|  |
| --- |
| .  **Estudo sobre a Quantificação de Aflotoxinas em fígado e músculo de frangos de corte produzidos no distrito de Quelimane.**  Quelimane , Setembro,  2019 |

INDICE

[1. INTRODUÇÃO. 1](#_Toc22523379)

[1.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 2](#_Toc22523380)

[1.1.1. Avicultura. 2](#_Toc22523381)

[1.1.2. Micotoxinas. 3](#_Toc22523386)

[1.1.3. Aflotoxinas. 4](#_Toc22523387)

[1.1.4. Efeito das Aflotoxinas na Avicultura. 6](#_Toc22523388)

[1.1.5. Níveis de tolerância das Aflotoxinas em alimentos. 7](#_Toc22523394)

[1.1.6. Métodos de Detenção e Controle em Alimentos. 8](#_Toc22523395)

[1.2. Problematização. 9](#_Toc22523396)

[1.3. Justificativa. 10](#_Toc22523397)

[1.4. OBJECTIVOS PROPOSTO. 11](#_Toc22523398)

[1.4.1. Objectivo Geral. 11](#_Toc22523399)

[1.4.2. Objectivos Específicos. 11](#_Toc22523400)

[1.4.3. Hipóteses. 11](#_Toc22523401)

[2. OPÇÕES METODOLÓGICA. 12](#_Toc22523402)

[2.1. Tipos de Estudos. 12](#_Toc22523403)

[2.2. Local de estudo. 12](#_Toc22523404)

[2.3. Universo da Pesquisa. 12](#_Toc22523405)

[2.4. Amostragem. 13](#_Toc22523406)

[2.5. Técnica e instrumentos de Recolha de Dados. 14](#_Toc22523407)

[2.5.1. Técnicas de recolha de dados. 14](#_Toc22523408)

[2.5.2. Método e Procedimentos para análise. 14](#_Toc22523409)

[2.6. Resultados Esperados. 16](#_Toc22523410)

[3. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS. 17](#_Toc22523411)

[4. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES. 18](#_Toc22523412)

[5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS. 19](#_Toc22523413)

# INTRODUÇÃO.

Em Moçambique, cerca de 80% da população está engajada em actividades agrícolas, sendo a criação de frango uma actividade complementar. Entretanto a avicultura é um dos segmentos da agro-pecuária que mais contribui para cobrir o défice de proteína, para a promoção da segurança alimentar, na geração de rendimento e de emprego, e do crescimento económico do país (APPOWEL, 2016) .

O presente projecto pretende fazer um estudo sobre a ocorrência de Aflotoxinas em fígado e músculo de frangos nacionais, particularmente os produzidos em Quelimane, com objectivo de conhecer a presença de aflatoxina em fígados e musculo, e comparar os níveis encontrados nas amostras de acordo com os limites estabelecidos pelas normas vigentes em alimentos para o consumo humano. Assim sendo, torna-se importante fazer fazer este estudo visto que (APPOWEL,2016) o sector de frango representa um dos maiores casos de sucesso na substituição das importações verificado em Moçambique na última década, mesmo com o sucesso impulsionado pela actuação conjunta do Governo, sector privado e ONGs, alguns produtores locais tem se deparado com alguns problemas face as exigências sanitárias na busca de uma alimentação adequada, assim como no ganho do peso para comercialização .

Sobretudo, sabendo que as micotoxinas são metabolitos secundários que-se produzem por fungos e desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais, incluindo o homem (COLUMBE, 1991), os efeitos primários das aflatoxicose em avés podem ser utilizados como guia para diagnóstico clínico da doença, sendo que a primeira mudança é alteração no tamanho dos órgãos internos como fígado, baço e rins.

Por outro lado, o país figura entre os países que apresentam elevadas incidências de contaminação de produtos agrícolas (MONDLANE *ET AL.*, 2005; AUGUSTO *ET AL*., 2014), por Aflotoxinas. E este trabalho tarara abordagem sobre a sua presença em frangos de corte como resultados da ingestão da ração produzida por matéria-prima de origem vegetal, devendo contribuir para melhorar o maneio dos produtores na alimentação e tipo de ração em cada fase de engorda garantindo a segurança alimentar e nutricional.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

### Avicultura.

O êxito na produção avícola no mundo é resultado da combinação de melhoramento genético, nutrição, sanidade e maneio. O frango de corte (*broilers)* é considerada uma ave com alta conversão alimentar, rápido ganho de peso, ciclo de produção curto, resistentes a doenças e crescimento uniforme. Esta espécie de ave é hoje considerada uma fonte importante de carne e responsável por mais de 30% do total de proteína animal consumida no mundo, com maior impacto nos países em desenvolvimento. (OPEWELL et all, 2016)

A avicultura tem-se destacado nos últimos tempos, como uma das actividades que apresenta maior dinamismo devido aos avanços, tecnológicos nas áreas de genética, nutrição, sanidade e maneio, possibilitando a instalação de uma indústria altamente eficiente e competitiva em todo mundo. (ROSAMINHO, et all, 2001). Por outro lado este crescimento acelerado da produção avícola nacional na última década, conquistando uma maior quota do mercado doméstico, indica a competitividade do frango nacional em relação ao frango importado, apesar dos obstáculos enfrentados pelos produtores. (OPPEWAL et all, 2016)

1. Produção e Consumo de frangos Nacionais.

O levantamento de dados estatísticos referentes à produção e consumo nacional de frango não é uma tarefa fácil, por várias razões tais como a existência de um número considerável de pequenos criadores informais de frango que torna difícil a compilação dos dados de produção sendo que a comercialização dos frangos produzidos por estes acontece quase exclusivamente através de redes retalhistas informais, como também a importação ilegal massiva de frango congelado faz com que os dados oficiais de importação não sejam suficientes para apurar as quantidades reais que entram no país e consequentemente os níveis de consumo nacional. (OPEWAL et all, 2016)

De acordo com os dados da Direcção Nacional de Veterinária (DINAV) e, da Associação Moçambicana dos Avicultores (AMA), há uma tendência similar de crescimento durante a última década, contrariamente aos dados da FAO que apresentam um cenário de estagnação. Porém, com base nos depoimentos dos maiores produtores do país, fica claro que o sector registou um forte crescimento contínuo na última década, o que leva-nos a depositar maior confiança nos dados das fontes nacionais.

1. Produção de frangos em Quelimane.

A avicultura em Moçambique encontra-se em fase de desenvolvimento sobretudo em Maputo, Manica e Nampula. Sendo que nas restantes províncias ainda na fase embrionária. Na província da Zambézia em particular no distrito de Quelimane, a avicultura é praticada por pequenos avicultores em quantidades que varia de 800 à 2000 aves, sendo que para estes criadores a actividade é complementar a outras actividades de rendimento. (ALEXANDRE, 2013). Um dos grandes problemas que dificulta o desenvolvimento da avicultura na Zambézia é o alto custo de ração, por um lado devido a falta de fábrica de ração e por outro lado a distância que se percorrem para aquisição da mesma, obrigando a determinadas práticas de misturar ração inadequado, que pode estar na origem de várias doenças no uso destas, como ocaso das micotoxicose.

### Micotoxinas.

Durante a década 60 uma doença denominada *Turkey* atacava e matava milhares de aves na Inglaterra sem uma causa aparente. E os prejuízos económicos que esta doença causava acabaram facilitando a rápida identificação inicialmente julgada como doença nutricional, visto que tortas de amendoim utilizadas como ração para peru estavam associadas como aparecimento da doença, rapidamente relacionou-se a causa a uma substância produzida por fungos*, Asperigillus flavous,* posteriormente nomeado como Aflotoxinas hoje um dos potentes carcinogénicos conhecidos no mundo. (FONSECA, 1999).

As micotoxinas são um grupo de metabolitos secundários produzidos por fungos toxigénico, sendo necessário para o crescimento e provavelmente possuem a função de limitarem a competição, podendo ainda estar associadas as mudanças na natureza física química, sabor, odor e aparência do alimento. Elas são produzidas ainda que não exclusivamente a medida em que o fungo atinge a maturidade. (BETINA,1984).

Os fungos toxigénico podem desenvolver-se nos alimentos durante a sua produção, processamento, transporte e armazenamento, e uma vez produzidos podem ser ingeridos, inalados ou absorvidos pela pele causando patologias e morte dos animais e o homem. Existem muitos tipos de micotoxinas sendo que seis são considerados importante do ponto de vista de Saúde pública: *Aflotoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, e AFG2), Ocratoxina A, patulina, fumosina, deoxinivalenol, e Zearalenona*.

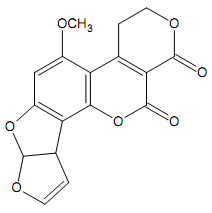
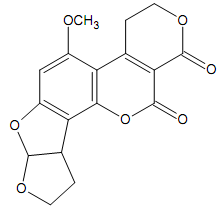
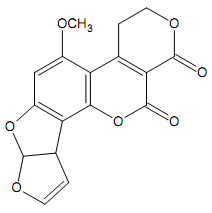
### Aflotoxinas.

As Aflotoxinas são produzidas por fungos do género *Asperigillus*, espécie *A.flavus* e *A.parasiticus.* Descoberta em 1960,apos provocarem um surto tóxico em perus na Inglaterra, (*Turkey-X-disease).* Neste surto milhares de Avés morreram após consumirem torta de amendoim na ração(LEESON et al., 1995). Contudo são conhecidos, actualmente,18 compostos similares, designados pelo termo *aflotoxinas*, porem, os principais de interesse médico sanitário, são identificados como B1,B2,G1,G2 (COULOMBE,1991). Actualmente apresentam diferentes graus de actividades biológicas, sendo que a aflotoxinas B1 (AFB1), alem de ser a mais frequente encontrada em substrato vegetal é a que apresenta maior poder toxicémico seguido de G1, B2, e G2 (LEESON et al., 1995)

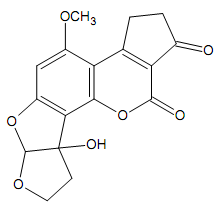
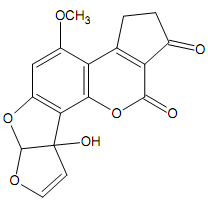
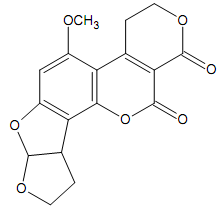
Em saúde animal varias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos, agudos, mutagénicos e carcinogénicos, sendo que o fígado é o principal órgão atingido (OSWEILER, 1990). Em países da África e Ásia, como Moçambique por exemplo onde ocorre o consumo regular de alimentos por Aflotoxinas a incidência do câncer no fígado é de aproximadamente 13 casos por 10.000 habitantes por ano. (FONSECA,2006~~)~~

1. Estrutura química.

São moléculas um tanto diferente como em estruturas que variam de simples anéis de 6 a 8aneis heterocíclicos.(BETINA,1984) e são altamente oxigenados, com uma estrutura que consiste essencialmente de um núcleo de *cumarina* fundido com um anel *bifurano* e outro anel pentanona (AFB1, B2, M1 e M2) ou 6-lactona (aflatoxinas G1 e G2). As aflotoxinas M1 e M2 são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B1 e B2, prospectivamente (DARSANAKI *ET AL.*, 2013).

**

*Aflotoxinas B1 Aflotoxinas B2 Aflotoxina G1*



*Aflotoxina G2 Aflotoxina M1 Aflotoxina M2*

Figura: Estrutura química das aflatoxinas mais importantes. Fonte: *Yunus et al. (2011).*

1. Mecanismo de Absorção das aflotoxinas**.**

A absorção das aflotoxinas ocorre no trato gastrointestinal e sua biotransformação ocorre primariamente no fígado por microssomias do sistema de funções oxidases mistas. (BIEHL –BUCK, 1987). São rapidamente absorvidas e isto pode ser evidenciado imediatamente após sua ingestão (WYATT, 1991).

A absorção de aflatoxinas ocorre por difusão passiva através do intestino, difundindo-se rapidamente por todo o organismo de maneira que três horas após a alimentação, Aflotoxinas B1 e B 2 podem ser encontradas em todos os tecidos, principalmente na moela e fígado. RAMOS e HERNANDEZ, (1996)

1. Produção de Aflotoxinas em Alimentos.

Para MONDLANE *et al.* (2005), verificaram cerca de 65,5% das amostras, com um nível médio de 3,11x10-2 ppm, assim como ALKHALAF *et al.* (2010), encontraram positividade em todas as amostras de ração, com um nível médio de 70,6 µg/kg, não estando acima dos limites recomendados. Enquanto RASHID *et al.* (2012), encontraram presença de AFB1 em 91,66% das amostras, com níveis entre 10 a 166 µg/kg, sendo que 82.30% estavam acima dos níveis recomendadas.

Num estudo experimental em frangos de corte, SALLE *ET AL.* (2002), ouve uma retenção 46,6% de AFB1 no fígado, nas primeiras duas horas após o consumo da ração contaminada. Estudos feitos por SALLE *ET AL.* (2001) E VILAR *ET AL.* (2002), Mostraram níveis de AFB1 que variavam de 0,54 a 2,41 ppb e 3,8 a 5,2 ppb em amostras de fígado de frangos de corte.

Um estudo sobre análise de aflatoxina B1 em fígados, feita em Maputo, apresentou coeficientes de recuperação não satisfatórios (59,2 à 66%). Todas as amostras positivas de fígado (39%) foram detectadas pelo método de ELISA, com maior parte das amostras provenientes do sistema de produção e abate local. (SINEQUE, 2015). Por outra o mesmo estudo provou que os níveis de contaminação das amostras por aflatoxina B1, foram inferiores aos limites estabelecidos pelas normas do *Codex Alimentarius* e pela maioria das legislações internacionais, tendo apresentado uma média de 1,73 µg/kg e 1,04 µg/kg no sistema PAL em amostras de fígado.(SINEQUE, 2015).

### Efeito das Aflotoxinas na Avicultura.

A produção animal e particularmente de aves é um componente importante da economia agrária do Pais, e o desenvolvimento contínuo do sector de avicultura pode contribuir para um crescimento inclusivo e sustentável. (OPEWELL et all,2016).

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das Aflotoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. Na avicultura comercial a susceptibilidade é maior em patos, seguidos de perus, gansos, faisões e frangos (MULLER et all, 1970). Dentro de uma mesma espécie, a relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade, entre outros factores (COULOMBE, 1991)

Os efeitos deletérios das Aflotoxinas em frangos são maiores na fase inicial de criação, até os 21 dias de vida, porém o reflexo negativo sobre o ganho de peso é persistente até a fase final de criação (HUFF et al., 1986 citado por TESSAR e CARDOSO,2012). Os efeitos tóxicos das Aflotoxinas dependem da dose e do tempo de exposição, determinando, assim, intoxicações agudas ou crónicas.

A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com altas concentrações de aflatoxina, e os efeitos são observados rapidamente, o animal apresenta perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (OSWEILER, 1990).

Na síndrome crónica, o sinal mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens (LEESON et al., 1995), ocorre quando o animal ingere concentrações pequenas de aflatoxina por um longo período de tempo. Na avicultura industrial, rações contaminadas mesmo com doses inferiores a 75 ppb de aflatoxina causam reduções de até 10% no peso das aves (LAZZARI, 1997). TESSARI et al. (2004), demonstrou que níveis a partir de 50 ppb de AFB 1 causam uma redução no ganho de peso corpóreo de frangos de corte ao final do experimento.

### Níveis de tolerância das Aflotoxinas em alimentos.

A maioria dos regulamentos existentes estabelece níveis para o leite, produtos de origem vegetal e rações, não existindo portanto, níveis padronizados em relação aos outros produtos de origem animal. (LIZÁRRAGA-PAULÍN *ET AL.*, 2011; WU *ET AL.*, 2011). Assim, em estudos de pesquisa de Aflotoxinas em produtos como carnes e vísceras, utilizam-se como limites admissíveis, os estabelecidos para alimentos no geral destinados ao consumo humano (VILAR *ET AL.*, 2002), que de acordo com a FAO (2004), variam entre algumas comunidades de países.

Em países como, Brasil o limite máximo permitido em alimentos regulamentado pelo Ministério da Saúde na resolução 34/76, estabelecia em 30 ppb a presença de Aflotoxinas B1 e G1 e pelo Ministério da Agricultura, resolução 183 de 21/03/96, estabeleceu-se em 20 ppb a soma das Aflotoxinas B1 + B 2 + 1 + G 2, sendo que esta portaria se internacionalizou para alguns países da América do sul.

Para alguns países da União Europeia (UE), estabeleciam um limite máximo nos alimentos, de 4μg/kg para aflatoxina total e 2μg/kg para AFB1, América Latina, Asia ou Oceânia e África, maior parte dos países, aplicavam 20 μg/kg e 5μg/kg, para aflatoxina total e AFB1, respectivamente (FAO, 2004; FREIRE *ET AL.*, 2007).

### Métodos de Detenção e Controle em Alimentos.

Os primeiros métodos para determinação de Aflotoxinas em alimentos foram desenvolvidos em 1960, logo após a descoberta da toxina., e hoje são conhecidos, vários métodos analíticos entre eles: A cromatografia de camada delgada (CCD), os ensaios imuno enzimáticos (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA e *Enzyme Immunoassay* - EIA) (SALLE *ET AL.*, 2002; HUSSAIN, 2011; DARSANAKI *ET AL.*, 2013). Porém o mais utilizado para análise de aflatoxina em grãos, cereais e produtos de origem animal é o método ELISA (OLIVEIRA; GERMANO, 1996). Mas nos países em desenvolvimento, como Moçambique a CCD tem sido o método de eleição devido ao seu relativo baixo custo quando comparado aos outros*, (*SALLE ET AL., 2002; HUSSAIN, 2011; DARSANAKI ET AL., 2013).

Portanto para o controle eficiente dos alimentos susceptíveis à contaminação, os laboratórios devem dispor de técnicas analíticas com sensibilidade, especificidade, rapidez e facilidade de uso, além de exactidão e precisão. Contudo existem vários factores que dificultam este tipo de análise como, distribuição não uniforme das micotoxinas nos lotes contaminados, concentrações extremamente baixas, extractos usualmente acompanhados de lipídicos e pigmentos interferentes, e a natureza variada das amostras, (OLIVEIRA et al., 2000).

## Problematização.

A indústria moçambicana de produção de frango de corte registou um crescimento assinalável na última década. Em 2005 o sector de avicultura encontrava-se num ponto baixo, produzindo menos de 5000 toneladas e com a maior parte do consumo doméstico a ser satisfeita pelas importações, entretanto em 2015 a produção superou 60,000 toneladas, satisfazendo aproximadamente 69% da demanda doméstica. (OPPEWAL, 2016)

No nosso País os sistemas de produção de aves obedece um arranjo comercial do tipo pequeno produtor - empresa de abate (NICOLAU *ET AL.*, 2011), que em parte, aumenta as possibilidades de incidência de fungos e de Aflotoxinas em rações para aves, pois, estes sistema é caracterizado por condições de armazenamento da ração muitas vezes impróprias, assim como pela prática de misturar rações de origens diferentes, incluindo, a derivada de matéria-prima de má qualidade (MONDLANE *ET AL.*, 2005; OKOLI *ET AL.*, 2006; SALEEMI *ET AL.*, 2010).

Por outro lado Moçambique figura entre os países que apresentam elevadas incidências de contaminação de produtos agrícolas (MONDLANE *ET AL.*, 2005; AUGUSTO *ET AL*., 2014), por aflatoxinas, (OLIVEIRA, 2010), para além de que a sensibilidade aos efeitos tóxicos destas varia consideravelmente entre as espécies animais. No entanto, mesmo com estes pressupostos, estudos sobre aflatoxinas e seus metabólicos em avês, e especialmente nos frangos de corte, produzidos no distrito de Quelimane não são conhecidos pelos produtores.

Contudo pesquisas feitas sobre Aflotoxinas, são de alimentos de origem vegetal em especial no milho (WARTH *ET AL*., 2012; AUGUSTO *ET AL*., 2014) e amendoim (AUGUSTO *ET AL*., 2014) e rações para avês (MONDLANE*ET AL.*, 2005), e têm demonstrado a presença destes contaminantes, em níveis acima dos recomendados pelas normas internacionais. Esta incidência de aflatoxinas em níveis acima dos recomendados em rações para aves, representa um potencial perigo para a saúde pública, tendo em conta que a produção avícola tem aumentado de forma significativa em Moçambique (NICOLAU *ET AL.*, 2011). e de forma particular no distrito de quelimane. E com estas incidência e da importância para a Saúde Pública, o presente estudo pretende responder a seguinte questão:

* *Qual é quantidade de Aflotoxinas presente em fígado e músculo de frangos de corte produzidos no distrito de Quelimane?*

## Justificativa.

O uso de ração e de outras substâncias na produção de frango de corte, seguindo os parâmetros legais de produção, tem como objectivos garantir a segurança do produto que será oferecido aos consumidores. A ração e algumas substâncias são utilizadas não somente para a segurança, mas também para optimizar e acelerar o consumo desta no processo de ganho de peso. Este último facto faz com que alguns produtores locais façam o uso deste propósito, na perspectiva de obter maiores rendimentos, contrariamente ao objectivo principal que e de garantir a segurança evitando ocorrência de perigos microbianos.

Contudo administração irregular por parte de alguns produtores durante a produção causa possíveis enfermidades no animal, entre elas as *micotoxicose,* que podem estar associado a perda do peso durante o processo da engorda quando presente nos frangos podendo resultar em grandes perdas económicas. E por isso deve-se destacar a importância das Aflotoxinas não apenas pelas ocorrências frequente, mais sim pelo elevado potencial toxigénico demonstrados por elas em avés, levando com que a relevância do estudo prenda-se em dois âmbitos:

* No âmbito científico a abordagem deste trabalho caracteriza-se pelas técnicas especifica para o estudo, pois as sugestões podem ser úteis para resolver o problema levantado, tanto nesta pesquisa assim como nas subsequentes, visto que os resultados obtidos no presente trabalho poderão servir de base para estimar os níveis de ocorrência de Aflotoxinas em fígado e músculo de frangos nesse assim como outros distritos.
* No âmbito social a realização deste estudo servirá de ferramenta para alertar os produtores e as autoridades, sobre os riscos decorrentes da Ocorrência de Aflotoxinas em produtos de origem animal, em especial em frangos de corte, contribuindo para a elaboração ou melhoria de estratégias de monitoria e controlo sanitário nas criações avícolas.

## OBJECTIVOS PROPOSTO.

### Objectivo Geral.

* Avaliar a quantidade de Aflotoxinas em fígado e músculo de frangos de corte produzidos no Distrito de Quelimane.

### Objectivos Específicos.

* Determinar a presença de aflatoxina total em fígados e músculo de frango de corte prduzidos no distrito de Quelimane.
* Quantificar os níveis de aflatoxina em fígados e musculo de frangos produzidos no distrito de Quelimane.
* Comparar os níveis de aflatoxina encontrados em figado e musculo de frango produzidos no distrito dequelimane , de acordo com os limites estabelecidos para o consumo humano.

### Hipóteses.

**H0**: A ocorrência de Aflotoxinas no fígado e músculo de frango de corte produzidos no Distrito de Quelimane não pode se observar em níveis admissíveis

**H1**: A ocorrência de Aflotoxinas no fígado e músculo de frango de corte produzidos no Distrito de Quelimane pode se observar em níveis admissíveis.

# 

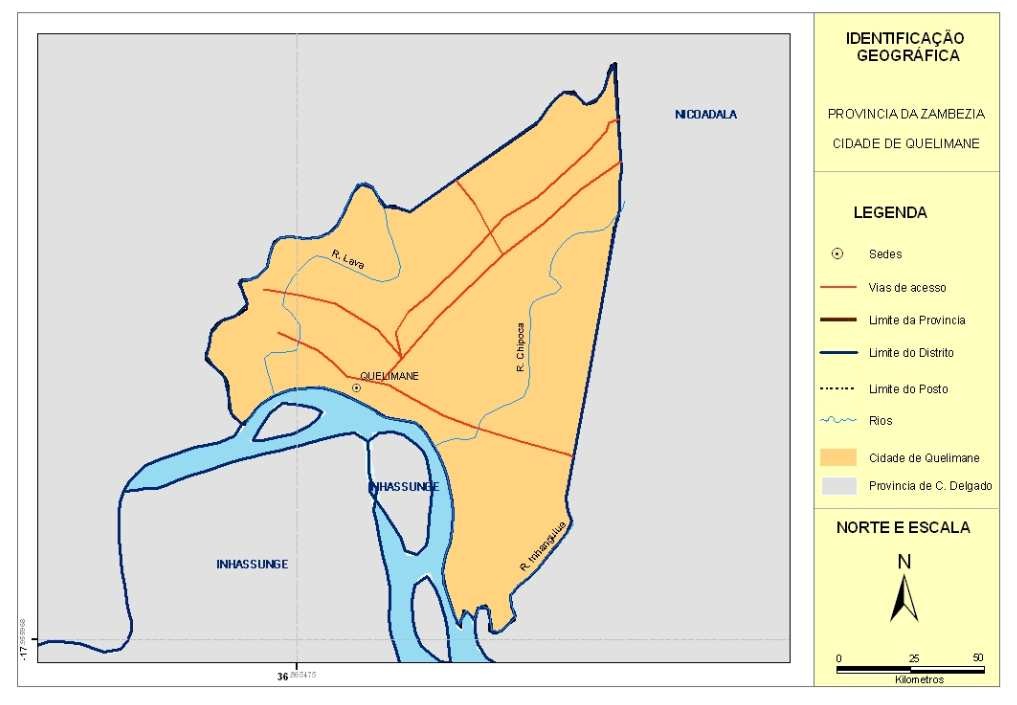
# OPÇÕES METODOLÓGICA.

## Tipos de Estudos.

Quanto à Abordagem ao Problema.

* Trata-se de um método quantitativa, pois permitira determinar a ocorrência de Aflotoxinas em frangos de corte produzidos, devendo-se classificar e quantificar dados estatisticamente *(*VANELLO, 2008

## Local de estudo.

 A pesquisa será realizada no distrito de Quelimane província da Zambézia no período compreendido entre Setembro de 2019 a Fevereiro de 2020. O distrito fica localizado na margem norte do rio dos bons sinais e a cerca de 20km do Oceano indico a leste, a Sul com o Distrito de Inhassunge, a Norte com o distrito de Nicoadala e Namacura.

*Figura: Mapa sobre a Localização Geográfica do distrito de Quelimane Fonte: INE*

## Universo da Pesquisa.

"O presente projecto de pesquisa terá como local de estudo no Distrito de Quelimane, e estarão envolvidos para o estudo cerca de 12 produtores informais que-se dedicam a criação de frangos de corte comercializados, quer localmente ou noutros mercados nacionais.

## Amostragem.

" A amostragem será realizada em três locais de produção de frangos no Distrito de Quelimane, seleccionados de acordo com o critério de amostragem, e identificados como “PF1”, “PF2” e “PF3” ”, respectivamente. Estes frangos serão adquiridos vivos dos produtores num período de dois a três meses, e sacrificados sob condições sanitárias adequadas para aquisição das amostras de fígado e musculo de (250g-1000g).

Tabela 1: Quantidade de frangos a serem adquiridos dos produtores para a colecta das amostras de fígado e músculo, no distrito de Quelimane.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Código do Produtor | **N0 de Frango** | **Número de amostra** | | **Período de colecta** | **Total das amostras** |
| **Figado** | **Musculo** |
| PF1 | 2 | 2 | 2 | 3 Meses | 4 |
| PF2 | 2 | 2 | 2 | 3 Meses | 4 |
| PF3 | 2 | 2 | 2 | 3 Meses | 4 |

As amostras de fígado e musculo, provenientes dos frangos de produtores identificados, anteriormente serão colocadas em sacos plásticos estéreis, identificados e armazenados a temperaturas de congelamento e posteriormente transportadas sob condições de refrigeração (a - 4ºC) em caixa isotérmica para o laboratório da Universidade Lurio, onde serão mantidas sob congelamento a temperaturas entre (–18 ºC e –20ºC ), numa geleira, até o momento da realização das análises.

## Técnica e instrumentos de Recolha de Dados.

### Técnicas de recolha de dados.

* Pesquisa bibliográfica: A partir de fontes consultadas de estudo feito sobre a ocorrência de Aflotoxinas vai permitir avaliar e comparar ocorrência da Aflotoxinas em frangos, discutindo os resultados da pesquisa em causa com as demais fontes a serem referenciadas para o alcance de resultados inovadores.
* Observação individual: Nessa técnica o pesquisador vai projectar os fenómenos observado, e pela limitada possibilidade de controlo, devera intensificar a objectividade de suas informações nos locais de produção, anotando os dados, dos fenómenos observados e as interpretações reais.
* Observação em laboratório: através das técnicas e instrumentos para análise possibilitaram a observação de Aflotoxinas nas amostras de fígado e músculo de frango de corte, de acordo com o número de ensaios que as amostras permitirem. E com estes o autor poderá chegar aos resultados esperados ou não da pesquisa.
* Entrevista: Essa técnica vai ser útil para averiguar os "fatos". Ou seja descobrir se produtores dos frangos são capazes de compreender os procedimentos de produção dos frangos sobre tudo no que diz respeito a administração da ração durante o processo de ganho de peso.

### Método e Procedimentos para análise.

Para a detecção e quantificação de Aflotoxinas nas amostra de fígado e musculo de frango, será utilizado a Cromatografia de Camada Delgada (CCD), uma vez que permite a separação eficaz dos compostos, tornando-o muito útil na caracterização de Aflotoxinas *(KARUNYAVANIJ, 1991; STROKA E ANKLAM, 2000)* e por ser o de referência para a maioria dos Laboratórios de Países em desenvolvimento, sendo considerada o método oficial pela, AOAC e IUPAC (STROKA E ANKLAM, 2000; SCUSSEL *ET AL.*, 2003; SHUNDO *ET AL.*, 2004; BORGES, 2005. Este método será constituído, pelas seguintes etapas: Amostragem, Preparação da amostra, Extracção, Purificação, Separação, Detecção ou Identificação, Quantificação e Confirmação da toxina.

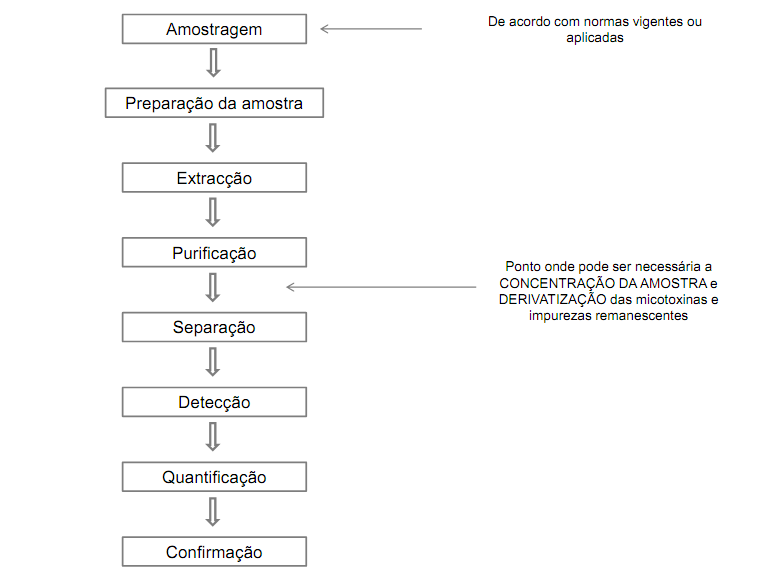


Figura. Esquema das principais etapas na análise de aflatoxinas. Adaptado: AOAC (2005).

## Resultados Esperados.

De forma afazer uma avaliação sobre a quantificação das Aflotoxinas nos fígados e músculo de frangos os dados serão apresentados de acordo com sua análise estatística, incorporando no texto apenas as tabelas, os quadros, os gráficos e outras ilustrações necessárias à compreensão do desenrolar do raciocínio da pesquisa; os demais deverão vir em apêndice. (MARCONI e LAKATOS, 2003) e para o alcance dos objectivos propostos da pesquisa será necessário:

* Seleccionar os locais para aquisição dos frangos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão seguindo o plano de amostragem para posteriores análises no laboratório da Universidade Lúrio em Nampula.
* Fazer a determinação quantitativa através de análises laboratoriais sobre a presença de aflatoxina total em fígados e músculo de frango de corte prduzidos no distrito de Quelimane.
* Apresentar os resultados das analises laboratoriais sobre a ocorrência de Aflotoxinas nas amostras de fígado e musculo de frango, verificando sobre tudo o nível.
* Comparar se os níveis encontrados nas amostras de figado e musculo de frango estao de acordo com os limites estabelecidos pelas normas vigentes em alimentos para o consumo humano.

# ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS.

Para a análise e interpretação dos dados, será usada uma análise na qual os dados serão apresentados com o suporte do programa estatístico *SPSS (versão 20.0, para Windows, Chicago, SPSS, Inc. 2011),* que consistirá de tabelas cruzadas de frequências e percentagens da contaminação das amostras por Aflotoxinas, Para a comparação dos resultados laboratoriais entre o fígado e o músculo de frango usar-se-á o teste de Qui-quadrado, enquanto, a diferença dos níveis de contaminação, será analisada pelo teste de hipóteses de Mann-Whitney tendo em consideração o método a ser usado. As diferenças serão consideradas significativas para valores de *P <0,05*.

# CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Actividades\Período (meses)** | **2019** | | | | **2020** |
| **Meses** | | | | |
| **Set** | **Out** | **Nov** | **De**z |  |
| Escolha do tema |  |  |  |  |  |
| Elaboração do Anteprojeto |  |  |  |  |  |
| Submissão do Protocolo |  |  |  |  |  |
| Apresentação do Protocolo |  |  |  |  |  |
| Colecta de Amostras |  |  |  |  |  |
| Análises Laboratoriais |  |  |  |  |  |
| Revisão bibliográfica (actualização) |  |  |  |  |  |
| Tratamento e análise dos Dados |  |  |  |  |  |
| Redacção da Dissertação |  |  |  |  |  |
| Revisão do Texto |  |  |  |  |  |
| Submissão da Dissertação Final |  |  |  |  |  |

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS.

1. Alkhalaf, N.A., Osmanand, A.K. e Salama, K.A. (2010). Monitoring of aflatoxins and heavy metals in some poultry feeds.: AFRican journal of food, 192.199
2. AOAC. (2000). Natural Toxins. Official method of analysis. 17th Edit., Association of Official Analytical Chemists. Arrington, Virginia. USA. Pp. 11-12, 16-18.
3. Augusto, J., Ate
4. hnkeng, J., Akello, J., Cotty, P., e Bandyopadhyay, R. (2014). Prevalence and distribution of *Aspergillus* section Flavi in maize and groundnut fields and aflatoxin contamination in Mozambique. (Abstract) **Phytopathology**. 104 (Suppl. 3): S3.10. Http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-104-11-S3.10.
5. Augusto, J., Atehnkeng, J., Akello, J., Cotty, P., e Bandyopadhyay, R. (2014). Prevalence and distribution of *Aspergillus* section Flavi in maize and groundnut fields and aflatoxin contamination in Mozambique. (Abstract) **Phytopathology**. 104 (Suppl. 3): S3.10. http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-104-11-S3.10.
6. BETINA,V, Micotxins: Production , Isolation,Separation, and purification,Amsterdam, Elsevier,1984,528p
7. BIEHEL,M.L.W.B.Chemical,Contaminants:theirmetabolism and their residues, Journal of food production. V.50. 12p.1058.1073,1987.
8. CHU, F.S,Micotoxins: food contamination , Mechanism,carcinogenic potencial,and preventive,measure. Mutat. Res,V. 259 Pag,1991
9. COULUMBE,R. Aflotoxins,In Sharma,R.P & Salunkhe. DK,Eds,Micotoxins and phytoalexins.Boca Raton,CRC,press,1991,
10. Darsanaki, R.K., Alikhani, F., Mohammadi, M. e Aliabadi, M.A. (2013). Biological Control of Aflatoxins. **Euroropean Journal of Experimental Biology.** 3: 162-166.
11. FAO. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos. Un compendio. Alimentación y nutrición. Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias (ESNS). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Food Agricultural Organization. Roma, Itália. pp. 1-45.
12. FONECA,H, pequenos historic das micotoxinas no mundo e no brazil. In molim, R & valentin , m. l.simposio sobre micotoxinas em grão. Fundacao cargil ⁄fundacao. ABC sao Paulo.208,p1999.
13. Freire, F.C.O., Vieira, I.G.P., Guedes, M.I.F. e Mendes, F.N.P. (2007). Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos**. 110. ISSN 1677-1915.
14. Governo de Moçambique (2014). Estratégia Nacional de Desenvolvimento (2015-35)
15. HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; JONES, F. T.; HAGLER, W. H. progression of aflatoxicosis in broiler chickens. Poultry Science , v.65, p. 1891- 1899, 1986
16. Hussain, I. (2011). Aflatoxin Measurement and Analysis. In. Aflatoxins Detection, Measurement and Control. Ed. Torres-Pacheco, I. InTech Press. Rijeka. Croatia. pp. 367-396. ISBN: 978-953-307-711-6
17. Jelinek.C.F.Distribution ofmicotxins na analises of world wide , comandities data, including data from FAO/WHO/UNEP food contamination monitoring programe. International conference on micotoxin. Bangkok 49p. 1988
18. LACASSE, Denisse, *Introdução a microbiologia alimentar*, S ed, Lisboa, Les Edition Saint Martin,1995.
19. LAKATOS, Eva Maria, e tal. *Metodologia de Trabalho Científico.* 7ª ed. Editora Atlas. São Paulo. 2003.
20. LAZZÁRI, F. A. Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações . 2 ed. Curitiba. Ed. Do Autor, 1997. p. 73-123.
21. LEESON, S. Dias, G.J.SUMMERS.J.D,Poultry Metabolic,Disorders and Micotxins. Guelph,universitybooks,1995,352p
22. LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. Poultry metabolicdisorders and mycotoxins . Guelph: University Books, 1995.
23. Lizárraga-Paulín, E.G., Moreno-Martínez, E. e Miranda-Castro, S.P. (2011). Aflatoxins and Their Impact on Human and Animal Health: An Emerging Problem. In. Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Guevara-Gonzalez, R.G. InTech Press. Rijeka. Croatia. pp. 255-282. ISBN: 978-953 307-395-8.
24. MARCONI, Rogério. *Guia para a Elaboração de Projectos de Pesquisa.* 2ª ed. Joinville. Editora Univelle. 2006.
25. Mondlane, I.A.P, Capece, B.P.S. e Parruque, A.F. (2005). Relação entre a Ocorrência de Fungos e a Presença de Aflatoxinas B1 em Rações para Aves Fabricadas em Maputo. Bol. Nº3. Instituto Nacional de Investigação Agrária – IIAM.
26. Mondlane, I.A.P, Capece, B.P.S. e Parruque, A.F. (2005). Relação entre a Ocorrência de Fungos e a Presença de Aflatoxinas B1 em Rações para Aves Fabricadas em Maputo. Boletim do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM). nº 3. 12 p.
27. Nicolau, Q.C., Borges, A.C.G. e Souza, J.G. (2011) Cutting poultry production chain from Mozambique: characterization and competitiveness. Revista de Ciências Agrárias. 1: 182-198.
28. Nicolau, Q.C., Borges, A.C.G. e Souza, J.G. (2011) Cutting poultry production chain from Mozambique: characterization and competitiveness. **Revista de Ciências Agrárias.** 1: 182-198.
29. Okoli, I.C., Nweke, C.U., Okoli, C.G. e Opara, M.N. (2006). Assessment of the mycoflora of commercial poultry feeds sold in the humid tropical environment of Imo State, Nigeria. International Journal of Environmental Science and Technology. 3: 9-14.
30. Okoli, I.C., Nweke, C.U., Okoli, C.G. e Opara, M.N. (2006). Assessment of the mycoflora of commercial poultry feeds sold in the humid tropical environment of Imo State, Nigeria. **International Journal of Environmental Science and Technology.** 3: 9-14.
31. OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Avaliação do desempenho do método do ensaio por enzimas imunoadsorvidas (ELISA) em amostras de leite em pó reconstituído contaminado experimentalmente com aflatoxina M 1. Revista Saúde Pública , v.30, p. 542-548, 1996.
32. Oliveira, C.A.F. e Germano, P.M.L. (1997). Aflatoxins in foodstuffs: current concepts on mechanisms of toxicity and its involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma. **Revista de Saúde Pública.** 31: 417-424.
33. Oliveira, M.S. (2010). Validação de Metodologia Analítica para Análise de Aflatoxina M1 e sua Ocorrência no Leite Bovino Comercializado no Sul do Brasil. Dissertação, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), p.105.
34. OPPEWAL, Jorrit at all*: Estudo Sectorial: Cadeia de Valor do Frango em Moçambique***,** Ministério da Economia e Finanças, Maputo, 2016
35. OSWEILER,G,D,Mycotoxins and livestock: what role do fungal toxins play in illness and production losses? Veternary medicine , V, 85, n.1, 1990
36. PEDRO GERMANO e MARIA ISABEL GERMANO, Vigilância Sanitária de Alimentos Qualidade da Materia Prima, Doenças de transmissão Alimentar, 5ª edição, são Paulo 2015.
37. PELCZAR,Jr, Michael J, at all, **MICROBIOLOGIA**: conceitos e aplicações, 2ª ed, vol 1, Brasil, Makron Books,2009.
38. RAMOS, A. J. & HERNANDEZ, E. In situ absorption of aflatoxins in rat small intestine. Mycopathologia , v.134, p.27-30, 1996.
39. Rashid, N., Bajwa, M.A., Rafeeq, M., Khan, M.A., Ahmad, Z., Tariq, M.M., Wadood, A. e Abbas, F. (2012). Prevalence of aflatoxin B1 in finished commercial broiler feed from West Central Pakistan. **The Journal of Animal & Plant Sciences.** 22: 6-10.
40. Resolução-rdc nº 12, de 02 de janeiro de 2001,sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos paraa limentos,
41. Rodríguez-Amaya, D.B. e Sabino, M. (2002). Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**. 33: 1-11.
42. Saleemi, M.K., Khan, M.Z., Khan, A., e Javed, I. (2010). Mycoflora of poultry feeds and mycotoxins producing potential of *Aspergillus* species. PakistanJournal of Botany. 42: 427-434.
43. Salle, C.T.P., Lorenzini, G., Sfoggia, M., Cé, M.C., Guahyba, A.S., Moraes, H.L.S., Nascimento, V.P. e Salle, F.O. (2001). The presence of aflatoxins in field broiler livers. Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS. 29: 101-106.
44. Salle, C.T.P., Rodrigues, O., Bavaresco, A., Lorenzini, G., Moraes, H.L.S., Silva, A.B., Nascimento, V.P., Wendelstein, A.C. e Fallavena, L.C.B. (2002). Detecção de aflatoxina B1 no organismo de frangos de corte através do emprego de anticorpos monoclonais medidos pelo ensaio imuno-enzimático (ELISA). Acta Scientiae Veterinariae. 30: 27-30.
45. Salle, C.T.P., Rodrigues, O., Bavaresco, A., Lorenzini, G., Moraes, H.L.S., Silva, A.B., Nascimento, V.P., Wendelstein, A.C. e Fallavena, L.C.B. (2002). Detecção de aflatoxina B1 no organismo de frangos de corte através do emprego de anticorpos monoclonais medidos pelo ensaio imuno-enzimático (ELISA). Acta Scientiae Veterinariae. 30: 27-30.
46. SMITH, J,E,ROSS, IC, Thetoxigenic Asperigilli : in smith J.E, Henderson R.S ED Micotoxin and animal foods,London Press,1991.
47. Tajkarimi, M., Shojaee, M.H., Yazdanpanah, H. e Ibrahim, S.A. (2011). Aflatoxin in Agricultural Commodities and Herbal Medicine, Aflatoxins. In. Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Guevara-Gonzalez, R.G. InTech Press. Rijeka. Croatia. pp. 367-396. ISBN: 978-953-307-395-8.
48. TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Efeitos da aflatoxina B 1 e fumonisina B 1 sobre os níveis séricos de aspartato amino-transferase e proteína total de frangos de corte. Arquivos do Instituto Biológico , São Paulo, v.72, n.2, p. 185-189, abr./jun., 2005.
49. TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Efeitos da aflatoxina B 1 e fumonisina B 1 sobre os níveis séricos de aspartato amino-transferase e proteína total de frangos de corte. Arquivos do Instituto Biológico , São Paulo, v.72, n.2, p. 185-189, abr./jun., 2005.
50. Vilar, E.A., Oliveira, M.C.M. e Stamford, T.L.M. (2002). Pesquisa micotoxicológica em fígado de aves produzidas e comercializadas em Pernambuco. Boletim do CEPPA, Curitiba. 20: 335-346.
51. Warth, B., Parich, A., Atehnkeng, J., Bandyopadhyay, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M., e Krska, R. (2012). Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 60: 9352-9363.
52. Wu, F., LNarrod, C., Tiongco, M. e Liu, Y. (2011). The Health Economics of Aflatoxin: Global burden of disease. International Food Policy Research Institute. Washington. USA. Working Paper nº4. pp. 20.
53. WYATT, R. D. Poultry. In: SMITH J. E. & HENDERSON, R. S. (Ed). Mycotoxins and animal foods . Athens CRC Press, 1991. cap. 24, p. 553-605, 199