

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**FUMONISINAS EM DERIVADOS DE MILHO COMERCIALIZADOS EM  
SANTA CATARINA E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE HUMANA E  
ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM FÍGADO DE CATFISH TRATADOS  
“IN VIVO” COM FUMONISINA B<sub>1</sub>**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora : Prof<sup>a</sup>. PhD. Vildes M. Scussel

Rejane Maria Cirra Scaff

2003

S278f SCAFF, Rejane Maria Cirra

Fumonisinias em derivados de milho comercializados em Santa Catarina e sua relação com a saúde humana e alterações histopatológicas em fígado de catfish tratados "in vivo" com fumonisinina B<sub>1</sub>. Rejane Maria Cirra Scaff, Orientadora, Vildes Maria Scussel Florianópolis, 2003

117p.: Graf.; fig.; 29 cm

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Dos Alimentos, 2003.

Inclui bibliografia.

1. Fumonisinias 2. Produtos derivados de milho 3. histopatologia  
4. Channel Catfish. I Scussel, Vildes Maria. II Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. III Título.

CDU: 663/664

Catálogo na fonte por : Onélia Silva Guimarães CRB-14/071

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	04
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	05
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	06
<b>RESUMO</b> .....	07
<b>ABSTRACT</b> .....	08
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	09
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
2.1 Milho.....	11
2.1.1 Processamento de milho.....	11
2.2 Fumonisinas.....	12
2.2.1 Características físicas e químicas.....	13
2.2.2 Mecanismos de ação.....	15
2.2.3 Marcadores biológicos .....	20
2.3 Níveis máximos de resíduos recomendados para fumonisinas.....	21
2.4 Exposição humana à fumonisinas.....	22
2.5 Ocorrência de fumonisinas.....	23
2.5.1 Em rações animais associadas a micotoxicoses.....	28
2.5.2 Em produtos de milho destinado ao consumo humano.....	29
2.5.3 Fumonisinas no Brasil.....	30
2.6 Metodologia analítica para fumonisinas.....	33
2.6.1 Efeitos do processamento de alimentos.....	35
2.7 Efeitos toxicológicos das fumonisinas.....	36
2.7.1 Em animais.....	36
2.7.2 Em animais de laboratório e sistema " <i>in vitro</i> ".....	38
2.8 Fumonisinas e riscos à saúde humana.....	42
2.8.1 Câncer de esôfago.....	43
2.8.1.1 Incidência e fatores relacionados.....	46
2.8.1.2 Câncer de esôfago e fumonisinas.....	48
2.9 Referências Bibliográficas .....	49

### **3 ARTIGO**

#### **FUMONISINS B<sub>1</sub> AND B<sub>2</sub> IN CORN-BASED PRODUCTS COMMERCIALIZED IN SANTA CATARINA STATE – SOUTHERN BRAZIL..... 65**

3.1 Resumo .....	66
3.2 Abstract.....	67
3.3 Introdução.....	68
3.4 Material e Método.....	70
3.4.1 Material.....	70
3.4.2 Método .....	71
3.5 Resultados e Discussão .....	72
3.6 Conclusões .....	78
3.7 Referências Bibliográficas .....	79

### **4 ARTIGO**

#### **STRUCTURAL, ULTRASTRUCTURAL AND HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF CHANNEL CATFISH (*Ictalurus punctatus*) LIVER INTRAPERITONEALLY TREATED WITH FUMOSIN B<sub>1</sub> ..... 83**

4.1 Resumo .....	84
4.2 Abstract .....	85
4.3 Introdução .....	86
4.4 Material e Método .....	88
4.4.1 Material .....	88
4.4.2 Método .....	89
4.5 Resultados e Discussão .....	90
4.5.1 Análise Estrutural e Ultraestrutural .....	90
4.5.2 Análise Histoquímica.....	101
4.6 Conclusões .....	103
4.7 Referências Bibliográficas .....	103

### **5 ARTIGO**

#### **ESOPHAGEAL CANCER IN THE SOUTHERN REGION OF BRAZIL – CASES FROM SANTA CATARINA STATE ..... 107**

5.1 Abstract .....	110
5.2 Introduction .....	110

5.3 Material and Method .....	111
5.4 Results and Discussion .....	111
5.4 References .....	113
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>115</b>
<b>7 ANEXOS</b> .....	<b>117</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Níveis máximos recomendados de FBs ( $FB_1 + FB_2 + FB_3$ ) em milho e produtos derivados destinados ao consumo humano
- Tabela 2** Níveis mais significativos de contaminação por  $FB_1$  e  $FB_2$ , registrados na literatura
- Tabela 3** Ocorrência mundial de fumonisina  $B_1$  ( $FB_1$ ) em produtos derivados de milho
- Tabela 4** Ocorrência mundial de fumonisinas  $B_1$  e  $B_2$ , publicados na literatura especializada
- Tabela 5** Fumonisinas em rações animais associadas à LEME em cavalos e EPS em suínos
- Tabela 6** Ocorrência de fumonisinas em milho nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, citadas em literatura
- Tabela 7** Estimativas de números de casos novos de câncer por região, para o ano 2003
- Tabela 8** Estimativas de números de óbitos por câncer, por região, para o ano 2003
- Tabela 9** Número de casos novos estimados (NC) e taxa bruta (CR) da incidência de câncer de esôfago para homens e mulheres, por 100.000 habitantes – Brasil, 1997 – 1999

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Estrutura química da fumonisina B<sub>1</sub>

**Figura 2:** Comparação entre as estruturas das fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, esfingosina e esfinganina

**Figura 3:** Mecanismo de inibição da biosíntese de esfingolipídios pelas fumonisinas

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AOAC</b>	Association Official Analytical Chemistry
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CEPON</b>	Centro de Pesquisas Oncológicas
<b>CFSAN</b>	Center for Food Safety and Applied Nutrition
<b>CIDASC</b>	Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>EC</b>	Câncer de Esôfago
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>EPS</b>	Edema Pulmonar em Suínos
<b>FAO</b>	Food Agricultural Organization
<b>FB<sub>1</sub></b>	Fumonisina B <sub>1</sub>
<b>FB<sub>2</sub></b>	Fumonisina B <sub>2</sub>
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IUPAC</b>	Internation Union of Pure and Applied Chemistry
<b>LC</b>	Cromatografia Líquida
<b>LEME</b>	Leucoencefalomalácia equina
<b>MS</b>	Espectrometria de massa
<b>NCTR</b>	National Center for Toxicological Research
<b>NOEL</b>	Non observed effect level
<b>PROMECC</b>	Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis



## RESUMO

Fumonisinias ocorrem amplamente em milho e produtos derivados provocando distúrbios em diferentes espécies animais e estando associada ao câncer de esôfago em algumas regiões do mundo. Com base nos dados acima o presente trabalho teve por objetivo: (i) avaliar a ocorrência de fumonisinias em produtos derivados de milho destinados a consumo humano comercializados no Estado Santa Catarina. Das 82 amostras analisadas (farinha de milho, canjica, flocos de milho e milho de pipoca), 92,68 % apresentaram níveis detectáveis de fumonisinias, sendo a farinha de milho o produto com maior contaminação. Foram analisadas farinha de milho artesanais e industrializadas e os resultados demonstraram níveis detectáveis de FBs em 91,5 % das amostras, sendo que os níveis médios foram de 3,81 e 5,73 µg/g, respectivamente; (ii) analisar as alterações morfológicas em fígado de channel catfish (*Ictalurus punctatus*) tratados intraperitonealmente com FB<sub>1</sub>, em doses de 1,0; 5,0 and 10,0 mg FB<sub>1</sub>/kg p.c./dia, respectivamente, durante 21 dias. Os fígados dos animais tratados apresentaram alterações de leves à drásticas, dependendo da dose e tempo de tratamento a que foram submetidos. Verificaram-se alterações e desestruturação generalizada das estruturas membranosas, dilatação e desenvolvimento anormal do REG, aumento de ribossomos e alterações mitocondriais. Pôde-se constatar ao nível morfológico a ocorrência de processos envolvendo necrose e apoptose. Ao final do tratamento figuras de mielina elétron-densas estavam bem caracterizadas; (iii) considerando-se que o sul do Brasil apresenta alta incidência de câncer de esôfago foi desenvolvido um levantamento de casos desta doença, através de registro hospitalar em Santa Catarina, determinando a prevalência por idade, sexo, atividade profissional e região do Estado, bem como dos hábitos alimentares, tabagismo e álcool. Sendo o câncer uma doença multifatorial, a contaminação por fumonisinias em produtos de milho consumidos por estas populações pode ser um dos fatores relacionados.

## ABSTRACT

Fumonisin occurs widely in corn and corn-based products. It causes disease in different animal species and is associated with esophageal cancer in some regions of the world. On the basis of the data above, the present work had for aim: (i) to evaluate the occurrence of fumonisins in corn-based products to human consumption commercialized in the Santa Catarina State. Of the 82 analyzed samples (flour, *canjica*, cornflakes and popcorn), 92.68 % had presented detectable levels of fumonisins, being the flour the product with bigger contamination. There have been analyzed home processed and industrialized corn flour and the results they had demonstrated detectable levels of FBs in 91.5% of the samples, being that the average levels had been of 3.81 and 5.73  $\mu\text{g/g}$ , respectively; (ii) to analyze the morphological alterations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) liver treated intraperitoneally with  $\text{FB}_1$ , in doses of 1,0; 5,0 and 10,0 mg /kg p.c./dia, respectively, during 21 days. The treated animals livers had presented from slight to drastic alterations, depending on the dose and time of treatment which had been submitted. Alterations had been verified and disorder generalized of the membranous structures, enlargement and abnormal development of the REG, increased of ribosomes and alterations mitochondrials. Could be evidenced the occurrence of processes involving necrosis and apoptosis. To the end of the treatment electron-dense myelin figures were well characterized; (iii) considering that the south of Brazil presents high incidence of esophageal cancer was developed a survey of cases, through hospital register in Santa Catarina, determining the prevalence for age, sex and State regions, as well as of the alimentary habits, tabagism and alcoholism. Being the cancer a multifactorial disease, the fumonisin contamination in corn-based products consumed by these populations can be one of the related factors.

## 1 INTRODUÇÃO

Fumonisinias são micotoxinas produzidas por várias espécies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon), um dos fungos mais comumente associado ao milho. Geograficamente as fumonisinias estão amplamente distribuídas e sua ocorrência natural em milho e produtos derivados é constatada em muitas regiões do mundo. Altas concentrações de fumonisinias têm sido registradas em milho cultivado e particularmente consumido por populações de países em desenvolvimento, tais como em culturas de subsistência. Por outro lado, também são verificadas consideráveis variações anuais nos níveis de contaminação por fumonisinias.

A Organização Mundial do Comércio, em recente acordo para redução nas tarifas alfandegárias, destacou especial atenção às micotoxinas entre outros contaminantes fitossanitários, conseqüentemente, avaliações da contaminação fúngica e de micotoxinas constituem etapa imprescindível na minimização de problemas internos, que poderão evoluir para o estrangulamento e comprometimento de toda a linha de exportação, inclusive de produtos de origem animal.

Desde sua descoberta as fumonisinias vem sendo objeto de intensos estudos na micotoxicologia atual, devido a sério risco de intoxicação animal e possíveis efeitos promotores de câncer, inclusive em humanos. Aliada a utilização universal de milho na alimentação humana e animal recomenda estudos mais aprofundados para determinação precisa de seus efeitos, sobre os possíveis órgãos-alvo já apontados na literatura. Uma alta incidência de câncer de esôfago em populações humanas com elevada ingestão de produtos de milho contaminados por fumonisinias sugerem papel etiológico destas na patologia em questão.

Estes dados podem servir como base para a estimativa do risco de exposição da população a contaminação de produtos por fumonisinias, entretanto em muitos casos, tem sido mensurados dados de um número relativamente

pequeno de amostras e também de áreas restritas, não alcançando muitos países ou regiões destes. De qualquer forma, está claro, dada a freqüente incidência e aos níveis de contaminação por fumonisinas em milho, que a sua presença em alimento destinado ao homem ou em ração animal tem grande implicação a nível econômico e podem propiciar aos governos a formulação e aprimoramento de controle legislativo. Além disto, pesquisas são necessárias principalmente visando reduzir o risco, particularmente em comunidades rurais onde se consome basicamente milho de produção doméstica e que desta forma estariam mais expostas.

Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho foram:

- Verificar a ocorrência de fumonisinas em produtos derivados de milho destinados a consumo humano (farinha de milho, flocos de milho pré cozidos, canjica e milho de pipoca) comercializados no Estado Santa Catarina;
- Analisar as alterações morfológicas estruturais, ultraestruturais e histoquímicas em fígado de channel catfish (*Ictalurus punctatus*) tratados intraperitonealmente com FB<sub>1</sub>;
- Avaliar a incidência de câncer de esôfago em Santa Catarina, determinando a prevalência por idade, sexo e região do Estado, bem como dos hábitos alimentares.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Milho

O milho (*Zea mays* L.) um dos três cereais de maior importância a nível mundial é utilizado no preparo de mais de 500 derivados e está constantemente exposto à contaminação por fungos micotoxigênicos.

Estima-se que nos países desenvolvidos, o consumo anual de grãos gira ao redor de 1600 kg/habitante, sendo 930 kg consumidos indiretamente, sob forma de ração para produção de carne e leite e, 70 kg diretamente na dieta humana. Nos países pobres da Ásia, o consumo *per capita* é de 150 kg, todo na forma de grãos "in natura".

No Brasil, terceiro produtor mundial, o milho é o cereal mais cultivado, com uma produção anual em torno de 41 milhões de toneladas, a região Centro-Sul responde por 90% da produção nacional sendo a região Sul responsável por 50% deste total. Apesar disto a produção nacional não satisfaz as necessidades internas e grandes volumes de importação se fazem necessário. A maior parte do nosso milho é destinada à consumo animal, constituindo 63% da ração para aves e 75% da ração para suínos (ICEPA, 2002). Ainda que a produção nacional de milho não satisfaça a demanda interna, pretende-se em médio prazo implementá-la para a introdução em linhas de exportação, portanto mecanismos de controle de qualidade tornam-se essenciais, particularmente no que se refere à contaminação por micotoxinas.

#### 2.1.1 Processamento de milho

O grão de milho é formado pelo germe, casca e endosperma, rico em carboidratos o qual corresponde a 70% da sua constituição. Do embrião ou germe (cerca de 25%) é extraída a maior parte do farelo de germe, além de todo o óleo obtido durante o processamento. O restante (5 %) resulta da casca e película, rica em fibras (Saldivar & Rooney, 1994).

De acordo com Silva (2001) existe duas formas principais de processamento industrial do milho; “à seco” e por “via úmida”.

O sistema de moagem “à seco” se caracteriza por um processo físico, através do qual se faz a remoção de todo o germe e película, sob a forma de partículas grandes e limpas, deixando o endosperma com baixo teor de gordura e fibras. Neste processamento podem ser utilizados dois sistemas, com ou sem degerminação. O sistema sem degerminação emprega o milho com pouca ou nenhuma remoção do germe, tendo como produto principal o fubá integral ou peneirado. O sistema de moagem do milho com degerminação separa o grão de milho da casca e do germe, que são recuperados em várias frações, diferindo no tamanho das partículas e no conteúdo de gordura. Neste sistema, são obtidos do endosperma os fubás degerminado, creme de milho, farinha de milho, “grits” de milho, além das canjicas.

Já o sistema de moagem “via úmida” consiste de um processo químico, tendo como objetivo a obtenção de amido de milho. O germe, farelo, glúten e a água de maceração constituem os subprodutos da fabricação do amido, que são amplamente empregados na fabricação de rações.

## 2.2 Fumonisinas

As fumonisinas, micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium* foram isoladas e caracterizadas quimicamente por Gelderblom *et al.* (1988) e Bezuidenhout *et al.* (1988), respectivamente, de culturas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg = (*Fusarium moniliforme* Sheldon) strain MRC 826 no *Medical Research Council*, África do Sul.

Há pelo menos dez outras espécies de *Fusarium* que produzem estas micotoxinas, porém apenas o *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg e o *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg produzem quantidades significantes de fumonisinas e estão entre os mais comumente fungos associados ao milho e alimentos derivados, podendo ser encontrados em grãos de milho danificados ou sãos. Fumonisinas são produzidas no milho antes da colheita ou durante o estágio inicial de secagem porque *Fusarium verticillioides*

e *Fusarium proliferatum* desenvolvem-se sob uma ampla variação de temperatura, mas somente em alta atividade de água (acima de 0,9) (Bolger *et al.*, 2001).

### 2.2.1 Características físicas e químicas

Fumonisinaz caracterizam-se como um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e um pentahidroxiicosano contendo um grupo amino primário, cuja fórmula química é  $C_{34}H_{59}NO_{15}$ . Similar à esfingosina, pode então interagir com enzimas envolvidas no metabolismo dos esfingolipídios e desta forma interferir em sua atividade funcional. Parecem exercer sua atividade biológica através da inibição de enzimas chaves envolvidas na biossíntese de esfingolipídios, a ceramida – sintase (esfinganina e esfingosina-N-acil-transferases).

Estão quimicamente caracterizados 4 grupos principais de fumonisinaz, compostos por FA<sub>1</sub>, FA<sub>2</sub>, FA<sub>3</sub>, FAK<sub>1</sub>; FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>; FC<sub>1</sub>, FC<sub>2</sub>, FC<sub>3</sub>, FC<sub>4</sub>; FP<sub>1</sub>, FP<sub>2</sub>, e FP<sub>3</sub> (Musser & Plattner, 1997). A fumonisina B<sub>1</sub>, (FB<sub>1</sub>) é a mais importante toxina do grupo, seguida de FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> que ocorrem naturalmente em milho e alimentos à base de milho.

Através de modelagem molecular, com conformações tridimensionais de mais baixa energia, Beier *et al.* (1995) estabeleceram a estereoquímica das fumonisinaz B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> e B<sub>4</sub>, que apresentam uma amina primária livre na posição C2 da cadeia com 20 átomos de carbono e esterificação pelo ácido tricarbóxico nas posições C14 e C15, além de metilação nas posições C12 e C16. As fumonisinaz deste grupo diferem entre si em número e localização dos grupos hidroxila, sendo que a FB<sub>1</sub> possui hidroxila em C10, C5 e C3, sendo a mais polar (Cawood *et al.*, 1991). A FB<sub>2</sub> possui grupo hidroxila em C3 e C5, a FB<sub>3</sub> em C10 e C3 e a FB<sub>4</sub> em C3. As fumonisinaz A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> são derivados N-acetilados (aminas) das fumonisinaz B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> respectivamente. A fumonisina C apresenta uma amina primária livre na posição C1 da cadeia com 20 átomos

de carbono, esterificação pelo ácido tricarbálico nas posições C13 e C14, metilação em C11 e C15 e grupos hidroxila em C2, C4 e C9.

Sendo compostos fortemente polares são solúveis em água, metanol e em acetonitrila/água, com ponto de fusão de aproximadamente 105°C e peso molecular de 721.

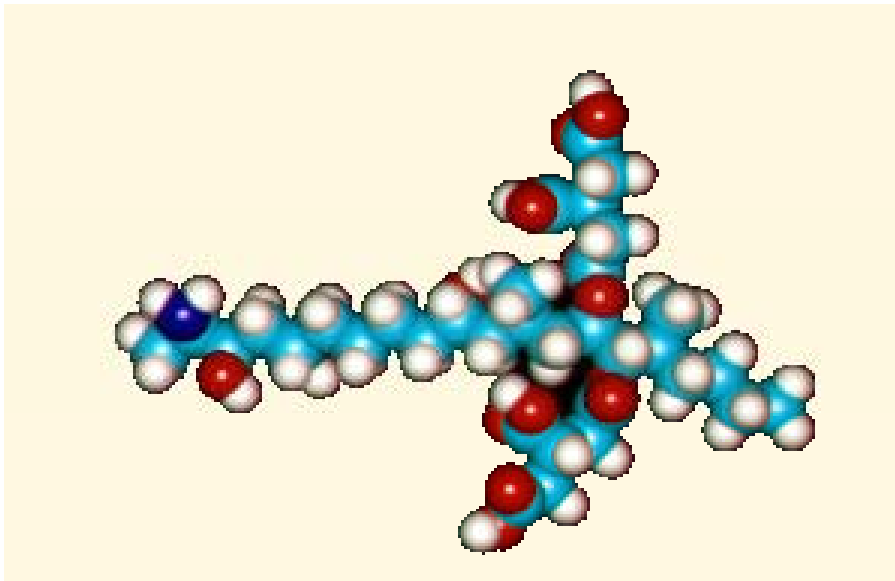


Figura 1 Estrutura química da fumonisina B<sub>1</sub>

Fonte: <http://sis.agr.gc.ca/brd/fusarium/home1.html>

### 2.2.2 Mecanismos de ação

Várias reações bioquímicas têm sido propostas para explicar todos ou alguns dos efeitos tóxicos das fumonisinas em animais. Dois deles envolvem ruptura do metabolismo de lipídios como o ponto inicial de ação e eles são similares em muitos aspectos (Gelderblom *et al.*, 2001; Merrill *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2001).

O 1º mecanismo proposto envolve ruptura do metabolismo de esfingolipídios através da inibição de ceramida sintase, uma enzima chave na biossíntese de esfingolipídios. Isto se deve a similaridade estrutural das fumonisinas com esfinganina e esfingosina que são intermediários na biossíntese e degradação de esfingolipídios.



O 2º mecanismo envolve alterações no metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados e fosfolipídios. Ambos levam finalmente a alterações provocadas por lipídios em vias metabólicas e de sinalizações cruciais para o crescimento, morte e diferenciação celular (FAO/WHO, 2001). Vários estudos “in vitro” indicam que alterações induzidas por fumonisinas em enzimas chaves envolvidas na regulação do ciclo celular, diferenciação e/ou apoptose são gatilhos iniciais ou secundários (Pinelli *et al.*, 1999; Mobio *et al.*, 2000).

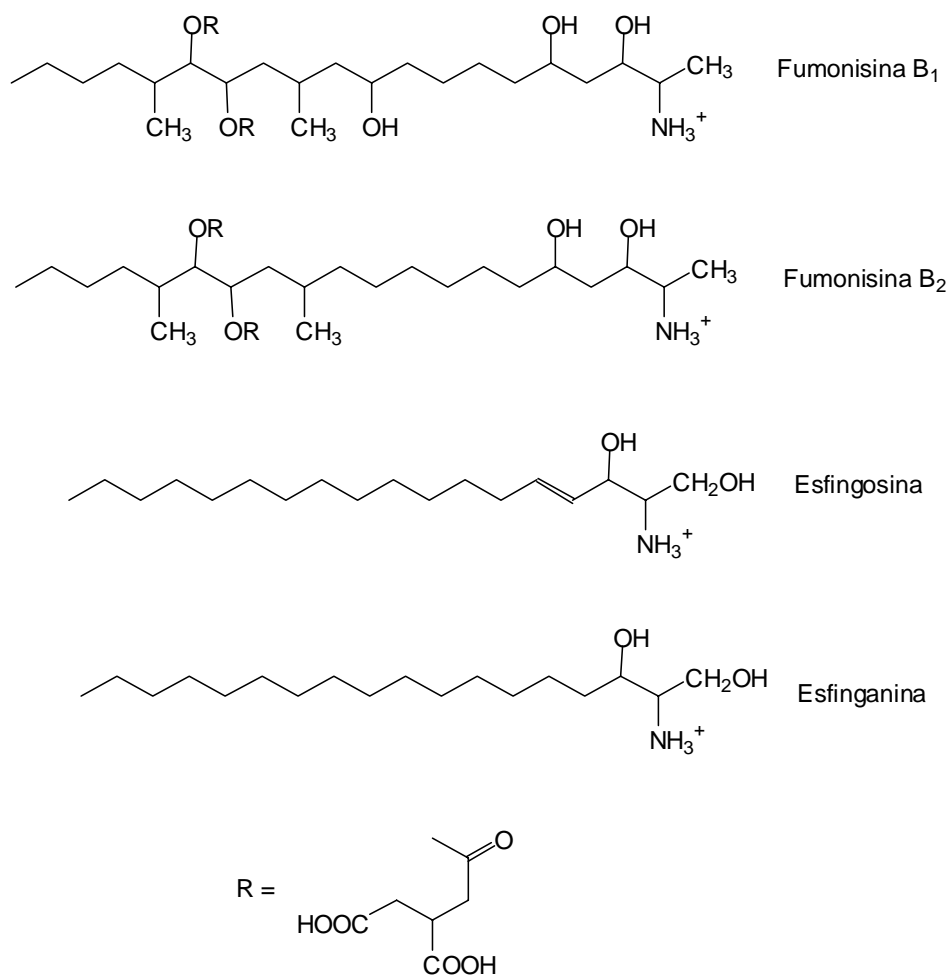


Figura 2 Comparação entre as estruturas das fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, esfingosina e esfinganina

A esfingosina constitui o esqueleto dos esfingolípídios, (esfingomielinas e glicosfingolípídios) componentes fundamentais da membrana celular e essenciais para a sua integridade, comunicação e contato intercelular. Os esfingolípídios são encontrados em grande quantidade no tecido nervoso, sendo que o glicosfingolípídio galactosil-ceramida é o maior constituinte da membrana dos oligodendrócitos e células de Schwann no Sistema Nervoso (Merril, 1991).

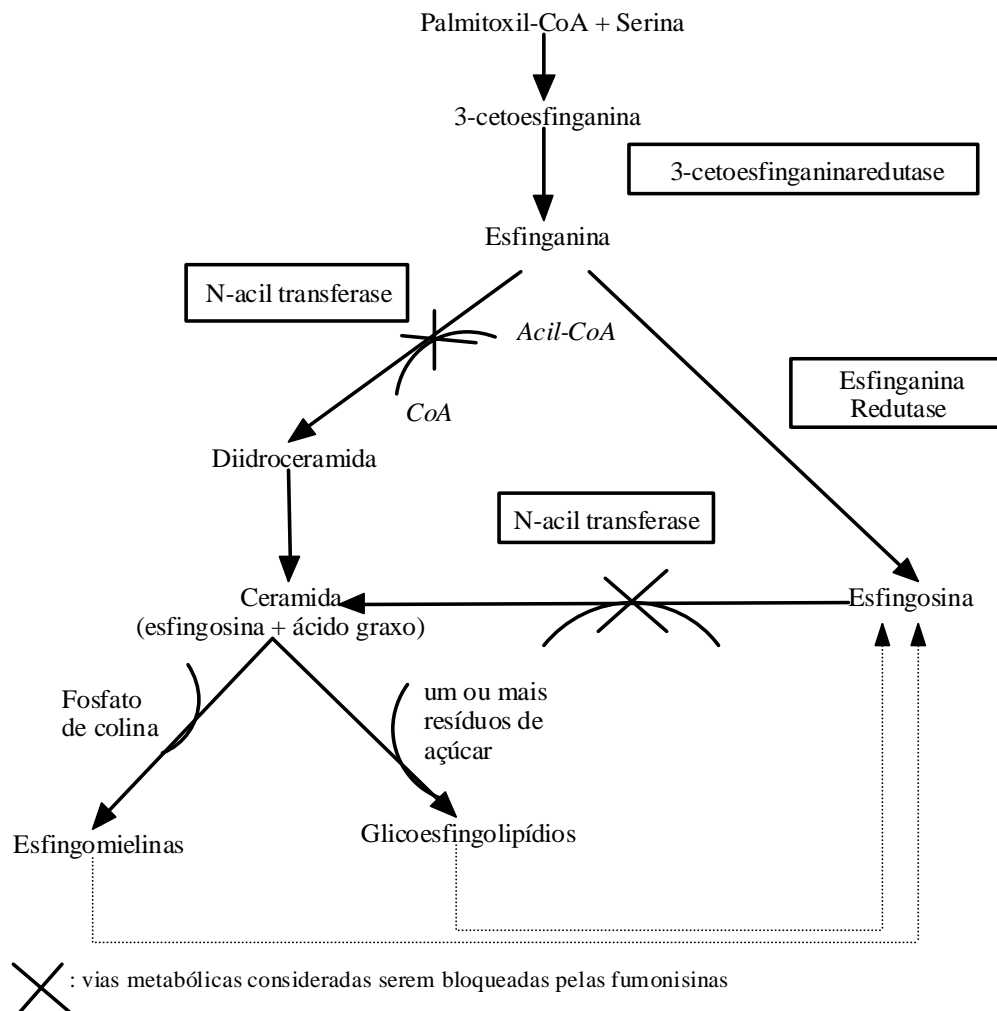


Figura 3 Mecanismo de inibição da biosíntese de esfingolípídios pelas fumonisinas

Fonte: Hennigen, 1998

A síntese de fumonisinas inicia com a condensação de aminoácido com acil-CoA, catalisada por serina-palmitoiltransferase. Na biossíntese de fumonisina a alanina substitui a serina, porém não se sabe ao certo se a porção de poliálcool seria sintetizada via alcil sintetase ou policetida sintetase.

A combinação de palmitoil-CoA e o aminoácido serina forma a 3-ceto-esfinganina que é reduzida à esfinganina, que é novamente reduzida à esfingosina. A ceramida é formada pela combinação de ácido graxo livre ou acil-Co-A e esfingosina, e a esfingomielina é formada quando a ceramida reage com a citosina difosfato colina ou fosfatidilcolina (Merril, 1991).

Estudos indicam que o sítio específico de ação da FB<sub>1</sub> são as enzimas esfinganina e esfingosina – N – aciltransferases e a inibição dessa via metabólica resulta na diminuição de esfingolipídeos, aumentando a concentração intracelular de esfinganina livre (e em menor extensão esfingosina livre e dos produtos de degradação).

Contudo, não está evidente se níveis elevados de bases esfingóides livres são responsáveis pela toxicidade em animais; ou se outras conseqüências da ruptura do metabolismo dos esfingóides são mais importantes para determinar os efeitos tóxicos.

Tem sido postulado (Wang *et al.*, 1992) que a similaridade entre as fumonisinas e a cadeia longa básica esfingóide permite que as fumonisinas sejam reconhecidas como substratos pelas enzimas ceramida-sintase (esfingosina ou esfinganina-N-acil-transferase).

Esfinganina é similar em todos os aspectos a esfingosina, exceto em que não apresenta a 4-trans dupla ligação e portanto é uma base esfingóide saturada. Utilizando FB<sub>1</sub> pura, tem sido demonstrado que a inserção da dupla ligação 4-trans ocorre somente após a formação da diidroceramida. Assim, a ocorrência de esfingosina livre em células de mamíferos é sempre como um produto do catabolismo de lipídeos complexos.

Esfinganina livre é um intermediário na via biossintética dos esfingolipídeos, explicando deste modo porque bases esfingóides livres estão normalmente presentes em muito baixa concentração em células saudáveis. Altas concentrações de bases esfingóides livres podem afetar o crescimento celular e

tem sido associadas à alterações na biossíntese de fosfolípidos (Riley *et al.*, 1994) .

A atual hipótese é de que a inibição por fumonisinas de esfinganina (esfingosina) – N-aciltransferase e a conseqüente disfunção no metabolismo de fosfolípidos conduzem a uma cascata de eventos bioquímicos que resultam em alteração e dano celular (Norred *et al*, 1996).

As conseqüências da inibição da esfinganina (esfingosina)–n-aciltransferase, por fumonisinas, nestes modelos celulares seria: inibição da biossíntese de esfingosina; acúmulo de esfinganina livre; esgotamento de esfingolípídeos complexos; aumento de produtos do catabolismo de bases esfingóides livres; aumento em produtos lipídicos derivados da degradação de bases esfingóides; elevação da esfingosina livre.

A manutenção de baixos níveis de bases esfingóides livres em tecidos é importante porque estes compostos apresentam considerável atividade biológica intrínseca, podendo ser citotóxicos em altas concentrações, alterando o mecanismo regulador normal dentro das células.

Esfingolípídeos complexos tem funções importantes em membranas celulares, incluindo estabilização, identificação de lipídeos e proteínas das membranas, ligação a elementos citoesqueléticos e reconhecimento célula à célula. Portanto, esgotamento de esfingolípídeos complexos levarão a alterações na fisiologia normal da membrana.

Fumonisinás também afetam sítios de regulação celular que são aparentemente independentes da ruptura do metabolismo de lipídios.

Alterações e modificações do metabolismo normal de esfingolípídeos complexos resultam na formação de lipídeos 2º mensageiros que atuam “ligando e desligando” processos intracelulares, incluindo a expressão de genes, ativação e inativação de proteínas específicas (quinase C, fosfatase ácida), apoptose, regulação de fatores de crescimento e outros sinalizadores intracelulares.

Desta forma, ruptura do metabolismo de lipídios, estrutura de membrana e vias de transdução de sinal mediadas por lipídios segundo mensageiros

apresentam-se como sendo importantes em todos os mecanismos de ação propostos (Bolger *et al.*, 2001).

Todos estes eventos estão intimamente relacionados aos processos de crescimento, proliferação e diferenciação celular. Desta maneira, esclarecer claramente os efeitos das fumonisinas em termos de metabolismo de esfingolipídios alterados é bastante complexo pelo fato de que há potencialmente muitos mecanismos de ação na célula.

Fumonisinás também afetam sítios de regulação celular, aparentemente independentes de mecanismo de ruptura de metabolismo de lipídios, resultando em alterações na proliferação celular, comunicação célula a célula, adesão celular e apoptose, indução de stress oxidativo e modulação da expressão de genes (Abado-Becognee *et al.*, 1998; Mobio *et al.*, 2000)

Sendo inibidoras da biossíntese de fosfolipídeos, as fumonisinas possivelmente interferem na regulação do crescimento e diferenciação celular propiciando surgimento de alterações neoplásicas.

A Fumonisiná B<sub>1</sub> é pobremente absorvida, rapidamente excretada e persiste em pequenas quantidades no fígado e rins (Norred *et al.*, 1996). Contudo, uma vez acumuladas as bases esfingoides livres podem persistir nos tecidos (especialmente rim) muito mais que fumonisiná B<sub>1</sub> (Shephard e Snijman, 1999; Enongene *et al.*, 2000).

Ácidos graxos essenciais são os maiores constituintes de todos os triglicerídios, esfingolipídios e glicerofosfolipídios de membrana celular. Além de serem componentes estruturais de todas as membranas eles são precursores de eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos e outros derivados oxigenados. Em adição o "turnover" regulado de esfingolipídios de membrana é importante em muitos sistemas de sinalização intracelular conhecidos para regular crescimento, morte e diferenciação celular.

Em fígado de ratos FB<sub>1</sub> induz alterações nos esfingolipídios e seus ácidos graxos de composição que marcadamente afetam muitas funções celulares que podem contribuir para sua toxicidade e carcinogenicidade (Voss *et al.*, 2002). "In vivo" há uma íntima relação entre acumulação de esfinganina e a expressão de toxicidade no fígado e rim (DeLongchamp & Young, 2001).

Em cultura de células os mecanismos dependentes de esfingolipídios para indução de apoptose incluem acumulação de excesso de ceramida, glucosilceramida (Korkotian *et al.*, 1999), ou bases esfingoides e esgotamento de esfingolipídios complexos.

Não há dúvidas que diminuição dos esfingolipídios complexos podem determinar comportamento anormal, morfologia e proliferação alterada de células tratadas com fumonisinas, em particular, a habilidade de FB<sub>1</sub> para alterar as funções de glicosfingolipídios, esfingolipídios de membrana, de associação e outros lipídios (Bolger *et al.*, 2001).

Há uma tendência geral de compreensão de que as vias de sinalização de esfingolipídios (Merrill *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2001) indicam que o equilíbrio entre as concentrações intracelulares de esfingolipídios efetores que protegem células de apoptose (diminuição de ceramida, aumento esfingosina 1 fosfato) e de efetores que induzem apoptose (elevação de ceramida, elevação de bases esfingoides livres, elevação de ácidos graxos) determinam a resposta celular.

Ao nível celular, necroses apoptóticas podem ser consideradas como sendo similares a necroses oncóticas (Levin *et al.*, 1999), no que ambas levam para um processo regenerativo envolvendo proliferação celular sustentada (Dragan *et al.*, 2001; Hard *et al.*, 2001).

### 2.2.3 Marcadores biológicos

Estudos com diversos tipos de células tais como hepatócitos, neurônios, células renais, fibroblastos, macrófagos e células vegetais têm estabelecido que fumonisina B<sub>1</sub> não somente bloqueia a biossíntese de fosfolipídios, mas também produz esfinganina; que pode ser identificada no sangue e urina o que viabiliza seu emprego em análises com biomarcados. A acumulação deste composto bioativo, bem como a depleção dos complexos de fosfolipídios podem contribuir para a toxicidade e talvez para a carcinogenicidade da fumonisina (Merrill *et al.*, 1996).

Os problemas potenciais do uso da elevação de esfinganina livre como um biomarcador funcional da exposição humana a FB<sub>1</sub> tem sido revisados (Turner

*et al.*, 1999). Em um estudo com homens na China, a proporção entre esfinganina e esfingosina livre em urina foi significativamente maior para homens onde a ingestão diária de FB<sub>1</sub> era > 110 ug/kg bw por dia (Qui *et al.*, 2001).

Em vários outros estudos um aumento na esfinganina livre em sangue e urina humanos não apresentou-se como sendo associado com ingestão de fumonisinas (van de Westhuizen *et al.*, 1999).

### 2.3 Níveis máximos de resíduos recomendados para fumonisinas

Micotoxinas são regulamentadas em mais de 77 países (FAO, 1995), embora as legislações variem de país para país de acordo com o tipo de micotoxina, matriz (tipo de alimento ou ração) bem como em relação aos níveis máximos permitidos. Porém, não somente limites legislativos têm sido regulamentados, mas também requisitos para os laboratórios envolvidos no controle oficial de alimentos tais como amostragem e métodos de análises tem sido definidos. Rotineiramente limites legislativos somente têm sido exigidos a nível comum para aflatoxinas, porém no futuro estes também deverão ser estendidos para outras micotoxinas (Anklam *et al.*, 2002).

A Suíça é atualmente o único país que apresenta um limite oficial de 1mg/kg de FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> para produtos de milho. Desta forma, no que se refere a fumonisinas os órgãos envolvidos em controle de qualidade nos alimentos têm elaborado documentos recomendando quais níveis seriam aceitáveis, com relação aos grãos e produtos derivados. Atualmente as informações disponíveis a respeito dos efeitos à saúde humana associados com fumonisinas não são ainda conclusivos. Entretanto, baseado na grande quantidade de informações sob os efeitos adversos a saúde animal, relacionados a fumonisinas, o FDA acredita que riscos à saúde humana associados com fumonisinas são possíveis. Neste sentido, publicou um documento elaborado pelo Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN-FDA) orientando sobre os níveis máximos recomendados para fumonisinas em milho e produtos derivados considerando os riscos demonstrados inicialmente em estudos com animais (FDA, 2001)

(Tabela 1). Contudo, baseado nas informações disponíveis sobre ocorrência de fumonisinas o FDA acredita que os níveis tipicamente encontrados de fumonisinas em milho e produtos derivados para consumo humano sejam mais baixos do que aqueles recomendados.

Tabela 1 Níveis máximos recomendados de FBs (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> + FB<sub>3</sub>) em milho e produtos derivados destinados ao consumo humano.

Produto	Fumonisinas
	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> + FB <sub>3</sub>
Produtos de milho moído, seco e degerminado (flaking grits, corn grits, corn meal, corn flour) com conteúdo de gordura < 2,25% do peso seco.	2 ppm
Produtos de milho moído, seco, integral ou parcialmente degerminado (flaking grits, corn grits, corn meal, corn flour) com conteúdo de gordura > ou = 2,25% do peso seco	4 ppm
Farelo de milho moído e seco	4 ppm
Milho selecionado destinado ao preparo de "masa"	4 ppm
Milho selecionado para pipoca	3 ppm

#### 2.4 Exposição humana à fumonisinas

Estimativas de exposição humana à FBs têm sido feitas em alguns países incluindo Suíça, Canadá, África do Sul, USA e Holanda. No período compreendido entre 1991 e 1995 foi encontrada uma estimativa de ingestão diária para o Canadá em torno de 0,017 a 0,089 µg/kg de peso corporal (Kuiper-Goodman *et al.*, 1996). Em estimativa preliminar os EUA determinaram uma ingestão em torno de 0,08 µg/kg p.c./dia de FBs em



alimentos contendo milho (Humphreys *et al.*, 1997). A média de ingestão diária de FBs na Suíça foi estimada como sendo 0,030  $\mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{dia}$  (Zoller *et al.*, 1994). Thiel *et al.* (1992) estimou que a exposição humana em Transkey, África do Sul era de 14 e 440  $\mu\text{g FB}_1/\text{kg p.c.}/\text{dia}$  em milho saudável e mofado, respectivamente. Estimativas mais recentes de ingestão diária provável para os sul africanos variam de 1,2 a 355  $\mu\text{g FB}_1/\text{kg p.c.}/\text{dia}$  para as comunidades negras de áreas rurais que consomem milho mofado de cultivo doméstico (Gelderblom *et al.*, 1996a; Marasas, 1997).

## 2.5 Ocorrência de fumonisinas

Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) e B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>) são as micotoxinas mais comumente encontradas em milho e alimentos a base de milho destinado ao consumo humano e animal, ocorrendo naturalmente e em níveis biológicos significantes, por todo o mundo.

A ocorrência natural de fumonisinas no milho, em ração animal e em alimentos à base de milho possivelmente contribui para problemas relacionados à saúde humana e de animais que consomem produtos contaminados. Entre as regiões produtoras de milho ao nível mundial, há consideráveis diferenças no que se refere ao risco de exposição humana à fumonisinas. Os riscos à saúde relacionados com o consumo de produtos contaminados por fumonisinas dependem da extensão destes na dieta alimentar, bem como dos níveis de contaminação. Isto é mais evidente quando se compara países muito desenvolvidos e países em desenvolvimento. Em países da Europa, nos Estados Unidos ou Canadá podem ocorrer contaminações por FBs em milho e seus produtos derivados mas o consumo humano daqueles produtos é modesto. Por outro lado, em regiões da África, Ásia e América do Sul, a farinha de milho representa grande parte do aporte calórico na alimentação, ressaltando ainda, várias outras deficiências nutricionais que podem estar relacionadas. Acrescenta-se a isso o fato de que muitas vezes fumonisinas são encontradas em grãos e derivados em combinação com outras micotoxinas.

FB<sub>1</sub> tem sido detectada em milho e produtos derivados da África, Ásia, Estados Unidos, Canadá, América do Sul e Europa. Analisando-se dados relacionados à

ocorrência de fumonisinas em todo o mundo, verifica-se que pelo menos 60% das amostras de milho, alimentos derivados e rações analisadas apresentam-se contaminadas por FB<sub>1</sub>. De acordo com Marasas *et al.* (2000) a maior incidência têm sido encontrada na Oceania (82 % de 82 amostras) e África (77 % de 382 amostras) seguido por América Latina (85 % de 266 amostras), América do Norte (63 % de 1662 amostras), Europa (53 % de 1918 amostras) e Ásia (52 % de 2525 amostras). Estes dados também demonstram que a incidência de contaminação varia consideravelmente de acordo com o tipo de produto e a origem. As maiores incidências foram registradas em rações a base de milho (82 % de 1112 amostras) seguido por produtos tais como farinha de milho, "grits", polenta, semolina e glúten (73 % de 517 amostras), milho em grão (52 % de 2525 amostras) e alimentos com mistura de milho (40 % de 892 amostras). Níveis muito altos foram encontrados em milho de regiões da África do Sul (> 117 mg/kg) e China (> 150 mg/kg) com altas incidências de câncer de esôfago. Shephard *et al.*, (1996a) publicaram um levantamento mundial a respeito da contaminação por fumonisinas em milho e produtos derivados. Produtos comercialmente disponíveis a base de milho para consumo humano, apresentam geralmente baixos níveis de contaminação, entretanto são observados que alguns produtos, em determinados países alcançam níveis bem maiores. Na Itália, altos níveis de fumonisinas (> 20 mg/kg) foram encontrados em milho, farinha de milho e polenta.

Em milho (grão) disponível comercialmente ou de estações experimentais e de cultivo FB<sub>1</sub> foi detectada em 96 % (de 70 amostras), 91 % (de 138 amostras), 76 % (de 260 amostras), 59 % (de 614 amostras), 44 % (de 729 amostras) e 35 % (de 714 amostras) provenientes da Oceania, América Latina, África, Ásia, América do Norte e Europa, respectivamente (Marasas *et al.*, 2000).

Tabela 2 Níveis mais significativos de contaminação por FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, registrados na literatura

Produtos de milho	País	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	Referência
		Níveis (µg/g)		
Milho/ração - PES	USA	330	48	Ross <i>et al.</i> (1991)
Milho/ração - LEME	USA	160	49	Ross <i>et al.</i> (1993)
Milho/cultivo domést. -	China	155	-	Chu & Li (1994)
EC				
Milho/cultivo domést. -	África do Sul	117	23	Rheeder <i>et al.</i> (1992)
EC				
Milho/exportado Japão	USA	4,1	10,2	Ueno <i>et al.</i> (1993)
Milho/exportado África	USA	7,6	3,1	Viljoen <i>et al.</i> (1993)
Sul				
Alimentos/milho *				
Farinha de milho	USA	6,8	-	Pestka <i>et al.</i> (1994)
Farelo/alimento de milho	USA	2,8	1,1	Sydenham <i>et al.</i> (1991)
Milho extrusado e Polenta	Itália	6,1	0,9	Doko & Visconti (1994)
Alimento	Zimbabwe	3,6	0,9	Sydenham <i>et al.</i> (1993)

- Alimentos destinados à consumo humano
- Fonte: Marasas, 1996.

Tabela 3 Ocorrência mundial de fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) em produtos derivados de milho

Produto	País	Detectado / total	FB <sub>1</sub> (µg/g)
<b>América do Norte</b>			
Milho	Canada, USA	324/729	0,08 – 37,9
Farinha milho, grits	Canadá, USA	73/87	0,05 – 6,32
Alimentos base de milho *	USA	66/162	0,004 – 1,21
Ração de milho	USA	586/684	0,1 - 330
<b>América Latina</b>			
Milho	Argentina, Uruguai, Brasil	126/138	0,17 – 27,05
Farinha de milho, grãos (submetidos à álcali), polenta	Peru, Venezuela, Uruguai	5/17	0,07 – 0,66
Alimentos base de milho *	Uruguai, Texas-México	63/77	0,15 – 0,31
Ração de milho	Brasil, Uruguai	33/34	0,2 – 38,5
<b>Europa</b>			
Milho	Áustria, Croácia, Alemanha, Hungria, Itália, Polônia, Portugal, România, Espanha, Reino Unido	248/714	0,007 - 250
Farinha de milho, grits, polenta, semolina	Áustria, Bulgária, República Tcheca, França, Alemanha, Itália, Holanda, Espanha, Suíça, Reino Unido	181/258	0,008 – 16
Alimentos base de milho *	República Tcheca, França, Alemanha, Itália, Holanda, Espanha, Suécia, Suíça, Reino Unido	167/437	0,008 – 6,10
Milho importado, grits e farinha	Alemanha, Holanda, Suíça	143/165	0,01 – 3,35
Ração de milho	França, Itália, Espanha, Suíça, Reino Unido	271/344	0,02 – 70
<b>África</b>			
Milho	Benin, Kenia, Malawi, Moçambique, África do Sul, Tanzânia, Uganda, Zâmbia, Zimbabwe	199/260	0,02 – 117,5
Farinha de milho, grits	Botswana, Egito, Quênia, África do Sul, Zâmbia, Zimbabwe	73/90	0,05 – 3,63
Alimentos base de milho *	Botswana, África do Sul	8/17	0,03 – 0,35
Ração de milho	África do Sul	16/16	0,47 – 8,85
<b>Ásia</b>			
Milho	China, Indonésia, Nepal, Filipinas, Tailândia, Vietnã	361/614	0,01 – 155
Farinha de milho, grits, glúten	China, Índia, Japão, Tailândia, Vietnã	44/53	0,06 – 2,60
Alimentos base de milho *	Japão, Taiwan	52/199	0,07 – 2,39
Ração de milho	Coreia, Tailândia	10/34	0,05 – 1,59
<b>Oceania</b>			
Milho	Austrália	67/70	0,3 – 40,6

\* Inclui snaks de milho, milho extrusado, biscoitos, cereais a base de milho, chips, flocos, alimento infantil, purê, pipocas, tortillas, tortilla chip, masas, sopas, tacos.

Fonte: Marasas *et al.*, 2000

Tabela 4 Ocorrência mundial de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, publicados na literatura especializada

País	Produto de milho	Ano	Fumonisina B <sub>1</sub>		Fumonisina B <sub>2</sub>		Referência
			Amostras Positivas	Níveis (mg/Kg)	Amostras Positivas	Níveis (mg/Kg)	
<b>AMÉRICA DO NORTE</b>							
USA	ração	1989	3/3	37 -122	3/3	2 -23	Wilson <i>et al.</i>
USA	grão quebrado		2/2	144-148	2/2	31- 41	(1990)
USA	ração	1983-86	14/14	1,30-27,0	14/14	0,1– 12,6	Thiel <i>et al.</i>
USA	ração	1989-90	177/232	1 -330			(1991b)
USA	ração	NR	2/2	20 -150			Ross <i>et al.</i>
USA	ração	1990-91	15/16	1.0 <sup>a</sup>	13/16	0,3	(1991)
USA	grão		10/10	0,6 <sup>a</sup>	5/10	0,4	Plattner <i>et al.</i>
USA	<i>Cornflake</i>		0/2		0/2		(1990)
Canada	farinha		1/2	0,05	0,2		Sydenham <i>et al.</i>
<b>AMÉRICA DO SUL</b>							
Brasil	grão	1985-90	20/21	0,2 –38,5	18/21	0,1 –12,0	(1991)
Peru	farinha	1990-91	1/2	0,66	1/2	0,13	Sydenham <i>et al.</i>
<b>EUROPA</b>							
Áustria	grão	1988-89	3/9	< 15			(1991b)
Itália	ração	NR	23 /25	0,01 –8,4	13/25	0,01 –1,33	Lew <i>et al.</i>
<b>AFRICA</b>							
Transkei	grão	NR	3/3	< 10-83			Minervini <i>et al.</i>
Transkei	grão	1985	39/48	0,2 –46,9	37/48	0,15 –16,3	(1993)
Transkei	grão	1985-89	61/74	0,05–117,5	55/74	0,05-22,9	Sydenham <i>et al.</i>
África Sul	Farinha	1990-91	46/52	0,14 <sup>a</sup>	11/52	0,08 <sup>a</sup>	(1990a)
África Sul	Farelo		10/18	0,13 <sup>a</sup>	4/18	0,09 <sup>a</sup>	Rheeder <i>et al.</i>
<b>AFRICA</b>							
África Sul	Farelo		10/18	0,13 <sup>a</sup>	4/18	0,09 <sup>a</sup>	(1992)

NR não relatado

<sup>a</sup> Média

Fonte – IARC, 1993.

### 2.5.1 Em rações animais associadas a micotoxicoses

A primeira correlação entre a LEME e fumonisinas foi apontada por Wilson *et al.* (1990) em 3 amostras de milho provenientes do Arizona, USA, onde ocorreram 14 óbitos em cavalos. Os níveis de contaminação por FB<sub>1</sub> eram de 37-122 µg/g e também havia presença de FB<sub>2</sub>.

A partir de então fumonisinas foram detectadas em rações obtidas da África do Sul, USA e Brasil, associadas à LEME, (Plattner *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1991, 1992; Sydenham *et al.*, 1992; Thiel *et al.*, 1991). FB<sub>1</sub> também foi encontrada em milho e ração associada com caso de Edema Pulmonar em Suínos (EPS) nos EUA e Brasil (Harrison *et al.*, 1990; Osweiler *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1991a; Sydenham *et al.*, 1992).

Os níveis de FB<sub>1</sub> em matéria prima para o preparo de rações podem ser excepcionalmente altos e já foram encontrados níveis máximos de 330, 70, 38, 9 e 2 µg/g na América do Norte (USA), Europa (Itália), América Latina (Brasil), África (África do Sul) e Ásia (Tailândia), respectivamente. A maioria destas rações altamente contaminadas estavam implicadas em casos de LEME, EPS e outras micotoxicoses (Marasas *et al.*, 2000).

Tabela 5 Fumonisinas em rações animais associadas à LEME em cavalos e EPS em suínos

Amostras de milho	País	Ano	Total / amostras positivas	Fumonisinas				Referência
				FB <sub>1</sub> (µg/g)		FB <sub>2</sub> (µg/g)		
				Níveis	Média	Níveis	Média	
<b>LEME</b>								
Ração	Brasil	1985-90	14 (14)	0,2-38,5	10,3	<0,05-12,0	3,8	Sydenham <i>et al.</i> , 1992
Milho	Itália	1993	1 (1)		60		15	Doko <i>et al.</i> , 1994
Ração "mix"	África Sul	1990	1 (1)		8,85		3,0	Shephard <i>et al.</i> , 1990
Milho branco	USA	1989	3 (3)	37-122	12	2-23	12	Wilson <i>et al.</i> , 1990
Milho e ração	USA	1983-86	14 (14)	1,3-27,0	7,7	0,1-12,6	3,1	Thiel <i>et al.</i> , 1991
Ração	USA	1984-85	13 (13)	1-32	17		NR	Ross <i>et al.</i> , 1991
Ração	USA	1989-90	98 (77)	<1-126	31		NR	Ross <i>et al.</i> , 1991
<b>EPS</b>								
Ração	Brasil	1985-90	3(3)	8,5-11,1	10,0	1,9-3,2	2,8	Sydenham <i>et al.</i> , 1992
Milho	USA	1989	29(29)	3-330	76	NR	NR	Osweiler <i>et al.</i> , 1992

NR não relatado

### 2.5.2 Em produtos de milho destinado ao consumo humano

A primeira publicação sob a ocorrência natural de FB<sub>1</sub>, com níveis de 44-83 µg/g, foi feita por Sydenham *et al.* (1990a) em milho de cultivo doméstico destinado à consumo humano na região de Transkei, África do Sul, que apresentava uma incidência muito alta de câncer de esôfago. Estes cientistas observaram que amostras de milho provenientes desta região apresentavam níveis de contaminação por fumonisinas (FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>) cerca de 20 vezes maior quando comparadas as regiões de baixa incidência de câncer de esôfago.

Yoshizawa *et al.* (1994) verificaram a ocorrência de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> na República da China, região de Lixian, uma área com alta incidência de câncer de esôfago. Constataram níveis 2 vezes maior de contaminação nesta região, sendo que mais freqüentemente este milho também apresentou co-contaminação por tricotecenos.

Sydenham *et al.* (1991) determinaram os níveis de fumonisinas em produtos comerciais derivados de milho (124 amostras), provenientes do Canadá, Egito, Peru, África do Sul e Estados Unidos. Os resultados indicaram que consumidores da África do Sul e Estados Unidos estavam expostos a elevados níveis de contaminação por fumonisinas.

Em áreas rurais com plantações domésticas de milho, sendo o mesmo produto básico na dieta alimentar, os níveis de contaminação podem ser superiores à 100 µg/g. Nestes níveis de contaminação têm-se estabelecido relação com alta incidência de câncer de esôfago (Shephard *et al.*, 1996).

Encontra-se também na literatura registros sobre contaminação por fumonisinas em alimentos derivados de milho, para consumo humano no norte da Itália, região com alto risco de incidência de câncer de esôfago (Doko & Visconti, 1993, 1994).

Nestes estudos, Doko e Visconti (1994) constataram contaminação por fumonisinas em todas as amostras de milho analisadas em níveis superiores a 5310 ng/g para FB<sub>1</sub> e acima de 1480 ng/g para FB<sub>2</sub>. Em produtos à base de milho os maiores níveis de contaminação foram registrados em milho extrusado para FB<sub>1</sub> (acima de 6100 ng/g) e FB<sub>2</sub> (acima de 910 ng/g). Na

farinha de milho ou polenta os níveis variaram de 420 a 3760 ng/g para FB<sub>1</sub> e de 80 a 910 ng/g para FB<sub>2</sub>.

Num levantamento sobre os níveis de fumonisinas no Reino Unido - UK em alimentos derivados de milho e outros cereais foi constatada contaminação em 26 % de todas as amostras analisadas numa concentração que variou de 10 a 2124 µg/kg. Das amostras coletadas no varejo, a polenta de milho apresentou os maiores níveis de contaminação, cerca de 78 % de "corn snacks" continham níveis de fumonisinas entre 11 e 220 µg/kg e 24 % dos cereais matinais apresentavam níveis entre 11 e 194 µg/kg. Em amostras de pipoca pronta não foram encontradas fumonisinas mas em milho de pipoca e milho de pipoca para microondas os níveis variaram de 14 a 110 µg/kg, sendo que 46% destas amostras estavam contaminadas. Nos produtos processados derivados de milho tais como pudim instantâneo de semolina e outros pudins em pó a contaminação atingiu 90 % com níveis entre 14 e 110 µg/kg. Baixos níveis de contaminação por fumonisinas foram também detectados em amostras de "tacos", entre 10 e 31 µg/kg (Patel *et al.*, 1997).

### 2.5.3 Fumonisinas no Brasil

Até início dos anos 90 haviam apenas registros da presença de *Fusarium* em milho no Brasil, isolados em cereais e rações procedentes de Estados brasileiros, com predominância de *F. verticillioides* e *F. graminearum*. De acordo com Wentz *et al.* (1981) 90 % das amostras de milho e ração, para suínos e aves por eles examinadas no Estado de Santa Catarina, estavam contaminadas por *Fusarium* spp. Analisando 90 amostras de milho, procedentes de várias regiões do Brasil, Asevedo (1988) encontrou *Fusarium* spp em 62,2 % delas e Corrêa *et al.* (1992), encontraram *F. verticillioides* com uma frequência de 85,1 % em milho pós-colheita.

A partir de então começaram a surgir dados a respeito da ocorrência de FBs em milho, rações e produtos derivados. Os primeiros registros estavam relacionados a surtos de toxicoses em animais (Sydenham *et al.*, 1992; Meirelles *et al.*, 1994).



Amostras (21) de ração associadas a casos de micotoxicose na região de Londrina, Paraná foram analisadas e os resultados mostraram que 95,2 % das amostras apresentavam FB<sub>1</sub> e 85,7% delas apresentavam FB<sub>2</sub> (Sydenham *et al.*, 1992). Hirooka *et al.* (1996), analisando 48 amostras de milho procedentes do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás, safras 1990/91, detectaram FB<sub>1</sub> em 97,4 % das amostras e FB<sub>2</sub> em 94,8 %. Em 4 das amostras a contaminação era superior a 10 µg/g. Analisando a ocorrência natural de fumonisinas em 195 amostras de híbridos de milho no Estado de São Paulo, Orsi *et al.*, 2000, determinaram 90,2 % de contaminação das amostras por FB<sub>1</sub> e 97,4 % para FB<sub>2</sub>, com níveis médios de contaminação de 9,72 µg/g e 7,67 µg/g, respectivamente. Há registros sobre ocorrência de fumonisinas em milho e produtos derivados, particularmente no que se refere as regiões sul e sudeste do país, com níveis que variaram de 0,02 a 49,31 µg/g para FB<sub>1</sub> e de 0,05 a 29,16 µg/g para FB<sub>2</sub> (Camargos *et al.*, 2000; Hirooka *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 2000, 2001, 2002; Orsi *et al.*, 2000).

São escassas as publicações sobre fumonisinas em produtos derivados de milho, destinados ao consumo humano no Brasil. Machinski *et al.* (2000) analisaram 81 amostras de produtos derivados de milho, coletados na cidade de Campinas, no estado de São Paulo, sendo que fumonisinas foram encontradas em 54 % das amostras com níveis entre 0,02 e 4,93 µg/g.

No estado de Santa Catarina estudos têm relatado contaminação por fumonisinas em pelo menos 97,3 % do milho comercializado. Hermanns *et al.* (2000) verificaram níveis que variaram de 1,12 a 31,88 µg/g em milho proveniente da região Oeste. Em estudo envolvendo três regiões do Estado (Oeste, Norte e Sul) van der Westhuizen *et al.* (2003) encontraram níveis que variaram de 0,02 a 18,74 µg/g. Já Günther & Scussel (2003) em milho armazenado, proveniente de todas as regiões produtoras do estado (Norte, Oeste, Sul, Vale do Itajaí e Serrana) observaram níveis de contaminação por FBs de até 71,14 µg/g em milho destinado ao consumo humano.

Tabela 6 Ocorrência de fumonisinas em milho nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, citadas em literatura

Região	Estado	Variação		Media (µg/g)	FB <sub>1+</sub> FB <sub>2</sub> (µg/g)	Amostras positivas	Referência
		FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>				
Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	4.90 - 18.52	3.62 - 19.13	10.59 <sup>b</sup>	NE	100 %	Hirooka <i>et al.</i> , 1996
Sudeste	São Paulo *	0,09 - 17,69	0,05 - 5,24	NE	NE	93,5%	Almeida <i>et al.</i> , 2002
	São Paulo ♦	0,87 - 49,31	1,96 - 29,16	8,05 <sup>b</sup>	NE	97,4 %	Orsi <i>et al.</i> , 2000
	São Paulo	1,63 - 25,69	0,38 - 8,60	5,61 <sup>b</sup>	NE	100 %	Camargos <i>et al.</i> , 2000
Sul	Paraná	0.60 - 12.55	1.20 - 10.24	4.79 <sup>b</sup>	NE	97.4 %	Hirooka <i>et al.</i> , 1996
	Paraná		NE	2,39 <sup>b</sup>	0,07 - 13,46	100 %	Ono <i>et al.</i> , 2000
	Paraná	NE	NE	9,85 <sup>x</sup> 5,08 <sup>y</sup> 1,14 <sup>z</sup>	0,096 - 22,60	98 %	Ono <i>et al.</i> , 2001
	Paraná*	NE	NE	9,9 ± 6,0	0,74 - 22,6	100 %	Ono <i>et al.</i> , 2002
	Santa Catarina	1,12 - 31,88	NE	NE	NE	100%	Hermanns <i>et al.</i> , 2000
	Santa Catarina	1,31 - 80,92		NE		97,3 %	Günther, 2003
Santa Catarina	NE	NE	2,66 ∨ 2,73	0,02 - 18,74	100 %	Westhuizen <i>et al.</i> , 2003	
Rio Grande do Sul	0.086 - 78.92	NE	8.86 <sup>b</sup>	NE	35.2 %	Mallmann <i>et al.</i> , 2001	

NE não especificado

<sup>b</sup> Fumonisina FB<sub>1</sub>

\* Capão Bonito e Ribeirão Preto

♦ Recém-colhido / híbrido armazenado

\* Recém colhido

<sup>x</sup> Norte

<sup>y</sup> Centro-Oeste

<sup>z</sup> Centro -Sul

## 2.6 Metodologia analítica para fumonisinas

Os problemas e riscos associados à contaminação em alimentos e rações têm levado ao desenvolvimento de métodos que buscam cada vez mais precisão, sensibilidade e reprodutibilidade para a determinação de fumonisinas em milho e produtos derivados. Contudo fumonisinas tem também sido determinadas em amostras fisiológicas como plasma e urina entre outras. Estas avaliações têm sido amplamente realizadas, associadas a experimentos envolvendo mecanismos de ação e deposição destas micotoxinas em animais após administração de relativamente altas doses.

Metodologias analíticas para determinação e quantificação das fumonisinas têm sido desenvolvidas, particularmente para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, as mais encontradas contaminando naturalmente milho e produtos derivados. Estes métodos também têm sido validados para FB<sub>3</sub>, porém seu uso está muitas vezes restrito, devido a problemas na disponibilidade de padrões para esta última.

Os métodos analíticos para fumonisinas citados na literatura pertinente são cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida (LC), espectrometria de massa (MS), cromatografia gasosa pós-hidrolise, métodos imunoquímicos e eletroforéticos. O desenvolvimento de métodos alternativos tais como ELISA (enzime-linked immunosorbent assay), tem proporcionado rapidez no tempo de análise para separação de amostras. Apesar de publicações envolvendo métodos por eletroforese de zona capilar estes não tem tido larga aplicação. Já os métodos analíticos quantitativos foram extensivamente revisados por Sydenham e Shephard, (1996); Shephard, (1998) e Wilson *et al.* (1998) e os mais comumente empregados envolvem separação das fumonisinas em milho e produtos derivados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após extração com solventes e purificação por extração em fase sólida (SPE). Apesar de métodos envolvendo cromatografia gasosa (GC-MS) serem utilizados como importante método confirmatório a maioria dos dados sobre ocorrência natural são obtidos através de CLAE porque são mais fáceis, práticos e requerem equipamentos menos sofisticados. Ênfase tem sido dada aos avanços alcançados em métodos associando cromatografia líquida e espectrometria de massa (LC-MS) que tem resultado na aplicação desta técnica para análise de fumonisinas

sem necessidade de derivatização (Shephard, 1998).

Shephard *et al.*, (1990) desenvolveram o primeiro método quantitativo em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de fumonisina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em milho naturalmente contaminado. Sendo moléculas polares, solúveis em água e solventes polares as fumonisinas são adequadas para determinação por CLAE em fase reversa. Como carecem de um cromóforo UV significativo e não apresentam fluorescência inerente, para detecção de baixos níveis de fumonisinas nas análises de alimentos contaminados faz-se necessário a derivatização dos extratos obtidos das amostras. Este método envolve extração com metanol:água (3:1), limpeza em cartuchos de extração em fase sólida (SPE), de troca aniônica forte (SAX), e quantificação em CLAE, fase reversa após derivatização com *o*-ftaldialdeído. A reprodutibilidade deste método foi estudada sob a supervisão da Comissão em Química Alimentar do IUPAC (Thiel *et al.*, 1993) e posteriormente aprimorado e estendido para determinação de FB<sub>3</sub> (Sydenham *et al.*, 1992b). Posteriormente a Comissão em Química Alimentar do IUPAC e AOAC Internacional conduziram um estudo colaborativo para avaliar a exatidão e reprodutibilidade deste método que é aceito atualmente como método oficial AOAC – 995 para determinação de fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> em milho (AOAC, 1998; Trucksess, 2000). Como uma alternativa aos cartuchos SPE, colunas de imunoafinidade, contendo anticorpo reativo com a fumonisina, tem proporcionado uma purificação bastante seletiva do extrato da amostra e são comercialmente praticáveis.

A aplicação dos métodos acima mencionados e outros que vêm sendo desenvolvidos tem oferecido uma grande quantidade de dados valiosos referentes a contaminação por fumonisinas em milho e seus derivados. A avaliação da exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade de tais métodos tem tornado possível a determinação rotineira e regular da contaminação por fumonsinas fornecendo subsídios para o estabelecimento de um futuro monitoramento legislativo para o controle do risco de exposição ao qual as populações podem estar expostas.

### 2.6.1 Efeitos do processamento de alimentos

A estabilidade das micotoxinas durante o processamento pode ser afetada por muitos fatores tais como a mistura do produto, a concentração da toxina e sua localização, a presença de aditivos e o tipo de matriz alimentar (Scott, 1984). FB<sub>1</sub> tem estabilidade química para resistir à completa destruição no processamento de alimentos (Scott & Lawrence, 1994; Doko & Visconti, 1994). De acordo com Bolger *et al.* (2001) no processamento de moagem "à seco" do milho, ocorre uma distribuição de FBs entre as frações obtidas, podendo-se determinar níveis baixos em "grits" e mais elevados no germe e farelo. No processo de moagem "via úmida", 22 % do teor de FBs foram encontrados na água de encharcamento, sendo que 10 a 40 % da concentração original ficou retida no glúten, fibra e germe, porém não no amido.

Canela *et al.* (1996) avaliaram o efeito da solução de dióxido de enxofre na moagem "via úmida" e concluíram que a extração da toxina no grão contaminado tornava-se mais demorada. No entanto, Pujol *et al.* (1999) comparando milho tratado com solução de dióxido de enxofre ou água pura, verificaram que a toxina encontrada na solução aquosa foi menor, sugerindo que o milho pode conter elementos ligantes à fumonisina.

De acordo com Shetty & Bhat, (1999) como o milho contaminado com FB<sub>1</sub> tem baixa densidade, 86 % da micotoxina pode ser removida na fração flutuante após tratamento com solução saturada de cloreto de sódio.

Os dados sobre os efeitos da temperatura em fumonisinas variam de acordo com o tipo de processamento e as perdas observadas podem ser devidas a dificuldades de recuperação e detecção relacionadas a matriz, mais do que à decomposição. Desta forma, há necessidade de aprimoramento de métodos para diferenciar entre ligação com a matriz e remoção das FBs. Scott & Lawrence (1994) recuperaram 40 % de FBs em farinha de milho, aquecida a 190°C, durante 60 minutos. Castelo *et al.* (1998) analisaram os efeitos da temperatura nos níveis de FBs, no processamento de conserva em lata, assar em forno e tostar. Constataram significativa diminuição nos níveis de fumonisinas nos dois primeiros casos, e em farinha de milho tostada ocorreu quase que perda completa.

Técnicas de preparo de produtos de milho relacionados à dietas básicas em muitos países tais como América do Sul e Central envolvem nixtamalização (cozimento

alcalino - aquecimento) durante o qual ocorre formação de fumonisinas hidrolizadas. Fumonisinas hidrolizadas têm sido detectadas em “masa” comercial e “tortilla chip”, provavelmente formadas durante a nixtamalização (Murphy *et al.*, 1996).

## 2.7 Efeitos toxicológicos das fumonisinas

A fumonisina está associada à toxicose e várias doenças em animais e humanos, incluindo câncer. Leucoencefalomalácia equina (LEME), hepatotoxicidade em cavalos, porcos e ratos, câncer hepático em ratos, edema pulmonar intersticial agudo em suínos, câncer de esôfago (EC) no homem, nefropatias, malformações ósseas entre outras são as mais citadas na literatura (Norred & Voss, 1994; Scott, 1993; Howard *et al.*, 1999). Cérebro, pulmões, fígado e rins são conhecidos órgãos-alvo, porém as análises a nível estrutural e morfológico são escassas e imprecisas, considerando-se de grande interesse estudos experimentais que nos proporcione tais dados. As observações “in vivo” disponíveis são consistentes com o modo proposto de ação para toxicidade induzida por FB<sub>1</sub> que é dependente de metabolismo de lipídios alterado.

Nos rins, os efeitos iniciais são freqüentemente elevação nas bases esfingóides livres, apoptose das células dos túbulos renais e regeneração celular. No fígado, necrose apoptótica e oncótica, proliferação celular, hiperplasia de ducto biliar e regeneração são os primeiros sinais de toxicidade.

### 2.7.1 Em animais

Surtos naturais de toxicose relacionada ao consumo de ração contaminada com fumonisina tem sido verificadas através da leucoencefalomalácia equina (LEME) e por edema pulmonar em suínos (EPS). Para outras espécies animais não existem registros da ocorrência natural de distúrbios e doenças.

A LEME é uma doença não infecciosa, esporádica e fatal, que se caracteriza pela necrose e liquefação da substância branca do Sistema Nervoso Central (SNC), com perda do controle motor de cavalos e outro eqüídeos. Além destes aspectos relacionados a neurotoxicidade, alterações histopatológicas foram verificadas em

figado e rins de eqüinos tratados oralmente com fumonisina pura, milho naturalmente contaminado ou material de cultura (Wilson *et al.*, 1992). Há registros da ocorrência de LEME nos EUA desde 1859, além de diversas partes do mundo. Esta doença tem sido reproduzida experimentalmente em eqüídeos através de FB<sub>1</sub> e também com material de cultura de *F. verticillioides* (Marasas *et al.*, 1976; Laurent *et al.*, 1989; Kellerman *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1992). No Brasil a relação entre o *Fusarium verticillioides* e a LEME foi estabelecida por Riet-Corrêa *et al.* (1982) e Barros *et al.* (1984) que descreveram vários surtos no Rio Grande do Sul. Posteriormente a doença foi identificada em Minas Gerais (Brito *et al.*, 1982), Santa Catarina (Martins *et al.*, 1988) e Paraná (Hirooka *et al.*, 1990; Sydenhan *et al.*, 1992).

Meireles *et al.* (1994) estudaram 29 casos de LEME entre 1988 e 1990 nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais. As análises microbiológicas determinaram que *Fusarium* spp., o fungo mais freqüentemente encontrado, estava presente em 97,4% das amostras de ração, sendo que *Fusarium verticillioides* foi a espécie predominante, ocorrendo em 82 % das amostras.

Em suínos os efeitos tóxicos da ração contaminada com fumonisinas caracterizam-se principalmente por edema pulmonar (EPS) e hidrotórax severo, mas alterações foram observadas no figado, pâncreas, sistemas cardiovascular e imunológico. A alteração no metabolismo de fosfolipídios provoca liberação na circulação de material membranoso que é fagocitado pelos macrófagos presentes em grande quantidade nos pulmões. A partir de então ocorre a liberação de mediadores inflamatórios que desencadeiam o quadro clínico de edema pulmonar (Haschek *et al.*, 1992). Surtos de EPS devido a contaminação natural de rações com fumonisinas foram descritos por Harrison *et al.* (1990); Ross *et al.* (1991(b), 1992); Colvin & Harrison (1992); Haschek *et al.* (1992); Osweiler *et al.* (1992); Riley *et al.* (1993) e Motelin *et al.* (1994).

### 2.7.2 Em animais de laboratório e sistema "*in vitro*"

Estudos têm sido desenvolvidos buscando determinar os efeitos tóxicos de fumonisinas em várias espécies animais. A maioria destes experimentos emprega ratos e camundongos como modelos biológicos. Um aspecto importante, já verificado, é que

os efeitos e danos atingem órgãos bastante diferenciados conforme a espécie animal, como já citado anteriormente. A hepatotoxicidade da FB<sub>1</sub> têm sido demonstrada em todas as espécies animais testadas incluindo camundongos, ratos, eqüídeos, coelhos, porcos e primatas não humanos, assim como nefrotoxicidade em porcos, ratos, ovelhas, camundongos e coelhos (Gelderblom *et al.*, 1988; 1992; 1994; Voss *et al.*, 1990; 1993; Shephard *et al.*, 1996b; Tolesson *et al.*, 1996; Bondy *et al.*, 1996; 1997). Estudos em roedores, primatas não humanos e outras espécies de animais tratados com material de cultura de *F. verticillioides* de um isolado que produz predominantemente FB<sub>1</sub> (isolado MRC 826) ou milho naturalmente contaminado com fumonisinas mostraram efeitos tóxicos no fígado e rins que foram similares aos estudos com fumonisina B<sub>1</sub> purificada. Ambos, MRC 826 e milho naturalmente contaminado causaram tumores de fígado em ratos em doses similares aquelas que causaram tumores de fígado em roedores tratados com FB<sub>1</sub> purificada (Bolger *et al.*, 2001).

O NOEL (non observed effect toxic) para toxicidade hepática e renal de todas as fumonisinas em vervet monkeys tratados com dieta contendo material de cultura de MRC 826 foi de 0,11 mg/kg p.c./dia. Fumonisin B<sub>1</sub> purificada de material de cultura de *F. verticillioides* e de milho naturalmente contaminado induziram não somente toxicidade hepática, mas também LEME em eqüinos e edema pulmonar e hidrotórax em porcos. Estes distúrbios aparecem secundariamente a disfunção cardiovascular. Efeitos cardiovasculares também têm sido observados em outras espécies. O NOEL para FB<sub>1</sub> na LEME foi equivalente a 0,3 mg/kg p.c./dia para animais tratados com dieta contendo material de cultura de *Fusarium*. Em porcos tratados com material de cultura de *Fusarium* evidências de edema pulmonar foram detectadas numa concentração de FB<sub>1</sub> equivalente a 0,4 mg/kg p.c./dia. Para porcos tratados com milho naturalmente contaminado, a concentração de FB<sub>1</sub> requerida para induzir edema pulmonar foi muito maior, contudo a NOEL para toxicidade hepática foi similar, equivalente a 0,2 mg/kg p.c./dia (Bolger *et al.*, 2001).

A toxicidade induzida por FB<sub>1</sub> em fígado e rim é normalmente caracterizada por elevação de processos apoptóticos e necrose oncótica (Gelderblom *et al.*, 1988; 1996b; 2001; Tolesson *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 2001). A elevação da taxa de



morte celular associada a proliferação celular regenerativa possivelmente por geração de dano oxidativo pode levar ao aumento na incidência de tumores em tecidos alvos. A 1ª evidência para uma perda celular sustentada e regeneração é a observação de tais efeitos em rins de ratos.

FB<sub>1</sub> é hepatotóxica em ratos, provocando hepatite tóxica progressiva, necrose hepatocelular, proliferação e fibrose do ducto biliar (Gelderblom *et al.*, 1988), progredindo para carcinoma hepatocelular (Gelderblom *et al.*, 1991).

Bondy *et al.* (1998) através da administração via sonda de FB<sub>1</sub> em ratos constataram que os rins e a medula óssea apresentaram-se mais sensíveis à exposição da toxina. Foram observadas alterações na morfologia renal e vacuolização celular associada à toxicidade da medula óssea. Hepatotoxicidade foi avaliada pela redução no peso do órgão, mas apenas leves alterações histológicas foram observadas.

Em ratos e camundongos foram observadas lesões nos fígados ou rins sugerindo também efeitos nefrotóxicos sexo-dependentes.

Em experimentos desenvolvidos com extrato de cultura de *Fusarium moniliforme*, contendo FB<sub>1</sub>, Gross *et al.* (1994) concluem que os efeitos no desenvolvimento de camundongos são mediados por hepatotoxicidade materna. Constataram deficiências nos processos de ossificação, hidrocefalia, fenda palatina, além de dano hepatocelular. Segundo Reddy *et al.* (1996) os efeitos da fumonisina no desenvolvimento de camundongos são mediados por hepatotoxicidade materna. Administrando extrato aquoso de material de cultura de *Fusarium verticillioides* contendo níveis conhecidos de FB<sub>1</sub> induziram lesões hepáticas materna, associadas com ascites e aumento do diâmetro nuclear do hepatócito. Houve aumento no número de abortos e de reabsorção fetal nas doses mais altas. Ocorreram reduções no peso dos filhotes além de malformações fetais.

A toxicidade da fumonisina no desenvolvimento de hamsters foi avaliada por Floss *et al.* (1994) onde se manifestou pelo aumento no número de abortos e reabsorção fetal até mesmo em doses que não induziam à evidências clinicopatológicas de toxicidade materna.

Em ratos e trutas tratados com iniciadores cancerígenos conhecidos e com vários protocolos de iniciação e promoção para câncer, fumonisina B<sub>1</sub> purificada acentuou o

desenvolvimento de câncer no fígado. Em rainbow trout fumonisina FB<sub>1</sub> não foi um carcinogênico completo, mas houve uma íntima correlação entre promoção de hepatocarcinogenicidade causada por aflatoxina, FB<sub>1</sub> e a concentração de esfinganina livre no fígado. Curta administração de altas doses que causavam significativa hepatotoxicidade resultaram no aparecimento de foco positivo para glutathione-S-transferase, nódulos hepatocelulares e outros precursores de desenvolvimento de tumor de fígado (Carlson *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2001).

Como o milho é o componente principal da maioria das rações animais, pesquisas vêm sendo realizadas em espécies economicamente importantes, tanto no que se refere ao emprego de milho naturalmente contaminado como utilizando fumonisina purificada. Entre estes podemos citar alguns estudos em frangos, gado, catfish, cabras, carneiros e coelhos.

Experimentos com aves e frangos demonstram principalmente efeito citotóxico para os macrófagos (Qureshi & Hagler, 1992), além disto, observou-se redução de ganho de peso, mortalidade e lesões em vários órgãos tais como fígado, rim, coração e pulmão (Javed *et al.*, 1993). Os efeitos da FB<sub>1</sub> sobre embriões de galinha desenvolvidos por Zacharias *et al.* (1996) apontam alterações no metabolismo de fosfolipídios além de lesões teciduais que puderam ser observadas à nível de microscopia de luz. Ocorreram hemorragias sob a pele e no fígado dos embriões injetados com FB<sub>1</sub>.

Pesquisas sobre a toxicidade das fumonisinas em peixes são escassas, sendo que alguns estudos foram conduzidos, particularmente nos EUA.

Lumlertdacha *et al.* (1995) observaram lesões no fígado de catfish tratados com ração contendo FB<sub>1</sub> obtida de material de cultura de *F. moniliforme*.

A ocorrência e a severidade das lesões pareciam aumentar com a concentração de FBs na dieta. Fígados de peixes tratados com todas as concentrações de FBs tinham focos de hepatócitos intumescidos, com núcleo localizado centralmente. Nos tratamentos com 80 mg ou mais de FB<sub>1</sub>/kg de dieta ocorreram focos de necrose hepatocelular e retração de hepatócitos. Hepatócitos contendo vacúolos esféricos claros foram observados em todos os peixes tratados com FBs e quando pósfixados com tetróxido de ósmio, os vacúolos foram osmiofílicos, consistentes com lipídios. Infiltrados linfocitários foram freqüentemente encontrados em áreas de hepatócitos degenerados.

Em outro experimento, Li *et al.* (1994) também avaliaram os efeitos da dieta contendo material de cultura de *Fusarium moniliforme* sobre catfish, tratados com ração contendo 0,7; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 240 mg de FB<sub>1</sub>/kg, sob condições laboratoriais, por 12 semanas. Nos tratamentos com ração contendo níveis de FB<sub>1</sub> entre 20 e 40 mg/kg, ocorreu diminuição do crescimento e consumo de ração e os peixes tratados com 40 mg/kg ou mais apresentaram elevação do glicogênio no fígado, aumento da vacuolização em fibras nervosas e invasão linfocítica perivascular, no cérebro.

Goel *et al.* (1994) analisaram esfingolipídios em catfish tratados com material de cultura de *Fusarium moniliforme* e constataram elevação nas taxas de esfinganina e esfingosina nos rins, soro, fígado e músculo de peixes tratados com 10, 20, 40 e 80 mg de FB<sub>1</sub>/kg de dieta.

Avaliando a toxicidade da FB<sub>1</sub> para carpas (*Cyprinus carpio* L.), Pepeljnjak *et al.* (2000) trataram os peixes com ração contendo 0,5 e 5,0 mg de FB<sub>1</sub> durante 42 dias. Verificaram redução no ganho de peso corporal e alterações patológicas foram observadas em órgãos parênquimais com hemorragia geral no fígado, trato intestinal e coração. Alterações histopatológicas nos rins com edema perivascular e capsular, infiltração, degeneração e necrose das células endoteliais glomerulares e ductos epiteliais foram visualizadas. Alterações mais evidentes foram constatadas na região medular dos rins com intensa proliferação celular e apoptose. No fígado foram constatadas degeneração e necrose dos hepatócitos, infiltração, fibrose, degenerações vasculares e edema do ducto biliar. No cérebro observou-se degeneração de células nervosas, proliferação de fibroblastos, infiltração linfocitária e apoptose. Ocorreu diferença significativa nos índices de apoptose dos grupos tratados em relação ao controle e este índice foi significativamente maior no grupo tratado com 5 mg/kg em relação ao grupo tratado com 0,5 mg/kg. Os resultados indicaram que um tratamento a curto prazo com ração contendo FB<sub>1</sub> em concentrações de 0,5 e 5,0 mg/kg não foi letal para as carpas mas produziu efeitos patológicos adversos nos rins, fígado, trato intestinal e cérebro, com significativa redução no crescimento, reforçando o conceito de que a FB<sub>1</sub> induz a degeneração de diferentes órgãos. As infecções dermatológicas oportunistas indicam efeito imunossupressivo da FB<sub>1</sub>.

## 2.8 Fumonisinias e riscos à saúde humana

Não há registros confirmados de intoxicação aguda por fumonisinias em humanos, porém uma associação tem sido estabelecida entre a ocorrência de *Fusarium verticillioides* no milho e a incidência de câncer de esôfago (EC) em várias regiões do mundo. Diferenças geográficas e demográficas, grupos étnicos, suscetibilidade genética, condições culturais, econômicas e nutricionais afetam os índices da doença, porém alguns fatores de risco em comum estão surgindo, tais como utilização do milho como principal item da dieta básica, associados a um baixo status socioeconômico (Bolger *et al.*, 2001).

Várias publicações têm sugerido correlação entre fumonisinias e câncer de esôfago (EC), particularmente na África do Sul e China (Sydenham *et al.*, 1990b, 1991; Rheeder *et al.*, 1992; Chu & Li, 1994; Marasas, 1996), mas estes estudos ainda não apresentam evidências conclusivas. No entanto, considerando que a fisiologia humana é similar a fisiologia de muitos animais (ex.: outros primatas, sistema cardiovascular de suínos), uma associação entre fumonisinias e distúrbios em humanos é possível (FAO, 2001).

A associação entre fumonisinias e outras micotoxinas com fatores de risco para distúrbios em humanos (EC, câncer de fígado, malformações no tubo neural e distúrbios gastrointestinais) são relatadas em várias regiões do mundo tais como, África do Sul/Transkei (Sydenham *et al.*, 1990b; Rheeder *et al.*, 1992), China (Chu & Li, 1994; Yoshizawa *et al.*, 1994; Ueno *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997), Irã (Shephard *et al.*, 2000), Itália/Nordeste (Franceschi *et al.*, 1990; Logrieco *et al.*, 1995), Quênia (Kedera *et al.*, 1999; van der Westhuizen *et al.*, 1999); USA/Carolina do Sul (Sydenham *et al.*, 1991), USA/Texas (Hendricks, 1999) Brasil/Sul (Scaff & Scussel, 1999), Índia/Sul (Prathapkumar *et al.*, 1997). Estes dados apontam a presença de fumonisinias, principalmente em milho, muitas vezes associada a outras micotoxinas, tais como aflatoxinas, zearalenona, desixinivalenol e tricotecenos, além da identificação dos fungos produtores correspondentes, nos alimentos que compõem as dietas básicas. Em muitos casos também são apresentados outros fatores associados tais como deficiências nutricionais de vitaminas (A, E, B<sub>12</sub> e C),

micronutrientes (magnésio, zinco, selênio, folatos), consumo de bebidas alcoólicas e fumo entre outros.

Não há biomarcadores validados para avaliar a exposição humana à FB<sub>1</sub>.

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou as toxinas derivadas de *Fusarium verticillioides* no Grupo 2B, como possível carcinogênico para humanos (IARC, 1993), indicando evidências de carcinogenicidade no que se refere a testes em animais, mas os dados em humanos são insuficientes.

### 2.8.1 Câncer de esôfago

O câncer é um problema de Saúde Pública grave e multifacetado. Necessita para sua compreensão, do envolvimento de várias áreas científicas e também de toda a sociedade. Representa uma ameaça para a humanidade por não dispormos ainda de conhecimentos suficientes sobre mecanismos biológicos íntimos que levam à transformação maligna para fundamentar uma atuação médica de eficácia máxima (CEPON, 1999).

O câncer constitui-se na segunda causa de morte por doença no Brasil com um perfil de morbimortalidade bastante heterogêneo em um país com dimensões continentais evidenciando aspectos epidemiológicos distintos de uma região para outra relacionados a fatores geográficos, genéticos ou à hábitos sociais e culturais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta que, se medidas de prevenção e de controle não forem tomadas, a incidência aumentará em 100% nos próximos 20 anos. Apesar do diferente comportamento do câncer como causa de morte nas diferentes macro-regiões do Brasil, sua proporcionalidade aumenta à medida que se desloca para o sul: 7,83 % (região norte), 9,89 % (região centro-oeste), 11,93 % (região sudeste) e 15,19 % (região sul). A estimativa de casos novos e de óbitos por câncer no Brasil ainda encontra-se em fase de evolução metodológica e suas bases de cálculo subestimam a realidade, pois entre os óbitos por causas mal definidas não se pode dimensionar o sub-registro de câncer (CEPON, 1999).

Calcula-se que 70 % de todos os cânceres são devidos a fatores ambientais,

especialmente pela prática de hábitos nocivos, decorrentes do estilo de vida atual e costumes dietéticos inadequados. É neste contexto, que os estudos considerando a ação de micotoxinas e câncer tem se desenvolvido, como no caso de aflatoxinas e carcinoma hepatocelular (Wild, 1995; McGlynn *et al.*, 1995; Haas e Scussel, 1999, 2000). Portanto, a modificação destes hábitos e fatores, associado a melhoria na qualidade de vida, poderá contribuir para diminuir a mortalidade pela doença, demonstrando que a prevenção é absolutamente necessária.

Tabela 7 Estimativas de números de casos novos de câncer por região, para o ano 2003

Localização Primária	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
Pele não Melanoma	980	6.100	8.220	54.215	12.640
Mama Feminina	510	5.270	2.260	28.350	5.220
Traquéia, Brônquio e Pulmão	700	2.010	1.425	12.310	5.640
Estômago	790	2.170	1.570	12.640	3.470
Próstata	410	4.270	2.660	22.920	4.980
Colo do Útero	890	3.570	2.000	7.690	2.330
Cólon e Reto	265	1.450	1.270	14.270	2.820
<b>Esôfago</b>	135	650	500	<b>5.300</b>	<b>2.310</b>
Leucemias	320	970	480	4.500	1.110
Cavidade Oral	325	1.230	370	7.080	1.630
Pele Melanoma	70	200	200	2.940	960
Outras Localizações	3.555	14.950	5.730	95.765	12.625
<b>TOTAL</b>	<b>8.950</b>	<b>42.840</b>	<b>26.685</b>	<b>267.980</b>	<b>55.735</b>

Tabela 8 Estimativas de números de óbitos por câncer, por região, para o ano 2003

Localização Primária	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
Pele não Melanoma	55	170	55	410	185
Mama Feminina	205	1.280	450	5.570	1.830
Traquéia, Brônquio e Pulmão	565	1.840	910	8.450	4.465
Estômago	575	1.540	590	6.130	2.310
Próstata	260	1.480	510	4.370	1.610
Colo do Útero	320	880	320	1.730	860
Cólon e Reto	180	710	380	4.900	1.800
<b>Esôfago</b>	105	590	260	<b>2.980</b>	<b>1.660</b>
Leucemias	235	850	290	2.320	910
Cavidade Oral	115	430	160	1.870	670
Pele Melanoma	20	120	55	600	330
Outras Localizações	1.745	8.670	3.155	29.660	11.265
<b>TOTAL</b>	<b>4.380</b>	<b>18.560</b>	<b>7.135</b>	<b>68.990</b>	<b>27.895</b>

Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003>

#### 2.8.1.1 Incidência e fatores relacionados

O câncer de esôfago (EC) é o 9º mais comum câncer no mundo, com cerca de 391.000 casos diagnosticados a cada ano, sendo que 80% ocorrem nos países em desenvolvimento e devido a suas características, sugere um papel predominante de fatores ambientais externos. Correspondem a 1 % dos tumores malignos, 11.000 novos casos ao ano, nos EUA. Os homens apresentam uma incidência 5 vezes maior que as mulheres, sendo fumo, álcool e refluxo gastroesofágico os principais fatores de risco para este tipo de câncer, além do uso de chimarrão, no sul do Brasil (CEPON, 1999).

Dados sobre a distribuição mundial do EC são pobres, mas verifica-se taxas muito elevadas em homens negros da África do Sul e América do Norte, taxas altas ou médias em algumas áreas do Caribe e Índia, taxas muito altas na China e em algumas populações chinesas migrantes. Altas taxas também tem sido observadas, particularmente entre homens, no Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Brasil (Munoz *et al*, 1996).

A variabilidade geográfica no risco é muito grande, maior que para qualquer outro tipo de câncer. As áreas de maior risco no mundo são a Ásia, estendendo-se desde o Norte do Irã, repúblicas da Ásia Central até a China, com taxas de incidência maiores que 200 por 100.000 habitantes. Altas taxas de incidência também são verificadas em regiões da África (Uganda, Zimbábwe, Natal e Transkei), América do Sul (região sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e região norte da Argentina) e certas partes Europa (França e Suíça) (Parkin *et al.*, 2001). Estudos têm apontado a importância etiológica do fumo e álcool, principalmente em combinação pois seus efeitos são multiplicativos. Dietas pobres, consumo de vegetais em conserva, que podem estar relacionados a presença de micotoxinas ou nitrosaminas, em algumas regiões da China também têm sido apontados como fatores de risco (Cheng *et al.*, 1996; IARC, 1993). O consumo de bebidas e alimentos em temperaturas muito altas, "escaldante", vem sendo estudado no Norte da China (Hu *et al.*, 1994). A ingestão de bebidas "hot spirits", particularmente em Calavados têm sido apontado como fator de risco elevado no nordeste da França (Launoy *et al.*, 1998). Craddock (1992) já sugeria o papel das fumonisinas e contaminantes na África, particularmente no que se refere ao consumo de bebidas alcoólicas de produção doméstica, baseado principalmente na contaminação de alimentos em áreas de alta incidência de EC. As observações com respeito a dietas têm focado atenção sobre o possível papel de deficiência de micronutrientes específicos. Fica evidente a associação com déficits em certas vitaminas tais como A, C, Beta-caroteno e riboflavina e de minerais.

Neste contexto o câncer de esôfago, neoplasia bem conhecida por sua marcada variação com relação a região geográfica, grupo étnico e sexo, apresenta-se como 4ª causa de morte por câncer em homens no Brasil sendo a maior incidência no sul do país com uma taxa bruta de 16,72 (por 100.000 homens) (INCA-MS, 1999). Segundo dados do Registro Hospitalar de Câncer (RHC-1999) do Paraná, a incidência de EC na região sul do país é de 44 casos por 100.000 habitantes, por ano.

#### 2.8.1.2 Câncer de esôfago e fumonisinas



Victora *et al.* (1987) estudando a alta incidência de câncer de esôfago na América do Sul, incluindo a região sul do Brasil, Uruguai e parte da Argentina desenvolveram um estudo de casos obtidos de hospitais do Rio Grande do Sul. O estudo mostrou-se falho para evidenciar a relação entre o EC e consumo de bebida quente (erva-mate), mas revelou que álcool, fumo (tabaco) e residir em área rural seriam os principais fatores de risco destas populações. Outro estudo, desenvolvido por Dietz *et al.* (1998) também avaliando fatores de risco relacionados à EC no Rio grande do Sul constatou que fumo, álcool, "mate" e a atividade profissional de agricultores, além de fatores genéticos, como "pai com câncer", foram significativamente mais freqüentes nos casos de EC. Tendo-se em vista os dados na literatura, já citados anteriormente, referentes a EC e fumonisinas, na África do Sul, China, Itália e EUA, desenvolvemos um estudos baseado em RHC do Serviço de Radioterapia do Hospital de Caridade, em Florianópolis, para avaliar se esta micotoxina pode estar contribuindo como um dos fatores no desenvolvimento e ocorrência de EC em nossa Região (Scaff & Scussel, 1999; 2000). Em Santa Catarina temos verificado incidência relativamente mais elevada de EC nas regiões oeste e sul do estado, com predomínio de casos em agricultores, onde o cultivo e consumo de milho na dieta básica são bastante significativos. Sabe-se que a colonização predominante nestas áreas é de descendentes de italianos, consumidores rotineiros de fubá, farinha de milho, pão e bolo de milho, "pamonha" entre outros, preparados normalmente à partir de milho de cultivo doméstico. Como não há monitoramento contínuo dos níveis de contaminação por fumonisinas em milho no nosso país e os dados publicados apontam muitas vezes níveis de contaminação bastante significativos este poderia ser um dos fatores relacionados ao desenvolvimento de EC nestas regiões.

Tabela 9 Número de casos novos estimados (NC) e taxa bruta (CR) da incidência de câncer de esôfago para homens e mulheres, por 100.000 habitantes – Brasil, 1997 – 1999

1999		1998		1997	
Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres

	1999				1998				1997			
	NC	CR <sup>a</sup>	NC	CR <sup>b</sup>	NC	CR <sup>a</sup>	NC	CR <sup>b</sup>	NC	CR <sup>a</sup>	NC	CR <sup>b</sup>
Brasil	5,300	6.75	1,700	2.14	5,370	7.4	1,770	2.4	5,080	7.01	1,470	1.98
Norte	200	3.24	50	0.75	175	3.4	40	0.8	210	4.03	50	0.94
Nordeste	1,200	5.27	400	1.49	1,180	5.7	480	2.2	1,170	6.88	490	2.75
Cento Oeste	250	5.31	100	2.10	270	5.7	80	1.7	270	5.64	70	1.47
Sudeste	1,700	5.08	350	0.97	1,720	5.6	340	1.1	1,630	5.29	250	0.79
Sul	1,950	16.75	800	6.76	2,020	18.4	835	7.5	1,810	16.45	620	5.52

<sup>a</sup> por 100.000 homens

<sup>b</sup> por 100.000 mulheres

Brasil - INCA ,1997, 1998, 1999.

## 2.8 Referência bibliográfica

ABADO-BECOGNEE, K., MOBIO, T.A., ENNAMANY, R., FLEURAT-LESSARD, F., SHIER, W.T., BADRIA, F., CREPPY, E.E. Citotoxicity of fumonisin B<sub>1</sub>: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA syntheses. **Archives Toxicology**, v. 72, p. 233 -236, 1998.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3877–3882, 2002.

ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v. 13, p. 173-183, 2002.

AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, e B<sub>3</sub> in Corn – Liquid Chromatographic Method, AOAC Official Method 995.15 **Natural Toxins**, v.2, p. 49-51, 1998.

ASEVEDO, I. G. **Estudo da microbióta fúngica e influência da temperatura e umidade na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* Link, 1809 em**

**amostras de milho provenientes de silos.** São Paulo, **Dissertação** (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1988.

BARROS, C.S.L.; BARROS, S.S.; SANTOS, M.N.; SOUZA, M.A. Leucoencefalomalácia em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, n.3, p. 101-107, 1984.

BEIER, R.C.; ELISSALDE, M. H.; STANKER, L.H. Calculated three dimensional structures of the fumonisin B<sub>1</sub>-B<sub>4</sub> mycotoxins. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 479-487, 1995.

BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society**, Chemical Communications, Cambridge, UK, s.v.. n.11, p. 743-745, June, 1988.

BOLGER, M.; COKER, R. D.; DINOVI, M.; GAYLOR, D.; GELDEBLOM, W.; OLSEN, M.; PASTER, N.; RILEY, R.T.; SHEPHARD, G.; SPIJERS, G. J. A. Fumonisins. Safety evaluation of certain mycotoxin in food. International Programme on Chemical Safety World Health Organization. Geneva. FAO FOOD and Nutrition Paper 74, **WHO – Food Additives Series**. v. 47, p. 103-279, 2001

BONDY, G.S; BAKER,M.G.; MUELLER, R.W.; FERNIE, S. M; MILER, J.D.; ARMSTRONG,C.L; HIERLIHY, S.L.; ROWSELL, P.; SUZUKI, C.A. Fumonisin B<sub>1</sub> toxicity in male Sprague-Dawley rats. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, p. 251 – 264, 1996.

BONDY, G.S; SUZUKI, C.A; FERNIE, S. M; ARMSTRONG,C.L; HIERLIHY S.L; SAVARD, M.E; BAKER,M.G. Toxicity of fumonisina B<sub>1</sub> to B6C3F<sub>1</sub> mice: A 14-day gavage study. **Food Chemistry Toxicology**, v. 35, p. 981 – 989, 1997.

BONDY, G.S; SUZUKI, C.A; MUELLER, R.W; FERNIE, S. M; ARMSTRONG,C.L; HIERLIHY S.L; SAVARD, M.E; BAKER,M.G. Gavage Administration of the Fungal Toxin Fumonisin B<sub>1</sub> to Female Sprague-Dawley rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.53, p.135-151, 1998.

BRITO, L.A.B.; NOGUEIRA, R.H.G.; PEREIRA, J.J.; CHQUILOFF, M.A.G., Leucoencefalomalácia em eqüino associada a ingestão de milho mofado. **Arquivos da Escola Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v.34, p.49-53, 1982.

CAMARGOS, S.M.; SOARES, L.M.V.; SAWAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 226-229, 2000.

CANELA, R.; PUJOL, R.; SALA, N.; SANCHIS, V. Fate of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in steeped corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 511 – 517, 1996.

CARLSON, D.B.; WILLIAMS, D.E.; SPITSBERGEN, J.M.; ROSS, P.F.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I.; RILEY, R.T. Fumonisin B<sub>1</sub> promotes aflatoxina B<sub>1</sub> and N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine initiated liver tumors in rainbow trout. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 172, p. 29 – 36, 2001.

CASTELO, M.M.; SUMNER, S.S.; BULLERMAN, L.B. Stability of fumonisin in thermally processed corn products. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1030 – 1033, 1998.

CAWOOD, M.E.; GELDERBLUM, W.C.A.; VLEGGAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v.39, n.11, p. 1958-1962, Nov., 1991.

CEPON- CENTRO DE PESQUISAS ONCOLÓGICAS DE SANTA CATARINA. **Registro Hospitalar de Câncer – RHC/ 1997**. 1999.

CHENG, K.K., DUFFY, S.W., DAY, N.E., LAM, T.H. Oesophageal cancer in never smokers and never drinkers. **International Journal of Cancer**, v. 16, p. 820 – 822, 1996.

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

CORRÊA, B.; POZZI, C.R.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N.O. Postharvest and stored corn in Brazil. Mycoflora, interation abiotic factors, and mycotoxins occurrence. VIII INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 1992, Mexico City, Mexico, **Livro de resumos...** p. 123, 1992.

CHU, F.S. & LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and mycotoxins in moldy corn collected from the peoples Republic of China. **Applied and Environmental Microbiology** (Washington, DC, USA) v. 60, n.3, p. 847-852, 1994.

CRADDOCK, V.M. Aetiology of oesophageal cancer: some operative factors. **European Journal Cancer Prevection**, v. 1, p. 89 – 103, 1992.

DELONGCHAMP, R.R. & YOUNG, J.F. Tissue sphinganine as a biomarker of fumonisin-induced apoptosis. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, p. 255 – 261, 2001.

DIETZ, J; PARDO, S.H; FURTADO, C.D; HARZHEIM, E; FURTADO, A.D. Risk factors related to esophageal cancer in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Associação Medica Brasileira**, v. 44 (4), p. 269-272, 1998.

DOKO, M.B.; VISCONTI, A. Fumonisin contamination of maize and maize-based foods in Italy. In: **Occurrence and Significance of Mycotoxins**; Scudamore, K.A. Ed.; Central Sci. Lab.: Slough, UK, 1993; pp. 49-55.

DOKO, M.B.; VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, p. 433-439, 1994.

DRAGAN, Y.P., BIDLACK, W.R., COHEN, S.M., GOLDSWORTHY, T.L., HARD, G.C., HOWARD, P.C., RILEY, R.T., VOSS, K.A. Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity and risk assessment: fumonisin B<sub>1</sub> as an example. **Toxicological Sciences**, v. 61, p. 6 – 17, 2001.

ENONGENE, E.N., SHARMA, R.P., VOSS, K. A., RILEY, R. T. Subcutaneous fumonisin administration disrupts sphingolipid metabolism in mouse digestive epithelia, liver and kidney. **Food and Chemistry toxicology**, v. 38, p. 793 – 799, 2000.

FLOSS, J.L; CASTEEL, S.W; JOHNSON, G.C; ROTTINGHAUS, G.E; KRAUSE, G.F. Developmental toxicity of fumonisin in Syrian Hamsters. **Mycopathologia**. v. 128, p. 33-38, 1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Worldwide regulation for mycotoxins 1995 – a compendium, **FAO Food and Nutrition Paper**, 64. FAO, Rome.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Center for Food Safety and Applied Nutrition, Center for Veterinary Medicine. November 9, 2001. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumonbg3.html>

FRANCHESCHI, S., BIDOLI, E., BARÓN, A.E., LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancer of the oral cavity, pharynx and esophagus in northeastern Italy. **Journal. Nat. Cancer Institute**, v. 82, p. 1407-1411, 1990.

GELDERBLUM, W.C.A., JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisins – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1806-1811, 1988.

GELDERBLUM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B<sub>1</sub> in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1247-1251, 1991.

GELDERBLUM, W.C.A.; SEMPLE, E.; MARASAS, W.F.O.; FARBER, E. The cancer initiating potential of fumonisina mycotoxins. **Carcinogenesis**, v. 13, p. 433 – 437, 1992.

GELDERBLOM, W.C.A., CAWOOD, M.E., SNYMAN, S.D., MARASAS, W.F.O. Fumonisin B<sub>1</sub> dosimetry in relation to cancer initiation in rat liver. **Carcinogenesis**, v.15, p. 209 – 214 , 1994.

GELDERBLOM, W.C.A., SNYMAN, S.D., ABEL, S., LEBEPE\_MAZUR, S., SMUTS, C.M., van der WESTHUIZEN, MARASAS, W.F.O., VICTOR, T.C., KNASMÜLLER, S., HUBER, W. Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats: A review regarding mechanistic implications for establishing risk in humans. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, p. 279 – 296, 1996a.

GELDERBLOM, W.C.A., SMUTS, C.M., ABEL, S., SNYMAN, S.D., CAWOOD, M.E., VAN DER WESTHUIZEN, L., SWANEVELDER, S. Effect of fumonisin B<sub>1</sub> on Protein and Lipid Synthesis in Primary Rat Hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 361-369, 1996b.

GELDERBLOM, W. C.A.; ABEL, S.; SMUTS, C.M; MARNEWICK, J; MARASAS, W. F.O; LEMMER, E. R; RAMLJAK, D. Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, 2, p. 291 – 300, 2001.

GOEL, S., LENS, S.D., LUMLERTDACHA, S.; LOVELL, R.T.; SHELBY, R.A.; LI, M., RILEY, R.T., KEMPPAINEN, B.W. Sphingolipid levels in catfish consuming *Fusarium moniliforme* corn culture material containing fumonisins. **Aquatic Toxicology**, v. 30, p. 285 – 294, 1994.

GROSS, S.M; REDDY, R.V; ROTTINGHAUS, G.E; JOHNSON G; REDDY, C.S. Developmental effects of fumonisin B<sub>1</sub>-containing *Fusarium moniliforme* culture extracts in CD1 mice. **Mycopathologia**. v. 128:2, p. 111-118. 1994.

GÜNTHER, T.M.F. & SCUSSEL, V.M. **Incidência de fumonisinas em milho (*Zea mays* L.) cultivado em Santa Catarina e efeito de processamento na sua degradação**. Florianópolis, 2003. **Dissertação** (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, Ciência dos Alimentos. Florianópolis. 2003.

HARD, G.C., HOWARD, P.C., KOVATCH, R.M., BUCCI, T.J. Rat kidney pathology induced by chronic exposure to fumonisin B<sub>1</sub> includes rare variants of renal tubule tumor. **Toxicological Pathologists**, v. 29, p. 379 – 386, 2001.

HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M.; GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, J.R. Jr. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub> , a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 2, p. 217-221, 1990.

HAAS, P.; SCUSSEL, V.M. Hepatocellular carcinoma and hepatic disease in adult patients from Santa Catarina State, Brazil. **Mycotoxin Contamination: Health Risk**

**and Prevention Project**, Mycotoxins Supplement'99, Chiba, Japan, p. 231-235, 1999.

HAAS, P.; SCUSSEL, V.M. Hepatocellular carcinoma and hepatic disease associated to consumption of food contaminated by AFB<sub>1</sub>, in Santa Catarina State. In: **X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, Guarujá, São Paulo, Brasil. **Anais...**p. 86, 2000.

HASCHEK, W.M.; MOTELIN, G.; NESS, D.K.; HARLIN, K.S.; HALL, W.F.; VESONDER, R.F.; PETERSON, R.E.; BEASLEY, V.R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. **Mycopathologia**. v.117, 1/2, p. 83-96, 1992.

HENDRICKS, K. Fumonisin and neural tube defects in south Texas. **Epidemiology**, v. 10, p. 198 – 200, 1999.

HENNIGEN, M.R. **Fumonisin em produtos e em variedades de milho argentinos**. Campinas, 1998. **Tese** (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas. 1998.

HERMANN, G., COSTA, L.L.F., SCUSSEL, V.M. Evaluation of fumonisin contamination in grains of corn (*Zea mays* L.) produced at the western region of Santa Catarina. In: **X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, 2000, Guarujá, São Paulo, Brasil. **Anais**, pp.147.

HIROOKA, E.Y.; VIOTTI, N.M.A.; MAROCHI, M.A.; ISHII, K.; UENO, Y. Leucoencefalomalácia em Equinos do Norte do Paraná. **Revista Microbiológica**, São Paulo, v.21(3): p. 223-227, 1990.

HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. The Natural Occurrence of Fumonisin in Brazilian Corn Kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 2, p. 173-183, 1996.

HOWARD, P.C.; EPPLEY, R.M.; STACK, M.E.; WARBRITTON, A.; VOSS, K.A.; LORENTZEN, R. J.; KOVACK, R.; BUCCI, T.J. Carcinogenicity of fumonisin B<sub>1</sub> in a two-year bioassay with Fischer 344 Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice. **Mycotoxin Contamination: Health Risk and Prevention Project Mycotoxins Supplement/1999**, p.45-54, 1999.

HOWARD, P.C., EPPLEY, R. M., STACK, M. E., WARBRITTON, A., VOSS, K. A., LORENTZEN, R. J., KOVACH, R. M., BUCCI, T. J. Fumonisin B<sub>1</sub> carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F<sub>1</sub> mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, 2, p. 277-282, 2001.

HUMPHREYS, S.H., CARRINGTON, C., BOLGER, P.M. Fumonisin risk scenarios. **Toxicologist**, v. 36, p. 170, 1997.

HU, J., NYREN, O., WOLK, A. Risk factors for oesophageal cancer in Northeast China. **International Journal of Cancer**, v. 57, p. 38 – 46, 1994.

IARC - MONOGRAPHS ON THE EVALUTION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. UK.1993, v. 56, p. 445-466.

ICEPA – Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. Milho. In: **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2001-2002**, Secretaria de Desenvolvimento Rural da Agricultura, Instituto CEPA, Florianópolis, 2002. 204p.

INCA-Ministério da Saúde - Coordenação de Programas de Controle de Câncer - Pro-Onco. "**O problema do câncer no Brasil**". 4 ed. Rio de Janeiro, 1997.

INCA - Ministério da Saúde -Instituto Nacional de Câncer- Coordenação de Programa de Controle de Câncer - Pro-Onco. **Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil**. 1998. 18 p.il.

INCA - Ministério da Saúde. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil** 1999. Rio de Janeiro, 1999.

JAVED, T.; BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L.; KUTZMAN, M.A.D.; COTE, L.M.; BUCK, W. B. Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture materials or with purified fumonisin B<sub>1</sub> and moniliformin. **Mycopathologia**. v. 123, p. 171-184, 1993.

KEDERA, C.J., PLATTNER, R.D., DESJARDINS, A.E. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B<sub>1</sub> in maize in western Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 41 – 44, 1999.

KELLERMAN, T.S.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; GELDERBLOM, W.C.A.; CAWOOD, M.E.; COETZER, J.A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B<sub>1</sub>. **Onderstepoort Journal Veterinary Res**. v.57, p. 269-275, 1990.

KORKOTIAN, E., SCHWARTZ, A., PELLER, D., SCHWARZMANN, G., SEGAL, M., FULERMAN, A.H. Elevation of intercellular glucosylceramide levels results in a increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. **Journal Biological Chemistry**, v. 274, p. 21673 – 21678, 1999.

KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M., McEWEN, N.P., LOMBAERT, G.A., Ng, W. Approaches to the risk assessment of fumonisins in corn-based foods in Canada. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, p. 369 – 393, 1996.

LAUNOY, G., MILAN, C., DAY, N.E. Diet and squamous-cell cancer of the oesophagus: a French multicentre case-control study. **International Journal of Cancer**, v. 30, p. 7 – 12, 1998.



LAURENT, D.; PELLEGRIN, F.; KOHLER, F.; COSTA, R.; THEVENON, J.; LAMBERT, C.; HUERRE, M. La fumonisine B<sub>1</sub> dans la pathogenie de la leucoencephalomalacie equine. **Microbiology Alimentary Nutrition**, v. 7, p. 285-291, 1989.

LEVIN, S., BUCCI, T.J., COHEN, S.M., FIX, A.S., HARDISTRY, J.F., LeGRAND, E.K., MARONPOT, R.R., TRUMP, B.F. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc committee of the Society of Toxicological Pathologists. **Toxicological Pathologists**, v. 27, p. 484 – 490, 1999.

LI, M.H.; RAVERTY, S. A.; ROBINSON, E.H. Effects of dietary mycotoxins produced by the mold *Fusarium moniliforme* on channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 25, n. 4, p. 512 – 516, 1994.

LOGRIECO, A., MORETTI, A., RITIENI, A., BOTTALICO, A., CORDA, P. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxin in Italy. **Plants Disease**, v. 79, p. 727 – 731, 1995.

LUMLERTDACHA, S.; LOVELL, R.T.; SHELBY, R.A.; LENZ, S.D.; KEMPPAINEN, B.W. Growth, hematology and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture**, v. 130, p. 201 – 218, 1995.

MACHINSKI, M. JR.; SOARES, L.M.V. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, 10, p. 875-879, 2000.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; ALMEIDA, C.A.A.; DILKIN, P. Fumonisin B levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Aquiver Institute of Biology**, v. 68, 1, p. 41-45, 2001.

MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; PIENAAR, J.G.; NAUDE, T.W. Leukoencephalomalacia: a mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 43, n. 3, p. 113-122, 1976.

MARASAS, W.F.O. Fumonisin: history, worldwide occurrence and impact. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, p. 1-17, 1996.

MARASAS, W.F.O. Risk assessment of fumonisins produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **Cereal Research Commun.**, v. 25, p. 399-406, 1997.

MARASAS, W.F.O., MILLER, J.D., RILEY, R.T., VISCONTI, A. **Environmental health criteria for fumonisin B<sub>1</sub>**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data – World Health Organization, 2000, 150p.

MARTINS, V.M.V.; MARTINS, E.; NEVES, D.S.; RIET-CORREA, F.; MEIRELES, M.C.A. Leucoencefalomalácia em equinos, no Estado de Santa Catarina. In: **Ciclo de**

**atualização em Medicina Veterinária (CAMEV)**, Lages – Santa Catarina, 1988. Resumos... p. 237, 1988.

MCGLYNN, K.A.; ROSVOLD, E.A.; LUSTBADER, E.D.; HU, Y.; CLAPPER, M.L.; ZHOU, T.; WILD, C.P.; XIA, X.L.; BAFFOE, B.A.; OFORI, A. D. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub>. **Proc. Natural Academic Sciences**, USA, v. 92, n. 6, p. 2384-2387, 1995.

MEIRELES, M.C.A.; CORRÊA, B.; FISCHMAN, O.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N.O.; POZZI, C.R. Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. **Mycopathologia**, v.127, p. 183-188, 1994.

MERRILL, A.H. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. **Journal Bioenergetic and biomembrane**, 23, p. 83 – 104, 1991.

MERRILL, A.H. Jr; WANG, E; VALES, T.R; SMITH, E.R; SCHROEDER, J.J; MENALDINO, D.S; ALEXANDER, C; CRANE, H.M; XIA, J. LIOTTA, D.C; MEREDITH, F.I; RILEY, R.T. Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, p. 297-306, 1996.

MERRILL, A. H. JR.; SULLARDS, M. C; WANG, E; VOSS, K. A; RILEY, R. T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environmental Health Perspectives**, v.109, 2, p. 283 – 289, 2001.

MOBIO, T.A., BAUDRIMONT, I., SANNI, A., SHIER, T.W., SABOURNEAU, D., DANO, S.D., UENO, Y., STEYN, P.S., CREPPY, E.E. Prevention of vitamin E of DNA fragmentation and apoptosis induced by fumonisin B<sub>1</sub> in C6 glioma cells. **Archives Toxicology**, v. 74, p. 112-119, 2000.

MOTELIN, G.K.; HASCHEK, W.M.; NESS, D.K.; HALL, W.F.; HARLIN, K.S.; SCHAEFFER, D.J.; BEASLEY, V.R. Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. **Mycopathologia**, v.126, p.27-40, 1994.

MUÑOZ, N.; DAY, N. E. - Esophageal cancer in: **Cancer epidemiology and prevention**. Second Edition - Oxford University Press. Edited by David Schottenfeld and Joseph F. Fraumeni, Jr. 1996. p. 681-701.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; HOPMANS, E. C.; HAUCK, C.C.; LU, Z.; BUSEMAN, G.; MUNKVOLD, G. Effect of processing on fumonisin content of corn. In: Jackson, L. S.; Devries, J.W.; Bullerman, L.B. eds. **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996, p. 323 – 334.

MUSSER, S.M. & PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1169 – 1173, 1997.

NORRED, W.P; VOSS, K.A. Toxicity and Role of Fumonisin in Animal Diseases and Human Esophageal Cancer. **Journal of Food Protection**. v. 57, n. 6, p. 522-527, 1994.

NORRED, W.P; VOSS, K.A; RILEY, R.T; PLATTNER, R.D. Fumonisin toxicity and metabolism studies at the USDA. Fumonisin toxicity and metabolism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.392, p. 225-236, 1996.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, T., HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of State of Paraná, Brazil, **Mycopathologia**, v. 1, p. 1-10, 2000.

ONO, E.Y.S.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; KAWAMURA, O.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, 8, p. 719-729, 2001.

ONO, E.Y.S.; SASAKI, E.Y.; HASHIMOTO, E.H.; HARA, L.N.; CORRÊA, B.; ITANO, E.N.; SUGIURA, T.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Post-harvest storage of corn: effects of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, 11, p. 1081-1090, 2002.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POSSI, C.R.; SCHAMMASS, A.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, p. 75-87, 2000.

OSWEILER, G.D.; ROSS, P.F.; WILSON, T.M.; NELSON, P.E.; WITTE, S.T.; CARSON, T. L.; RICE, L.G.; NELSON, H.A. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 4, p. 53-59, 1992.

PARKIN, D.M., BRAY, F.I., DEVESA, S.S. cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 4 – 66, 2001.

PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.; GLEADLE, A. E. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n.2, p. 187-191, 1997.

PEPELJNJAK, S., PETRINEC, Z., DRCA, S., SEGVIC, M., FERENCIC, Z., JURISIC, B. Evaluation of fumonisin B<sub>1</sub> toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.). In: **X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, 2000, p. 70.

PINELLI, E.; POUX, N.; GARREN, L.; PIPY, B.; CASTEGNARO, M.; MILLER, D.J.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B<sub>1</sub> stimulates cPLA<sub>2</sub> phosphorylation, the arachidonic acid cascade and cAMP production. **Carcinogenesis**, v. 20, 9, p. 1683-1688, 1999.

PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; VOSS, K.A.; PETERSON, R.; SHACKELFORD, D.D.; WEISLEDER, D. A method of detection of fumonisin in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. **Mycologia**, Bronx, USA, v.82, n.2, p.698-702, 1990.

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

PUJOL, R.; TORRES, M.; SANCHIS, V.; CANELA, R. Fate of fumonisin B<sub>1</sub> in corn kernel steeping water containing SO<sub>2</sub>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 276 – 278, 1999.

QUI, M.; LIU, X.; WANG, Y. Determination of sphinganine, sphingosine and Sa/So ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B<sub>1</sub>. **Food Additives and Contaminants**, 18, 263 – 269, 2001.

QURESHI, M.A.; HAGLER, W.M.Jr. Effect of fumonisin B<sub>1</sub> exposure on chicken macrophage functions *in vitro*. **Poultry Science**, v.71, n.1, p. 104-112, 1992.

REDDY, R.V.; JOHNSON, G.; ROTTINGHAUS, G.E.; CASTEEL, S.W.; REDDY, C.S. Developmental effects of fumonisin B<sub>1</sub> in mice. **Mycopathologia**, v. 134:3, p. 161-166. 1996.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; Van SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkey. **Phytopathology**, v. 82, p. 353-357, 1992.

RIET-CORREA, F.; MEIRELLES, M.A.; SOARES, J. M.; MACHADO, J.J.; ZAMBRANO, A.F. Leucoencefalomalácia em equinos associada à ingestão de milho mofado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 27-30, 1982.

RILEY, R.T.; AN, N.H.; SHOWKER, J.L.; YOO, H.S.; NORRED, W.P.; CHAMBERLAIN, W.J.; WANG, E.; MERRIL, A.H.; MOTELIN, G.; BEASLEY, V.R.; HASCHEK, W. M. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: Na early biomarker of exposure to fumonisin containing feeds in pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.118, p. 105-112, 1993.

RILEY, R. T.; HINTON, D.M.; CHAMBERLAIN, W.J.; BACON, C.W.; WANG, E; MERRILL, A. H. JR.; VOSS, K. A. Dietary fumonisin B<sub>1</sub> induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. **Journal of Nutrition**, v.124, p. 594 – 603, 1994.

RILEY, R.T.; ENONGENE, E.; VOSS, K. A.; NORRED, W. P.; MEREDITH, F. I.; SHARMA, R. P.; SPITSBERGEN, J.; WILLIAMS, D. E.; CARLSON, D. B.; MERRILL, A. H. JR. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis **Environmental Health Perspectives**, v. 109, 2, p. 301 – 308, 2001.

ROSS, P.F.; RICE, L.G.; REAGOR, J.C.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M.; NELSON, H.A.; OWENS, D.L.; PLATTNER, R.D.; HARLIN, K.A.; RICHARD, J.L.; COLVIN, B.M.; BANTON, M.I. Fumonisin B<sub>1</sub> concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 3, p. 238-241, 1991a.

ROSS, P.F.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M.; OWENS, D.L.; NELSON, H.A.; RICHARD, J.L. Concentrations of fumonisin B<sub>1</sub> in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, v. 114, p. 129-135, 1991b.

ROSS, P.F.; RICE, L.G.; OSWEILER, G.D.; NELSON, H.A.; RICHARD, J.L.; WILSON, T.M. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin – contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, v. 117, n.1/2, p. 109-114, 1992.

SALDIVAR, S. O.S. & ROONEY, L.W. Quality protein maize processing and perspectives for industrial utilization. In: **Quality Protein Maize, Proceedings of the International Symposium on quality Protein Maize**, Embrapa/CNPMS, Sete Lagoas, MG, Brazil, Dec., 1994.

SCAFF, R.M.C.; SCUSSEL, V.M. Esophageal cancer in the Southern region of Brazil – Cases from Santa Catarina State. **Mycotoxin Contamination: Health Risk and Prevention Project**. p. 226-230, 1999.

SCAFF, R.M.C.; SCUSSEL, V.M. Esophageal cancer and its relationship to diet and cultural habits. In: **X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, Guarujá, São Paulo, Brasil. **Anais**...p. 86, 2000.

SCOTT, P.M. Effect of food processing on mycotoxins. **Journal Food Protection**, v. 47, p. 489 – 499, 1984.

SCOTT, P.M. Fumonisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 257-270, 1993.

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

SHEPHARD, G.S. Chromatographic determination of fumonisins mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 31 – 39, 1998.

SHEPHARD, G.S; SYDENHAM, E. W; THIEL, P. G; GELDERBLOM, W. C.A.. Quantitative Determination of Fumonisin B<sub>1</sub> and B by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, 10, p. 2077 - 2087, 1990.

SHEPHARD, G.S; THIEL, P.G; STOCKENSTROM, S; SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal AOAC International**, v.79:3, p.671-687. 1996a.

SHEPHARD, G.S; VAN DER WESTHUIZEN, L.; THIEL, P. G; GELDERBLOM, W. C.A.; MARASAS, W.F.O.; VAN SCHALKWYK, D.J. Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. **Toxicology**, v.34, p. 527 - 534, 1996b.

SHEPHARD, G.S.; SNIJMAN, P.W. Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B<sub>2</sub> in a non-human primate. **Food and Chemistry toxicology**, v. 37, p. 111 – 116, 1999.

SHEPHARD, G.S., MARASAS, W.F.O., LEGOTT, N.L., YASDANPANAH, H., SAFAVI, N. Natural occurrence of fumonisins in corn in Iran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1860 – 1864, 2000.

SHETTY, P. H. & BHAT, R.V. Physical method for segregation of fumonisin-contaminated maize. **Food Chemistry**, v. 66, p. 371 – 374, 1999.

SILVA, V. L. S. Processamento Industrial do Milho, 2001. <http://produto2.pep.ufrj.br/abepro/enegep96/2/A2009.htm>. Acessado em julho/2003.

SYDENHAM, E.W; GELDERBLOM, W. C. A; THIEL, P.G; MARASAS, W.F.O. Evidence for the Natural Occurrence of Fumonisin B<sub>1</sub>, a Mycotoxin Produced by *Fusarium moniliforme*, in Corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA v.38, p.285-290, 1990a.

SYDENHAM, E.W; THIEL, P. G; MARASAS, W.F.O; SHEPHARD, G. S; VAN SCHALKWYK, D.J; KOCH, K.R. Natural Occurrence of Some *Fusarium* Mycotoxins in Corn from Low and High Esophageal Cancer Prevalence Areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v.38, p.1900-1903, 1990b.

SYDENHAM, E. W; SHEPHARD, G.S; THIEL P. G; MARASAS, W.F.O; STOCKENSTRÖM, S. Fumonisin Contamination of Commercial Corn-Based Human Foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v.39, p.2014-2018, 1991.

SYDENHAM, E. W; MARASAS, W. F. O; SHEPHARD, G.S; THIEL, P. G; HIROOKA, E. Y. Fumonisin Concentration in Brazilian Feeds Associated with Field Outbreaks of Confirmed and Suspected Animal Mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA. v.40, p. 994 - 997, 1992a.

SYDENHAM, E. W., THIEL, P.G., SHEPHARD, G.S. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in foods and feeds. . **Journal AOAC International**, v. 75, p. 313 – 318, 1992b.

SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G.S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: Gilbert, J., ed. **Progress in Food Contaminants Analysis**, London: Blackie Academic & Professional, 1996, p. 65 – 146.

THIEL, P.G.; SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E.; WILSON, T.M. Levels of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 109-111, 1991.

THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLOM, W.C.A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, v. 117, p. 3-9, 1992.

THIEL, P.G., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G.S., Van SCHALKWYK, D.J. Study of the reproducibility characteristics of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn: IUPAC collaborative study. **Journal AOAC International**, v. 76, p. 361 – 366, 1993.

TOLLESON, W.H.; DOOLEY, K.L.; SHELDON, W.G.; THURMAN, J.D.; BUCCI, T.J.; HOWARD, P.C. The mycotoxin fumonisin induces apoptosis in cultured human cells and in livers and kidneys of rats. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, p. 237 – 250, 1996.

TRUCKSESS, M.W. Natural toxins. In: Horwitz, W., ed., **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17 th Ed., AOAC International, Gaithersberg, Florida: AOAC International, 2000, Chapter 49.

TURNER, P.C., NIKIEMA, P., WILD, C.P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, v. 443, p. 81 – 93, 1999.

UENO, Y., IJIMA, K., WANG, S.D., SUGIURA, Y., SEKIJIMA, M., TANAKA, 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 Chemistry and Toxicology**, v. 35, p. 1143 – 1150, 1997.

VICTORA, C.G; MUNOZ, N; DAY, N.E; BARCELOS, L.B; PECCIN, D.A; BRAGA, N.M. Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study. **International Journal of Cancer**, v.15; 39, p. 710-716, 1987.

VOSS, K.A., PLATTNER, R.D., BACON, C.W., NORRED, W.P. Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material. **Mycopathologia**, v. 112, p. 81 – 92, 1990.

VOSS, K.A., CHAMBERLAIN, W.J., BACON, C.W., NORRED, W.P. A preliminary investigation on renal and hepatic toxicity in rats fed purified fumonisin B<sub>1</sub>. **Natural Toxins**, v. 1, p. 222 – 228, 1993.

VOSS, K. A., HOWARD, P.C., RILEY, R., SHARMA, R.P., BUCCI, T.J., LORENTZEN, R.J. Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B<sub>1</sub>: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). **Cancer Detection and Prevention**, v. 26, p. 1 – 9, 2002.

WANG, E.; ROSS, P.F.; WILSON, T.M.; RILEY, R.T.; MERRIL, 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*. **Journal of Nutrition**. v. 122, p. 1706-1716, 1992.

WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SOBESTIANSKY, J.; SANTOS, C.R.M.; REES, U. Fusariotoxicoses e estrogénismo em suínos. **Comunicação Técnica CNPSA/ EMBRAPA**. v. 24, p. 1-3, 1981.

Van der WESTHUIZEN, L., BROWN, N.L., MARASAS, W.F.O., SWANEVELDER, S., SHEPHARD, G.S. Sphinganine/sphingosine ratio in plasma and urine as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa. **Food Chemistry toxicology**, v. 37, p. 1153 – 1158, 1999.

Van der WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G. S.; SCUSSEL, V. M.; COSTA, L.F.; VISMER, H.F.; RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, 18, p. 5574 - 5578, 2003.

WILD, C.P; HASEGAWA, R.; BARRAUD, L.; CHUTIMATAEWIN, S.; CHAPOT, B.; ITO, N.E.; MONTESANO, R. Aflatoxin-albumin adducts: a basis for comparative



carcinogenesis between animals and humans cancer. **Epidemiology Biomakers Prevention.**, v. 5, p. 179-189, 1995.

WILSON, T.M.; ROSS, P.F.; RICE, L.G.; OSWEILER, G.D.; NELSON, H.A.; OWENS, D.L.; PLATTNER, R.D.; REGGIARDO, C.; NOON, T.H.; PICKRELL, J.W. Fumonisin B<sub>1</sub> levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 2, p. 213-216, 1990.

WILSON, T.M.; ROSS, P.F.; OWENS, D.L.; RICE, L.G.; JENKINS, S.J.; NELSON, H.A. Experimental production of ELEM. A study to determine the minimum toxic dose in ponies. **Mycopathologia.** v. 117, p. 115-120, 1992.

WILSON, D.M., SYDENHAM, E.W., LOMBAERT, G.A., TRUCKSESS, M.W., ABRAMSON, D., BENNETT, G.A. mycotoxin analytical techniques. In: Sinha, K.K., Bhatnagar, d., eds, **Mycotoxins in Agriculture and Food Safety**, New York: Marcel Dekker, 1998, p. 135 – 182.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high – and low risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 60, 5, p. 1626-1629, 1994.

ZACHARIAS, C; van ECHTEN DECKERT, G; WANG, E; MERRIL, A.H, Jr; SANHOFF, K. The effect of fumonisin B<sub>1</sub> on developing chick embryos: correlation between de novo sphingolipid biosynthesis and gross morphological changes. **Glycoconjunctiv J.** v. 13:2, p. 167-175. 1996.

ZHANG, H., NAGASHIMA, H., GOTO, T. Natural occurrence of mycotoxins in corn, samples from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. **Mycotoxins**, v. 44, p. 29 – 35, 1997.

ZOLLER, O., SAGER, F., ZIMMERLI, B. Occurrence of fumonisins in food. **Mitt Gebiete Lebensm Hyg**, v. 85, p. 81 – 99, 1994.

### **3 ARTIGO**

## **FUMONISINS B<sub>1</sub> AND B<sub>2</sub> IN CORN-BASED PRODUCTS COMMERCIALIZED IN SANTA CATARINA STATE – SOUTHERN BRAZIL**

Trabalho já aceito e em processo de publicação na revista: *Brazilian Archives of Biology and Technology*.

# FUMONISINAS B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> EM PRODUTOS DERIVADOS DE MILHO, COMERCIALIZADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA – REGIÃO SUL DO BRASIL

## 3.1 RESUMO

Produtos derivados de milho (n=82): farinha de milho (artesanal e industrializada), canjica, flocos de milho e milho pipoca, comercializados em Santa Catarina, mas processados em diferentes estados, foram analisados a fim de determinar a ocorrência de fumonisinas B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>). Do total de amostras, 92,68 % apresentaram níveis detectáveis de fumonisinas, sendo a farinha de milho o produto com maior contaminação. Os níveis variaram de 0,08 a 21,82 µg/g para FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub> (93,6% das amostras), com média de 3,81 e 5,73 µg/g para farinha de milho artesanal e industrializada, respectivamente. O segundo produto mais contaminado foi o milho pipoca com uma média de contaminação de 2,46 µg/g e ocorrência em 91,6% das amostras. Todas as amostras de flocos de milho apresentaram contaminação por fumonisinas, porém mais baixos, com uma média de 1,32 µg/g. O produto com menores níveis de FBs foi a canjica com contaminação média de 0,73 µg/g, em 83,3% das amostras. Estes resultados indicam a necessidade de monitoramento dos produtos derivados de milho em nosso Estado, ressaltando-se que os níveis mais expressivos foram encontrados em produtos comercializados no Sul e Oeste de SC, regiões agrícolas, marcadamente colonizadas por descendentes de italianos, consumidores habituais de produtos derivados de milho, particularmente a polenta.

**Palavras chave:** milho, fumonisinas, produtos derivados de milho

### 3.2 ABSTRACT

Corn-based products (n=82): corn flours (*home-processed* and *industrialized*), corn grits, corn flakes and popcorn, commercialized in Santa Catarina State (SC) but processed in different Brazilian states, were evaluated for fumonisins B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) and B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) contamination. From the total of samples studied, 92.6% presented fumonisins contamination. The highest levels of contamination were detected in the corn flours. Levels ranged from 0.08 to 21.82 µg/g to FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub> (93.6%), with mean levels of 3.81 and 5.73 µg/g for *home-processed* and *industrialized* flours, respectively. The following most contaminated product was popcorn (x = 2.46 µg/g) with FBs in 91.6% of the samples. Although all the corn flakes samples were contaminated, the levels were lower (x = 1.32 µg/g). The product with the lowest FBs levels (83.3%) was corn grits (x = 0.73 µg/g). The most expressive levels were found in corn products commercialized in the Southern and Western regions of SC, both agricultural regions, colonized predominantly by Italian immigrants descendants, who are habitual consumers of corn-based products, mainly *polenta*. Although those products were commercialized in SC, they were packed in other Brazilian states.

**Key-words:** corn, fumonisins, corn-based products

### 3.3 INTRODUÇÃO

Fumonisinias, micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* (*F. verticillioides* e *F. proliferatum*) são encontradas principalmente no milho e produtos derivados. Neste grupo a micotoxina mais comumente encontrada, contaminando naturalmente o milho é a fumonisinina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), podendo ocorrer em grãos destinados ao consumo humano e animal.

Desde sua descoberta (Bezuidenhout *et al.*, 1988) vem sendo associada a doenças em animais, tais como LEME em eqüinos (Kellerman *et al.*, 1990), edema pulmonar, hidrotórax e distúrbios cardiovasculares em suínos (Harrison *et al.*, 1990, Gumprecht *et al.*, 2001), incluindo efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos e imunossupressores em várias espécies animais (Marasas, 1996). Embora seu efeito em humanos ainda não esteja perfeitamente estabelecido, estatisticamente é associado ao câncer de esôfago (EC) em algumas regiões tais como Transkei/África do Sul (Sydenham *et al.*, 1990; Rheeder *et al.*, 1992), Linxian/China (Chu *et al.*, 1994) sendo relatado como possível carcinogênico para humanos, Grupo 2B, pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993). Francheschi *et al.* (1990) relacionou o aumento do risco no desenvolvimento de EC no north-eastern da Itália ao maior consumo de milho, onde a polenta é principal alimento básico (Doko & Visconti, 1994).

No Brasil, têm sido relacionadas a surtos de toxicoses em animais (Meirelles *et al.*, 1994; Sydenham *et al.*, 1992). Há registros sobre ocorrência de fumonisinias em milho e produtos derivados, particularmente no que se refere às regiões sul e sudeste do país, com níveis que variaram de 0.02 a 49.31 µg/g para FB<sub>1</sub> e de 0.05 a 29.16 µg/g para FB<sub>2</sub> (Camargos *et al.*, 2000; Hirooka *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 2000, 2001, 2002; Orsi *et al.*, 2000).

No estado de Santa Catarina estudos têm relatado contaminação por fumonisinias em pelo menos 97,3 % do milho comercializado. Hermanns *et al.* (2000) verificaram níveis que variaram de 1,12 a 31,88 µg/g em milho proveniente da região Oeste. (a

metodologia empregada foi através de ELISA). Em estudo envolvendo três regiões do Estado, van der Westhuizen *et al.*, (2003) encontraram níveis que variaram de 0,02 a 18,74 µg/g, com uma média entre 2,66 e 2,73 µg/g. O método utilizado foi através de CLAE e os níveis médios foram de 3,2; 3,4 e 1,7 µg/g para as regiões Oeste, Norte e Sul, respectivamente.

Machinski *et al.* (2000) analisaram 81 amostras de produtos derivados de milho, coletados na cidade de Campinas, no estado de São Paulo, sendo que fumonisinas foram encontradas em 54 % das amostras com níveis entre 0,08 e 4,93 µg/g para FB<sub>1</sub> e 0,03 – 1,38 µg/g para FB<sub>2</sub>.

Em estudo realizado na Argentina, país vizinho ao nosso Estado (SC), Hennigen *et al.* (2000) analisaram 35 amostras de "corn flour e corn grits", destinados a consumo humano encontrando fumonisinas em 91,4 % dos produtos. Os níveis variaram de 0,038 a 4,987 µg/g e de 0,015 a 1,818 µg/g para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, respectivamente.

Com base nos dados acima apresentados faz-se necessário avaliar os riscos aos quais a população está exposta, considerando entre outros aspectos que a região Sul do Brasil apresenta a maior incidência de EC do país (INCA, 1999), sendo que as fumonisinas podem ser um dos fatores relacionados (Scaff & Scussel, 1999; Bolger *et al.*, 2002; Scussel, 2002).

Em nosso Estado esta é a primeira avaliação dos níveis de fumonisinas em produtos derivados de milho destinados a consumo humano, particularmente a farinha de milho.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.4.1 MATERIAL

**Amostras:** farinha de milho (*artesanal* = 22 e *industrializada* = 25). *Outros produtos derivados de milho:* flocos de milho pré-cozidos (11), canjica (12), milho pipoca (12), totalizando 82 amostras (1 kg cada), comercializadas em diversas regiões de SC (Norte, Vale do Itajaí, Florianópolis, Serrana, Oeste e Sul), porém muitas delas processadas nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil.

**Padrões:** Fumonisininas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> gentilmente doado a V.M.S por PROMEC, Tygerberg, South África.

**Solventes:** acetonitrila p.a.; metanol p.a., metanol (HPLC).

**Reagentes:** ácido acético e ácido orto-fosfórico; hidrogenofosfato dissódico; 2 mercaptoetanol, tetraborato de sódio e o-ftaldialdeído - OPA (Merk) (todos p.a).

**Equipamentos:** agitador de tubos AP56 (Phoenix), moinho de facas (equipado com malha de 250µm mesh), balança analítica AB204S (Monoblock), bomba de vácuo 820 (Fsatom), evaporador de solvente (Tecnal), liquidificador com copo de alumínio /1000mL (Walita), banho de ultra-som SX-10 (Microsonic), pHmetro CG 818 (Schott Gerate).

**Sistema para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência:** válvula de injeção, loop 20 µl (Rheodyne). Bomba isocrática, manômetro e detector de fluorescência (Gilson). Coluna cromatográfica de fase reversa C18, 150 mm x 4,6 mm, 5µ (Phenomenex).

**Outros:** água ultra-pura Milli-Q (Waters); N<sub>2</sub> (White Martins); cartuchos de extração de fase sólida (SPE) (500mg), troca aniônica (SAX) (Varian). Conjunto para filtração à vácuo (Millipore); papel filtro n° 1; membranas filtrantes 0,45 µm (Whatman).

### 3.4.2 MÉTODOS

**Coleta das amostras:** realizada de Janeiro a Junho de 2001, por técnicos do Laboratório de Classificação de Produtos de Origem Vegetal (LCPOV), da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC). As Amostras (a) farinha de milho foi coletada em moinhos e, (b) outros produtos derivados de milho de supermercados, e cooperativas, em diferentes regiões do Estado. Nota: Os produtos eram comercializados em SC, porém muitos deles, foram processados principalmente nas regiões sudeste e sul do país (Tabela 1).

**Preparo da amostra:** cada amostra foi triturada em moinho de facas (250 mesh), homogeneizada e reduzida através da técnica de quarteamento manual até 250 g (sub-amostra) e desta foram retiradas alíquotas de 50 g para análise.

**Análise de fumonisinas:** foi empregado o método oficial da AOAC nº 995.15 (2000). Utilizou-se metanol-água ( $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$  / 3:1) como solvente de extração e cartuchos para extração em fase sólida (SPE) - SAX para purificação das amostras. A derivatização dos extratos foi procedida com OPA e detecção em CLAE, equipado com detector de fluorescência (335 nm de excitação e 440 nm de emissão). Foi empregada uma fase móvel isocrática (metanol – tampão diidrogenio fosfato de sódio - 0,1M (77:23). Fluxo de 1 ml/min. Para calibração do aparelho foram utilizadas soluções padrões de fumonisina nas concentrações de 0,0125; 0,025 e 0,05  $\mu\text{l/ml}$  para  $\text{FB}_1$  e de 0,005; 0,01 e 0,02  $\mu\text{g/ml}$  para  $\text{FB}_2$ . O limite de detecção do método foi 0,04  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{FB}_1$  e 0,05  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{FB}_2$  (considerando-se 3 vezes o desvio padrão do branco) e a recuperação do método foi de 80 e 73% para  $\text{FB}_1$  e  $\text{FB}_2$  respectivamente. Os dados foram analisados através de correlação simples e parcial empregando statistical software (SAS, version 6.11)



### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes aos produtos derivados de milho (farinha de milho, canjica, flocos de milho e milho pipoca), comercializados em SC, porém processados em diferentes estados (Goiás, São Paulo, Paraná e Santa Catarina) estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Fumonisinas foram encontradas em 92,6 % das amostras (76/82) com níveis de contaminação que variaram de 0,06 a 21,82  $\mu\text{g/g}$ . Todas as amostras contaminadas continham  $\text{FB}_1$ , mas somente 42,6 % apresentaram níveis detectáveis de  $\text{FB}_2$ . Somente 29,2 % das amostras apresentaram contaminação por FBs acima do nível máximo de resíduos para ( $\text{FB}_1+\text{FB}_2+\text{FB}_3$ ) recomendado pelo FDA (2001) para consumo humano, que é de 4  $\mu\text{g/g}$ . Salientamos, no entanto que nossos dados referem-se a somatória de  $\text{FB}_1+\text{FB}_2$ .

#### (a) Farinha de Milho

O produto com maior índice de contaminação foi a farinha de milho (fubá), ressaltando-se que 22 (46,8 %) destas amostras eram provenientes de (a.1) cultivo doméstico, para consumo próprio ou regional, produzidos em condições artesanais, minimamente processado, a partir do grão inteiro, mantendo-se o germe. As outras 25 amostras (53,2 %) foram (a.2) farinhas processadas industrialmente, sem germe. (Tabela 1).

*(a.1) Farinha de Milho Artesanal:* apenas uma amostra deste produto não apresentou contaminação por fumonisinas e os níveis situaram-se entre 0,08 e 19,22  $\mu\text{g/g}$  com uma média de 3,81  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{FB}_1+\text{FB}_2$ . A maioria destes produtos (18 amostras) foi coletada no Sul e Oeste de SC, regiões agrícolas de SC, onde o milho é bastante cultivado. Estas regiões também apresentam características culturais marcantes de colonização italiana, sendo, portanto habituais consumidores de polenta, comumente preparada a partir de farinha de milho de produção doméstica. Na região Sul os níveis

encontrados foram superiores (até 19,22 µg/g) para FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>, como também a frequência, quando comparado à região Oeste (até 10,69 µg/g) (Tabela 1).

(a.2) *Farinha de Milho Industrializada*: das amostras analisadas 92 % apresentaram contaminação e os níveis variaram de 0,14 a 21,82 µg/g com média de 5,73 µg/g. Os maiores níveis de contaminação do produto também foram verificados na região Sul do Estado onde todas as amostras analisadas estavam contaminadas. As amostras com maiores níveis de contaminação eram provenientes de SC, apesar de terem sido detectados níveis expressivos em produtos provenientes dos estados de Goiás e São Paulo.

Embora a *farinha de milho artesanal* seja preparada com milho integral e desta forma esperava-se uma maior contaminação neste produto, não observamos diferença significativa entre os resultados destes dois tipos de farinha de milho (Tabela 1).

Os resultados aqui apresentados reforçam dados já citados anteriormente, em grãos de milho, comercializados em SC, onde foram encontrados níveis que variaram de 1,12 a 31,88 µg/g (Hermanns *et al.*, 2000) e entre 0,02 e 18,74 µg/g (van der Westhuizen *et al.*, 2003), para fumonisinas. Porém neste estudo estamos nos reportando a análises em produtos derivados de milho, destinados ao consumo humano.

No Brasil diversas publicações, principalmente nos estados do Sul e Sudeste, apontam a presença de fumonisinas em milho com uma frequência alta de amostras positivas e níveis médios de contaminação geralmente superiores a 4 µg/g (Hirooka *et al.*, 1996; Camargos *et al.*, 2000; Hermanns *et al.*, 2000; Orsi *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2000, 2001 and 2002; Almeida *et al.*, 2002; Westhuizen *et al.*, 2003).

Machinski *et al.*, (2000) encontraram contaminação por fumonisinas em todas as amostras de farinha de milho analisadas (9/9) com níveis variando de 0,56 a 4,93 µg/g, com uma média de 2,32 µg/g, em Campinas. Os níveis médios encontrados em

nossas análises foram de 5,165 µg/g, portanto superiores ao acima citado o que demonstra necessidade de monitoramento do produto em nossa região.

**(b) Outros produtos:** *Milho pipoca, flocos de milho, canjica*

As diferentes etapas e tipos de processamento ao qual os alimentos derivados de milho são submetidos podem afetar a estabilidade das fumonisinas, seja por remoção, destruição ou ainda através de alterações estruturais, decorrentes de tratamentos químicos, físicos ou biológicos.

Conforme podemos verificar na Tabela 2, os níveis médios de contaminação por fumonisinas B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> em canjica, flocos de milho e milho de pipoca foram relativamente mais baixos que os detectados em farinhas de milho, porém algumas amostras ainda apresentaram níveis preocupantes.

*(b.1) Milho pipoca:* segundo produto mais contaminado, apresentou FB<sub>1</sub> variando de 0,10 a 7,34 µg/g com frequência de 11/12 das amostras e de 0,31 a 2,42 µg/g para FB<sub>2</sub>, com ocorrência em 6/12 amostras. Os níveis médios de contaminação foram de 2,87 µg/g. Machinski *et al.* (2000) encontraram níveis de contaminação em milho pipoca no estado de SP de 0,30 a 1,72 µg/g, portanto inferiores aos verificados em nosso estudo. De acordo com Bolger *et al.* (2001) na Argentina foram detectados fumonisinas em milho pipoca variando de 1,084 a 14,241 µg/g, em 42 amostras coletadas entre maio e junho de 1999. Segundo informação das empresas empacotadoras, o consumo nacional de milho pipoca está em torno de 80 mil toneladas, sendo que 75% desse mercado corresponde a milho pipoca americano, importado principalmente da Argentina (Sawaki, 2001).

*(b.2) flocos de milho pré-cozidos:* foram encontradas fumonisinas em todas as amostras com uma média de contaminação de 1,32 µg/g. Sendo este produto além da moagem, submetido a processamento térmico (cozimento) esperava-se redução de FBs, seja por remoção como também por degradação. O processo de moagem, via seco ou úmido, pode levar a uma remoção da micotoxina, mais significativa, porém no

segundo caso ( Bolger *et al.*, 2001). O efeito do processamento térmico ainda é bastante discutido e não está perfeitamente estabelecido. Há trabalhos que indicam a redução (Jackson *et al.*, 1996) enquanto outros demonstram a estabilidade térmica de fumonisinas (Alberts *et al.*, 1990; Dupuy, 1993) e de acordo com Bolger *et al.* (2001) é necessária temperatura > 150°C para que ocorra perda significativa. Contudo há registros de que produtos termicamente processados geralmente apresentam níveis mais baixos de FBs do que os não processados ou minimamente processados (Stak & Eppley, 1992)

(b.3) *canjica*: produto com menores níveis de contaminação, com FB<sub>1</sub> variando de 0,29 a 2,23 µg/g e ocorrência em 83 % das amostras e FB<sub>2</sub> sendo detectada em apenas uma amostra com nível de 0,098 µg/g. A contaminação média deste produto foi de 0,73 µg/g.

**Tabela 1** Fumonisinias em farinha de milho comercializada em Santa Catarina (SC).

Farinha de milho	Origem processamento		Comercializada em SC	Fumonisinias ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )		
	Região	Estado <sup>c</sup>		Região	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>
<i>Artesanal<sup>a</sup></i>						
	Sul	SC	Vale Itajaí	0,25	ND	0,25
				0,50	ND	0,50
				2,55	0,67	3,23
			Oeste	ND <sup>d</sup>	ND	ND
				0,08	ND	0,08
				0,41	ND	0,41
				0,70	ND	0,70
				1,08	ND	1,08
				2,54	ND	2,54
				4,76	0,475	5,24
				5,37	1,39	6,77
				8,52	2,17	10,69
			Serrana	3,89	0,06	3,95
			Sul	0,75	ND	0,75
				0,26	ND	0,26
				0,29	ND	0,29
				0,53	ND	0,53
				1,30	0,23	1,54
				4,18	1,05	5,23
				6,01	1,55	7,57
				10,07	2,87	12,94
				15,03	4,18	19,22
			<i>Min. e Max.</i>	0,08 – 15,03	0,06 – 4,18	0,086 – 19,22
Total: 22			<i>Média</i>	3,14	0,66	3,81
<i>Industrializada<sup>b</sup></i>						
	Centro-Oeste	GO	Florianópolis	1,67	ND	1,67
				2,11	0,46	2,58
				9,06	2,59	11,65
				11,43	3,40	14,83
	Sudeste	SP	Norte	0,43	ND	0,43
				0,56	ND	0,56
			Vale Itajaí	0,83	0,06	0,90
				1,44	ND	1,44
				4,36	ND	4,36
				9,94	2,84	12,78
	Sul	PR	Norte	ND	ND	ND
			Florianópolis	0,14	ND	0,14
				0,33	ND	0,33
				0,71	ND	0,71
		SC	Oeste	ND	ND	ND
				3,00	0,36	3,37
				3,82	1,01	4,83
			Sul	3,95	1,10	5,06
			Oeste	4,37	1,15	5,53
				5,65	1,32	6,98
				7,63	2,02	9,65
			Sul	9,43	3,04	12,48
				11,68	3,84	15,52
				16,35	5,46	21,82
				16,45	4,79	21,24
			<i>Min. e Max.</i>	0,14 – 16,45	0,06 – 5,46	0,145 – 21,82
Total: 25			<i>Média</i>	5,45	1,19	5,73

<sup>a</sup> com germe

<sup>b</sup> degerminada

<sup>c</sup> GO, SP, PR, SC = Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina

<sup>d</sup> não detectada

**Table 2** Fumonisinias em produtos derivados de milho, comercializados em Santa Catarina.

Produtos de milho <sup>a</sup>	Origem do processamento		Comercializado em SC		Fumonisinias ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	
	Região	Estado <sup>c</sup>	Região	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> +FB <sub>2</sub>
<i>Canjica</i>						
	Sudeste	SP	Vale Itajaí	ND <sup>d</sup>	ND	ND
				0,53	ND	0,53
				2,23	ND	2,23
	Sul	PR	Oeste	0,70	ND	0,70
		SC	Vale Itajaí	ND	ND	ND
				0,53	ND	0,53
			Serrana	0,73	ND	0,73
			Oeste	0,29	ND	0,29
				0,53	ND	0,53
				0,81	ND	0,81
				0,94	ND	0,94
				1,35	0,09	1,45
			<i>Min. e Max.</i>	0,29 – 2,23	0,09 <sup>b</sup>	0,29 – 2,23
		Total: 12	Média	0,72	0,008	0,73
<i>Flocos milho</i>						
	Centro-Oeste	GO	Florianópolis	1,41	ND	1,41
	Sudeste	SP	Vale Itajaí	0,38	0,11	0,46
				0,47	0,08	0,55
				1,09	ND	1,09
			Florianópolis	0,79	ND	0,79
				0,80	ND	0,80
				4,52	1,32	5,85
	Sul	SC	Norte	0,98	ND	0,98
				0,15	ND	0,15
				1,12	ND	1,12
			Oesten	1,11	ND	1,11
			<i>Min. e Max.</i>	0,15 – 4,52	0,08 – 1,32	0,15 – 5,85
		Total: 11	Média	1,17	0,13	1,30
<i>Milho pipoca</i>						
	Sudeste	SP	Florianópolis	ND	ND	ND
			Vale Itajaí	0,13	ND	0,13
			Sul	2,69	0,31	3,01
	Sul	SC	Vale Itajaí	6,38	1,65	8,03
			Oeste	0,23	ND	0,23
				0,60	ND	0,60
				2,23	0,59	2,82
				2,73	0,61	3,35
				7,34	2,42	9,77
			Sul	0,10	ND	0,10
				2,28	ND	2,28
				3,26	0,82	4,09
			<i>Min. e Max.</i>	0,10 – 7,34	0,31 – 2,42	0,10 – 9,77
		Total: 12	Média	2,33	0,53	2,87

<sup>a</sup> diferentes tipos de amostra    <sup>b</sup> única contaminada    <sup>c</sup> GO, SP, PR, SC = Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina

<sup>d</sup> não detectada

### **3.6 CONCLUSÕES**

A análise de dados referentes a contaminação por fumonisinas em milho e produtos derivados no Brasil demonstram que os níveis e a ocorrência foram significativos.

Em nosso Estado, os resultados indicam a necessidade de controle e monitoramento do milho e produtos derivados, destinados ao consumo humano, haja vista as características regionais de comunidades descendentes de italianos, consumidores habituais de polenta, alimento básico, preparado a partir de farinha de milho (fubá), minimamente processado.

A ingestão de produtos derivados de milho em áreas rurais de nosso país, pode variar de 11 a 39 g por pessoa/dia (Machinski *et al.*, 2000), desta forma, estes níveis podem representar risco a saúde da população. Portanto, nestas regiões a possível ingestão de fumonisinas a que tal população estaria exposta seria bem maior do que a proposta por Gelderblom *et al.* (1995), onde Tolerable Daily Intake é de 800 ng/kg bw/day.

Considerando que o sul do Brasil apresenta incidência relativamente alta de câncer de esôfago (EC) e que a presença de fumonisinas está relacionada em algumas regiões do mundo a esta patologia (Sydenham *et al.*, 1990, Francheschi *et al.*, 1990, Chu *et al.*, 1994, Doko & Visconti, 1994), associada ao fumo, consumo de bebida alcoólica, "chimarrão" (Perin *et al.*, 1990; Scaff & Scussel, 2000), estas micotoxinas podem estar contribuindo nestas estatísticas, haja vista ser o câncer uma doença multifatorial.

Estes dados, analisados em conjunto com outros resultados obtidos em nosso país, apontam a necessidade de estudos mais amplos que demonstrem a situação em todo o Brasil de forma freqüente e global, considerando diferenças climáticas e sazonais, haja vista que os registros encontrados são regionais e parciais.

### 3.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C. A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; VAN SCHLANKWIK, D.J.; BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, 6, p. 1729-1733, 1990.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3877 – 3882, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY –AOAC. **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**. Edited by Cunniff (Gaithersburg: AOAC Internacional), 2000, chapter 49, p.1-51.

BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society**, v. 11, p. 743-745, 1988.

BOLGER, M.; COKER, R. D.; DINOVI, M.; GAYLOR, D.; GELDEBLOM, W.; OLSEN, M.; PASTER, N.; RILEY, R.T.; SHEPHARD, G.; SPIJERS, G. J. A. Fumonisin. Safety evaluation of certain mycotoxin in food. International Programme on Chemical Safety World Health Organization. Geneva. FAO FOOD and Nutrition Paper 74, **WHO – Food Additives Series**. v. 47, p. 103-279, 2001.

CAMARGOS, S.M.; SOARES, L.M.V.; SAWAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 226-229, 2000.

CHU, F.S. & LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and mycotoxins in moldy corn collected from the peoples Republic of China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, 3, p. 847-852, 1994.

DOKO, M.B.; VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, p. 433-439, 1994.

DUPUY, J.; LE BARS, P.; BOUNDRA, H. LE BARS, J. Thermostability of fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, 9, p. 2864-2867, 1993.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000. **Guidance for Industry –**



**Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds.** Draft Guidance. June 6<sup>th</sup>, p. 1-3. Disponível on line: <http://www.cfsan.FDA.gov/~dms/>. Acesso em 9/04/2003.

FRANCHESCHI, S., BIDOLI, E., BARÓN, A.E., LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancer of the oral cavity, pharynx and esophagus in northeastern Italy. **Journal National Cancer Institute**, v. 82, p. 1407-1411, 1990.

GELDERBLUM, W.C.A.; SNYMAN, S.D.; ABEL, S.; LEBEPE-MAZUR, S.; SMUTTS, C.M.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; MARASAS, W.F.O.; VICTOR, T. C.; KNASMULLER, S; HUBER, W. Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats. **Fumonisin in Food**, edited by L.S. Jackson. J.w. de Vries and L.B. Bullerman (New York: Plenum Press), 1995, pp.279-296.

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.

HIROOKA, E.Y; YAMAGUCHI, M.M; AOYAMA, S; SUGIURA, Y; UENO, Y. The Natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, 2, p. 173-183, 1996.

HERMANN, G.; COSTA, L. L.F.; SCUSSEL, V.M. Evaluation of fumonisin contamination in grains of corn (*Zea mays* L.) produced at the western region of Santa Catarina. In: **X International Iupac Symposium On Mycotoxins And Phycotoxins**, Guarujá, São Paulo, Brasil. 2000, Anais, pp.147.

IARC - MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, France, 2002, v. 82, p.301.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - Ministério da Saúde. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 1999.

JACKSON, L.S.; HLYWKA, J.J.; SENTHIL, K.R.; BUÇÇERMAN L.B. Effect of thermal processing on the stability of Fumonisins. In: Jackson, L.S.; Devries, J.W.; Bullerman, L.B., eds. **Fumonisins in Food**, New York: Plenum Press, 1996, p. 345-353.

KELLERMAN, T.S.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A.; CAWOOD, M.E.; COETZER, J.A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B<sub>1</sub>. **Onderstepoort Journal Veterinary Research** v. 57, p. 269-275, 1990.

MACHINSKI, M. JR.; SOARES, L.M.V. Fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, 10, p. 875-879, 2000.

MARASAS, W.F.O. Fumonisin: history, worldwide occurrence and impact. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, p.1-17, 1996.

MEIRELES, M.C.A.; CORREA, B.; FISCHMAN, O.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N. O.; POZZI, C.R. Mycoflora of the toxin feeds associated with equine leukoencephalo-malacia (ELEM) outbreaks in Brazil. **Mycopathology**, v. 127, p. 183–188, 1994.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, T., HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of State of Paraná, Brazil, **Mycopathologia**, v. 1, p. 1-10, 2000.

ONO, E.Y.S.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; KAWAMURA, O.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants**, v.18, 8, p.719-729, 2001.

ONO, E.Y.S.; SASAKI, E.Y.; HASHIMOTO, E.H.; HARA, L.N.; CORRÊA, B.; ITANO, E.N.; SUGIURA, T.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Post-harvest storage of corn: effects of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, 11, p. 1081-1090, 2002.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POSSI, C.R.; SCHAMMASS, A.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, p. 75-87, 2000.

PATEL, S.; HAZEL, C..M.; WINTERTON, A.G..M.; GLEADLE, A.E. Surveillance of fumonisin in UK maize-based foods and other cereals. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, 2, p. 187-191, 1997.

PERIN, I. L.; KUHNEN, N.P; MIROSKI, L; RIBEIRO, H.G. Análise de 149 Casos de Câncer de Esôfago tratados com Acelerador Linear, no Período de 1980 a 1985, no Serviço de Radioterapia do Hospital de Caridade. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 19, p. 5-8, 1990.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; VAN SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkey. **Phytopathology**, v. 82, p. 353-357, 1992.

SAWAZAKI, E. A cultura do milho pipoca no Brasil. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, 2, p. 11 – 13, 2001.

SCAFF, R.M.C.; SCUSSEL, V.M. Esophageal cancer in the Southern region of Brazil – Cases from Santa Catarina State. **Mycotoxin Contamination: Health Risk and Prevention Project**, p. 226-230, 1999.

SCUSSEL, V. M. **Fungos e micotoxinas associados a grãos armazenados**. In: Lorini, I.; Miike, L. H.; Scussel, V. M. editores. *Armazenagem de Grãos*. São Paulo, 2002, pp. 675-804.

SHEPHARD, G.S; SYDENHAM, E. W; THIEL, P. G; GELDERBLOM, W. C.A. Quantitative Determination of Fumonisin B<sub>1</sub> and B by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13 (10), p. 2077-2087, 1990.

STAK, M.E.; EPLEY, R.M. Liquid chromatographic determination of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn products. **Journal AOAC International**, v. 75, p. 834-837, 1992.

SYDENHAM, E.W; THIEL, P. G; MARASAS, W.F.O; SHEPHARD, G. S; VAN SCHALKWYK, D.J; KOCH, K.R. Natural occurrence of some fusarium mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1900-1903, 1990.

SYDENHAM, E. W; MARASAS, W. F. O; SHEPHARD, G.S; THIEL, P. G; HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 994-997, 1992.

TRUCKSESS, M. Mycotoxins. In: General Referee Reports. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 84, 1, p. 202-210, 2001.

van der WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G. S.; SCUSSEL, V. M.; COSTA, L.F.; VISMER, H.F.; RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v. 51, 18, p. 5574-5578, 2003.

## 4 ARTIGO

### **STRUCTURAL, ULTRASTRUCTURAL AND HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF CHANNEL CATFISH (*Ictalurus punctatus*) LIVER INTRAPERITONEALLY TREATED WITH FUMOSIN B<sub>1</sub>**

Trabalho submetido a publicação na revista: Food and Chemical Toxicology

## **ANÁLISE ESTRUTURAL, ULTRAESTRUTURAL E HISTOQUÍMICA DE FÍGADO DE CHANNEL CATFISH (*Ictalurus punctatus*) TRATADOS INTRAPERITONEALMENTE COM FUMONISINA B<sub>1</sub>.**

### **4.1 RESUMO**

A aquicultura têm se desenvolvido muito nos últimos anos no Brasil, particularmente para o cultivo de catfish. Devido a sua importância econômica vem recebendo forte incentivo do governo e neste contexto, indústrias produtoras de rações para peixes também proliferam. Fumonisinas foram detectados em rações para peixes e casos de intoxicação em catfish foram relatados, com um elevado índice de mortalidade, conduzindo conseqüentemente a consideráveis perdas econômicas. Entretanto, há escassez de dados e poucas pesquisas foram realizadas sobre a ação das fumonisinas em peixes, na América sul. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações histopatológicas em fígado de catfish, cultivados em fazendas de Santa Catarina, sul de Brasil, após injeções intraperitoneais de FB<sub>1</sub>. Os catfish (60g cada) foram divididos em 4 grupos e tratados com dieta semipurificada. Os grupos II, III e IV foram tratados com injeções IP de 1,0; 5,0 e 10,0 mg FB<sub>1</sub>/kg p.c./dia, durante 21 dias, respectivamente e o grupo I (controle) recebeu somente injeções de solução salina. Após o 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias, seis exemplares de cada grupo foram sacrificados. Os fígados foram removidos e processados de acordo com a técnica histológica de rotina, para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os fígados de catfish não tratados com fumonisina B<sub>1</sub> apresentaram o padrão de organização dos demais peixes descritos na literatura, porém estes órgãos nos animais tratados apresentaram alterações de leve à drásticas, dependendo da dose e tempo de tratamento a que foram submetidos. Desde o início do tratamento destacou-se um aumento de volume do retículo endoplasmático granular (REG), formando agregados de cisternas dilatadas, freqüentemente circundando mitocôndrias. A partir de então, foram observados hepatócitos com núcleo retraído, muitas vezes sem nucléolo aparente. O parênquima hepático apresentava-se desagregado com grande número de cavidades e acentuada anisocariose. Constatou-se dificuldade generalizada em identificar limites celulares e pôde-se observar fragmentos de membranas sendo englobados por lisossomos. As cristas mitocôndriais apresentaram alterações degenerativas, com aspecto fragmentado ou mesmo ausentes. Nas doses maiores observou-se intensa resposta ao tratamento com FB<sub>1</sub>, com acentuada desorganização tecidual. Em algumas regiões do fígado, prevalecia a ocorrência de necrose, enquanto em outras, o processo de remoção dos hepatócitos que haviam sofrido os efeitos tóxicos da FB<sub>1</sub>, era a apoptose. Aqui, a característica mais evidente, foi o encolhimento da célula e de seu núcleo. Já nos locais onde havia prevalência de necrose, encontramos células rompidas e outras com volume aumentado. Figuras mielínicas elétron-densas estavam bem características nesta etapa do tratamento.

Palavras-chave: fígado, catfish, fumonisina, análise estrutura e ultraestrutural

## 4.2 ABSTRACT

Aquiculture, mainly for catfish (*Ictalurus punctatus*), has grown strong and encouraged by the Brazilian government due to its economical importance. The industry for fish feed is also growing. In fact, fumonisins have been detected in fish feed and cases of catfish poisoning have been reported, with a high mortality, leading therefore to economic losses. However, there are only a few research carried out on fumonisins toxicity in fish in South America. The aim of this work was to evaluate the histopathological effects of FB<sub>1</sub>, applied intraperitoneally (IP) in catfish grown in Santa Catarina State farms, South of Brazil. Channel catfish (60g each) were divided into 4 Groups fed with semi-purified diet. Groups II, III and IV were treated with IP injections of 1; 5 and 10 mg FB<sub>1</sub>/kg b.w./day, respectively, during 21 days and Group I (Control) received only saline solution. After 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>nd</sup> days, six samples of each group were sacrificed. The livers were removed and routinely processed according to hystological methodology for by light and transmission electron microscopy. The liver from catfish which were not treated with FB<sub>1</sub> (control group) presented the organization pattern similar to others fish described in the literature, however these treated animals organs showed from slight to deep alterations, depending on the dose and time treatment to which they were submitted. Already from the first collection it was found out that the granular endoplasmatic reticle (GER) volume was greatly increased, with annular lamel shaped cisterns often surrounding the mitochondria. Retracted nucleus hepatocyte could be observed, many of which did not present a nucleolus. The tissue showed vacuolated areas and the presence of macrophages containing lysosomes. The hepatic parenchyma appeared disaggregated presenting great number of cavities and accentuate anisokariosis. There was general difficulty for identifying cell limits and it was observed the presence of cell membrane fragments being digested by lysosomes. The mitochondria cristae presented degenerative alterations, fragmented in aspect or were even absent. The highest doses presented an intense response for FB<sub>1</sub>, already showed an accentuate tissue disorganization, revealing the absence of cell limits and intense cytoplasm vacuolization. The analysis images suggest the occurrence of necrosis in some areas, characterized by the presence of fully broken cells, or presenting a volume increase and acquiring a swollen aspect. Other hepatocytes presented nuclei reduced in volume and no visible nucleolus similar those found in literature as apoptotic process cells. Electron-dense myelinic figures were well featured at this stage of treatment.

Key words: liver, catfish, fumonisin, structural, ultrastructural analysis

### 4.3 INTRODUÇÃO

Fumonisin, grupo de micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* e que contaminam produtos e sub-produtos agrícolas, vem sendo objeto de intensos estudos na micotoxicologia atual, devido a sérios riscos de intoxicação animal e possíveis efeitos promotores de câncer, inclusive em humanos. São estruturalmente similares a esfingosina e bloqueiam a biossíntese de novo esfingolípido através da inibição de esfinganina (esfingosina) N – aciltransferase (Wang *et al.*, 1991). Isto resulta em acúmulo intracelular de esfinganina, elevação da relação esfinganina/esfingosina e depleção de esfingolípídios complexos (Tolleson *et al.*, 1999; Voss *et al.*, 2002). Os esfingolípídios são os principais componentes de membranas biológicas tendo desta forma papel importante, incluindo regulação do crescimento, diferenciação e proliferação celular (Lim *et al.*, 1996). Fumonisin também afetam sítios de regulação celular, aparentemente independentes de mecanismo de ruptura de metabolismo de lípidios, resultando em alterações na proliferação celular, comunicação célula a célula, adesão celular e apoptose, indução de stress oxidativo e modulação da expressão de genes (Abado-Becognee *et al.*, 1998; Mobio *et al.*, 2000).

A fumonisin está associada à surtos de toxicoses tais como, leucoencefalomalácia equina (LEME), edema pulmonar intersticial agudo em suínos e experimentos já demonstraram hepatotoxicidade em cavalos, porcos e ratos, câncer hepático em ratos, nefropatias, depressão do sistema imunológico, malformações ósseas entre outros distúrbios em varias espécies animais (Harrison, 1990; Norred & Voss, 1994; Scott, 1993; Howard *et al.*, 1999).

Pesquisas sobre a toxicidade das fumonisin em peixes são escassas, sendo que alguns estudos foram conduzidos, particularmente nos EUA. Lumlertdacha

*et al.* (1995) desenvolveram estudo em catfish (*Ictalurus punctatus*), no qual os peixes foram tratados com ração contendo milho contaminado com *F. verticillioides*. A dieta contendo 20 mg FB<sub>1</sub>/ kg, durante 10 semanas, inibiu o desenvolvimento e ganho de peso dos peixes e lesões hepáticas foram observadas. Em outro experimento, Li *et al.* (1994) também avaliaram os efeitos da dieta contendo material de cultura de *Fusarium verticillioides* sobre catfish. Nos tratamentos com ração contendo FB<sub>1</sub> ocorreu diminuição do crescimento e consumo de ração e os peixes tratados com 40 mg/kg ou mais apresentaram elevação do glicogênio no fígado, aumento da vacuolização em fibras nervosas e invasão linfohistiocítica perivascular, no cérebro.

Goel *et al* (1994) analisou esfingolipídios em catfish tratados com material de cultura de *Fusarium verticillioides* e constatou elevação nas taxas de esfinganina e esfingosina nos rins, soro, fígado e músculo.

Avaliando a toxicidade da FB<sub>1</sub> para carpas (*Cyprinus carpio* L.), Pepeljnjak *et al.* (2000) verificaram redução no ganho de peso corporal e alterações patológicas foram observadas em órgãos parênquimais como fígado, trato intestinal, coração e rins. No fígado foram constatadas degeneração e necrose dos hepatócitos, infiltração, fibrose, degenerações vasculares e edema do ducto biliar e ocorreu diferença significativa nos índices de apoptose.

O peixe channel catfish (*Ictalurus punctatus*) é uma espécie importante tanto do ponto de vista comercial como esportivo nos EUA e nos últimos anos também no Brasil. A piscicultura de água doce cresceu cerca de 4.500 % nos últimos dez anos em Santa Catarina. Os peixes mais cultivados são o bagre americano e africano; carpas, além de cascudo, tilápia e traíra. Hoje, com apenas 1,13 % do território nacional, Santa Catarina é responsável por 25 % da produção de pescado de água doce no Brasil. Porém a maioria dos produtores obtém baixas produtividades e não conta com assistência técnica e treinamentos profissionalizantes que demandam um esforço aquém da capacidade individual de qualquer uma das instituições existentes atualmente. Bactérias, vírus, parasitoses, fatores relacionados à nutrição, qualidade das rações e água podem influenciar no desenvolvimento e crescimento e até levar à altos índices de mortalidade, gerando grandes perdas econômicas. Por outro



lado, a quantidade e qualidade dos recursos hídricos e a disponibilidade de subprodutos agropecuários propiciam excelentes condições para a criação de peixes a baixo custo de produção.

De acordo com dados da literatura o fígado é o órgão mais atingido por fumonisinas, em todas as espécies estudadas inclusive em catfish. Os poucos estudos desenvolvidos com esta espécie foram conduzidos utilizando-se material de cultura de *fusarium* junto à ração. Estudos em roedores, primatas não humanos e outras espécies de animais tratados com material de cultura de *F. verticillioides* de um isolado que produz predominantemente FB<sub>1</sub> (isolado MRC 826) ou milho naturalmente contaminado com fumonisinas mostraram efeitos tóxicos no fígado e rins que foram similares aos estudos com fumonisina B<sub>1</sub> purificada. Ambos, MRC 826 e milho naturalmente contaminado causaram tumores de fígado em ratos em doses similares aquelas que causaram tumores de fígado em roedores tratados com FB<sub>1</sub> purificada (Bolger *et al.*, 2001).

No Brasil não temos registro na literatura de alguma pesquisa sobre o assunto. Nosso objetivo foi conduzir um estudo a partir de fumonisina B<sub>1</sub> injetada intraperitonealmente a fim de se avaliar as alterações estruturais, ultra-estruturais e histoquímicas no fígado de channel catfish. A via de administração intraperitoneal (IP), é um procedimento laboratorial comum e oferece grande superfície de absorção, a partir da qual as substâncias entram rapidamente na circulação, possibilitando desta forma uma resposta rápida a nível tecidual e celular. Apesar das diferenças, estudos com administração IP podem revelar-se como um valioso instrumento para elucidar o mecanismo de ação de fumonisinas, empregando-se consideravelmente menores quantidades de toxina purificada sob um menor período de administração (Bondy *et al.*, 1995).

Constata-se no entanto que os órgãos-alvo atingidos variam conforme o animal, o que recomenda estudos nas mais variadas espécies, com objetivo de identificar-se adequadamente o mecanismo de ação desta micotoxinas.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.4.1 MATERIAL

**Reagentes e Corantes:** Azul Brilhante de Comassie (Bio Rad); glutaraldeído (Eletron Microscopic Sciences); paraformaldeído (Eletron Microscopic Sciences); resina Spurr (Eletron Microscopic Sciences); cacodilato de sódio (Eletron Microscopic Sciences); tetróxido de ósmio (Polysciences); Histoiresin glicolmetacrilato (LKB); hematoxilina, eosina, tricrômico de Gomori, azul de toluidina, ácido periódico de Schiff (PAS), sudam black.

**Padrão:** Fumonisin B<sub>1</sub> gentilmente doado à V.M.S pelo PROMEC (Tygerberg, South África).

**Equipamentos:** micrótomo (Reichert-Jung 4045), microscópio ótico (Olympus BH2) equipado com máquina fotográfica (Olympus C-35-AD); ultramicrótomo (Porter Blum MT2 Sorvall); microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 100CX)

**Animais:** exemplares machos de channel catfish (*ictalurus punctatus*) (60), com aproximadamente 60g de peso, procedentes de Blumenau, estado de Santa Catarina.

### 4.4.2 MÉTODO

**Tratamento:** Os peixes foram divididos, ao acaso, em quatro grupos experimentais de 18 animais e mantidos em aquários no Laboratório de Estudos de Peixes, no CCB, equipados com suprimento de ar e fluxo contínuo de água (1 l/min), mantidos a temperatura de 25 – 28 °C, em ciclo claro-escuro de 14/10 horas. Durante todo o período do experimento foi feito controle constante das condições de sanidade da água (oxigênio, amônia, pH). Os peixes foram tratados com ração balanceada, analisada previamente para micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas), não se encontrando níveis detectáveis

de micotoxinas. Após 15 dias de adaptação, três grupos de peixes foram submetidos a tratamento com injeção diária intraperitoneal (IP) de FB<sub>1</sub>, durante 21 dias consecutivos, sendo grupo I – 1mg/kg p.c./dia; grupo II – 5mg/kg p.c./dia; grupo III – 10mg/kg p.c./dia, tendo como veículo solução salina. O grupo controle recebeu apenas injeção IP de solução salina. Após 7, 14 e 21 dias, seis exemplares de cada grupo foram sacrificados.

**Obtenção e fixação dos espécimes:** os exemplares foram anestesiados com 0,2 ml de mistura de Ketalar/Rompum (1:1) e após foi feita uma incisão longitudinal na região ventral com lâmina de bisturi, expondo o abdômen. O fígado foi removido e seccionado em fragmentos de 0,1 a 0,5 mm, sendo imediatamente fixado a 4 °C em paraformaldeído 2,5 % por 2h para subsequente análise histológica e histoquímica. Para análise ultra-estrutural o material foi fixado em glutaraldeído 2 % durante 2 horas.

**Microscopia de luz (ML):** Foram obtidas secções dos fragmentos teciduais de 5 a 7 µm respectivamente, embebidas em glicolmetacrilato (historesina) e parafina. As técnicas de coloração histológicas utilizadas foram hematoxilina-eosina, azul de toluidina e tricrômico de Gomori. Os métodos histoquímicos para proteínas totais (*comassie brilhante blue*), carboidratos (reação do PAS – ácido periódico de Schiff) e lipídeos (sudam black) foram realizados de acordo com Pearse (1985) e Brancoft *et al.* (1990). Reações complementares foram usadas para identificar glicogênio.

**Microscopia eletrônica de transmissão (MET):** Após fixação os fragmentos de fígado foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1 %, pH 7.2 e embebidos em resina spurr, durante 18 h a 70 °C. Os cortes ultrafinos obtidos em ultramicrotomo, contracorados com acetato de uranila 1 % e citrato de chumbo de Reynolds foram analisados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão e as eletromicrografias foram obtidas em filme Fuji e revelada em papel Kodabromide RC-F4.

## **4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.5.1 Análise Estrutural e Ultraestrutural**

#### **4.5.1.1 Fígado**

##### **Grupo 1 (grupo controle)**

Os fígados de catfish não tratados com fumonisina B<sub>1</sub> apresentaram o padrão de organização dos demais peixes descritos na literatura (Grizzle & Rogers, 1985) (fig. 1), porém estes órgãos nos animais tratados apresentaram alterações de leve à drásticas, dependendo da dose e tempo de tratamento a que foram submetidos.

##### **Grupo 2 (1mg/kg. pc. /dia)**

**Coleta 7º dia:** nos peixes sacrificados após 7 dias de injeções IP de FB<sub>1</sub> (1mg/kg/bw), a estrutura do fígado, vista através de microscopia de luz (ML) aparentava semelhança àquela do animal controle, embora em algumas regiões os cordões de hepatócitos apresentassem um aspecto vacuolizado, caracterizado pela presença de áreas intracitoplasmáticas claras e arredondadas (fig. 2). Na análise através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), destacou-se um aumento de volume do retículo endoplasmático granular (REG), formando agregados de cisternas dilatadas, sugerindo aumento de síntese de proteínas (fig. 3a). Os limites celulares (membranas celulares) ainda podiam ser evidenciados.

**Coleta 14º dia:** após 14 dias de tratamento os hepatócitos de algumas regiões do fígado apresentavam aumento de volume. Seu núcleo também estava aumentado e o nucléolo mostrava alteração de contorno, caracterizado por um aspecto "borrado", mal delineado. Nessa etapa havia dificuldade em observar nitidamente o contorno nuclear, sugerindo perda da integridade da

membrana que constitui a carioteca, às vezes aparentando estar ocorrendo extravasamento do conteúdo nuclear (destaque da fig. 4). Quando comparados aos animais controle, ou aos da 1ª coleta, vimos que o volume do REG estava bastante aumentado, com cisternas na forma de lamelas aneladas, muitas vezes circundando mitocôndrias. Constatou-se ainda a presença de lisossomos e vacúolos autofágicos, muitos deles próximos a conjuntos de mitocôndrias circundadas por REG, havendo indícios de estarem sendo englobados pelos vacúolos lisossômicos (fig. 4). Algumas imagens sugerem estar ocorrendo fusão entre ambos. Nos animais desse grupo, vimos que a vacuolização do citoplasma tornou-se evidente, possivelmente devido a processo autofágico.

**Coleta 21º dia:** nas amostras analisadas através de MET, ao final do período de tratamento (21 dias), podia-se observar hepatócitos com núcleo retraído, muitos deles com ausência de nucléolo. O REG mostrava-se bastante alterado com algumas áreas apresentando grande concentração de cisternas dilatadas e outras onde o REG exibia forma filamentosa e descontínua (fig. 3b). Estas características indicam estar ocorrendo intensa síntese protéica numa possível tentativa da célula recuperar sua homeostase através da produção de enzimas lisossômicas e proteínas de membrana.

Na ML, o tecido mostrava áreas vacuolizadas e presença de macrófago contendo lisossomos.

É importante salientar que esse fato é convergente com afirmações feitas por outros pesquisadores. Exemplificando, Haschek *et al.* (1992), trabalhando com suínos, encontrou um quadro hepático semelhante ao nosso onde, desorganização e necrose dos hepatócitos podiam ser observadas, indicando que a hepatotoxicidade das fumonisinas acomete tanto mamíferos quanto peixes, de maneira semelhante.

**Grupo 3 (5mg/kg. pc. /dia)**

**Coleta 7º dia:** já a partir do 7º dia de tratamento o parênquima hepático apresentou-se desagregado, com presença de grande quantidade de cavidades. Tanto em ML quanto em MET era possível observar uma anisocariose marcante, onde alguns núcleos se mostravam aumentados enquanto outros estavam diminuídos em relação ao controle (figs. 1, 5). Aqueles que se mostravam aumentados tinham aspecto globoso e o nucléolo podia ser localizado com facilidade, embora a membrana nuclear apresentasse muitas vezes, um aspecto difuso. Em contrapartida, nos hepatócitos com núcleo retraído, este se mostrava disforme e a maioria destes, mantinha preservada a integridade da carioteca (fig. 5).

**Coleta 14º dia:** nesta etapa observou-se muitas alterações na membrana celular o que levava a uma dificuldade generalizada em identificar limites celulares, uma vez que a membrana se apresentava fragmentada (fig. 6). Na MET foi possível identificar a presença de fragmentos de membrana celular sendo digeridos por lisossomos (figs. 7 - destaque, 8). Gelderblom *et al.* (1996) através de radiomarcção em hepatócitos de ratos constataram redução de lipídios totais e de colesterol livre sob ação de FB<sub>1</sub>. Como componente integral de membranas celulares é provável que um decréscimo no colesterol livre afete a fluidez das membranas. Ambos, colesterol e esfingolipídeos são constituintes de membranas celulares e contribuem significativamente para a organização das membranas que são importantes nas funções celulares, incluindo transporte entre membranas e transdução de sinal (Harder and Simons, 1997).

**Coleta 21º dia:** Embora em outras etapas fossem localizadas mitocôndrias com alterações degenerativas tais como mudanças morfológicas e fragmentação das cristas, ao final deste tratamento observamos que quase todas as mitocôndrias possuíam morfologia arredondada, contrastando com o controle, onde sua forma era oval ou alongada. As cristas mitocondriais mostravam alterações degenerativas, com aspecto fragmentado ou mesmo ausentes (fig. 7). Vale observar que o elemento mitocondrial mais resistente à

desintegração foi a membrana externa, que mantinha uma aparente integridade, mesmo quando os elementos mais internos haviam desaparecido. Este fato aponta em direção às diferenças de composição e permeabilidade entre as membranas mitocondriais.

De acordo com Tomassini & Testi (2002), membranas mitocondriais podem assim agir como um sensor do stress celular pela quantidade e local de acumulação de glicolipídios e lipídios específicos. Acumulação aguda de ceramidas, diretamente ou indiretamente, afetam profundamente as funções mitocondriais. A membrana externa contém enzimas envolvidas na síntese de lipídios mitocôndriais e enzimas que convertem substratos lipídicos em forma que possam ser metabolizadas na matriz (Alberts *et al.*, 1999).

Outra alteração relevante é a que ocorre com os vasos sanguíneos, principalmente capilares que aparecem com seu diâmetro dilatado quando comparados com capilares e vasos do animal controle, ao mesmo tempo em que o tecido conjuntivo circunjacente se mostrava diminuído.

#### **Grupo 4 (10 mg/kg. pc. /dia)**

**Coleta 7º dia:** tendo sido aplicado aos animais uma concentração de FB<sub>1</sub> significativamente maior, observamos já na 1ª coleta, uma acentuada desorganização tecidual, com ausência de limites celulares e citoplasma intensamente vacuolizado (fig. 10). Em algumas áreas, as análises das imagens obtidas com ML e MET sugerem que esteja ocorrendo necrose, caracterizada pela presença de células totalmente rompidas, ou apresentando aumento de volume, adquirindo um aspecto intumescido (fig. 12).

Foram também observados macrófagos e vacúolos fagocíticos, que indicavam intensa atividade macrofágica (fig. 16).

Nossas observações estão em acordo com Haschek, *et al.* (1992) que, em seu estudo com suínos, verificaram após tratamento com fumonisinas (oral e IV), alterações hepáticas caracterizadas por desorganização e necrose dos hepatócitos e também mencionam a presença de células de Kupffer contendo corpos multilamelares.

Lumlertdacha *et al.* (1995) observaram lesões microscópicas hepáticas em catfish tratados com dieta contendo material de cultura de *F. moniliforme*. As observações destes autores também são coincidentes com as nossas, quando descrevem que fígados de peixes tratados com todas as concentrações de FBs apresentavam áreas onde os hepatócitos estavam intumescidos e com núcleo localizado centralmente. Descrevem ainda que os fígados de animais tratados com 80mg ou mais de FB<sub>1</sub>/kg na dieta, tiveram focos de necrose hepatocelular, retração do volume celular e que foram observados grupos de hepatócitos contendo vacúolos esféricos, os quais, após serem pósfixados com tetróxido de ósmio, se mostraram osmiofílicos, consistentes com lipídios.

Em nossas fotomicrografias pudemos também observar que os núcleos de alguns hepatócitos ainda apresentavam uma aparente integridade, indicando a manutenção da compartimentalização do material nuclear, através da preservação da carioteca. Em outros, podia-se verificar intensa retração celular, núcleos sem nucléolo aparente, cromatina fragmentada e muitas vezes marginalizada (figs. 10, 11), mostrando-se semelhante aos que a literatura apresenta como núcleos de células em processo apoptótico.

O rompimento do metabolismo dos esfingolipídios e conseqüentemente de sua função regulatória provavelmente são aspectos críticos para a citotoxicidade, apoptose e carcinogenicidade resultantes da exposição à fumonisinas. Há evidências de que outro fator também está envolvido, incluindo fator necrótico citokinético para tumores (Voss *et al.*, 2002).

Dentro desse contexto, Bondy *et al.* (2000) menciona ter encontrado um aumento na incidência de células apoptóticas no fígado de ratos tratados com FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> após 2, 4 e 6 dias de tratamento. A confirmação de que se tratava realmente de células em processo de apoptose, foi obtida através da utilização de fragmentos marcados de DNA.

Portanto, dada às semelhanças encontradas entre nossos resultados e a literatura pertinente, temos fortes indícios de que um elevado número de hepatócitos de fígado de peixe, sob o efeito tóxico de FBs, são selecionados para serem removidos pelo processo de apoptose.



**Coleta 14º dia:** o citoplasma dos hepatócitos mostrava-se intensamente desorganizado e vauolizado (Fig. 13). Em algumas regiões do fígado, prevalecia a ocorrência de necrose, enquanto em outras, o processo de remoção dos hepatócitos que haviam sofrido os efeitos tóxicos da FB<sub>1</sub>, era a apoptose. Aqui, a característica mais evidente, era o encolhimento da célula e de seu núcleo (fig. 14). Já nos locais onde havia prevalência de necrose, encontramos células rompidas e outras com volume aumentado, fato que lhes dava uma configuração circular, esférica. Seu citoplasma mostrava-se parcialmente esvaziado, embora se pudesse observar o núcleo circundado por algum material desorganizado, pouco corado, na região mais central da célula. Mas, mesmo que a região periférica da célula se mostrasse esvaziada dos elementos citoplasmáticos normais, as células vizinhas eram mantidas afastadas, sugerindo que algum conteúdo, talvez líquido, mantivesse o tônus intracelular.

**Coleta 21º dia:** as imagens obtidas nessa coleta mostravam ampla desorganização tecidual, já que a alta concentração de FB<sub>1</sub> associada ao tempo de atuação que seus efeitos tóxicos se fizeram sentir sobre o fígado dos peixes, causou o maior dano que encontramos, quando comparados com qualquer das coletas anteriormente descritas.

Analisando imagens de MET de células que mantinham alguma integridade, constatamos que embora fosse possível observar o REG por todo o citoplasma, não se identificava agregados de cisternas paralelas. Em sua grande maioria a estrutura estava alterada e muitas vezes não era possível visualizar a presença de 2 membranas distintas. Chama a atenção também, o fato de que figuras mielínicas elétron-densas, estavam bem características nesta etapa do tratamento (fig. 15).

A observação das mitocôndrias mostrou a quase ausência de cristas mitocondriais, que ficaram restritas em geral, a um pequeno resíduo de material na periferia das mitocôndrias.

As alterações descritas anteriormente para todas as coletas, estavam presentes nesta etapa de maneira bem mais acentuada, levando a um quadro de desorganização mais abrangente e intenso.

#### 4.5.1.2 Ácinos Pancreáticos

No parênquima hepático de peixes não submetidos a tratamento, encontram-se pequenos agregados de células acinosas circundando ramos da veia porta. Estas células aparecem na ML com formato piramidal, citoplasma fortemente basófilo principalmente no pólo basal e presença de acúmulo apical de grânulos de secreção que chegam a ocupar até 1/3 do comprimento baso-apical das células (figs. 1, 9). O núcleo com nucléolo visível localiza-se em posição basal. Nos peixes submetidos a injeção IP de FB<sub>1</sub> vimos que as células acinosas sofreram progressivas e significantes alterações. Estas alterações se caracterizavam por retração celular e encolhimento dos agregados celulares. Surgiram no citoplasma pequenos vacúolos, conferindo às células um aspecto esponjoso (fig. 10)

Ao final do tratamento ocorreram alterações na organização geral dos ácinos, seja ao nível celular, como também na arquitetura dos ácinos. Observou-se desagregação e compactação das células com conseqüente redução do seu volume. Não se evidenciou presença de grânulos de secreção no citoplasma, fato depois confirmado por teste histoquímico para proteínas totais. Notou-se aumento do tecido conjuntivo junto aos ácinos, numa possível indicação de estarem sendo desenvolvidas áreas de cicatrização (fig. 10).

Nossas observações são coincidentes com os dados obtidos por Haschek *et al.* (1992) que constatarem no pâncreas de porcos tratados oralmente e IV com FBs, degeneração das células acinosas. Em seus resultados eles descreveram células acinosas encolhidas e dissociadas das células adjacentes, com citoplasma condensado e hipereosinófilo e um decréscimo no número de grânulos secretores. Os núcleos eram picnóticos e irregulares, com cromatina condensada irregularmente e nucléolo grande. Descrevem também a presença de corpos multilamelares na região apical do citoplasma e na membrana plasmática lateral.

#### **4.5.2 Análise Histoquímica**

##### **Proteínas Totais – (Comassie brilhante blue)**

As análises histoquímicas foram processadas ao final dos 21 dias de tratamento. Observou-se no citoplasma dos hepatócitos dos animais controle reação positiva que apareceu como uma fina granulação, uniformemente distribuída (fig. 17). Já nos animais tratados notava-se, principalmente com objetivas de maiores aumentos, que todas as células apresentavam reação positiva, embora algumas mostrassem reação de maior intensidade. Isso conferia às células uma variedade de formatos irregulares, com manchas escuras. O citoplasma adquiriu um aspecto rendado, proveniente de estruturas citoplasmáticas semelhantes a vacúolos. O material nuclear ficou caracterizado por uma mancha azul escuro de contorno irregular, bastante indefinido, o que não permitia ter noção dos limites do envelope nuclear (fig. 18). Em algumas células ainda foi possível observar-se nucléolo.

No que se refere aos ácinos pancreáticos, não se constatou reação positiva para proteínas totais ao final do tratamento. No grupo controle este teste foi fortemente positivo para as células acinosas pancreáticas, com evidencia de grande quantidade de grânulos grosseiros intensamente corados de azul.

##### **Glicogênio – (PAS – Amilase)**

Houve uma reação de baixa intensidade para glicogênio nos hepatócitos dos grupos tratados (fig. 20), ao contrário do controle onde a reação positiva estava bem caracterizada pela presença de granulações púrpura no citoplasma dos hepatócitos (fig. 19).

Nossos resultados estão em concordância com aqueles encontrados por Bondy *et al.* (1995), o qual afirma que nas secções de fígado de ratos do grupo controle coradas através do ácido periódico de Schiff (PAS), havia uma generalizada coloração do citoplasma dos hepatócitos, enquanto que nos

figados dos ratos tratados, as células coradas positivamente para PAS estavam limitadas a alguns agrupamentos, ou isoladas e continham menos grânulos positivos, indicativo de reduzida estocagem de glicogênio no fígado.

Da mesma maneira, Haschek *et al.* (1992), trabalhando com suínos, também afirma que os hepatócitos de animais tratados apresentaram redução na quantidade de glicogênio.

#### *Lipídios – (Sudam Black)*

O corante marcou positivamente os hepatócitos dos animais tratados, porém revelou agregados grosseiros e irregulares de material lipídico, distribuído pelo parênquima hepático de maneira disforme (fig. 22). No grupo controle constatou-se distribuição regular de lipídios nas células hepáticas, evidenciada pela presença de uma granulação citoplasmática fina e escura, concernente com uma reação positiva e homogênea (fig. 21).

## **4.6 CONCLUSÕES**

Este estudo nos permitiu a análise e observação das alterações que ocorreram particularmente nas organelas intracelulares tais como núcleo, nucléolo, REG, mitocôndria, ao longo do período de tratamento e em diferentes doses.

Como já citado na literatura, verificaram-se alterações e desestruturação em todas as membranas (complexos membranosos), seja ao nível celular, como da carioteca, membranas constituintes das organelas intracitoplasmáticas, tais como mitocôndrias e REG.

Processos de desenvolvimento anormal do REG e ribossomos, alterações mitocondriais, desintegração de organelas relacionadas a estruturas de membranas apontam para a complexidade dos mecanismos celulares envolvidos na toxicidade mediada por fumonisinas.

Pode-se constatar ao nível morfológico a ocorrência de processos envolvendo necrose e apoptose. A necrose se caracteriza por tumefação celular, perda da

membrana celular e posterior desintegração. Já na morte celular programada ou apoptose, observa-se que o citoplasma da célula se contrai e a mesma diminui de tamanho. A cromatina fica compactada formando massas concentradas na borda do núcleo. A célula se fragmenta em pedaços cobertos de membrana (corpos apoptóticos) contendo organelas no seu interior, os quais são fagocitados.

Estes resultados indicam a necessidade de estudos morfológicos e histoquímicos complementares em outros órgãos, a fim de constatar se as alterações ao nível celular observadas no fígado, também ocorrem em outros sistemas e tecidos.

#### **4.7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

ABADO-BECOGNEE, K., MOBIO, T.A., ENNAMANY, R., FLEURAT-LESSARD, F., SHIER, W.T., BADRIA, F., CREPPY, E.E. Citotoxicity of fumonisin B<sub>1</sub>: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA syntheses. **Archives Toxicology**, v. 72, p. 233 -236, 1998.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ª edição, Porto Alegre. Editora Artes Médicas, 1999.

BOLGER, M.; COKER, R. D.; DINOVI, M.; GAYLOR, D.; GELDEBLUM, W.; OLSEN, M.; PASTER, N.; RILEY, R.T.; SHEPHARD, G.; SPIJERS, G. J. A. **Fumonisin. Safety evaluation of certain mycotoxin in food**. International Programme on Chemical Safety World Health Organization. Geneva. FAO FOOD and Nutrition Paper 74, *WHO – Food Additives Series*. v. 47, p. 103-279, 2001.

BONDY, G, SUZUKI, C. BARKER, M., ARMSTRONG, C., FERNIE, S., HIERLIHY, L., ROWSELL, P. MULLER, R. Toxicity of Fumonisin B<sub>1</sub> administered intraperitoneally to male sprague-dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, 8, p. 653 - 665, 1995.

BONDY, G.S., BARKER, M.G., LOMBAERT, G.A., ARMSTRONG, C.L., FERNIE, S.M., GUROFSKY, S., HUZEL, V., SAVARD, M.E., CURRAN, H.A.. A comparison of clinical, histopathological and cell-cycle markers in rats receiving the fungal toxins fumonisin B<sub>1</sub> or fumonisin B<sub>2</sub> by intraperitoneal injection. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 873 - 886, 2000.

BRANCROFT, I.D., STEVENS, A., TURNER, D.R. **Theory and Practice of Histological Techniques**. Churchill Livingstone. Edinburgh. 1990.

GELDERBLOM, W.C.A., SMUTS, C.M., ABEL, S., SNYMAN, S.D., CAWOOD, M.E., VAN DER WESTHUIZEN, L., SWANEVELDER, S. Effect of fumonisin B<sub>1</sub> on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 361 - 369, 1996.

GOEL, S., LENS, S.D., LUMLERTDACHA, S.; LOVELL, R.T.; SHELBY, R.A.; LI, M., RILEY, R.T., KEMPPAINEN, B.W. Sphingolipid levels in catfish consuming *Fusarium moniliforme* corn culture material containing fumonisins. **Aquatic Toxicology**, v. 30, p. 285 – 294, 1994.

GRIZZLE, J.M. & ROGERS, W.A. **Anatomy and histology of the channel catfish**. 3<sup>rd</sup> edition, Craftmaster Printer Inc. Alabama – USA, 1985, pp. 94.

HARDER, T., & SIMONS, K. Caveolae, DIGs and the dynamic of sphingolipid-cholesterol microdomains. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 534 – 542. 1997.

HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M.; GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, J.R. Jr. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub>, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 2, p. 217 - 221, 1990.

HASCHEK, W.M., MOTELIN, G., NESS, D.K., HARLIN, K.S., HALL, W.F., VESONDER, R.F., PETERSON, R.E., BEALEY, V.R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. **Mycopathologia**, v. 11, 7, p. 83 - 96, 1992.

HOWARD, P.C.; EPPLEY, R.M.; STACK, M.E.; WARBRITTON, A.; VOSS, K.A.; LORENTZEN, R. J.; KOVACK, R.; BUCCI, T.J. Carcinogenicity of fumonisin B<sub>1</sub> in a two-year bioassay with Fischer 344 Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice. **Mycotoxin Contamination: Health Risk and Prevention Project Mycotoxins Supplement/1999**, p. 45-54, 1999.

LI, M.H.; RAVERTY, S. A.; ROBINSON, E.H. Effects of dietary mycotoxins produced by the mold *Fusarium moniliforme* on channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 25, n. 4, p. 512 – 516, 1994.

LIM, C.W.; PARKER, H.M.; VESONDER, R.F.; HASCHEK, W.M. Intravenous fumonisin B<sub>1</sub> induces cell proliferation and apoptosis in the rat. **Natural Toxins**. v. 4, p. 34 – 41, 1996.

LUMLERTDACHA, S.; LOVELL, R.T.; SHELBY, R.A.; LENZ, S.D.; KEMPPAINEN, B.W. Growth, hematology and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture**, v. 130, p. 201 – 218, 1995.

MOBIO, T.A., BAUDRIMONT, I., SANNI, A., SHIER, T.W., SABOURNEAU, D., DANO, S.D., UENO, Y., STEYN, P.S., CREPPY, E.E. Prevention of vitamin E of DNA fragmentation and apoptosis induced by fumonisin B<sub>1</sub> in C6 glioma cells. **Archives Toxicology**, v. 74, p. 112-119, 2000.

NORRED, W.P; VOSS, K.A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Journal of Food Protection**. v. 57, n. 6, p. 522-527, 1994.

PEARSE, A.G.E. Histochemistry Theoretical and Applied. **Analytic Technology**. V. 2, 4 th. Churchill Livingstone. New York. 1985.

PEPELJNJAK, S., PETRINEC, Z., DRCA, S., SEGVIC, M., FERENCIC, Z., JURISIC, B. Evaluation of fumonisin B<sub>1</sub> toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.). In: **X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, 2000, 70.

SCOTT, P.M. Fumonisins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 257-270, 1993.

TOLLESON, W.H., COUCH, L.H., MELCHIOR JR, W.B., JENKINS, R.G., MUSKHELISHVILI, L., MCGARRITY, L.J., DOMON, O., MORRIS, S.M., HOWARD, P.C. Fumonisin B<sub>1</sub> induces apoptosis in cultured keratinocytes through sphinganine accumulation e ceramide depletion. **International Journal of Oncology**, v. 14, p. 833 – 843, 1999.

TOMASSINI B., TESTI, R. Mitochondria as sensors of sphingolipids. **Biochimie**, v. 84, p. 123-129, 2002.

VOSS, K. A., HOWARD, P.C., RILEY, R., SHARMA, R.P., BUCCI, T.J., LORENTZEN, R.J. Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B<sub>1</sub>: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). **Cancer Detection and Prevention**, v. 26, p. 1 – 9, 2002.

WANG, E.; NORRED, W.P; BACON,CW; RILEY, R.T.; MERRIL, A.H. Jr. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisin. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 14486 - 14490, 1991.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das fumonisinas envolve vários aspectos, desde econômicos, fitossanitários e de saúde animal e humana. A associação direta entre fumonisinas e alguma doença em humanos não está ainda diretamente estabelecida. No entanto é importante considerar que fumonisinas estão definitivamente relacionadas a edema pulmonar em suínos, leucoencefalomalácia eqüina e uma ampla variação de efeitos biológicos incluindo a ruptura do metabolismo de esfingolipídios em animais.

As análises histopatológicas em fígado de catfish tratados intraperitonealmente com FB<sub>1</sub> evidenciam ao nível estrutural, ultraestrutural e histoquímico as alterações decorrentes do mecanismo alterado na biossíntese de esfingolipídios. Os distúrbios teciduais e celulares foram evidentes, destacando-se danos mitocondriais e no retículo endoplasmático granular. O mecanismo de resposta tecidual aos efeitos provocados pela ação de FB<sub>1</sub> implica em processos de apoptose e necrose celular.

Considerando-se que fumonisinas contaminam milho e produtos derivados em todo o mundo e que várias populações utilizam o milho na sua dieta básica, dados epidemiológicos relativos a ingestão destas micotoxinas precisam ser estabelecidos. Fica evidente a necessidade de se estabelecer limites adequados de tolerância máxima para estes contaminantes em milho, rações e alimentos derivados.

No Brasil observa-se que os dados relativos a fumonisinas em milho e produtos derivados são escassos, limitando-se quase que exclusivamente as regiões Sudeste e Sul. Nossas análises revelaram ocorrência e níveis significativos de contaminação por FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em produtos de milho destinado ao consumo humano. Verificam-se ainda diferenças anuais e regionais na contaminação por fumonisinas decorrentes de fatores climáticos e sazonais, indicando a necessidade de monitoramento constante.

Com base nestes aspectos e nos muitos dados apresentados na literatura está claro que estudos envolvendo fumonisinas têm se revelado complexos, envolvendo múltiplos aspectos, desde o cultivo, colheita e processamento do milho, até os riscos relacionados à saúde humana e animal. Na busca de respostas e resultados positivos para as questões acima apresentadas destaca-se a necessidade de interação entre múltiplos grupos de pesquisa que envolvam várias áreas de conhecimento e atuação tais como ciência dos alimentos, análise clínicas, bioquímica, morfologia, agronomia, nutrição, etc.

