Ocorrência aflatoxinas B_1 e G_1 em rações para frangos de corte em granjas do Estado de Goiás

(Aflatoxins B_1 and G_1 in broiler feeds on farms from Goiás)

M.A.B. *Oliveira*[1], A.J. *Mesquita*[1],
M. *Sabino*[2], M. B. *Café*[1]

[1] Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás
CP 131. CEP 74001-970. Goiânia, GO
[2]Seção de Química Biológica - IAL

RESUMO

Foram analisadas 60 amostras de ração farelada para frangos de corte, no Estado de Goiás, para detecção da presença de aflatoxinas B_1 e G_1. As amostras foram colhidas no período de março a setembro de 1996, diretamente de comedouros, em granjas de empresas avícolas. A técnica utilizada foi a de cromatografia em camada delgada. Verificou-se contaminação em apenas 1,66% das amostras, correspondente a uma amostra que continha 28 ppb de aflatoxina B_1.

Palavras-chave: Aflatoxina, frango de corte, cromatografia em camada delgada.

ABSTRACT

Aflatoxins B_1 and G_1 were screened in 60 samples of scratched broiler feed, in Goiás State, Brazil, using thin layer chromatography as the method of detection. Samples of ration provided to the chickens were collected from feeder troughs in the farms. Only 1.66% of contamination was detected that corresponded to one sample with 28 ppb of aflatoxin B_1.

Keywords: Aflatoxins, broiler; thin layer chromatography.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são produtos tóxicos do metabolismo dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus.* Elas foram inicialmente detectadas em 1960, quando um surto dizimou mais de 100.000 peruzinhos de diferentes criatórios da

Recebido para publicação em 19 de março de 1997

Inglaterra. O episódio, que ficou conhecido como *Turkey disease,* ocorreu após terem as aves consumido ração que continha farelo de amendoim importado do Brasil. O fungo *Aspergillus flavus* foi o principal contaminante isolado deste material e seus metabólitos tóxicos foram denominados de aflatoxinas (Sargeant *et al.*, 1961).

O grande interesse de pesquisadores sobre as aflatoxinas permanece por causa de seu potencial efeito carcinogênico em animais suscetíveis e efeitos toxicológicos agudos em seres humanos (Wood, 1992; Sabino & Rodriguez-Amaya, 1993). As aflatoxicoses, agudas ou crônicas, causam prejuízos ao desempenho produtivo e sanidade das aves, além de perdas econômicas (Leeson *et al.*, 1995). Estas perdas se relacionam ao aumento da taxa de mortalidade na aflatoxicose aguda, piora da conversão alimentar, aumento do número de condenações, devido à maior fragilidade capilar e suscetibilidade a contusões, queda da eficiência de vacinas, diminuição do rendimento de partes nobres e pouca pigmentação de carcaça (Doerr *et al.*, 1983; Muirhead, 1989;).

As principais aflatoxinas são B_1, B_2, G_1 e G_2, sendo B_1 e G_1 as mais tóxicas (Leeson *et al.*, 1995). A produção das micotoxinas, no entanto, depende da toxigenicidade do fungo, da suscetibilidade do substrato e de fatores ambientais como temperatura e umidade (Environmental... 1979).

A contaminação da matéria-prima por fungos pode ocorrer no campo, na armazenagem, no transporte ou na fase de processamento da ração. Vários produtos e subprodutos agrícolas utilizados na formulação de rações animais, como milho, trigo, soja, sorgo, cevada, aveia, farelos de arroz, de amendoim e de algodão, constituem substratos suscetíveis ao desenvolvimento de fungos e à conseqüente produção de aflatoxinas (Mahmoud, 1993) e mesmo sem apresentarem contaminação fúngica aparente, podem causar prejuízos às aves, uma vez que o fungo pode não estar mais presente, mas a aflatoxina permanece inalterada.

Tendo em vista o potencial risco das aflatoxicoses para a sanidade dos plantéis de frangos e considerando as características peculiares do Estado de Goiás, grande produtor nacional de grãos, onde a avicultura desponta como atividade emergente, torna-se necessário desenvolver pesquisas nesta área. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de verificar a qualidade de rações destinadas à alimentação de frangos de corte, colhidas em granjas, quanto à presença de aflatoxinas B_1 (AFB_1) e G_1 (AFG_1) e quantificar o nível de contaminação das amostras positivas.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre março e setembro de 1996, colheram-se 60 amostras de ração farelada para frangos de corte, diretamente dos comedouros, em granjas de empresas avícolas do Estado de Goiás. Cada amostra constou de, aproximadamente, cinco quilos, colhidos em cerca de 80% dos comedouros, tipos bandeja e tubular, onde as aves se alimentavam. As amostras foram homogeneizadas manualmente e uma subamostra de dois quilos e meio de ração foi depositada em saco plástico com identificação.

Questionários foram distribuídos para se obter informações sobre a composição básica da ração, tempo de estocagem, origem do milho utilizado como componente e utilização de antifúngico. As granjas pesquisadas apresentavam adequadas práticas de manejo na fabricação, armazenagem e distribuição da ração, traduzidas pela aquisição de matéria-prima de boa qualidade, por curto tempo de estocagem e renovação constante nos comedouros. A composição básica das rações constava de milho, farelo de soja, soja extrusada, sorgo, farinha de carne, farinha de vísceras, farinha de penas, óleo de soja, óleo de vísceras de frango, calcário, sal e premix mineral e vitamínico. O tempo médio de estocagem nas granjas, no momento da colheita, era de cinco dias. O milho utilizado na composição das rações era procedente de armazéns da região, apresentando menos de um ano de armazenamento na maioria dos casos, exceto por duas amostras que continham milho de safras antigas. Em 90% das granjas um ou mais antifúngicos eram adicionados à ração no momento de seu preparo. O sulfato de cobre era de uso mais comum, na proporção de 350 gramas por tonelada. Utilizava-se também uma associação de sulfato de cobre (250 gramas) com violeta genciana (12 a 15 gramas) e mais um veículo, como farelo de soja, para completar um quilo e empregava-se esta quantidade de mistura para uma tonelada de ração. O uso de propionato de cálcio e sulfato de cálcio não era muito freqüente.

A análise das amostras foi realizada utilizando-se padrões Sigma[1] e reagentes[2] de grau analítico. O método usado na extração das micotoxinas foi semelhante ao descrito por Soares & Rodriguez-Amaya (1989), que utiliza a técnica de cromatografia em camada delgada - CCD. Para extração, 50g de amostra foram homogeneizados com 270ml de metanol e 30ml de solução de cloreto de sódio a 4% e clarificados com sulfato de amônio a 30%. Em seguida, foram utilizadas duas partições de 10ml de clorofórmio, obtendo-se 10ml de eluato. Procedeu-se à

---

[1] Padrões de aflatoxinas B_1 e G_1 *Sigma Chemical Co. - Saint Louis, USA*

[2]Reagentes *E. Merck - Darmstadt, Germany*

evaporação até resíduo, em manta aquecedora, e este foi diluído em 200µL de clorofórmio. Na cromatografia foram usadas cromatofolhas de alumínio[3]. O sistema solvente utilizado na unidimensional constou de tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (60:30:10) e na bidimensional, clorofórmio: acetona (90:10) na primeira fase móvel e o mesmo sistema da unidimensional na segunda.

Foi pulverizada solução de ácido sulfúrico a 20% sobre as amostras positivas presuntivas para as aflatoxinas em estudo. Na persistência da cor azul ou verde, no caso de suspeita da presença de AFB_1 e AFG_1, respectivamente, as amostras eram descartadas. As que apresentavam mudança para amarelo eram submetidas à confirmação com ácido trifluoracético, conforme metodologia de Przybyski (1975).

A quantificação de aflatoxina foi realizada segundo Scott (1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises das rações são apresentados na Tab. 1. Das 60 amostras de ração para frangos de corte analisadas, cinco (8,33%) foram consideradas positivas presuntivas para aflatoxinas B_1 e G_1, na triagem. Posteriormente, duas amostras apresentaram fluorescência azul e razão do fluxo (Rf) semelhante à solução padrão de aflatoxina B_1 na cromatografia bidimensional. No entanto, ao pulverizar a mancha fluorescente do extrato dessas amostras com ácido sulfúrico a 20%, somente uma delas mudou a fluorescência de azul para amarelo. A presença de aflatoxina B_1 nessa amostra foi confirmada com o uso de ácido trifluoroacético, que promoveu tanto na amostra quanto na solução padrão de AFB_1 formação do derivado B_{2a}, que possui Rf correspondente a cerca de um terço do Rf da AFB_1 (Fig. 1).
A concentração de AFB_1 na amostra de ração onde houve confirmação foi de 28 ppb (Tab. 1) e a freqüência de contaminação das amostras foi de 1,66%. Resultados semelhantes foram obtidos por Sebunya & Yourtee (1990), em Uganda, que ao analisarem 25 amostras de milho e ração para frangos, detectaram duas amostras que continham 20 ppb de AFB_1, sendo uma de cada produto. Entretanto, esses resultados diferem dos de Camargos (1994), que considerou 13 de 80 amostras de ração para frangos disponível no comércio varejista de Belo Horizonte, em Minas Gerais, suspeitas de conter aflatoxina B_1 e confirmou a presença da micotoxina em seis amostras, 7,5%, em níveis que

[3] Cromatofolhas de alumínio para c.c.d. 20x20cm, sílica gel 60 *E. Merck*, art. 1.05553

variaram de 11,44 a 51 ppb. Oyejide et al. (1987) verificaram alta freqüência de contaminação, 50%, e o conteúdo de 0,57 a 2,55 ppm de AFB_1, em amostras de ração para aves colhidas em comedouros, associado ao inadequado manejo de distribuição da ração, que favorecia um excesso de umidade nos comedouros. Gupta et al. (1985) detectaram 66% de amostras de ração para poedeiras positivas, com índices de 70 a 1809 ppb de aflatoxinas e verificaram que a procedência dessas era de uma partida de ração embolorada.

Tabela 1. Presença de aflatoxinas B_1 e G_1 e confirmação da presença de AFB_1 em rações para frangos de corte colhidas em granjas do Estado de Goiás.

Procedência	Amostras analisadas	Amostras positivas presuntivas	Confirmação*
Empresa A	6	0	-
Empresa B	12	1	1 (28ppb)
Empresa C	12	1	-
Empresa D	6	3	-
Empresa E	24	0	-
Total	60	5	1

*Com ácido trifluoroacético (TFA)

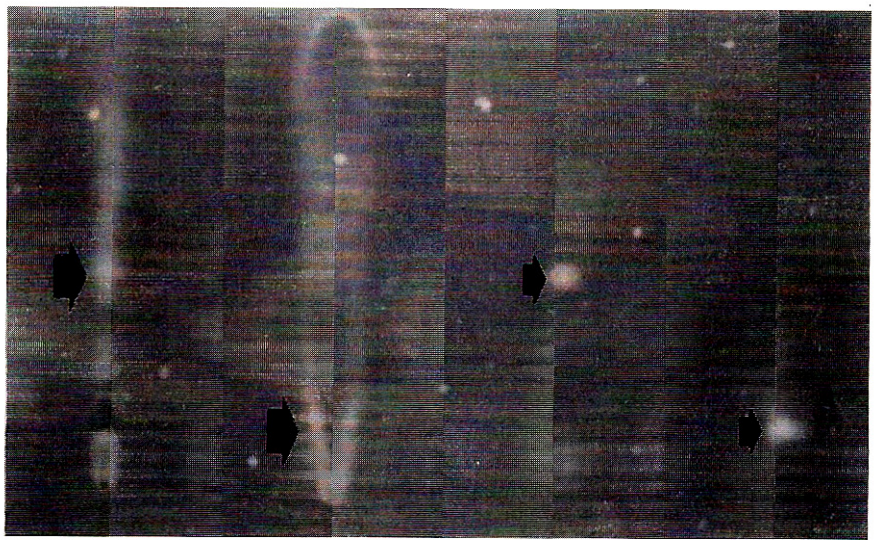

Figura 1. Presença de aflatoxina B_1 e formação de seu derivado B_{2a} na amostra (setas maiores) e na solução padrão (setas menores).

O baixo índice de contaminação das amostras de ração indica que, possivelmente, a matéria-prima utilizada foi de boa qualidade, especialmente o milho, produto suscetível ao crescimento de fungos aflatoxigênicos, que correspondeu a mais da metade da composição das rações. Esta observação encontra suporte nos relatos de Camargos (1994) sobre a ocorrência da contaminação por aflatoxinas na matéria-prima.

Na ração cuja amostra apresentou positividade para aflatoxina B_1 havia sido adicionada violeta genciana em sua preparação. Chen & Day (1974) relataram a eficácia da violeta genciana na inibição do crescimento fúngico. Entretanto, quando as aflatoxinas são produzidas anteriormente, permanecem no substrato por serem altamente estáveis. Dessa forma, a contaminação pode ter ocorrido na matéria-prima e, provavelmente, no milho, pois o que foi utilizado no preparo dessa ração era de safra superior a um ano.

O teor de 28 ppb de AFB_1 encontrado em uma das amostras de ração é muito menor que a concentração de 500 ppb utilizada por Gregory III *et al.* (1983), em experimento com perus, onde foram encontrados resíduos de 0,01 a 1,19 ppb de AFB_1, AFM_1 e aflatoxicol no fígado e tecidos dos animais. Segundo os autores, esses níveis teriam pequena significância toxicológica para o homem. A concentração de aflatoxina e o tempo de exposição também seriam insuficientes para que houvesse prejuízos à sanidade do plantel, pelo que se observou nos estudos de Doerr et al. (1983) e Mashaly *et al.* (1986).

A concentração de 28ppb de aflatoxina B_1 se encontra abaixo da tolerância máxima de 30ppb de aflatoxinas para alimentos, estabelecido pela legislação brasileira (Brasil, 1977). Contudo, se fosse considerado o limite máximo de 20ppb para rações de frangos, sugerido pelo *Food and Drug Administration* (Park, 1993), a ração contaminada seria considerada imprópria para o consumo de aves.

CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais utilizadas no presente trabalho pode-se concluir que a ração utilizada na alimentação de frangos de corte, no Estado de Goiás, apresentou boa qualidade quanto à presença de aflatoxinas.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer o suporte financeiro dado pelo CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Resolução nº 34/76, Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. Diário Oficial, Rio de Janeiro 19 de jan. 1977. Seção I, Parte 1, p. 710.

CAMARGOS, S.M. Ocorrência de aflatoxinas e qualidade microbiológica de ração para frango de corte disponível no comércio varejista de Belo Horizonte - MG. Belo Horizonte:UFMG, Faculdade de Farmácia, 1994. 89p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentação).

CHEN, T.C., DAY, E.J. Gentian violet as a possible fungal inhibitor in poultry feed: plate assays on its antifungal activity. *Poult. Sci.*, v. 53, p. 1791-1795, 1974.

DOERR, J. A., HUFF, W.E.,WABECK, C.J. et al. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* , v. 62, p. 1971-1977, 1983.

ENVIRONMENTAL health criteria 11 - *Mycotoxins*. Geneva: World Health Organization, 1979. 127 p.

GREGORY III, J.F., GOLDSTEIN, S.L., EDDS, G.T. Metabolite distribution and rate of residue clearance in turkeys fed a diet containing aflatoxin B_1. *Food Chem. Toxicol.*, v. 21, p. 463-467, 1983.

GUPTA, R.K.P., BHATIA, K.C., RAM, G.C. et al. A report of aflatoxicosis in poultry. *Indian Vet. J.*, v. 62, p. 203-208, 1985.

LEESON, S., DIAZ, G.J., SUMMERS, J.D. *Poultry metabolic disorders and mycotoxins.* Guelph: University Books, 1995. 352 p.

MAHMOUD, A. L. Toxigenic fungi and mycotoxin content in poultry feedstuffs ingredients. *J. Basic Microbiol.*, v. 33, p. 101-104, 1993.

MASHALY, R.I., SALEM, M.H., MAHMOUD, Z.H. *et al.* Effect of aflatoxins on body-weight gains, and on protein and RNA synthesis in chickens. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 56, p. 698-702, 1986.

MUIRHEAD, S. Studies show cost of mycotoxin contamination to poultry firms. *Feedstuffs*, v. 61, p. 10, 1989.

OYEJIDE, A., TEWE, O.O., OKUSOM, S.E. Prevalence of aflatoxin B_1 in commercial poultry rations in Nigeria. *Beitr. Trop. Landwirtsch. Veterinarmed.*, v. 25, p. 337-341, 1987.

PARK, D.L. Controlling aflatoxin in food and feed. *Food Technol.*, v. 10, p. 92-96, 1993.

PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivates on thin layer chromatographic plates. *J. Assoc.Off. Anal. Chem.*, v. 58, p. 163-164, 1975.

SABINO, M., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Mycotoxin research in Brazil. *Ciên. Cult.*, v. 45, p. 359-371, 1993.

SARGEANT, K., O`KELLY, J., CARNAGHAN, K.B.A. et al. The assay of a toxic principle in certain groundnuts meals. *Vet. Rec.*, v. 73, p.1219-1223, 1961.

SCOTT, P.M. Natural poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Arlington: AOAC, 1990, v.2, p.1184-1213.

SEBUNYA, T.K., YOURTEE, D.M. Aflatoxigenic Aspergilli in foods and feeds in Uganda. *J. Food Qual.*, v.13, p.97-107, 1990.

SOARES, L.M.V., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer-chromatographic method. *J. Assoc. Off. Chem.*, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

WOOD, G.E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J. Anim. Sci.*, v. 70, p. 3941-3949, 1992.