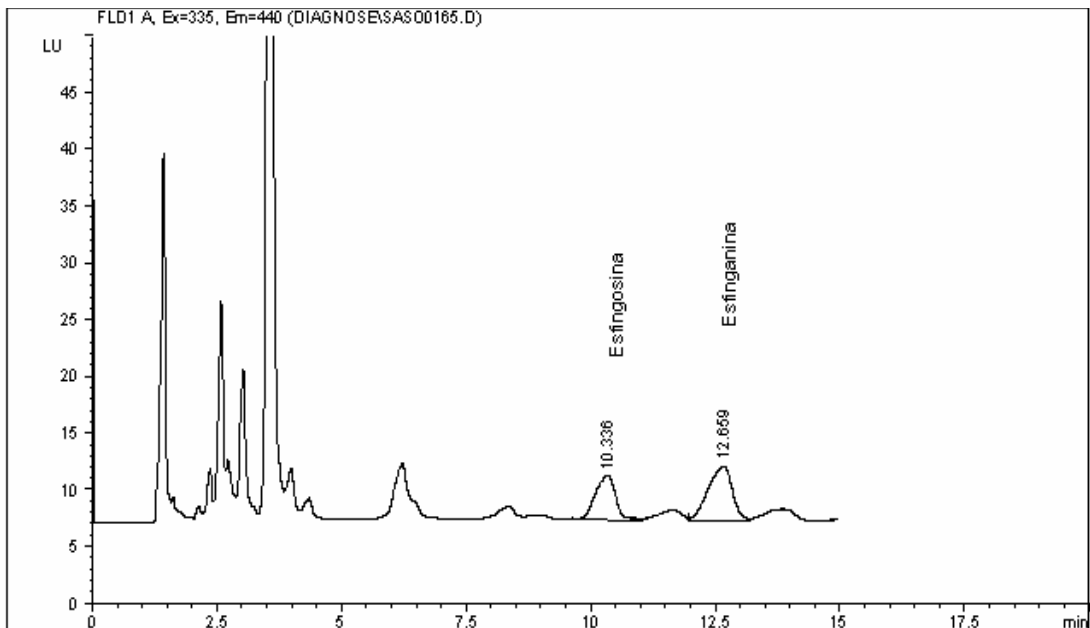


Figura 9: Cromatograma de amostra de urina com efeitos da FB₁ e da AFB₁. Apresentando So = 4,69 ng/ml e Sa = 6,72 ng/ml, obtidos com a coluna Microsorb D8 C18, a335 nm de excitação e 440 nm de emissão, com a fase móvel metanol:água (9:1, v/v).

4.1 Análise do Soro

Nesta espécie, o perfil sérico dos esfingolipídios é um sensível biomarcador de exposição para a FB₁, proposto por RILEY et al. (1993).

No gráfico 1 de acordo com os resultados obtidos na tabela 1, do total de 45 amostras (17,77 %), foram detectadas alterações indicativas de ingestão de fumonisinas em 8 animais. Onde as concentrações de Sa detectadas estavam em torno de três vezes os valores observados para So (Fig 10). Em cinco 5 amostras (11,11 %) foram percebidas alterações sugestivas da intoxicação concomitante de fumonisinas e aflatoxinas. Notada pela elevação simultânea tanto da Sa quanto da So, ou concentrações mais elevadas do que aquelas observadas em condições normais.

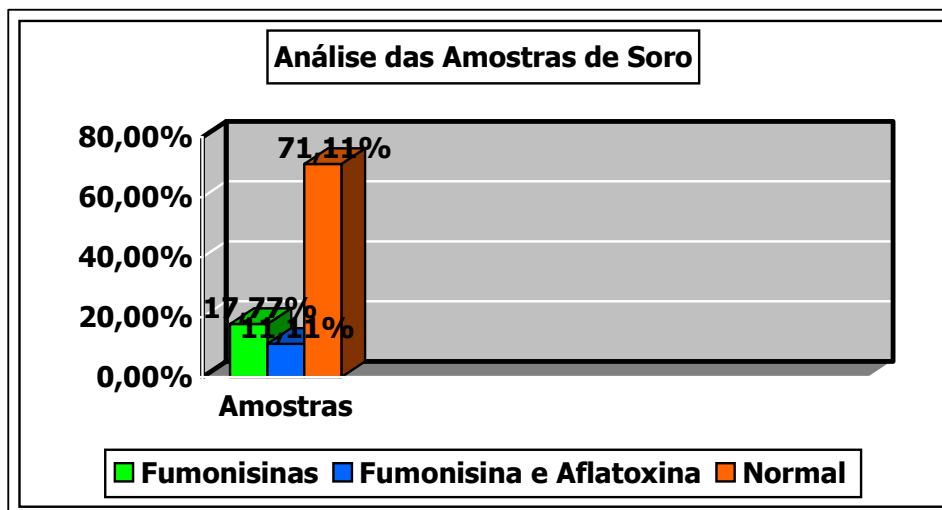


Gráfico1: análise das amostras de soro.

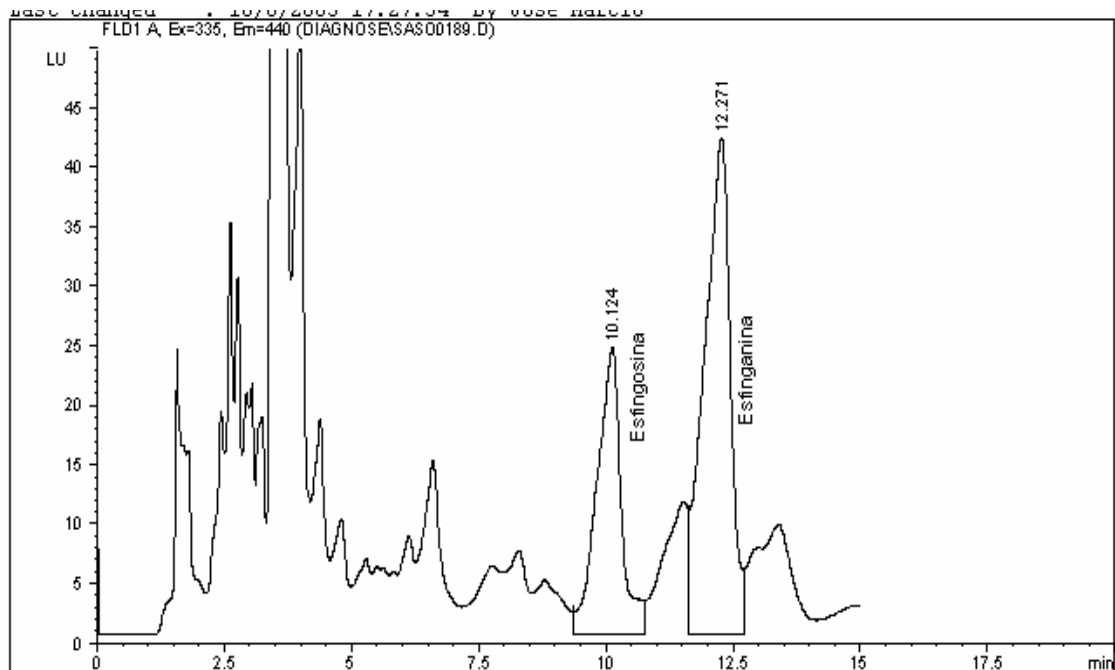


Figura 10: Cromatograma de amostra de soro com efeitos da FB_1 e da AFB_1 . Apresentando esfingosina $S_o = 33,30$ ng/ml e $S_a = 61,58$ ng/ml, obtidos com a coluna Microsorb D8 C18, a 335 nm de excitação e 440 nm de emissão, com a fase móvel metanol:água (9:1, v/v).

Das amostras consideradas positivas para intoxicação por fumonisinas, cinco eram oriundas de uma mesma propriedade e correspondeu a 100 % de amostras colhidas. As outras três pertenciam a animais de outra propriedade, localizada em município e estados diferentes, correspondendo a 60 % das amostras analisadas.

Conforme resultados demonstrados na tabela 1 e representados no gráfico 2 as concentrações de S_o variaram de 0,24 a 46,94 ng/ml e as referentes à S_a oscilaram de 0,26 a 78,40 ng/ml, nas amostras onde foi possível detectá-la.

Tabela 1: Concentrações, em ng/ml, de Sa e So nas amostras de soro.

Propriedade	Animal	Concentração de esfingolipídios (ng/ml)		
		Esfingosina (So)	Esfinganina (Sa)	Proporção Sa/So
1	01	36,86	5,00	0,14
	02	32,45	2,79	0,09
	03	9,54	1,13	0,12
	04	5,48	1,22	0,22
	05	7,35	1,73	0,23
	06	5,91	nd	0,00
	07	25,52	3,90	0,15
	08	Nd	nd	Nd
	09	2,03	nd	Nd
	10	12,96	nd	Nd
	11	32,64	5,60	0,17
	12	7,49	nd	Nd
2	01	2,96	nd	Nd
	02	4,14	nd	Nd
	03	3,81	nd	Nd
	04	6,34	nd	Nd
	05	4,58	nd	Nd
	06	8,04	nd	Nd
	07	3,02	nd	Nd
3	01	0,36	1,93	5,36
	02	0,72	2,75	3,82
	03	0,63	5,97	9,47
	04	1,08	7,26	6,72
	05	2,84	21,85	7,69
4	01	0,24	0,26	1,08
	02	0,55	1,21	2,20
	03	0,89	1,36	1,53
	04	33,30	61,58	1,85
	05	46,94	78,40	1,67
5	01	18,97	5,89	0,31
	02	15,30	9,77	0,64
	03	1,23	nd	Nd
	04	13,52	2,11	0,15
	05	13,98	2,43	0,17
6	01	4,43	1,24	0,28
	02	11,19	2,85	0,25
	03	14,12	2,47	0,17
	04	16,23	nd	Nd
	05	14,43	1,70	0,12
	06	11,47	17,04	1,48

n 45 amostras;
nd não detectado.

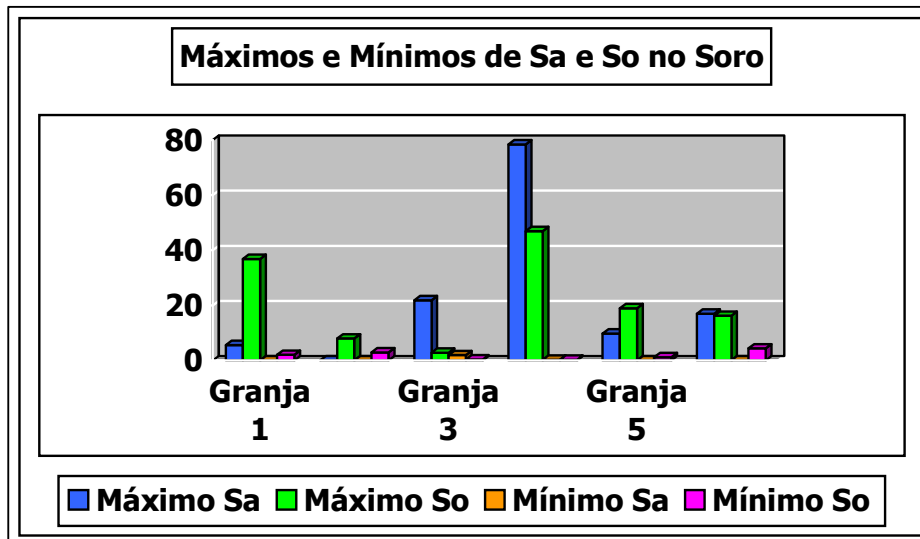


Gráfico 2: Máximos e mínimos de Sa e So nas amostras de soro.

Nas amostras consideradas as concentrações de Sa e So são indicativas de ingestão de concentrações abaixo daquelas que causam sintomas clínicos, conforme a literatura consultada (GUMPRECHT, et al, 1995;DIREITO, 2003; RIBEIRO, 2005).

O perfil cromatográfico obtido foi muito semelhante àqueles observados por DIREITO (2003), onde foram avaliados animais intoxicados experimentalmente, com diferentes concentrações de FB₁ isolada ou associada com AFB₁, quanto aos valores de Sa e So e sua proporção (Sa/So) em tecidos, urina e soro.

Deve-se salientar que os efeitos da FB₁ mostram-se transitórios, quando da ingestão de uma única dose de FB₁. Podendo ser detectado a típica elevação da concentração de Sa e So apenas no período de 12 à 48h após a administração de FB₁. Estes valores decrescem, gradativamente, até completar 96 h. Conseqüentemente a proporção Sa/So varia conforme a alteração das concentrações de esfinganina (DIREITO, 2003; RIBEIRO, 2005).

A análise do biomarcador (Sa/So) confirmou parcialmente os resultados obtidos com a avaliação de cada parâmetro (esfinganina e esfingosina). Observando-se a variação entre 0,12 e 9,47. Não sendo possível caracterizar as variações decorrentes da ação da FB₁ associada com a AFB₁, resultados que estão de acordo com o observado por DIREITO (2003).

O comportamento deste biomarcador é dose-dependente, como observado em alguns estudos. O aumento significativo da proporção Sa/So foi observado somente com a dose de 23 ppm (RILEY et al., 1993), embora uma elevação discreta pode ser observada com a dose de 10 ppm (DIREITO, 2003); na qual evidenciamos a diminuição da concentração de So e elevação da concentração de Sa. Portanto as variações de concentrações observadas neste estudo podem ser explicadas pelas diferenças de concentração que podem ocorrer em um mesmo lote de ração ou grãos, como também de quanto tempo os animais ingeriram o alimento contaminado. Acarretando assim heterogeneidade nas concentrações ingeridas.

4.2 Análise da Urina

As amostras de urina apresentaram muitos interferentes, o que em alguns casos dificultou a identificação dos picos de Sa e So. Os resultados da quantificação estão listados na tabela 2.

No gráfico 3 de acordo com os resultados obtidos na tabela 2, do total de 31 amostras analisadas e dentre as que possibilitaram a detecção tanto de So e principalmente de Sa, seis amostras (26%), indicaram a ingestão de fumonisinas (Fig. 11).

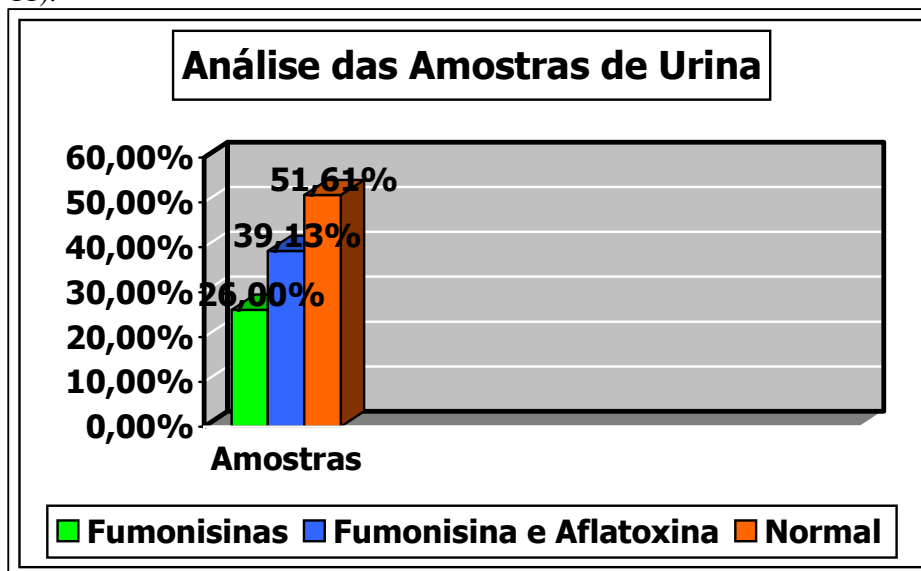


Gráfico 3: Análise das amostras de urina.

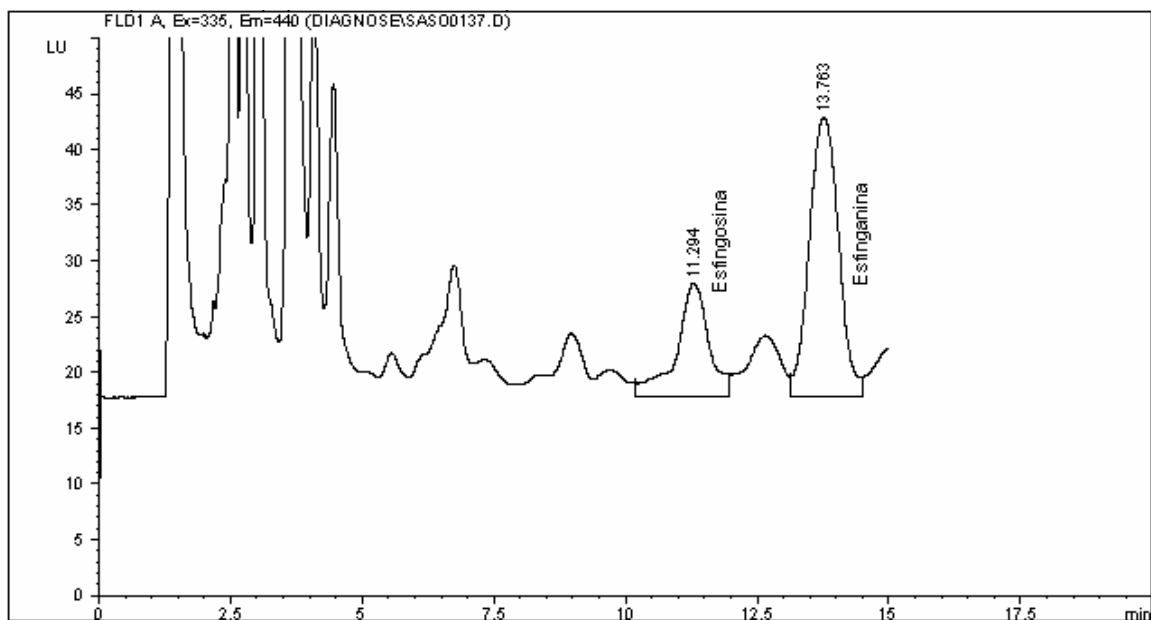


Figura 11: Cromatograma de amostra de urina com alterações características da intoxicação por FB₁. Apresentando esfingosina So = 18,38 ng/ml e Sa = 40,73 ng/ml, obtidos com a coluna Microsorb D8 C18, a 335 nm de excitação e 440 nm de emissão, com a fase móvel metanol:água (9:1, v/v).

Entretanto, em 39,13 % das amostras 9 apresentaram alterações sugestivas da ingestão concomitante de fumonisinas e aflatoxinas (Fig.12).

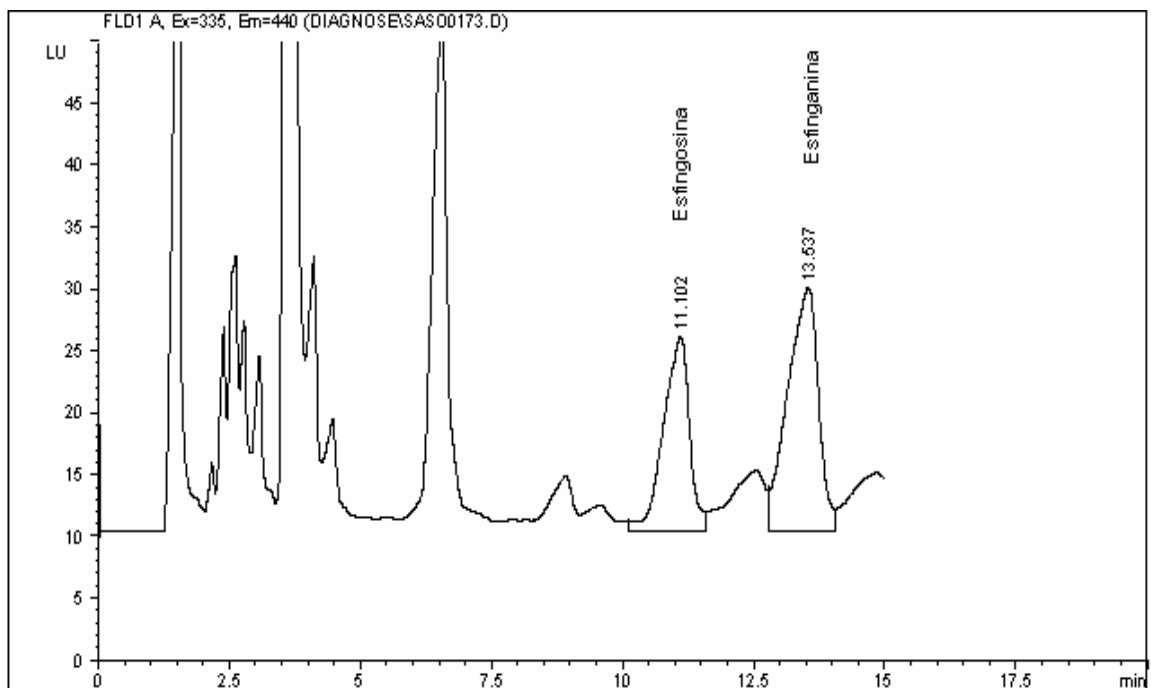


Figura 12: Cromatograma de amostra de urina com alterações características da intoxicação por FB_1 e AFB_1 . Apresentando $So = 22,47$ ng/ml e $Sa = 33,39$ ng/ml, obtidos com a coluna Microsorb G8 C18, a 335 nm de excitação e 440 nm de emissão, com a fase móvel metanol:água (9:1, v/v).

Conforme resultados demonstrados na tabela 2 e representados no gráfico 4, as concentrações So foram de 0,17 a 22,47 ng/ml, enquanto que as de Sa variaram de 0,00 a 33,39 ng/ml, apesar de que em muitas amostras não ser possível a determinação da Sa . Observou-se que a os menores valores encontrados (0,33 ng/ml) foram próximos daqueles observados no soro e os valores observados para a proporção Sa/So estiveram entre 0,28 e 2,60 (Tabela 2).

Tabela 2: Concentrações, em ng/ml, de Sa e So nas amostras de urina.

Propriedade	Animal	Concentração de esfingolípídios (ng/ml)		
		Esfingosina (So)	Esfinganina (Sa)	Proporção Sa/So
1	01	Nd	nd	0,00
	02	Nd	nd	0,00
	03	Nd	nd	0,00
	04	Nd	nd	0,00
2	01	0,18	0,33	1,83
	02	1,19	1,39	1,17
	03	2,87	4,66	1,62
	04	Nd	nd	0,00
	05	2,50	2,37	0,95
3	01	5,20	nd	0,00
	02	1,17	1,44	1,23
	03	1,69	0,51	0,30
	04	2,11	0,60	0,28
	05	Nd	nd	0,00
	06	Nd	0,51	0,00
	07	2,59	1,02	0,39
4	01	1,13	1,16	1,026
	02	1,60	4,16	2,60
	03	1,50	1,17	0,78
	04	18,38	40,73	2,21
	05	13,90	25,82	1,85
	06	4,19	8,25	1,97
5	01	0,98	1,096	1,12
	02	4,69	6,72	1,43
	03	7,58	11,72	1,54
	04	1,45	nd	0,00
	05	22,47	33,39	1,48
6	01	0,42	nd	0,00
	02	1,05	nd	0,00
	03	0,17	nd	0,00
	04	0,26	nd	0,00

n 31
nd não determinado

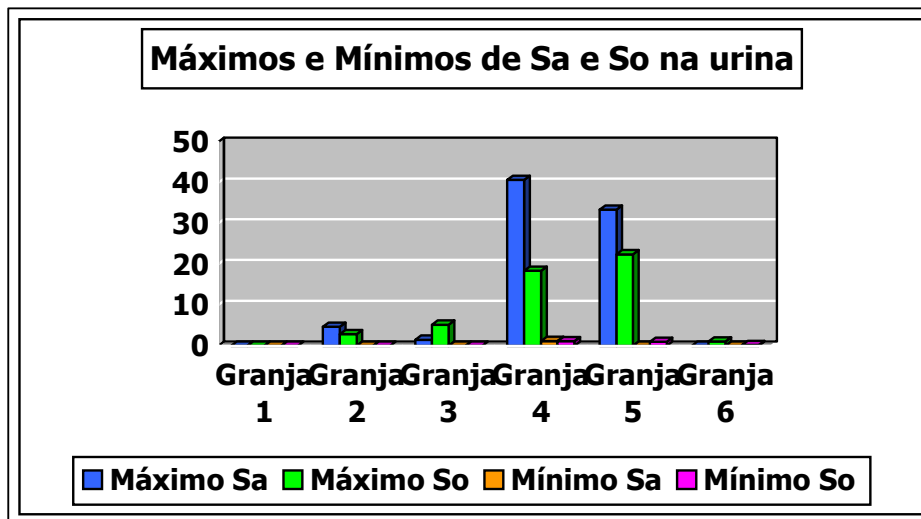


Gráfico 4: Máximos e mínimos de Sa e So em amostras de urina.

As concentrações tanto de Sa quanto de So foram inferiores as observadas no soro, conseqüentemente a proporção Sa/So também. Dados que não estão de acordo com a indicação de sensibilidade proposta por RILEY et al. (1993, 1994). Fato que pode ser explicado pela dificuldade na obtenção das células em algumas amostras, que pode ocorrer não só com os métodos testados, mas com todos os outros, já que é imprescindível o isolamento das células descamativas em todos os métodos descritos na literatura (SHEPHARD et al., 1998, SOLFRIZO et al., 1998).

A maior dificuldade encontrada nesta metodologia, foi no isolamento das células, o que acarretou nas baixas concentrações observadas em algumas amostras e a impossibilidade de quantificação em muitas outras. Entretanto, quando novas alíquotas foram processadas, aumentando-se o tempo de centrifugação inicial, foi possível obter concentrações proporcionalmente mais elevadas, sem no entanto modificar o perfil encontrado anteriormente.

Os métodos selecionados foram eficientes e possibilitaram a análise de um grande número de amostras, em curto espaço de tempo, com boa repetitividade e reprodutibilidade. Embora exista a indicação da urina como uma matriz eficiente para esta determinação, este estudo demonstrou um ponto crítico, a obtenção das células.

Este estudo é o ponto de partida para avaliações futuras. Trata-se de um trabalho pioneiro nesta área, que foi capaz de caracterizar a presença de quadros de intoxicação, com concentrações que não causam sintomas clínicos sugestivos. Embora seja relatada a frequência, relativamente constante de animais com edema pulmonar, pelo serviço de inspeção.

Certamente a utilização do biomarcador possibilita a identificação de quadros de intoxicação, até os mais discretos, sem que seja necessária a detecção da toxina nos alimentos ou em amostras de tecidos ou fluidos biológicos. Fato que acarreta na utilização de metodologias mais elaboradas, com maior tempo de execução e invariavelmente dispendiosas, conseqüentemente restringindo o número de laboratórios capacitados em aplicar tais métodos.

5 CONCLUSÕES

- A utilização do biomarcador permitiu evidenciar a existência de casos compatíveis com intoxicação por fumonisinas na população estudada.
- Foi possível detectar casos de exposição mesmo em animais clinicamente saudáveis.
- Foi possível determinar a ocorrência de casos de intoxicação concomitante de fumonisinas e aflatoxinas.
- Devem ser consideradas as concentrações de So e Sa, bem como seu perfil cromatográfico, por possibilitarem a visualização da ação das aflatoxinas.
- O método de coleta de urina não foi eficiente para fêmeas, que esvaziam o conteúdo vesical no momento da insensibilização (Fig. 13).
- As amostras de urina possibilitaram um maior grau de sensibilidade, porém também apresentaram dificuldades na obtenção das células.
- Os cromatogramas das amostras de urina apresentaram muitos interferentes, o que dificultava a identificação dos picos de So e Sa.
- As amostras de soro geraram dados mais constantes e com poucos interferentes.



Figura 13: Esvaziamento vesical em fêmeas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.K.; OCAMB, C.M. – First report of fumonisin B₁ *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobus*. **Plant Dis.**, v.79, p.642-645, 1995.
- AH SEO, J.; WON LEE, Y. – Natural occurrence of the series of fumonisins in moldy corn. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 1331-1334, 1999.
- ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R.B.A.; SARGEANT, K.; O'KELLY, J. – A toxic factor in Brazilian groundnut meal. **Vet. Rec.**, v.73, p.128-129, 1961.
- ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R.B.A. – Groundnut toxicity *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Preliminary communication. **Vet. Rec.**, v. 74, p. 863 – 864, 1962.
- ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B. ; MALLOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L.M.V. – Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 2000.
- ALMEIDA, A.P.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; DIREITO, G.M.; ORTEGA, E.M.; CORRÊA, B. – Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3877-3882, 2002.
- BAILLY, J.D.; BENARD, G.; JOUGLAR, J.Y.; DURAND, S.; GUERRE, P. – Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ in ducks. **Toxicology**, v. 163, p. 11-22, 2001.
- BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAR, R. – Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, v.11, p. 743-745, 1988.
- BONDY, G.; BARKER, M.; MUELLER, R.; FERNIE, S.; MILLER, J.D.; ARMSTRONG, C.; HIERLHI, S.L.; ROWSELL, P. ; SUZIKI, C. - Fumonisin B₁ toxicity in male Sprague-Dawley rats. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 392, p. 251-264, 1996.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**:
Informação e documentação: referências: elaboração Rio de Janeiro, 2002.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in index
Medicus., 2001.

Available from:

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi

www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html

CAMARGOS, S.M.;- **Incidência de fumonisinas em cultivares de milho no Estado de São Paulo: influência das características do cultivar e das condições climáticas.** 165 p. Tese de (Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Campinas, 2000.

CARLSON, D.B.; WILLIAMS, D.E.; SPITSBERGEN, J.M.; ROSS, P.F.; BACON, C.W.; MEREDITH, F. I. ; RILEY, R.T. – Fumonisin B₁ promotes Aflatoxin B₁ and N-methyl-n'-nitrosoguanidine-initiated liver tumors in rainbow trout. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 172, p. 29-36, 2001.

CASADO, J.M.; THEUMER, M.; MASIH, D.T.; CHULZE, S. ; RUBINSTEIN, H.R. – Experimental subchronic mycotoxicoses in mice: individual and combined effects of dietary exposure to fumonisins and aflatoxin B₁. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 579-586, 2001.

CASTEGNARO, M.; GARREN, L.; GAUCHER, I. ; WILD, C.P.– Development of a new method for the analysis of sphinganine and sphingosine in urine and tissues. **Natural Toxins**, v. 4, p. 284 – 290, 1996.

CASTEGNARO, M.; GARREN, L.; GALENDO, D.; GELDERBLUM, W.C.A.; CHELULE, P.; DUTTON, M.F. ; WILD, C.P. – Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. **J. Chromatogr. B. Biomed Sci. Appl.** v. 720, n. 1-2, p. 15-24, 1998.

CENTEC - Instituto Centro Ensino Tecnológico. Suinocultura, **Cadernos Tecnológicos**, 96p. 2004.

CHAMBERLAIN, W.J.; BACON, C.w.; NORRED, W.P.; VOSS, K.A. – Levels of fumonisin B₁ in corn naturally contaminated with aflatoxins. **Food Chem. Toxicol.**, v. 31, p. 995-998, 1993.

CHEN, J.; MIROCHA, C.J.; XIE, W.; HOGGE, L.; OLSON, D. – Production of the fumonisin B₁ by *Alternaria alternata f. sp. lycopersici*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p.28-31, 1992.

CHU, F.S. ; LI, G.Y. – Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the people's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 3, p. 847-852, 1994.

CIEGLER, A. – Fungi that produce mycotoxins: condition and occurrence. **Mycopathologia**, v. 65, n. 5, p. 5-11, 1978.

CLEVSTROM, G. – **Studies of fungi flora of plants and feeds and the influence in *Aspergillus flavus*.** Upsala: 1986.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. **Mycotoxins and phytoalexins.** Boca Raton: C.R.C. Press, 1991. p.103-143.

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

D’MELLO, J.P.F.; PLACITA, C.M.; MAC DONALD, A.M.C. – *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Sci. Technol.**, v. 80, p.183-205, 1999.

ETZEL, R.A. Mycotoxins. **JAMA**, v. 287, n.4, p. 425-427, Jan, 2002.

FRANCESCHI, S.; BIDOLI, E.; BARON, A. E.; LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx, and esophagus in northeastern Italy, **JNCI**. v.82, p. 1407-1411, 1990.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N.P.J.- Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1806-1811, 1988.

GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.-Toxicity and carcinogenic of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1247-1251, 1991.

GELDERBLOM, W.C.A.; SMUTS, C.M.; ABEL, A.; SNYMAN, S.D.; ABEL, A.; SNYMAN, S.D.; CAWOOD, M.E.; van der WESTHUIZEN, L.; SWANEVELDERS, S. Effect of fumonisin B₁ on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes. **Food Chem. Toxicol.**, v. 34, p. 361-369, 1996.

GUMPRECHT, L.A.; MARCUCCI, A.; WEIGEL, R.M., VESONDER, R.F.; RILEY, R.T.; SHOWKER, J.L.; BEASLEY, V.R.; HASCHEK, W.M.– Effects of intravenous Fumonisin B₁ in rabbits: nephrotoxicity and sphingolipid alterations. **Natural Toxins**, v. 3, n. 5, p. 395-403, 1995.

GUMPRECHT, L.A.; BEASLEY, V.R.; WEIGEL, R.M.; PARKER, H.M.; TUMBLESON, M.E.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I.; HASCHEK, W.M. – Development of Fumonisin – induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. **Toxicol. Pathol.**, v. 26, n. 6, p. 777-788, 1998.

GUMPRECHT, L.A.; SMITH, G.W.; CONSTABLE, P.C.; HASCHEK, W.M. – Species and organ specificity of fumonisin-induced endothelial alterations: Potential role in porcine pulmonary edema. **Toxicology**, v. 160, p. 71-79, 2001.

HASSEGAWA, R.H. – **Influência de macro e micronutrientes no crescimento fúngico e na produção de micotoxinas em grãos de milho e diversidade genética das cepas de *Fusarium verticillioides*.** Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. 2004.

HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M.; GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E. COLE, F.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁ a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme* **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 2, p. 217-221, 1990.

HARVEY, R.B.; KUBENA, L.F.; HUFF, W.E. Effects of aflatoxin, deoxynivalenol and their combinations in the diets of growing pigs. **Am. J. Vet. Res.** , v. 56, p. 1688-1693, 1989.

HARVEY, R.B.; KUBENA, L.F.; HUFF, W.E. – Effects of treatment of growing swine with aflatoxins and T₂ toxin. **Am. J. Vet. Res.** , v. 56, p. 1668-1672, 1990.

HARVEY, R.B.; EDRINGTON, T.S.; KUBENA, L.F.; ELISSALDE, M.H.; CASPER, H.H.; ROTTINGHAUS, G.E.; TURK, J.R. – Effects of dietary Fumonisin B₁ – containing culture material, deoxynivalenol – contaminated wheat, or their combination on growing barrows. **Am. J. Vet. Res.**, v. 57, n. 12, p. 1790 -1794, 1996.

HARVEY, R.B.; EDRINGTON, T.S.; KUBENA, L.F.; ELISSALDE, M.H.; ROTTINGHAUS, G.E.- Influence of aflatoxin and fumonisin B₁-containing culture material on growing barrows. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, n. 12, p. 1668 -1672, 1995.

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

HUWILER, A.; KOLTER, T.; PFEILSCHIFTER, J.; SANDHOFF, K. – Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1485, p. 63 –99, 2000.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC – Some Naturally Occurring Substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, IARC, Lyon, 1993, V. 56.

KPODO, K.; THRANE, U.; HALD, B. – *Fusaria* and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 61, p. 147-157, 2000.

KUBENA, L.F.; EDRINGTON, T.S.; KAMPS-HOLTZAPPLE, C. HARVEY, R.B.; ELISSALDE, M.H.; ROTTINGHAUS, G.E. – Effects of feeding fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin single and in combination to turkey poultry. **Poultry Sci.** v. 74, p. 1295-1303, 1995.

MALLOZI, M.A.B. & CORRÊA, B. Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. **Bol. Tecn. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 12, p. 5-26, 1997.

MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLUM, W.C.A.; COETZER, J.A.W. THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J.J. – Leukoencefalomalacia in horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, V. 55, p. 197-203, 1988.

- MARTINOVA, E. A.; MERRILL, A.H. JR.– Fumonisin B₁ alters sphingolipid metabolism and immune function in BALB/c mice: immunological responses to Fumonisin B₁. **Mycopathologia** v. 130, p. 163 -170, 1995.
- MERRILL, A.H. JR.; WANG, E.; MULLINS, R. E.; JAMILSON, W. C. L.; NIMKAR, S.; LIOTTA, D.C.– Quantitation of free sphingosine in liver by high – performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.** v. 171, p. 373 -381, 1988.
- MERRILL, Jr., A.H. Cell reagentation by sphingosine and more complex sphingolipids. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 23, p. 83-104, 1991.
- MERRILL, A. H. JR.; WANG, E.; GILCHRIST, D.G.; RILEY, R.T.– Fumonisin and others inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis. **Adv. Lipid Res.**, v. 26, p. 215-231, 1993.
- MERRILL, A.H. JR.; SCHMELZ, E.M.; DILLEHAY, D.L.; SPIEGEL, S.; SHAYMAN, J.A.; SCHROEDER, J.J.; RILEY, R.T.; VOSS, K.A.; WANG, E.– Sphingolipids – the enigmatic lipid class; biochemistry, physiology and pathophysiology. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 142, n. 1, p. 208-225, 1997.
- MERRILL, A.H. JR.; LIOTTA, D.C.; RILEY, R.T. — Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. **Trends Cell Biol.**, v. 6, p. 218-223, 1996 a.
- MURPHY, P.A.; RICE, L.G.; ROSS, P.F. – Fumonisin B₁, B₂ e B₃ content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. **J. Agric. Food. Chem.**, v.41, p.263-266, 1993.
- MUSSER, S.M.; PLATNER, R.D. – Fumonisin composition in culture of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 1169 -1173, 1997.
- NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia.**, v.117, p. 29-36, 1992.
- NORRED, W. P.; WANG, E.; YOO, H.; RILEY, R.T.; MERRILL, A.H. JR. –*In vitro* toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. **Mycopathologia**, v. 117, n. 1-2, p. 73-78, 1992.
- NORRED, W. P., Voss, K. A. – Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Food Protect.** V. 57, p. 52 – 57, 1994.
- ONO, E.Y.S.; KAMOGAE, M.; ONO, M.A.; SASAKI, E.Y.; VIZZONI, E.; HARA, L.N.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. In: **INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM – MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10.**, Guarujá, 2000, **Abstracts**, p. 144.
- ORSI, R.B. **Efeitos da administração oral de Fumonisina B₁ e Aflatoxina B₁ em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).** 2000. 135 p. Tese de (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo.

OSWEILER, G.D.; ROSS, P.F.; WILSON, T.M.; NELSON, P.E.; WITTE, S.T.; CARSON, T.L.Ç RICE, L.G.; NELSON, H.A. – Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine in corn screening. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 4, p. 53 – 59, 1992.

PIER, A.C. – An overview of the mycotoxicose of domestic animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 163, p. 1259-1261, 1973.

PITTET, A.– Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update review. **Revue Méd. Vét.**, v. 149, n. 6, p. 479-492, 1998.

POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; XAVIER, J.G.; DIREITO,G.M.; ORSI, R.B.; MATARAZZO, S.V. – Effects of prolonged oral administration of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in rats. **Mycopatologia**, v. 151, p. 21-27, 2000.

PRIESCHL, E. E.; BAUMRUKER, T. – Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling. **Immunol. Today**, 2000.

RIBEIRO, D.H.B. – **Efeitos da Aflatoxina B₁ e da Fumonisina B₁ em hepatócitos primários de ratos.** Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. 2005.

RIBONI, L.; VIANI, P.; BASSI, R.; PRINETTI, A.; TETTAMANTI, G. – The role of sphingolipids in the process of signal transduction. **Prog. Lipid Res.**, v. 36, n. 2/3, p. 153-195, 1997.

RIET-CORREA, F.; MEIRELLES, M. A.; SOARES J. M.; MACHADO, J. J. ; ZAMBRANO, A. F. Leucoencefalomalácia em equinos associada a ingestão de milho mofado. **Pesq. Vet. Bras.**, v.2, p. 27-30, 1982.

RILEY, R.T.; AN, N.; SHOWKER, J.L.; YOO, H.; NORRED, W. P.;CHAMBERLAIN, W.J.; WANG, E.; MERRILL, A.H. JR.; MOTELIM, G. BEASLEY, V. R.; HASCHEK, W.M.– Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 118, n. 1, p. 105-112, 1993.

RILEY, R.T.; WANG, E.; MERRILL, A.H. JR.– Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine – to – sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. **Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 77, n. 2, p. 533-540, 1994.

RODRÍGUEZ, J. A. – Diferencia entre la enfermedad de los rastrojos y la meningo encefalomielitis infecciosa de los equinos. **Anales de la Sociedad Rural Argentina**, v. 69, p.305-307, 1945.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. – Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Braz. Microbiol.**, v.33, p. 1-11, 2002.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, I.D.; OSWEILER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. – Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolate associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 3225-3226, 1990.

ROSS, P. F. – What are going to do with this dead horse? **AOAC Interna** v.77, p. 491 – 494, 1994.

ROTTER, B.A.; THOMPSON, B.K.; PRELUSKY, D.B.; TRENHOLM, H.L.; STEWART, B.; MILLER, J.D.; SAVARD, M.E.– Response of growing swine to dietary exposure to pure fumonisin B₁ during an eight-week period: growth and clinical parameters. **Natural Toxins**, v. 4, p. 42-50, 1996.

SCOTT, P.M. – Fumonisins. **Inst. J. Microbiol.**, v. 18, p. 257-270, 1993.

SCHMELZ, E.M.; MERRILL, A.H. JR. – Ceramides and ceramide metabolites in cell regulation: evidence for dietary sphingolipids as inhibitors of colon carcinogenesis. **Nutrition**, v. 14, n. 9, p. 717-719, 1998.

SHEPHARD, G. S.; VAN DER WESTHUIZEN, L.– Liquid chromatographic determination of the sphinganine/sphingosine ratio in serum. **J. Chromtogr. B.**, v. 710, n, 1-2, p. 219 – 222, 1998.

SHEPHARD, G. S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SYDENHAM, E. W.– Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **J. AOAC Int.**, v. 79, n. 3, p. 671-687, 1996.

SHETTY, P.H.; BATT, R.V. – Natural occurrence of fumonisin B₁ and its co-occurrence with aflatoxin B₁ in Indian Sorghun, maize and poultry feeds. **J. Agric. Ood Chem.**, v. 45, p. 2170-2173, 1997.

SMITH, G.W., CONSTABLE, P.D., EPPLEY, R.M., TUMBLESÓN, M.E., GUMPRECHT, L.A. AND HASCHEK, W.M. – Purified fumonisin B₁ decreases cardiovascular function but does not alter pulmonary capillary permeability in swine. **Toxicol. Sci.**, v. 56, p. 240-249, 2000.

SMITH, J. E.; JERDERSON, S. R. (Ed). **Mycotoxin and Animal Food**. CRC Press. p. 1-35, 1991.

SMITH, J.E.; SOLOMONS, G.; LEWIS, C.; ANDERSON, J.G. – Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Natural Toxins**, v.3, p. 187-192, 1995.

SOLFRIZZO, M.; AVANTAGGIATO, G.; VISCONTI, A.– Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. **J. Chromtogr. B.**, v. 692, n. 1, p. 87-93, 1997.

STOLOFF, L. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. In: RODRICKS, J.W. ed. **Mycotoxins and other fungal related problems**: Advances in Chemistry Series. Washington: American Chemical Society, 1976.

- SYDENHAM, E. W.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W. F. O.– Evidence for the natural occurrence of Fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **J. Agric. Food Chem.**, v. 38, p. 285-290, 1990.
- SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P.G.; MARASAS, W. F. O.; STOCKENSTRÖM, S.– Fumonisin contamination of commercial corn – based human foodstuffs. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 2014-2018, 1991.
- THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W. SHEPARD, G.S.; GELDERBLOM, W.C.A. - The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologica**, v. 117, p. 3-9, 1992.
- THIEL, P.G.; SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E.; WILSON, T.M. – Levels of fumonisins B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. **J. Agric. Food Chem.** V.39, p. 109-111, 1991.
- TURNER, P.C.; NIKIEMA, P.; WILD, C.P. – Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutat. Res.**, v. 443, p. 81-93, 1999.
- UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.D.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TAKANA, T.; CHEN, C.; YU, S.Z. – Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3 – year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and Elisa. **Food Chem. Toxicol.**, v. 35, p. 1143-1150, 1997.
- VESONDER, R.; HALIBURTON, J.; STUBBLEFIELD, R.; GILMORE, W.; PETERSON, S. *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁, B₂, and M₁ in corn associated with equine death. **Arch. Environ. Contamin. Toxicol.**, n.20, p.151-153, 1991.
- VESPER, H.; SCHMELZ, E.; NIKOLOVA-KARAKASHIAN, DILLEHAY, D.L.; LYNCH, D.V.; MERRIL, A.H. Jr – Sphingolipids in food and emerging importance of sphingolipids to nutrition. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1239-1250, 1999.
- VISCONTI, A.; DOKO, M.B. – Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **J. Assoc. Official Anal. Chem. Int.**, v. 77, n. 2, p. 546-550, 1994.
- VOSS, K.A.; CHAMBERLAIN, W.J.; BACON, C.W.; HERBERT, R.A.; WALTERS, D.B.; NORRED, W.P. – A preliminary investigation on renal and hepatic toxicity in rats fed purified fumonisin B₁. **Natural Toxins**, v. 1, p. 222-228, 1993.
- WANG, E.P.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRILL, A.H. JR– Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J. Biochem.**, v. 226, n. 22, p. 14486-14490, 1991.
- WANG, E.P.; ROOS, F.; WILSON, T.M.; RILEY, R.T.; MERRILL, A.H. JR – Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **J. Nutr.**, v. 122, p. 1706-1716, 1992.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; TURK, J.R.; ROTHINGAUS, G.G.; WANG, E.P.; MERRILL, A.H. JR – Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Sci.**, v. 72, p. 456-466, 1993a.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BROWN, T.P.; ROTHINGAUS, G.G. – Fumonisin toxicity in turkey poult. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 5, p. 75-83, 1993b.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTHINGAUS, G.G. – Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁. **Poultry Sci.**, v. 73, p. 1517-1525, 1994.

WILSON, T.M.; ROSS, P.E.; TOUSSON, T.A.; MARASAS, W.F.O. – The *Fusarium* Research Center proposed diagnostic animals. **Proc. Ann. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Inv.**, v. 24, p. 261-276, 1981.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin Occurrence in Corn from High-and-Low-Risk Areas for Human Esophageal Cancer in China. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 5, p. 1626-1629, 1994.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; CHOKETHAWORN, N. – Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. **Food Additives Contaminan.**, v.13, n. 2, p. 11163-11168, 1996.