

PESQUISA MICOTOXICOLÓGICA DE PRODUTOS AVÍCOLAS “IN NATURA” E PROCESSADOS

TÂNIA L. M. STAMFORD*

ELISA A. VILAR**

SIDNEY T. G. BASTOS***

CELIANE G. M. SILVA****

Analisou-se a ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A em carcaças, vísceras comestíveis e processadas de aves de empresas que representam diferentes regiões de produção avícola do Brasil. Diferentes tipos de produtos foram coletados, trimestralmente, sendo nove “*in natura*” e oito processados para extração de micotoxinas e quantificação pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Amostras positivas pelo método ELISA foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Do total de amostras analisadas 12% foram positivas, sendo 10,8% para aflatoxina total e 1,2% para ocratoxina A. Os resultados obtidos pela CCD mostraram contaminação por aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) em concentração inferior a 5 µg/kg. O ensaio imunoenzimático (ELISA) mostrou-se mais eficaz para produtos “*in natura*”, sendo isolada maior quantidade de aflatoxinas e ocratoxina A no segundo trimestre (julho-setembro). A ocorrência de aflatoxina total foi mais frequente em produtos oriundos das empresas avícolas das diferentes regiões do estado de Pernambuco e ocratoxina A das empresas produtoras das Regiões Sul e Sudeste do Brasil.

PALAVRAS-CHAVES: AVES; AFLATOXINA; OCRATOXINA A.

* Professora adjunta, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Recife, PE (e-mail: newtonps@fastmodem.com.br).

** Médica Veterinária, Doutora em Nutrição, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE (e-mail: elisavilar@uol.com.br).

*** Professor assistente, Departamento de Micologia, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, Recife, PE.

**** Nutricionista, Doutoranda em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, Recife, PE.

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são substâncias produzidas por grande número de espécies fúngicas, que afetam os animais e os seres humanos. Causam lesões orgânicas diversas e podem ser detectadas em carnes e ovos (SALLE et al., 2000).

A carne de aves constitui uma das mais consumidas no Brasil e a avicultura representa a segunda economia do estado de Pernambuco (AVIPE, 2002/2003).

O impacto econômico causado pelas micotoxinas ocorre em todas as fases de produção das aves, sendo proveniente de grãos contaminados. Envolve, principalmente, o milho que representa 60% da composição das rações avícolas. A distância entre a região produtora de milho e as granjas força seu consumo, mesmo quando contaminado por micotoxinas (VIEIRA, 1995). A contaminação freqüente dos grãos provoca exposição crônica da toxina via ração. Tal fato significa a diferença entre lucros e perdas na indústria avícola, além de representar diminuição de toneladas de carne no comércio (LAZZARI, 1997; SANTÚRIO, 1995). De acordo com a Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas (FAO) mais de 25% da produção mundial de alimentos encontra-se contaminada com algum tipo de micotoxina (BENÍTEZ, 2002).

Resíduos de micotoxinas têm sido relatados em carnes de aves chamando a atenção para a necessidade de controle do produto antes de ser destinado ao consumo humano. O mecanismo de ação da aflatoxina (micotoxina mais pesquisada) consiste em ligar-se, principalmente, às proteínas plasmáticas de forma irreversível. As não-ligadas espalham-se pelos tecidos, especialmente no fígado, determinando palidez, consistência friável e aumento do tamanho do órgão (MAZZUCO, 2000; SANTURIO, 1997).

A ocratoxina A (OA) destaca-se entre as micotoxinas por ser três vezes mais tóxica que as aflatoxinas (HUFF, et. al., 1974). É encontrada em rins, fígado, músculo e tecido adiposo (SALLE et. al., 2000). Com exceção do primeiro, os demais tecidos são comestíveis e ingredientes primordiais dos processados avícolas. Segundo SCUSSEL (1998), essa toxina normalmente não se acumula em músculo de aves naturalmente contaminadas.

As aflatoxinas e a Ocratoxina A, quando encontradas juntas na ração,

ocasionam ação maléfica superior à ação isolada devido ao sinergismo, podendo provocar queda de 40% no peso corporal de frangos de corte (SFOGGIA e SALLE,1998).

As carnes constituem alimentos dos mais relevantes para a nutrição humana. Os produtos processados apresentaram expansão e alta competitividade na última década, tornando-se hábito alimentar de parcela considerável de consumidores brasileiros (MELO FILHO e GUERRA,1998). Essa evolução decorre do preço acessível, da palatabilidade e do fácil preparo. No processamento desses produtos são utilizadas farinhas de cereais, bem como processos de fermentação e maturação capazes de contaminá-los. Na maturação ocorre crescimento externo de fungos filamentosos que complementam as mudanças bioquímicas envolvidas no processo. Muitos desses fungos são indesejáveis, podendo alterar as características organolépticas do produto final (como cor e odor) e a qualidade sanitária pela possibilidade da presença de toxinas. No Brasil, *Aspergillus ochraceus* (produtor de Ocratoxina) foi isolado em processado suíno (salame nacional) por LUCHESE (1998).

Nenhum nível de micotoxina é considerado seguro. A quantificação de aflatoxina abaixo de 20 µg/kg, limite máximo permitido pela legislação (BRASIL, 2002), pode provocar a ilusão de segurança de produtos avícolas. Como dificilmente a micotoxina encontra-se sozinha no alimento, qualquer falha em demonstrá-las pode representar falso senso de segurança.

O objetivo deste trabalho consistiu em utilizar o ensaio imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa de micotoxinas (aflatoxina total e ocratoxina A) em produtos avícolas, "*in natura*" e processados, provenientes de diferentes regiões do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Durante 12 meses foram coletados, trimestralmente, 17 tipos de produtos avícolas (9 "*in natura*" e 8 processados) totalizando 54 amostras, que foram divididas em 3 grupos de 18 amostras. Cada grupo originou uma amostra coletiva para análise (separada) de aflatoxina total e ocratoxina A, em 3 repetições por produto.

Os produtos "*in natura*" representaram diferentes regiões da produção avícola do estado de Pernambuco (litoral, zona da mata norte e início do

agreste), sendo classificados como A, B e E. Os processados representaram 2 empresas das regiões sul e sudeste do Brasil (C e D) e uma empresa da zona da mata pernambucana (B).

Os produtos "*in natura*", coletados em abatedouros industriais, compreenderam fígados (sem a vesícula biliar), coxas e sobre coxas, divididos em íntegros e condenados. Os produtos condenados foram coletados em supermercados (selecionados pela composição descrita no rótulo), incluindo lingüiça de frango da empresa B, hambúrgueres, patê de galinha e nuggets da empresa C, patê de fígado de frango, salsicha, almôndega de frango, mini-chicken e chicken dorê da empresa D.

Foram estudados os produtos, as empresas, os trimestres e suas interações. Devido às diferenças descritas na composição dos produtos processados terem sido consideradas pequenas, esses também foram comparados entre si.

Para a extração das micotoxinas empregou-se a metodologia descrita por SALLE et al. (1994), que utiliza metanol a 70% (diluído em água destilada). Na maceração do produto foram utilizadas 5 g da amostra para 12,5 mL de metanol na extração da ocratoxina A e 25 mL de metanol na extração aflatoxina total. A mistura amostra e metanol foi homogeneizada em Stomacher por dois minutos, em alta rotatividade, e filtrada em papel de filtro quantitativo.

Na detecção de aflatoxina total e ocratoxina A utilizou-se o ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA), conforme recomendação do kit comercial Ridascreen Fast (da empresa Alemã R-biopharm) que emprega anticorpos monoclonais. Para a execução da prova, o filtrado de cada amostra foi diluído 1:1 em água destilada e retirados 50 mL para proceder à análise quantitativa.

A prova ELISA é de competição direta entre a micotoxinas extraída da amostra e o conjugado. A toxina extraída da amostra foi misturada ao conjugado e transferida para as cavidades sensibilizadas, nas quais a toxina livre competiu com o conjugado pelos sítios de ligação. O conjugado não-ligado e outras substâncias produzidas nessa fase foram eliminados mediante processo de lavagem. O conjugado ligado desenvolveu cor, estabelecida com a adição da solução bloqueadora, que foi lida por densidade ótica.

A intensidade ótica da amostra foi comparada com a dos controles e calculada a concentração em partes por bilhão no kit aflatoxina total ou em partes por milhão na quantificação de ocratoxina A. Realizou-se a leitura em leitor de ELISA com filtro de 450 nm.

O teste de recuperação e sensibilidade do kit foi medido adicionando-se 50 µL da solução padrão de cada micotoxina, previamente, quantificada em algumas amostras (*in natura* e processadas) escolhidas aleatoriamente. Efetuou-se essa contaminação artificial com padrões de micotoxinas produzidos pela Sigma Chering Co. (St. Louis, - USA), submetidos ao processo de extração e quantificação pelo método ELISA.

A curva-padrão (ou faixa ótima de quantificação) da aflatoxina total e da ocratoxina A descrita pelo kit é de 1,7 µg/kg a 45,0 µg/kg e de 5,0 mg/kg a 40,0 mg/kg, respectivamente. Os limites de 1,7 µg/kg e 5,0 mg/kg são os mais baixos pontos da curva de calibração que o teste é capaz de detectar nos respectivos kits. Abaixo de cada limite a margem de erro é de 20% (R-BIOPHARMS, 2000) para mais ou para menos do valor quantificado. Valores até 20% abaixo da curva-padrão dos kits em estudos foram considerados como aceitáveis para o cálculo da média quando nas três repetições havia, no mínimo, dois níveis situados na curva-padrão da micotoxina em estudo. Caso contrário, a micotoxina analisada nessa amostra foi classificada como não-detectada.

Como contra prova dos resultados positivos obtidos em fígados pelo teste ELISA, as mesmas amostras foram enviadas para a Divisão de Toxicologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Pernambuco. Essas amostras foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), conforme método desenvolvido por SOARES e RODRIGUES-AMAYA (1989) para extração e quantificação das micotoxinas. Foi utilizada placa pronta de Sílica Gel G 60 com 0,25 mm de espessura (Wathaman) como fase estacionária. Para eluição das toxinas empregou-se o sistema solvente tolueno: acetato de etila: ácido fórmico na proporção de 1:1:1.

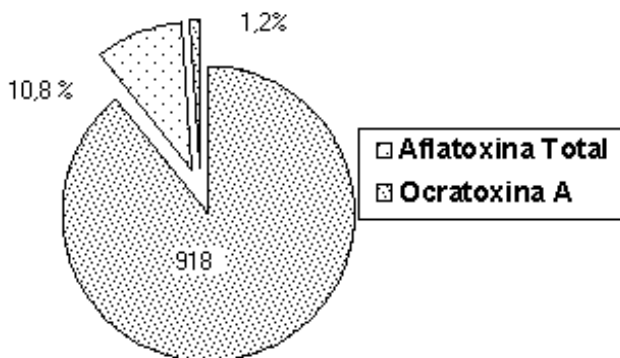
O limite mínimo de detecção das Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e da Ocratoxina A foi de 5,0 µg/kg. A visualização da presença da toxina no padrão e nos extratos de amostras ocorreu sob luz ultravioleta de ondas longas e curtas. Efetuou-se a quantificação da intensidade de fluorescência por comparação visual entre os padrões de aflatoxinas e o extrato da amostra (sempre na mesma cromatoplaça).

Os resultados obtidos foram analisados mediante delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os tratamentos organizados em arranjo fatorial: 2 (empresas) X 2 (produtos) X 4 (trimestres) X 3 (repetições por tratamento), totalizando 48 parcelas. Após a análise de variância (ANOVA), as médias foram separadas pelo teste F e comparadas pelo teste Tuckey (ao nível de 5% de significância) usando-se o programa SAS (1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Somente 12% das 918 amostras analisadas (Figura 1) foram positivas, sendo 10,8% para aflatoxina total (médias variando de 1,4 µg/kg a 5,2 µg/kg) e 1,2% para ocratoxina A (médias de 4,0 mg/kg a 5,4 mg/kg).

FIGURA 1 - PERCENTUAL DE AMOSTRAS POSITIVAS DE OCRATOXINA A E AFLATOXINA TOTAL EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS



Do total de amostras positivas (12%), os produtos *in natura* (fígados e coxas) apresentaram os maiores índices de contaminação (57,2%), conforme a Figura 2.

Detectou-se aflatoxina total em 88,9% das amostras de fígado e ocratoxinas em 11,1%. As médias de aflatoxina total variaram de 1,7 µg/kg a 5,8 µg/kg e de ocratoxina A de 5,1 mg/kg a 5,5 mg/kg.

Nos produtos processados (47 amostras positivas) verificou-se maior

contaminação por aflatoxina total (média variando de 1,7 µg/kg a 2,5 µg/kg). Em 42,9% dessas amostras a contaminação por ocratoxina A foi de 5,1 mg/kg a 5,6 mg/kg.

Das 216 amostras de fígado analisadas, 58% foram positivas pelo ensaio imunoenzimático e 42% pela CCD (Figura 3). Os resultados obtidos pela CCD mostraram contaminação por aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) em concentração inferior a 5 µg/kg (considerados como traços) e a Ocratoxina A não foi detectada. Resultado semelhante foi verificado por MILANEZ, ATUI e LÁZZARI (1998) utilizando os kits Veratox (Neogen Co.) e amostras de milho. Obtiveram maiores valores pelo ELISA que pela CCD, mas os resultados obtidos pelas duas técnicas foram concordantes de forma geral. Amostras de fubá analisadas pelos mesmos autores apresentaram baixa média de aflatoxinas pelo ELISA. Pela CCD, os valores foram menores e próximos aos limites de detecção das aflatoxinas. PRADO e OLIVEIRA (1999) também encontraram resultado semelhante na detecção de aflatoxina total em amostras de amendoim por esses dois métodos, demonstrando maior sensibilidade dos kits em comparação com a CCD. Em relação à cromatografia o líquido de alta eficiência (CLAE), MILANEZ, ATUI e LÁZZARI (1998) afirmaram que os métodos convencionais (CCD e CLAE) apresentam boa correlação com o ELISA que tem mostrado contínuo avanço.

FIGURA 2 – PERCENTUAL DE AMOSTRAS POSITIVAS (DE OCRATOXINA A E AFLATOXINA TOTAL) POR PRODUTOS “IN NATURA” E PROCESSADOS

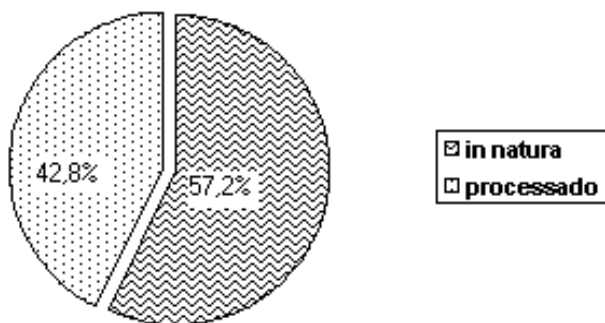
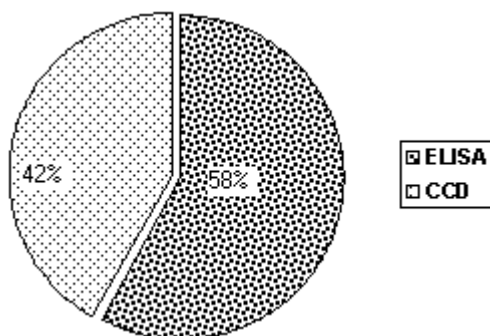


FIGURA 3 - PERCENTUAL DE AMOSTRAS POSITIVAS EM FÍGADO COMPARANDO-SE OS MÉTODOS CCD E ELISA



Para testar os kits de aflatoxina total e de ocratoxina A calcularam-se os índices de recuperação, cujos resultados variaram de 85 a 97%. PRADO e OLIVEIRA (1999), utilizando CLAE em combinação com coluna de imunoafinidade na quantificação de ocratoxina A em café solúvel, encontraram índices superiores a 75%. LORENZINI (1997) utilizou kits comerciais para detectar aflatoxina total em fígado de aves, naturalmente, contaminadas e encontrou índice de 116%.

Aflatoxina total foi isolada em todas as amostras de fígado e a interação trimestre vs produto demonstrou que as médias isolada nos fígados íntegros e nos condenados dependeram dos trimestres (interação significativa). Porém, comparando-se o fígado condenado com o íntegro houve resposta diferente para cada empresa (interação não-significativa), conforme a *Tabela 1*.

A detecção da aflatoxina em fígado foi atribuída ao mecanismo de ação das mesmas. Essa micotoxina, depois de absorvida, liga-se de forma irreversível à albumina e as não-ligadas espalham-se pelos tecidos especialmente o fígado (MAZZUCO, 2000; SANTÚRIO, 1997).

Verificando-se a frequência dos teores de aflatoxina total em fígado íntegro com relação às estações do ano, as concentrações variaram de 1,5 µg/kg (III e IV trimestre) a 2,5 µg/kg (I trimestre). Nos trimestres I (abril a junho) e II (julho a setembro) foram encontradas as maiores médias (2,5 e 2,2 µg/kg), as quais não diferiram entre si. Os resultados obtidos no I trimestre mostraram-se semelhantes aos encontrados por

LORENZINI (1997) em fígado de frango de corte naturalmente contaminado, cuja maior concentração (2,41 µg/kg) ocorreu no outono. Tal fato foi justificado pela maior frequência de contaminação da ração nos meses de março a junho, que correspondem à colheita. As práticas de manejo (na pós-colheita) consistem em deixar os grãos no campo para secar, sujeitos as chuvas e oscilações de temperatura (dias quentes e noites frias), que proporcionam o desenvolvimento fúngico (SCUSSEL, 1998).

TABELA 1 - MÉDIA DE AFLATOXINA TOTAL (µg/kg) EM FÍGADO CONDENADO E INTEGRO, POR EMPRESA, TRIMESTRE, PRODUTO E SUAS INTERAÇÕES

Variáveis	Fígado		
	Condenado	Íntegro	Média
Trimestres I	2,9 a A	2,5 a A	2,7 a
II	3,6 a A	2,2 ab B	2,9 a
III	1,7 b A	1,5 b A	1,6 b
IV	1,7 b A	1,5 b A	1,6 b
Empresa A	2,3 a A	1,9 a A	2,1 a
B	2,6 a A	1,9 a B	2,3 a
Média	2,5 A	1,9 B	
Coeficiente de Variação = 23,4 %			
Valor de F (empresa) NS			
Valor de F (trimestre) *			
Valor de F (produto) *			
Valor de F (empresa x produto) NS			
Valor de F (trimestre x produto) *			

NS = Não-significativo.

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical ou maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

A diferença entre os valores encontrados semestralmente pode ser avaliada também pela variação natural da contaminação ocorrida nos grãos individualmente. Segundo SHOTWELL, GOLDEN e HESSELTINE (1972) é possível encontrar grãos com níveis de 0 a 300 µg/kg de aflatoxinas em amostras de milho contaminadas, demonstrando a variabilidade de sua distribuição no substrato. Vale salientar que o milho é o componente com maior participação na ração avícola (60 a 70%).

Em fígado condenado, as médias de aflatoxina total obtidas no I (2,9 µg/kg) e II (3,6 µg/kg) trimestres diferiram dos demais. Os fígados condenados (2,5 µg/kg) e os íntegros (1,9 µg/kg) apresentaram diferença significativa ($P > 0,01$) em relação à média final. Tal diferença foi proveniente do II trimestre, cuja média para o fígado condenado (3,6 mg/kg) superou a dos demais trimestres e a de todos os trimestres para o fígado íntegro (*Tabela 1*). Esse resultado sugere que as perdas financeiras por condenações em abatedouros tiveram como causa principal as micotoxinas.

Os fígados classificados como condenados evidenciaram as características citadas por BATA et al. (1996) e SANTURIO (1997) como efeitos primários da aflatoxicose: alteração no tamanho (68% de aumento), na coloração e na consistência que os tornou amarelados e friáveis. Tais características devem-se à dificuldade na síntese hepática de gordura e seu transporte para outras áreas do organismo pela ação da AFB₁ (MIAZZO et al. 2000). O comprometimento do órgão, atribuído à absorção constante da aflatoxina, facilita sua detecção.

Nos meses de julho, agosto e setembro (II trimestre), apenas ocratoxina A foi detectada em fígado íntegro. As médias obtidas para os demais trimestres, produtos e empresas foram consideradas como não-detectadas (*Tabela 2*).

SALLE et al. (2000) utilizaram o método ELISA para detecção de ocratoxina A em fígado de frangos de corte aos 42 dias de idade inoculados com dose única de 200 µg/kg de ocratoxina A diretamente no ingluvío. A ocratoxina foi detectada até 2 horas pós-inoculação ($66,24 \pm 16,59$ µg/kg). Mesmo assim afirmaram que se pode monitorar a presença da ocratoxina A pelo ELISA em vísceras de aves portadoras dessa micotoxicode. A baixa detecção da micotoxina em fígado de aves naturalmente contaminadas (*Tabela 1*) pode ser atribuída ao tempo entre a última ingestão da ração contaminada e o abate das aves.

**TABELA 2 - MÉDIA DA OCRATOXINA A (mg/kg) EM FÍGADOS
CONDENADO E INTEGRO POR EMPRESA, TRIMESTRE,
PRODUTO E SUAS INTERAÇÕES**

Variáveis	Fígado		Média
	Condenado	Íntegro	
Trimestres I	2,6 b A	2,1 c A	2,4 b
II	3,2 a b B	4,4 a A	3,8 a
III	3,7 a A	3,2 b A	3,5 a
IV	3,7 a A	1,6 c B	2,6 b
Empresa A	3,5 a A	2,8 a B	3,1 a
B	3,1 a A	2,9 a A	3,0 a
Média	3,3 A	2,8 B	

Coefficiente de Variação = 18,2 %

Valor de F (empresa) NS

Valor de F (trimestre) *

Valor de F (produto) *

Valor de F (empresa x produto) NS

NS = Não-significativo.

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical ou maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

Apenas 2 empresas (C e D) produzem e comercializam nacionalmente o patê de fígado de frango. Verificou-se interação empresa vs trimestre significativa ($P > 0,01$) na análise da ocratoxina A, ou seja, os resultados obtidos nas empresas dependeram dos trimestres. Em cada empresa, a ocratoxina A foi isolada em dois trimestres, sendo o III comum às duas empresas (Tabela 3).

Aflatoxina total isolada em patê de fígado só ocorreu, simultaneamente, nas duas empresas (C e D) no IV trimestre, cujas médias não diferiram

(1,6 e 1,7 µg/kg). Deve-se salientar que as duas empresas localizam-se na Região Sul do Brasil (Tabela 4).

TABELA 3 - MÉDIA DA OCRATOXINA A (mg/kg) EM PATE-DE-FÍGADO POR EMPRESA, TRIMESTRE E A INTERAÇÃO EMPRESA VS TRIMESTRE

Variáveis	Empresa			
	C		D	Média
Trimestres I	1,6 b A		0,9 c A	1,2
II	1,4 b B		4,0 b A	2,7
III	4,5 a A		5,3 a A	4,9
IV	4,2 a A		3,4 b A	3,8
Média	2,9		3,4	

Coeficiente de variação = 15,3 %
 Valor de F (empresa) *
 Valor de F (trimestre) **
 Valor de F (empresa x trimestre) **

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical ou maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

A metodologia usada para detecção da aflatoxina total em patê de fígado, que emprega metanol como extrator, pareceu adequada. ROSA et. al. (1994), desenvolveram metodologia para a detecção de aflatoxinas B₁, M₁ e aflatoxicol (AFRO) em patês de fígado industrializado, mediante Cromatografia Planar e Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência. Afirmaram que a metodologia para fígado “in natura” descrita por SABINO (1991) não se mostrou adequada, pois a pasta de fígado geleifica diante do clorofórmio utilizado como extrator. Após substituição do clorofórmio pelo metanol e inclusão de acetato de chumbo como precipitante de proteínas consideraram tal metodologia eficiente.

A empresa E, produtora de coxa com sobrecoxa temperada, apresentou as maiores médias de aflatoxina total (5,2 µg/kg) e de ocratoxina A (5,2 mg/kg) no I trimestre, diferenciando-se estatisticamente ($p > 0,01$) das demais (Tabela 5 e 6). Não se atribuiu esse resultado ao tempero,

pois a diferença ocorreu apenas no I trimestre.

TABELA 4 - MÉDIA DA AFLATOXINA TOTAL ($\mu\text{G/kg}$) EM PATE-DE-FÍGADO POR EMPRESA, TRIMESTRE E INTERAÇÃO EMPRESA VS TRIMESTRE

Variáveis	Empresa		Média
	C	D	
Trimestres I	0,5	0,8	0,7 b
II	1,4	0,8	1,1 a b
III	1,1	1,5	1,3 a b
IV	1,6	1,7	1,7 a
Média	1,2 A	1,2 A	

Coeficiente de Variação = 42,4 %
 Valor de F (empresa) NS
 Valor de F (trimestre) *
 Valor de F (empresa x trimestre) NS

NS = Não-significativo.

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical ou maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) pelo teste Tukey.

Na análise de coxa íntegra, condenada e temperada, ocratoxina A foi detectada apenas no I e no IV trimestres nos dois últimos produtos (Tabela 5). A baixa detecção da ocratoxina A em coxas foi atribuída à rápida metabolização que ocorre no fígado. Sua meia-vida biológica em aves é de mais ou menos 4 horas e a eliminação é quase total dentro de 48 horas. Os resíduos persistem por somente curto período, 4 dias ou menos, quando dietas tóxicas são trocadas por alimentos livres de ocratoxina A (HOERR, 1991). Os estudos de SCUSSEL (1998) evidenciaram que apesar de ter sido isolada em músculo de frango de corte, essa micotoxina normalmente não deixa resíduo em tecidos quando presente em rações avícolas.

Analisando-se as empresas (A, B e E), aflatoxina total foi detectada

apenas em coxa íntegra (1,4 µg/kg) da empresa A e coxas condenadas (1,7 µg/kg) da empresa B (Tabela 6). A interação trimestre vs produto foi significativa ($p > 0,01$) demonstrando que os resultados obtidos em cada produto dependeram do trimestre. Em coxas com sobre coxa temperada, aflatoxina total só foi isolada no I e no IV trimestres com média final (2,4 µg/kg) significativamente inferior a das coxas íntegras (2,9 µg/kg) e condenadas (2,8 µg/kg). A detecção da aflatoxina em músculo torna-se possível pela lenta eliminação que dura de 7 a 10 dias após a administração (VIEIRA, 1995). A detecção da aflatoxina em coxas (tecido muscular) corrobora os achados por MABE e CHIPLEY, apud MAZZUCO (2000). Após verificarem a distribuição tissular da aflatoxina B₁ marcada com ¹⁴C, mediante cromatografia em camada delgada, obtiveram em músculos peitorais (31,7%) e em coxas (30,6%) os maiores percentuais da décima parte da dose administrada.

TABELA 5 - MÉDIA DE OCRATOXINA A (mg/kg) EM COXA ÍNTEGRA, CONDENADA E SOBRE-COXA TEMPERADA POR EMPRESA, TRIMESTRE, PRODUTO E SUAS INTERAÇÕES

Variáveis	Coxa			Média
	Íntegra	condenada	com sobre coxa temperada	
Trimestres I	2,0 c B	2,0 c B	5,2 a A	3,1 a
II	3,0 a b B	1,2 d A	1,3 b B	1,8 b
III	3,5 a A	3,7 b A	1,2 b B	2,8 a
IV	2,8 b A	4,7 a B	1,8 b C	3,1 a
Empresa A	2,3 b b ₁ B	3,8 a A		3,0 a
B	3,4 a a ₁ A	1,9 b B		2,7 b
E			2,4 b ₁	2,4 c
Média	2,8 A	2,9 B	2,4 B	

Coeficiente de Variação = 18,9 %

Valor de F (empresa) *

Valor de F (trimestre) *

Valor de F (produto) NS

Valor de F (empresa x produto) *

Valor de F (trimestre x produto) *

NS = Não significativo.

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical ou maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) pelo teste Tukey.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula com numeral subscrito não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) pelo teste Tukey.

Os níveis de resíduos de aflatoxinas ou de outra micotoxina e seus metabólitos que ocorrem naturalmente em carnes são inferiores a 1,0 µg/kg, porém não é recomendável a comercialização de tecidos contaminados com qualquer nível de concentração (SABINO, 1991).

Amostras positivas simultaneamente para ocratoxina A (e" 4,0 mg/kg) e aflatoxina total (e" 1,4 µg/kg) foram obtidas em: fígado íntegro no II trimestre (*Tabelas 1 e 2*), patê de fígado no III e no IV trimestres (*Tabelas 3 e 4*), coxas temperadas e coxas condenadas nos trimestres I e IV, respectivamente (*Tabelas 5 e 6*).

TABELA 6 - MÉDIA DE AFLATOXINA TOTAL (µg/kg) EM COXA ÍNTEGRA E CONDENADO POR EMPRESA, TRIMESTRE, PRODUTO E SUAS INTERAÇÕES

Variáveis		Íntegra	Coxa condenada	com sobre coxa temperada	Média
Trimestres	I	2,0 c B	2,0 b B	5,2 a A	3,1 a
	II	1,2 d B	3,0 a A	1,3 b B	1,8 b
	III	3,7 b A	3,5 a A	1,2 b B	2,8 a
	IV	4,7 a A	2,8 a B	1,8 b B	3,1 a b
Média		2,9 A	2,8 A	2,4 B	
Empresa	A	1,4 a a ₁ A	1,1 b A		1,2 a b
	B	1,2 a a ₁ B	1,7 a A		1,4 a
	E			1,0 a ₁	1,0 b
Média		1,3 A	1,4 A	1,0	

Coeficiente de Variação = 40,1 %

Valor de F (empresa) *

Valor de F (trimestre) *

Valor de F (produto) NS

Valor de F (empresa x produto) **

Valor de F (trimestre x produto) **

NS = Não-significativos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical ou maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) pelo teste Tukey.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula com numeral subscrito não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

Os produtos processados apresentaram expansão e grande aceitação na última década (MELO FILHO e GUERRA, 1998) pela sua praticidade. Desse grupo, aflatoxina total (Tabela 7) foi isolada apenas no nugget (excetuando-se o I trimestre) e na salsicha (nos trimestres I e IV). Também foi detectada ocratoxina A em salsicha e nugget (Tabela 8) nos trimestres I (5,3 e 5,0 mg/kg) e II (5,4 e 5,0 mg/kg), respectivamente.

TABELA 7 - MÉDIA DA AFLATOXINA TOTAL ($\mu\text{g/kg}$) EM NUGGET, SALSICHA, HAMBÚRGUER E LINGÜIÇA POR PRODUTO, TRIMESTRE E A INTERAÇÃO PRODUTO VS TRIMESTRE

Variável	Produtos				Média
	Nugget	Salsicha	hambúrguer	lingüiça	
Trimestres I	1,1	1,5	0,6	0,4	0,9 a
II	2,0	1,0	0,9	0,5	1,1 a
III	2,0	0,6	1,2	0,6	1,1 a
IV	1,6	1,5	1,1	1,3	1,4 a
Média	1,7 A	1,1 AB	0,9 B	0,7 B	

Coeficiente de Variação = 42,7 %
 Valor de F (produto) *
 Valor de F (trimestre) NS
 Valor de F (produto x trimestre) NS

NS = Não-significativo.

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical ou maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

A composição do Nugget inclui farinha de rosca, farinha de arroz, farinha de trigo, leite em pó e ovo em pó, ingredientes não existentes nos demais produtos processados. Aflatoxinas têm sido constantemente isoladas nesses ingredientes (CAMPOS, 1999; FRAGA et al., 1996). Mesmo sendo produto pré-cozido, a detecção de aflatoxinas ocorre por tratar-se de elemento químico extremamente estável (DOER, 1993) que não é destruído por cocção (BORETTI, 1998). Tais características facilitaram a detecção das aflatoxinas no produto mais contaminado do grupo.

Como os produtos chicken-dorê, mini-chicken e almôndega (produzidos pela empresa D) apresentaram pequena diferença na composição foram analisados apenas em dois trimestres. Como resultado final, chicken-dorê diferiu ($p > 0,05$) dos demais produtos na análise da ocratoxina A. Apenas no IV trimestre essa micotoxina não foi detectada nesses produtos. Na análise final da aflatoxina total a média para esses produtos foi semelhante. Essa micotoxina só foi detectada no II (1,7 µg/kg) e III (1,4 µg/kg) trimestres (Tabela 9).

Positividade simultânea para aflatoxina total e ocratoxina A em processados avícolas ocorreu no II (Tabela 7 e 8) e no III trimestres (Tabela 9).

TABELA 8 - MÉDIA DE OCRATOXINA A (mg/kg) EM NUGGET, SALSICHA, HAMBÚRGUER E LINGÜIÇA POR PRODUTO, TRIMESTRE E INTERAÇÃO PRODUTO VS TRIMESTRE

Variável	Produtos				Média
	Nugget	Salsicha	hambúrguer	lingüiça	
Trimestres I	4,3 b B	5,3 a A	1,5 b C	1,5 b C	3,1
II	5,4 a A	4,6 a B	3,0 a C	1,3 b D	3,6
III	1,7 c A	0,9 c B	2,4 a A	0,8 b B	1,5
IV	1,5 c B	2,0 b B	3,0 a A	3,2 a A	2,4
Média	3,2	3,2	2,5	1,7	
Coeficiente de Variação = 12,5 %					
Valor de F (produto) *					
Valor de F (trimestre) *					
Valor de F (produto x trimestre) *					

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical ou maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

TABELA 9 - MÉDIA DE OCRATOXINA A (MG/KG) E DE AFLATOXINA TOTAL (µG/KG) EM CHICKEN-DORÊ, MINI-CHICKEN E ALMÔNDEGA POR PRODUTO E TRIMESTRE

Variável	Ocratoxina A (AO)				Aflatoxina total (AFL)				Média	
	trimestres								AO	AFT
	I	II	III	IV	I	II	III	IV		
Chicken-dorê	4,6 A	5,3 A			1,2 B	1,7 A			5,0 a	1,4 a
Mini-chicken	5,3 A			1,6 B	1,2 B			1,7 A	3,4 b	1,4 a
Almôndega			5,3 A	0,9 B			1,4 A	1,5 A	3,1 b	1,4 a
Média	4,9 A	5,3 A	5,3 A	1,2 B	1,2 B	1,7 A	1,4 A	1,2 B		
Coeficiente de Variação =				5,7 %				45,9 %		
Valor de F (trimestre)				*				NS		
Valor de F (produto)				*				NS		

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

NS = Não-significativo.

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical ou maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) pelo teste Tukey.

A fabricação em embutidos, como a salsicha, envolve processos de fermentação e maturação capazes de contaminar o produto por fungos filamentosos (LUCHESE, 1998). A baixa detecção de micotoxinas nos embutidos pode ser atribuída à metodologia escolhida, que se mostrou mais eficaz para produtos “in natura”.

Dentre os produtos pesquisados, independentes da classificação *in natura* e processados, o chicken-dorê apresentou a maior média de ocratoxina A (5,0 mg/kg) diferindo dos demais (Tabela 10).

A maior média de aflatoxina total (1,7 µg/kg) ocorreu no segundo trimestre e entre todos os produtos analisados, os fígados condenados e íntegros apresentaram as maiores médias de aflatoxina total (2,5 µg/kg e 1,9 µg/kg).

Os produtos da empresa D (Região Sudeste do Brasil) apresentaram a maior média de ocratoxina A (3,5 mg/kg) e as empresas A (Litoral de Pernambuco) e B (Zona da Mata Norte de Pernambuco) as maiores médias de aflatoxina total (1,7 µg/kg e 1,6 µg/kg, respectivamente).

Os resultados encontraram-se muito abaixo do permitido pela Resolução nº 274 / 04 do Ministério da Saúde, que estabelece 20 µg/kg para aflatoxina em alimentos (BRASIL, 2002), e pela Portaria nº 183 do Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária (BRASIL, 1999), cujo limite máximo é de 20 µg/kg para o somatório das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (MERCOSUL, 1994).

O Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) reavaliou a toxicidade da ocratoxina A e estimou como nível seguro aceitável dessa micotoxina 100 ng / kg de peso corpóreo / semana (PATEL et al., 1997; STEGEN et al., 1997). Assim, uma pessoa com 60 kg poderia consumir 857 ng / kg / dia de ocratoxina A. A média de ocratoxina A (4,0 mg/kg a 5,4 mg/kg) encontrada em produtos avícolas situou-se muito além do nível seguro estimado. Além disso, quando associada no mesmo produto com até 20 µg/kg de aflatoxinas total (nível permitido pela legislação) certamente causaria danos irreparáveis à saúde humana. Isso sem contar com o sinergismo aditivo existente entre essas duas micotoxinas. Tal fato pode ocorrer pela existência de fontes desconhecidas de aflatoxinas na dieta e/ou pelo alto nível de tolerância permitido nos alimentos (CARVAJAL, 1994).

A ocratoxina A não foi detectada pela CCD, inviabilizando a comparação efetiva entre as duas técnicas estudadas. Resultado semelhante foi encontrado por MILANEZ, ATUI, LÁZZARI (1998) com relação à ocratoxina A em fubá e milho em grão. Afirmaram que o limite de detecção dessas micotoxinas é de 7,0 µg/kg na maioria dos laboratórios que trabalham com CCD. Portanto, resultados abaixo desse nível não serão detectados pela metodologia (CCD) oficial da AOAC (FURLANI, SOARES e OLIVEIRA, 1999). Desta forma, café contendo 7,0 µg/kg de Ocratoxina A poderá ser considerado de excelente qualidade por essa metodologia e ser consumido várias vezes ao dia.

A técnica ELISA foi indicada para triagem de aflatoxinas B e G em edição mais recente dos métodos analíticos da AOAC, mas com aplicabilidade limitada em termo de tipo de amostras. Apenas quatro métodos quantitativos foram aprovados, sendo dois aplicáveis na detecção de aflatoxinas B e G em pasta de amendoim e em milho e um para aflatoxina

total em milho, trigo e ração (SCOTT, 1997). Tais limitações obrigam os analistas a buscar ou desenvolver métodos para poder analisar produtos ainda não cobertos pelos métodos oficiais (RODRÍGUEZ-AMAYA, 2000).

TABELA 10 - ANÁLISE CONJUNTA DAS MÉDIAS DE OCRATOXINA A (mg/kg) E DA AFLATOXINA TOTAL (µg/kg) NOS PRODUTOS AVÍCOLAS, INDEPENDENTE DA CLASSIFICAÇÃO (“IN NATURA” E PROCESSADOS) POR PRODUTO, TRIMESTRE E EMPRESA

Variáveis	Média geral dos trimestres	
	Ocratoxina A	Aflatoxina total
Produtos		
Chicken-dorê	5,0 a	1,4 b c d
Mine-chicken	3,4 b	1,4 b c d
Fígado condensado	3,0 b c	2,5 a
Nugget	3,2 b c	1,7 b c
Salsicha	3,2 b c	1,1 c d e
Patê-de-fígado	3,2 b c	1,2 c d e
Almôndega	3,1 b c	1,4 b c d
Coxa íntegra	2,9 b c d	1,3 b c d e
Fígado íntegro	2,8 b c d	1,9 a b
Coxa condensada	2,8 c d	1,4 b c d e
Coxa temperada	2,4 c d	1,0 d e
Hambúrguer	2,5 d	0,9 d e
Lingüiça	1,7 e	0,7 e
Trimestres		
I	2,8 b	1,4 b
II	3,1 a	1,7 a
III	3,1 a	1,2 b
IV	2,8 b	1,4 b
Empresas		
A	3,1 b	1,7 a
B	2,6 c	1,6 a
C	2,7 c	1,2 b
D	3,5 a	1,3 b
E	2,4 c	1,0 b
Coeficiente de Variação =	14,3 %	35,4%

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

4 CONCLUSÃO

A ocorrência de aflatoxina total foi mais freqüente em produtos procedentes de empresas avícolas de diferentes regiões do estado de Pernambuco e ocratoxina A das empresas das Regiões Sul e Sudeste do Brasil.

As maiores médias de aflatoxina total e de ocratoxina A ocorreram no segundo trimestre (meses de julho a setembro).

O fígado "in natura" apresentou maior contaminação por aflatoxina total e o chicken-dorê (processado) por ocratoxina A.

O ensaio imunoenzimático (ELISA) mostrou-se mais eficaz para a análise de produtos "in natura".

Abstract

MYCOTOXICOLOGICAL RESEARCH OF POULTRY "IN NATURE" AND PROCESSED PRODUCTS

The occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in carcasses, edible viscera and poultry processed products purchased from different industries of various Brazilian regions was evaluated. Different types of products were collected in a trimester period being nine of them "in natura" and eight processed, for extraction of mycotoxins and quantified through the immunoenzymatic assay (ELISA). Samples with positive results for ELISA were analyzed using thin layer chromatography (TLC). From the total analyzed samples 12% resulted positive, being 10.8% for total aflatoxins, and 1.2% for ochratoxin A. The results obtained by TLC showed aflatoxins contamination (B_1 , B_2 , G_1 and G_2) inferior to $5\mu\text{g/kg}$. The immunoenzymatic assay was more effective for "in natura" products, and the second trimester (July - September) was the period when it was isolated the highest quantity of aflatoxins and ochratoxin A. The occurrence of total aflatoxins was more evident in the poultry industries from different regions of the state of Pernambuco, and ochratoxin A from industries in the South and Southeast regions of Brazil.

KEY-WORDS: POULTRY; AFLATOXIN; OCHRATOXIN A.

REFERÊNCIAS

- 1 AVIPE. Associação Avícola de Pernambuco. Dados estatísticos. **Boletim Estatístico**, Recife, 2002 / 2003 - trimestral.
- 2 BATA, A.; GLAVITS, R.; VANYI, A.; SALYI, G. More important mycotoxinoses of poultry clínico-pathological: review article. **Magy. Allatorv. Lapja**, n.51, p.395-408. 1996.

- 3 BENÍTEZ, J. Manejo integrado de micotoxinas utilizando el concepto análisis de peligro y puntos de control críticos. **Revista Industria Avícola**, v. 2, p.24-30, 2002.
- 4 BORETTI, L. Micotoxinas em poedeiras. **Revista Avicultura Industrial**, São Paulo, n.1059, p. 41-44, set. 1998.
- 5 BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária. Portaria nº 183 de 25 de março de 1995. Adotou o Regulamento Técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 de março 1996. seção1, p.54-58.
- 6 BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária. Resolução nº 274 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 15 de outubro de 2002. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 16 outubro de 2002. seção1, p.16.
- 7 CAMPOS, S. G. Micotoxicose. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v.5, n.16, p.28-29, 1999.
- 8 CARVAJAL, M. Las aflatoxinas como factor de riesco de câncer em humanos. In: CONGRESSO LATINO – AMERICANO DE MICOTOXINAS, 1.; ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8, 1994, Rio de Janeiro, **Livro de resumo...** Rio de Janeiro: UFRJ/Centro de Micologia e Micotoxicologia, 1994. p.151-152.
- 9 CENTRO NACIONAL DE PESQUISA TECNOLÓGICA EM INFORMÁTICA PARA A AGRICULTURA. **SWNTIA**: statistical system for windows. Campinas, 1996. Versão 4.2.1.
- 10 DOER, J. A. Micotoxinas na ração - consequência para a indústria de ovos. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE PRODUÇÃO DE OVOS, 8., 1993, São Paulo. **Resumo...** São Paulo/SP: Associação Paulista de Avicultura, 1993. v.1, p.1-18.
- 11 FRAGA, M. E.; DIREITO, G. M.; SANTANA, D. M. N.; BARROS, G. C.; ROSA, C. R. Determinação por cromatografia em camada delgada de aflatoxina (B₁ e M₁) e aflatoxicol em ovos destinados ao comércio. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 18, n.4, p.172-175, 1996.
- 12 FURLANI, R. P. Z.; SOARES, L. M. V.; OLIVEIRA, P. L.C. Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em café verde e torrado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, n.58, v.2, p.87-98, 1999.

- 13 HOERR, F. J. Micotoxicoses. In: CALNEK, B. W. et al. **Diseases of Poultry**. 9th ed. New York: Wolfe Publishing, 1991.
- 14 HUFF, W. E.; WYATT, R. D.; TUCKER, T. C.; HAMILTON, P. B. Ochratoxicosis in the broiler chickens. **Poultry Science**, n.53, p.1585-1591, 1974.
- 15 LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Ed. Do autor, 1997. p. 73 - 123.
- 16 LORENZINI, G. **Presença de aflatoxinas no alimento, cama e fígado de frango de corte e sua correlação com os parâmetros de produção**. Rio Grande do Sul, 1997. 91 f. Dissertação (Mestrado em Patologias Animal), Área de concentração patologias Avícolas, Centro de Diagnóstico e Patologias Avícolas, Universidade Federal Rural do Rio Grande do Sul.
- 17 LUCHESE, R. H. Produtos cárneos fermentáveis vs micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998, Florianópolis. **Livro de resumo...** Florianópolis: UFSC / Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, 1998. p. 28.
- 18 MABEE, M. S.; CHIPLEY, J. R. Tissue distribution and metabolism of aflatoxin B₁ - ¹⁴C in broiler chickens. **Applied Microbiology**, v.25. p.763-769, 1973.
- 19 MAZZUCO, H. Micotoxicoses múltiplas. **Avicultura Industrial**, v. 91, n. 1084, p. 20-29, nov., 2000.
- 20 MELO FILHO, A. B.; GUERRA, N. B. Avaliação da quantidade nutricional de produtos cárneos: salsicha e mortadelas comercializadas na região metropolitana do Recife. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRICIONISTAS DIETISTAS, 1998, Montevideu. **Livro de resumo...** SBCTA, Montevideu: SBCTA, 1998. p. 96.
- 21 MERCOSUL. Mercado Comum do Cone Sul. **Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas**. [s.n.t.]. Correspondência interna – MERCOSUL \ GMC \ Res. nº 56 / 94, 1994.
- 22 MIAZZO, R. D.; ROSA, C. A. R.; CARVALHO, E. C. Q.; MAGNOLI, C.; HIACCHIERA, S. M.; PALACIO, G.; SAENZ, M.; KIKOT, A.; BASALDELLA, E.; DALCEO, A. M. Efficacy of synthetic zeolites to reduce the toxicity of Aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, p.1-6, 2000.
- 23 MILANEZ, T. V.; ATUI, M. B.; LÁZZARI, F. A. Comparação entre imunoensaio e cromatografia em camada delgada na determinação de

- aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho em grão e fubá. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.57, n.1, p.65-71, 1998.
- 24 PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M.; GLEADLE, A. E. Survey of Ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additive Contamination**, v.14, n.3, p.217-222, 1997.
 - 25 PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. Comparação entre ELISA e Cromatografia em camada delgada na quantificação de aflatoxinas em amendoim. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.2, n.58, p.99-104, 1999.
 - 26 R-BIOPHARMS. **Rid screen-fast**: informações gerais. São Paulo, 2002. 4 p.
 - 27 RODRÍGUEZ - AMAYA, D. B. R. O uso de métodos oficiais em países em desenvolvimento. In: SCUSSEL, V. M. **Atualidades em micotoxinas e Armazenagem de grãos**. São Paulo: Ed. Da autora, 2000. p.67-71.
 - 28 ROSA, M. F. P.; SANTANA, D. M. N.; DIREITO, G. M.; SABINO, M.; ROSA, C. A. R. Desenvolvimento de metodologia analítica para detecção de aflatoxinas B₁, M₁ e AFRO, por cromatografia líquida de alta resolução, em patê de fígado industrializado. In: CONGRESSO LATINO - AMERICANO DE MICOTOXINAS, 1., ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS. 8., 1994, Rio de Janeiro. **Livro de resumo...** Rio de Janeiro: UFRRJ / Centro de Micologia e Micotoxicologia 1994. p.115-118.
 - 29 SABINO, M. **Aflatoxinas B₁, M₁ e Aflatoxicol**: extração e caracterização em tecidos e urina. São Paulo, 1991. 113 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
 - 30 SALLE, C. T. P.; RODRIGUES, O.; BAVARESCO, A.; LORENZINI, C.; MORAES, H. L. S.; SILVA, A. B.; NASCIMENTO, V. P.; WENDELSTEIN, A. C.; FALLAVENA, L. C. B. Detecção de aflatonina B₁ no organismo de frango de corte, através do emprego de anticorpos monoclonais, medidos pelo ensaio-enzimático (ELISA) In: CONGRESSO LATINO - AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1., ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS. 8., 1994, Rio de Janeiro. **Livro de resumo...** Rio de Janeiro: UFRRJ / Centro de Micologia e Micotoxicologia, 1994, p.98-102.
 - 31 SALLE, C. T. P.; RODRIGUES, O.; BAVARESCO, A.; LORENZINI, G.; SILVA, A. B.; GUAYHYBA, A.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Detecção de ocratoxina A em vísceras de frango de corte, através de ensaio

imunoenzimático. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22, n.1, p.23-26, 2000.

- 32 SANTURIO, J. M. Antifúngicos e adsorventes de aflatoxinas em grãos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSE EM AVES, 1995. Curitiba. **Livro de resumo...** Curitiba: Associação Paulista de Avicultura, 1995. p.98.
- 33 SANTÚRIO, J. M. Micotoxinas na produtividade avícola: tipos; seus efeitos; como detecta-las. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS. São Paulo. **Livro de resumo...** São Paulo: APINCO / Associação Paulista de Avicultura, 1997. p.223-257.
- 34 SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system (SAS)** : versão 6.12. Cary, NC, 1996.
- 35 SCOTT, P. M. Natural toxins. In: CUNNIFF, P. (Ed.). **Official Methods of Analysis of Association of Official Agricultural Chemists International**. Gaithersburg, 1997. p.1-57.
- 36 SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ocratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods, utilizing a multitoxin thin layer chromatographic method. **J. of AOAC**, v.72, n.1, p. 22-26. 1989.
- 37 SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 110 p.
- 38 SFOGGIA, M. V. B.; SALLE, C. T. P. Detecção de ocratoxinas em rações e rins de frango de corte e sua correlação com os parâmetros de produção de uma integração avícola no Rio Grande do Sul. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, v.26, n.2, p.106-108, 1998.
- 39 SHOTWELL, O. L.; GOLDEN, M. L.; HESSELTINE, C. W. Aflatoxin Contamination: association with foreign material and characteristic fluorescence in damaged corn kernels. **Cereal Chemistry**, v.49, p.458-465, 1972.
- 40 STEGEN, G. V. D.; JORISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VINCENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; SCHLATTER, C. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additive Contamination**, v.14, n.3, p.211- 216, 1997.
- 41 VIEIRA, S. L. Micotoxinas e produção de ovos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSE EM AVES, 1995. Curitiba. **Livro de resumo...** Curitiba: Associação Paulista de Avicultura, 1995. p.65 - 80.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e ao CNPq pelo oferecimento de recursos sob a forma de bolsas.