

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**ESTUDO DA OCRATOXINA EM SORO SANGÜÍNEO**  
**DE SUÍNOS CONFINADOS EM DIFERENTES**  
**ESTADOS BRASILEIROS.**

**Cesar Daniel Krüger**

**2010**



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

**ESTUDO DA OCRATOXINA EM SORO SANGÜÍNEO DE SUÍNOS  
CONFINADOS EM DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS.**

**CESAR DANIEL KRÜGER**

*Sob a orientação do Professor*  
**Carlos Alberto da Rocha Rosa**

*e Co-orientação das Professoras*  
**Glória Maria Direito**  
**Lilia Renee Cavaglieri**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em**  
**Ciências**, no Curso de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias, Área de  
Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2010

636.089

K94e

T

Krüger, Cesar Daniel, 1976-.

Estudo da ocratoxina em soro sanguíneo de suínos confinados em diferentes estados brasileiros / Cesar Daniel Krüger - 2010.

114 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.

Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 92-107.

1. Ocratoxina - Teses. 2. Hematologia - Teses. 3. Cromatografia - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CESAR DANIEL KRÜGER**

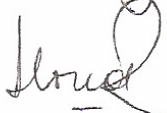
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 11 / 02 / 2010.



---

Prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, (Ph.D., L.D.) UFRRJ  
Orientador



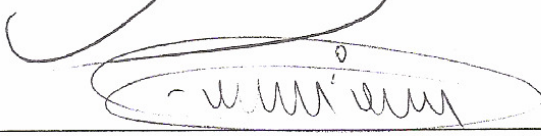
---

Prof. Dra. Lilia Renee Cavaglieri (UNRC- Argentina)



---

Prof. Dra. Adriana Mabel Torres (UNRC- Argentina)



---

Prof. Dr. Eulógio Carlos de Queiroz Carvalho (UENF)



---

Prof. Dr. Sergio Gaspar de Campos (UFRRJ)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Oscar Kruger e Eva Izolda Kruger

Ao Professor. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa – UFRRJ - Orientador,

À professora Dr. Glória Maria Direito – UFRRJ - Co-orientadora,

À professora Dr. Lilia Renee Cavaglieri – UNRC - Co-orientadora,

Ao Professor Dr. Sérgio Gaspar de Campos - UFRRJ,

Ao Professor Dr. Francisco de Assis Baroni - UFRRJ,

À Professora Dra. Rosane Nora – UFRRJ,

Ao Professor Dr. Marcelo Elias Fraga – UFRRJ,

À professora Dr. Áurea Echevarria Neves Lima – UFRRJ,

À Professora Dr. Ana Maria Dalcero (Laboratório de Micologia da Universidade Nacional de Rio Cuarto, Argentina)

Aos alunos e alunas de pós-graduação da UNRC e da UFRRJ, que de alguma maneira colaboraram,

À equipe de apoio da UFRRJ, Adevaldo, Angélica, Joel, Luiz Jorge, Valcir,

À toda equipe do laboratório de micotoxicologia,

Aos amigos do alojamento e da universidade,

À Letícia, sempre,

À CAPES, financiadora deste projeto através de bolsa auxílio,

E a todos que de alguma maneira participaram da execução do presente trabalho.

## RESUMO

KRÜGER, Cesar Daniel. **Estudo da ocratoxina em soro sangüíneo de suínos confinados em diferentes estados brasileiros**, 2010. 114 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2010.

O interesse pelos fungos e pelas micotoxinas é enorme, não só do ponto de vista científico, como também sob a perspectiva econômica. São muitos os problemas gerados desde o agricultor até o consumidor final. Baixos rendimentos da colheita, deterioramento de níveis zootécnicos na produção comercial de animais e doença nos mesmos, alterações nos alimentos, perdas de características sensoriais e nutricionais, aumento dos custos derivados da prevenção e do tratamento descontaminante estão entre alguns dos transtornos gerados pela presença dos fungos e seus metabólitos. A ocratoxina A ocupa a cada dia um papel de destaque no cenário da micotoxicologia devido a sua importância. Muitos esforços têm sido empreendidos para se definir a situação mundial da ocorrência desta micotoxina. Este trabalho teve como foco principal definir em algumas áreas específicas a ocorrência desta micotoxina, que há pouco tempo atrás era ignorada dentro do cenário dos contaminantes nos produtos brasileiros, além de colocar em prática a metodologia de detecção de OTA em soro suíno. Foram coletadas 400 amostras de soro sangüíneo suíno em diferentes matadouros de quatro estados brasileiros. Estas amostras foram processadas e submetidas a técnicas de determinação por cromatografia líquida de alta eficiência para se determinar suas concentrações da toxina em estudo. **RESULTADOS:** A concentração média de ocratoxina A no soro sangüíneo suíno das amostras com níveis acima do limite de detecção foi de 23,729 µg/L. **CONCLUSÕES:** A ocratoxina A está presente no suíno produzido no Brasil. Todos os Estados pesquisados apresentaram amostras acima do limite de detecção e quantificação. O clima mais frio favorece o aparecimento de ocratoxina A, demonstrado no maior nível de amostras positivas com limites acima de 5 µg/L no Estado de Santa Catarina (52%). O Estado de Mato Grosso apresentou o maior número de amostras positivas para ocratoxina A acima do limite detectável pela técnica utilizada (69%). O Estado da Bahia foi o que apresentou maior quantidade de amostras abaixo do limite detectável (64%).

**Palavras chave:** ocratoxina, hematologia, cromatografia

## ABSTRACT

KRÜGER, Cesar Daniel. **Study of ochratoxin A in blood serum of pigs confined in different Brazilian states**, 2010. 114 p. Thesis (Ph.D. in Veterinary Science, Animal Health) Institute of Veterinary, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2010.

Interest in fungi and the mycotoxins is enormous, not only from the scientific point of view, but also in the economic outlook. There are many problems arising from the farmer to the consumer. Low yields, deteriorating levels in commercial husbandry of animals and disease in them, changes in food, loss of sensory and nutritional characteristics, increased costs resulting from the prevention and treatment of decontamination are among some of the disorders generated by the presence of fungi and their matabólitos. Ochratoxin A occupies every day a major role in the setting of Mycotoxicology due to its importance. Many efforts have been undertaken to define the global situation of occurrence of this mycotoxin. This study focused on a set in specific areas the occurrence of this mycotoxin, which not long ago was ignored in the setting of contaminants in Brazil as well as putting into practice the methods of detection of OTA in pig serum. We collected 400 samples of blood serum from pig slaughterhouses in four different states. These samples were processed and subjected to techniques for determining liquid chromatography with high efficiency to determine concentrations of the toxin in the study. **RESULTS:** The mean concentration of ochratoxin A in pig blood serum samples with levels above the limit of detection was 23.729 µg/L. **CONCLUSIONS:** Ochratoxin A is present in the pork produced in Brazil. All the samples surveyed were above the limit of detection and quantification. The colder climate favors the development of ochratoxin A, demonstrated the highest level of positive samples with limits above 5 µg/L in the State of Santa Catarina (52%). The state of Mato Grosso showed the highest number of positive samples for ochratoxin A above the limit detectable by the technique used (69%). The State of Bahia showed the greatest number of samples below the detectable limit (64%).

**Key words:** ochratoxin, hematology, cromatography

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1: Estrutura química da ocratoxina A. (7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3-metil-isocumarina ligado através do grupo 7-carboxílico por um ligante amida a L-fenilalanina) (STORMER, 1992; WHO IARC 1993).	12
Figura 2: Área e Produção de Cereais, leguminosas e oleaginosas no Brasil de 1981 até 2009 (Fonte: IBGE, 2009).	33
Figura 3: Participação na produção de cereais, leguminosas e oleaginosas divididos por Regiões e por Estados brasileiros no ano de 2009 ( Fonte: IBGE, 2009)	34
Figura 4: Variação absoluta da produção – comparação 2009 / 2008 (Fonte: IBGE, 2009)	35
Figura 5: Total de estabelecimentos armazenadores de grãos no Brasil em 2008 (Fonte: IBGE, 2009)	36
Figura 6: Capacidade útil dos armazéns existentes no Brasil do tipo convencionais, estruturais e infláveis em 2008 (Fonte: IBGE, 2009)	36
Figura 7: Capacidade útil dos armazéns graneleiros e granelizados existentes no Brasil em 2008 (Fonte: IBGE, 2009)	36
Figura 8: Maiores estoques de grãos em 2008 no Brasil (Fonte: IBGE, 2009)	37
Figura 9: Cromatograma da amostra 53 sem passagem pela IAC	79
Figura 10: Cromatograma da amostra 53 com passagem por IAC	79
Figura 11: Cromatograma da amostra 372 sem passagem por IAC	80
Figura 12: Cromatograma da amostra 372 com passagem por IAC	80



## ÍNDICE DE TABELAS

## PÁGINA

Tabela 1. <b>Micotoxinas representativas das principais categorias biossintéticas de metabólitos secundários de acordo com Steyn, (1998).</b>	7
Tabela 2. <b>Efeitos da Atividade de água (<math>a_w</math>) e do aquecimento espontâneo sobre a colonização de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp., entre outros fungos, sobre grãos de cereais armazenados</b>	9
Tabela 3. <b>Exemplos de micotoxinas, seus principais fungos produtores, commodities afetados e efeitos biológicos no homem e animais.</b>	11
Tabela 4. <b>Atividade de água mínima para o crescimento e a produção de micotoxinas por alguns fungos toxicogênicos.</b>	13
Tabela 5. <b>Potencial toxicogênico das principais espécies de <i>Aspergillus</i> e teleomorfos que contaminam produtos agrícolas.</b>	13
Tabela 6. <b>Produtos alimentícios com presença de ocratoxina A e suas respectivas referências.</b>	16
Tabela 7. <b>Níveis máximos de micotoxinas tolerados nos cereais e em alimentos a base de milho para consumo animal (continua).</b>	27
Tabela 8. <b>Ocorrência de ocratoxina A em amostras de sangue humano</b>	32
Tabela 9: <b>Estoque de grãos e sementes no Brasil totalizados no ano de 2008.</b>	37
Tabela 10: <b>Concentração de amostras de soro suíno divididos por faixas de concentração demonstrando a taxa de recuperação entre análise utilizando e não utilizando a Coluna de Imunoafinidade (IAC)</b>	48
Tabela 11: <b>Níveis de ocratoxina A em amostras de soro suíno obtidas em quatro Estados brasileiros divididos por número de amostras.</b>	51
Tabela 12: <b>Níveis de ocratoxina A em alimentos destinados ao consumo de suínos provenientes de literatura e suas relações com os níveis de ocratoxina A encontrados em soro em quatro Estados brasileiros</b>	53

## ÍNDICE DE QUADROS

## PÁGINA

Quadro 1. Características químicas, físicas e físico-químicas da ocratoxina A.	18
Quadro 2: Animais abatidos e peso total das carcaças,segundo os meses - Brasil no 1º Trimestre de 2009.	38
Quadro 3. Fluxograma de extração de ocratoxina A de soro sanguíneo de suíno	42

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µl	microlitros
CLAE	cromatografia liquida de alta eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
g	giros
H.E.	hematoxilina eosina
IARC	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
kg	kilograma
min	minutos
ml	mililitro
mm	milímetro
NEB	nefropatia endêmica dos Balcãs
ng	nanograma
OT	ocratoxina
OTA	ocratoxina A
ppb	partes por bilhão
ppm	partes por milhão
TCA	ácido tricloroacético
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
v/v	volume por volume
γ	linearidade de detecção

## SUMÁRIO

	PÁGINA
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Justificativa	2
1.2 Objetivo Geral	2
1.3 Objetivos Específicos	2
1.4 Hipótese	3
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
2.1 Histórico da Micotoxicologia	3
2.2 Generalidades Sobre Fungos Toxígenos e Micotoxinas	5
2.2.1 Aspectos climáticos para fungos	5
2.2.2 Micotoxinas	6
2.2.3 Aspectos climáticos para micotoxinas	8
2.2.4 Principais micotoxinas	10
2.2.5 Características climáticas para fungos produtores de ocratoxina A	11
2.3 Ocratoxina em Alimentos	15
2.4 Mecanismos de Ação da Ocratoxina A	17
2.5 Quadro Clínico e Achados Anatomopatológicos	21
2.6 Métodos Analíticos para Detecção da Ocratoxina A	23
2.7 Legislação	24
2.8 Prevenção	28
2.9 Micotoxicoses em Humanos Transmitidas por Alimentos de Origem Animal micotoxinas no Brasil	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
3.1 Material	39
3.1.1 Amostras	39
3.1.2 Equipamentos	40
3.1.3 Padrão	40
3.1.4 Reagentes e Soluções	41
3.2 Métodos	41
3.2.1 Coleta de material	41
3.2.2 Procedimentos para cromatografia	41
3.2.3 Cálculo da concentração de ocratoxina A em amostras de soro suíno	43
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>58</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>59</b>
<b>7 ANEXOS</b>	<b>76</b>
7.1 Tabela A2: Níveis de ocratoxina A em amostras de soro suíno obtidas em quatro Estados brasileiros	76
7.1 Figuras 1, 2, 3, 4 Cromatogramas com e sem IAC	80

## 1 INTRODUÇÃO

Os estudos na área da micotoxicologia aumentam a cada dia, o que pode ser visto claramente na quantidade de artigos que vêm sendo publicados atualmente e no aumento de circulação de revistas voltadas para a área de microbiologia bem como nas revistas especializadas no tema.

Áreas da Ciência dos Alimentos que visa a Segurança Alimentar vem crescendo e tendo maiores suportes para suas pesquisas. Entre elas, o crescente interesse pelos fungos e pelas micotoxinas motivados pelas perdas econômicas e em relação a saúde pública vem se destacando.

As micotoxinas produzem efeitos deletérios em animais e também em seres humanos há centenas de anos, porém foram reconhecidas pela comunidade científica apenas na década de 1960. Os números da ocorrência das micotoxinas ainda são pouco precisos, devido principalmente a dificuldade de diagnóstico laboratorial em inúmeros países que não dispõem da tecnologia necessária ou ainda de falta de interesse na pesquisa da causa de patologias multifatoriais, comuns a diferentes fatores. Ainda, outro fator limitante são os custos das análises de uma maneira geral, que costumam ter seus custos relativamente altos e na maioria das vezes não são subsidiadas pelos governos dos países interessados.

A minimização dos danos causadas pela presença das micotoxinas em geral e, principalmente da ingestão de seus metabólitos, devem fazer parte da cadeia produtiva de alimentos seguros tanto para animais quanto para humanos. Portanto, muitos estudos ainda devem ser realizados para avaliar os vários efeitos toxicológicos das micotoxinas em humanos e animais. Problemas como baixo rendimento das colheitas, índices zootécnicos desfavoráveis, doenças nos animais, alterações nos alimentos com perdas de características sensoriais e nutricionais, elevados custos derivados da prevenção e dos tratamentos para a descontaminação e aparecimento de doenças geralmente de caráter crônico em humanos são determinantes para fundamentar a necessidade do aprofundamento do conhecimento das micotoxinas.

A exposição do homem às micotoxinas ocorre na maior parte dos casos por via alimentar. Existem ocorrências de ingestão de micotoxinas por via respiratória através da manipulação de grãos contaminados por fungos. Esta última forma é mais rara, e geralmente acomete trabalhadores que lidam diretamente com a manipulação de grandes quantidades de grãos diariamente como estivadores e trabalhadores de moinhos e indústrias processadoras de grãos. Pode ainda ocorrer na etapa da colheita.

A exposição dos animais ocorre geralmente pela ingestão direta dos grãos contaminados que servem de base para a alimentação de várias espécies. O nível de contaminação está diretamente relacionado a quantidade de grãos, *in natura* ou na forma de rações, ingerida pelos animais.

A prevenção da presença de fungos na pré-colheita e na pós-colheita é fundamental para a prevenção das doenças relacionadas com a ingestão de micotoxinas. Devemos tentar reduzir ao máximo os problemas no campo, aplicando técnicas convenientes de colheita, secagem e armazenamento desses grãos, além de manter um programa de vigilância constante através da análise de lotes de grãos que são mandados para o consumo direto ou não. A contaminação fúngica vêm se tornando um problema crescente para indústrias de alimentos para homens e de rações para animais.

Os métodos de análise têm se tornado mais rápidos e eficazes para que supram as necessidades dos locais de produção do alimento, seja animal ou vegetal. A análise cromatográfica já existe há décadas, mas atualmente vem sendo desenvolvida de forma bastante rápida para a área de alimentos. Para que estas análises possam ser executadas, as

micotoxinas devem ter suas características químicas bem descritas, pois a base da cromatografia é essencialmente química e para a utilização das técnicas de extração da micotoxinas nos diferentes substratos, esse conhecimento é essencial.

A agilidade nos processos de determinação de micotoxinas para a garantia de qualidade do alimento que seguem para o consumo humano ou para o arração animal depende em grande parte do desenvolvimento e execução de metodologias eficazes de extração e leitura dos resultados. Para isso, dependem dos equipamentos utilizados nas análises. Por isso que estas análises costumam ter um custo elevado. Mas com a disseminação do uso destes equipamentos a tendência é diminuir os custos iniciais das análises, o que permitirá uma maior qualidade nos produtos expostos ao consumo.

A ocratoxina A pode ocorrer naturalmente em alimentos e rações e também em tecidos de suínos de produção, numerosas investigações experimentais têm sido realizadas para melhorar o conhecimento sobre essa toxina. No Brasil, os estudos vem sendo desenvolvidos, mas ainda são escassos os dados epidemiológicos sobre a ocorrência de ocratoxina em alimentos. Esforços em busca destes dados são necessários pois nosso país é um grande produtor de grãos e de alimentos em geral, além de um grande exportador destes gêneros alimentícios. A capacitação dos laboratórios e de pessoal voltados para a área de análise de micotoxinas é muito importante e pode, no futuro, constituir um diferencial para a busca de mercados consumidores mais exigentes. Isto é fundamental para que o Brasil não perceba as restrições mercadológicas no comércio internacional de seus produtos, além é claro, de diminuir as perdas durante o processo de produção dos alimentos em geral.

## **1.1 Justificativa**

A ocorrência de contaminação por ocratoxina em humanos através da ingestão de alimentos produzidos a partir de tecidos, órgãos ou vísceras e sangue de suínos previamente contaminados por esta micotoxina é um fator que pode ocorrer. Existem poucos relatos na literatura que correlacionem de forma definitiva esta possibilidade de intoxicação indireta, apesar de sugerirem a grande correlação desta forma. O esclarecimento desta correlação tem sido buscada por grandes centros de pesquisa em micotoxinas ao redor do Mundo devido a importância desta intoxicação que, por não estar esclarecida de forma objetiva, evita que sejam tomadas medidas mais exatas para sua prevenção.

## **1.2 Objetivo Geral**

- ∞ Estudar a presença de OTA no soro sanguíneo de suínos em diferentes Estados do Brasil.

## **1.3 Objetivos Específicos**

- ∞ Avaliar a ocorrência de OTA em soro nos suínos dos locais estudados a partir da análise estatística dos resultados;
- ∞ Avaliar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência na detecção de resíduos de ocratoxina A em soro sanguíneo suíno;
- ∞ Comparar a técnica utilizada com e sem o uso de coluna de imunoafinidade;
- ∞ Relacionar os níveis de OTA presentes em soro suíno com os níveis de OTA presentes em alimentos das regiões estudadas

## 1.4 Hipótese

Os suínos no Brasil constituem uma fonte de contaminação para os seres humanos em relação a ocratoxina A pois ao ingerirem rações ou outros alimentos contaminados com esta micotoxina apresentam níveis quantificáveis em seus tecidos, principalmente no sangue.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico da Micotoxicologia

O homem convive com fungos nos alimentos desde a antiguidade. O uso em benefício próprio para a alimentação e para o processamento de gêneros alimentícios ou ainda na composição de antibióticos se deu há muito tempo atrás quando alguns povos começaram a utilizar determinadas espécies de fungos para a maturação de queijos, a fabricação de medicamentos e de bebidas. Antes ainda desta época do uso das características positivas dos fungos, já se sabia dos aspectos negativos de outros tantos fungos por seus efeitos indesejáveis através da intoxicação de homens e animais por alimentos mofados (PITTET, 1998; CAMPOS, 1999). Durante a metade do século XVIII muitos cientistas começaram a perceber a relação entre microrganismos e os alimentos. Em 1866, Louis Pasteur concluiu pesquisas em células leveduriformes que originaram os princípios básicos da tecnologia da fermentação, abrindo as portas de um novo e vasto horizonte para a indústria de alimentos (NAGODAWITHANA, 1992).

Nos últimos 50 anos a presença do crescimento fúngico nos alimentos e da produção de toxinas tem sido esclarecidas por comprovações científicas (PITTET, 1998; CAMPOS, 1999; PITT, 2000). Segundo relatos baseados nas descobertas destes últimos anos, essas toxinas têm causado muitas das principais epidemias nos homens e animais desde muito tempo atrás. Suspeita-se que desde a Antiguidade até a era moderna, a ação das micotoxicoses tenha sido de grande importância, principalmente se pensarmos na qualidade do controle dos alimentos ingeridos, bem como do seu armazenamento diante da falta de conhecimento de estruturas como os microorganismos de maneira geral. Existem evidências que 5.000 anos atrás médicos chineses usavam o ergot e, ulterior a eles, os anciãos gregos, romanos e árabes já estavam familiarizados com suas propriedades farmacológicas. O primeiro caso de epidemia de ergotismo foi reportado em 430 A.C. em Esparta, Grécia. A associação do ergotismo com a intoxicação através da ingestão de pães contaminados foi descrita apenas em 1673 na França. Dois séculos depois, o princípio ativo do ergotismo foi isolado e descrito (ergotamina). Muitas alterações psíquicas e neurológicas no ergotismo estão ligadas a capacidade do fungo converter o alcalóide ergotamina em metabólitos como o ácido lisérgico (LSD). Atualmente o ergotismo está menos disseminado, porém a vigilância continua sendo importante, pois o problema não está solucionado, apenas controlado (LINSELL, 1977).

A micotoxicose causada pelo *Stachybotrys atra* (*S. chartarum*, *S. alternans*) representa uma estreita associação perigosa tanto para animais como para humanos. Em 1931 ocorreu o primeiro relato da hemorragia fatal em cavalos, que matou centenas de milhares de cavalos na antiga União Soviética com sintomas também nos seus tratadores. A aleucia tóxica alimentar, responsável pela morte de mais de 100.000 russos entre 1942 e 1948 que também está associada a ingestão de grãos contaminados, como o trigo, o painço e a cevada provoca inflamações das mucosas e gastroenterite aguda, evoluindo para uma síndrome hemorrágica genital e sintomas neurológicos. (LINSELL, 1977, SCHOENTAL, 1995). Outras intoxicações como ingestão de cogumelos do da espécie *Amanita muscaria* (50 % de mortalidade) e

micotoxinas derivadas do *Fusarium* como a toxina T-2 e a zearalenona também aparecem descritas desde tempos bastante antigos (SCHOENTAL, 1995). Um importante problema foi a aflatoxicose, que matou 100.000 perus jovens no Reino Unido em 1960 e tem causado doenças e casos de óbito em animais e, provavelmente, no homem até os dias de hoje (PITT, 2000). Um caso recente foi o achado feito por pesquisadores sobre a morte misteriosa de arqueologistas que efetuaram estudos em tumbas egípcias. Uma das hipóteses apontadas como causa foi a inalação de micotoxinas, particularmente a ocratoxina A, que poderia estar relacionada com uma série de incidentes envolvendo falência aguda renal (DI PAOLO et al., 1993).

Dentre estes e muitos outros casos envolvendo ou ao menos indicando o envolvimento de micotoxinas, um caso foi marcante para os estudos das micotoxinas no Mundo. Nas décadas de 60 e 70 houve o grande aumento nos estudos das micotoxinas, pois muitos cientistas reuniram seus esforços e realizaram pesquisas bem fundamentadas sobre esses agentes tóxicos (BENNETT; KLICH, 2003). O caso ocorreu no início da década de 60, quando mais de 100.000 perus morreram na Inglaterra, causando um grande prejuízo para os criadores. Os pesquisadores da época descobriram que as mortes das aves aconteceram após a alimentação com grãos contaminados. Estes grãos eram provenientes do Brasil. Constataram que algo no produto brasileiro estava levando a morte dos animais. Entre as várias hipóteses que surgiram na época, duas chamaram mais a atenção: a existência de um contaminante externo e a possibilidade da ocorrência de um contaminante natural dos grãos. Naquela ocasião, não existia o conceito de micotoxina. Foram realizados experimentos com os grãos provenientes do Brasil e de outros locais considerados isentos do contaminante desconhecido, denominado inicialmente de fator tóxico e a doença ocasionada por ele foi descrita como “doença X dos perus” (ALLCROFT et al., 1961; BLOUNT, 1961; SARGEANT et al., 1961; CAMPOS, 1999). Não chegaram a definir a causa exata da mortalidade, apesar de saberem que aparecera a partir da alimentação. Surgiram estudos de todos os tipos, gerando grande polêmica sobre o assunto. Muitos estudos começaram a ser publicados com conclusões controversas. Alguns defendiam a tese de que eram contaminantes naturais enquanto outros achavam que eram contaminantes tóxicos externos. Alguns ainda defendiam que a toxidez aumentava com o calor, outros grupos de cientistas defendiam o oposto. Isso foi de certa forma importante para chamar a atenção para o problema.

Ao realizarem estudos experimentais após a descoberta do “fator X”, pesquisadores examinaram os extratos derivados dos grãos contaminados através do uso de diferentes solventes para verificar qual era o grupo de substâncias que ele poderia se enquadrar. Dividiram esses extratos por toxidez e administraram individualmente em patos em fase de crescimento. Eliminaram a possibilidade de se tratar de um alcalóide. Suspeitaram então de que a substância poderia ser derivada de microrganismos e as pesquisas continuaram (SARGEANT et al., 1961).

Posteriormente, isolaram o princípio ativo tóxico que estava causando a morte dos animais e descobriu-se que o que estava levando os animais a morte era uma toxina derivada do fungo *Aspergillus flavus*, o que originou seu nome, a aflatoxina (KROGH, 1977; SCOTT, 1978; ABARCA, 2001). Esse conjunto de fatores determinou o início das pesquisas e revelou a importância das micotoxinas e seus efeitos deletérios aos homens e animais.

Apesar de a doença ter sido reconhecida em meados da década de 50 e ter sido estudada intensamente desde então, sua etiologia e muitos fatores ecológicos e epidemiológicos permanecem obscuros. Muitas hipóteses têm sido investigadas com respeito ao envolvimento de fatores relacionados ao ambiente e aos hospedeiros, incluindo metais pesados, minerais, bactérias, vírus, fatores genéticos, radiação, substâncias orgânicas e as toxinas fúngicas, mas nenhum desses tem tido suporte epidemiológico satisfatório



(BULLERMAN, SCHROEDER, PARK, 1984; VRABCHEVA et al., 2000; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002).

## **2.2 Generalidades Sobre Fungos Toxígenos e Micotoxinas**

### **2.2.1 Aspectos climáticos para fungos**

Os fungos pertencem ao Reino Fungi e podem ser definidos como sendo um organismo eucarionte, heterótrofo não fotossintético, multicelular e filamentoso, formador de esporos e que não possui movimento em todas as fases do seu ciclo de vida; suas paredes celulares são formadas por celulose e/ou quitina e absorvem seus nutrientes por digestão enzimática externa. Também costumam ser denominados de mofos ou bolores (KLICH; PITT, 1988; PITT; HOCKING, 1997). Os fungos são microrganismos presentes tanto em climas tropicais quanto temperados, tendo sua maior biodiversidade ocorrendo nos trópicos (latitudes de aproximadamente 23° norte e 23° sul). Nem todas as áreas tropicais são quentes e úmidas mas, na maioria delas, as condições climáticas são bastante favoráveis (de 70 a 100% de umidade e mais de 25°C) para a rápida proliferação de fungo. Os cuidados contra a contaminação e o crescimento de espécies toxígenas em produtos agrícolas deve ser redobrado nestas áreas, devido ao maior risco de produção de micotoxinas (ALMEIDA et al., 2000). O Brasil, que tem a maior parte do seu território na faixa de clima predominantemente tropical, propicia condições ideais para a proliferação de fungos potencialmente toxígenos (SABINO et al., 1988). Os fungos, bolores ou mofos atuam diretamente nos produtos armazenados causando entre outras alterações: perda no poder germinativo das sementes; podem afetar a qualidade por descoloração do arroz, produção de aromas desagradáveis, alteração das condições físicas por desidratação nos grãos, diminuição no valor nutritivo das proteínas dos produtos, além de prejudicar o aspecto externo dos alimentos. (FONSECA, 2009). Essas alterações podem ocorrer pois os esporos fúngicos se dispersam com muita facilidade e os grãos armazenados são um excelente substrato para a proliferação de fungos. Além destes fatores próprios dos fungos, temos ainda a difícil realidade de um país em desenvolvimento. O manejo dos grãos armazenados torna-se mais complexo devido a vários fatores como: deficiência nos sistemas de conservação; uso de uma grande variedade de estruturas de armazenamento; presença de condições climáticas tropicais e subtropicais favorecem a multiplicação de insetos cosmopolitas e, espécies fúngicas, diferente dos países desenvolvidos, onde o clima é temperado e estes organismos não são tão ubíquos; alto nível de atividade biológica e diversidade de organismos que contribuem para a deterioração dos grãos, tais como roedores, pássaros, besouros, ácaros, fungos filamentosos, leveduras, entre outros com conseqüentes perdas na qualidade e na quantidade dos grãos; situação financeira mais precária dos produtores destas regiões; falta de conhecimento das práticas adequadas de armazenamento (LINDBLAD E DRUBEN, 1980; MITCHELL, 1984; FLEURAT-LESSARD, 2002).

Os grãos de cereais, frutos oleaginosos e seus produtos derivados são a base da alimentação humana e animal. O manejo correto da matéria prima armazenada com perdas mínimas na qualidade nutricional é o principal objetivo dos países produtores de grãos, pois não adianta que vastas áreas sejam cultivadas se, no momento da colheita e pós-colheita, estes grãos não recebam os devidos cuidados.

Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento são a umidade, atividade de água, temperatura, período de armazenamento, nível de contaminação, matérias estranhas, insetos, nível de oxigênio, condições físicas da semente ou do grão e condições sanitárias da semente, do grão ou das rações (DIONELLO et al., 2000).

O armazenamento adequado deve levar em consideração a manutenção equilibrada do ecossistema dos grãos armazenados, aplicando-se tecnologias que controlam continuamente os fatores ambientais (temperatura, umidade, aeração). As práticas de manejo dos produtos consistem em: secar os grãos com sistemas eficientes de ventilação, construção de estruturas de armazenamento em ambientes controlados criando uma concentração adequada de gases e/ou praguicidas. Isso ocorre em geral com maior abrangência em países desenvolvidos (DUNKEL, 1992; BILGRAMI, CHOUDHARY, 1998)

Durante a secagem dos grãos no campo ou nos terreiros de secagem é bem provável que haja o desenvolvimento da micotoxina, porém em níveis não muito elevados (a não ser que chova muito na colheita). As altas concentrações de toxina são encontradas geralmente em grãos colhidos por máquinas colheitadeiras ainda úmidos e quando são inapropriadamente armazenados, contendo demasiada umidade ou por falta de proteção ao reumedecimento durante este período de armazenamento. Estudos feitos neste sentido mostraram que é durante o transporte e armazenamento que concentrações elevadas da toxina são encontradas, causadas por secagem insuficiente antes do armazenamento, por infiltração de água em caminhões ou armazéns ou mesmo por reumedecimento deliberado (FONSECA, 2009).

Algumas estratégias para o armazenamento satisfatório de grãos de cereais são: a utilização de depósitos protegidos da chuva, da luz direta do sol e dos roedores; a limpeza dos depósitos, removendo todo o resto de cereal da colheita anterior, insetos, roedores e material estranho, antes de colocar novo cereal; a secagem dos grãos provenientes do campo, até um nível de umidade de 12-13%, antes do início do armazenamento; a proteção dos grãos contra a infestação por insetos; o uso de inseticidas (químicos, biológicos, etc.) e de depósitos herméticos e a avaliação regular dos níveis de infestação seguida de tomada de decisão rápida (LINDBLAD E DRUBEN, 1980; DUNKEL 1992; SINHA et al, 1986).

### 2.2.2 Micotoxinas

Além do problema das perdas econômicas pela perda de qualidade e quantidade dos grãos, o desenvolvimento de fungos é geralmente acompanhado de produção de toxinas bastante deletérias como é o caso da aflatoxina do *A. flavus*, da ocratoxina do *A. allutaceus* (*A. ochraceus*) e outras.

Micotoxinas são compostos orgânicos de baixo peso molecular, produzidos como metabólitos secundários tóxicos por várias espécies de diferentes gêneros fúngicos, com estruturas químicas variadas e que ocorrem em uma variedade de substratos, incluindo produtos agrícolas. A formação do metabólito secundário está sujeito ao controle fisiológico que responde a fatores ambientais, ocorrendo apenas quando existem fatores de estresse para o fungo, já que a prioridade fisiológica é para o crescimento e proliferação. As micotoxinas são sintetizadas por diferentes vias a partir de um ou mais metabólitos provenientes do metabolismo primário. Na natureza há uma variação enorme neste metabolismo secundário, que pode variar entre os gêneros fúngicos, entre as espécies fúngicas e, também, entre cepas de uma mesma espécie (CAMPBELL, 1984; VINING, 1992). Muitos dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos têm atividade biológica e podem ser tóxicos para microrganismos (antibióticos), plantas (fitotoxinas) ou animais (micotoxinas) (VINING, 1992).

Assim como o manejo dos grãos armazenados requerem o conhecimento de diferentes aspectos do ecossistema envolvido (SINHA et al, 1986), o estudo das micotoxinas também envolve diferenciado conhecimento e capacidade para delimitar as áreas complexas que estão envolvidas no estudo desta toxina. Existem aspectos que são geralmente abordados no estudo das micotoxinas. O estudo dos aspectos da produção, comercialização e utilização dos gêneros alimentícios; o sistema da deterioração tem muitos fatores inter-relacionados, isto é, o

fator biológico, químico, físico, micro e macroambiental; a determinação de aspectos relacionados com a produtividade, metabolismo, toxicologia, saúde e oferta e distribuição na natureza da micotoxinas; a análise da micotoxina e segregação do material contaminado e detoxificação, tendo a análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) como excelente ferramenta, como formas de prevenção; e por fim, a análise do sistema sócio-econômico que relaciona e envolve a conjuntura cultural, política e econômica estudada (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004).

Devido a suas diversas estruturas químicas e origem biossintética (ou seja metabólito primário a partir do qual se inicia a via biossintética), seus variados efeitos biológicos e sua produção por um grande número de diferentes espécies de fungos, os esquemas de classificação das micotoxinas podem se encaixar em diferentes classificações. Podem ser classificadas pelos órgãos que são afetados por seus efeitos tóxicos. Assim, as micotoxinas podem ser classificadas em hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas e imunotoxinas. Podem ser classificadas em grupos genéricos como teratogênicos, mutagênicos, carcinogênicos e alérgenos. Podem ser classificadas também com base na sua estrutura química (ex. cumarinas, lactonas); ou de acordo com sua origem biossintética (derivados de aminoácidos) e ainda de acordo com o fungo que as produzem (toxinas de *Aspergillus*, toxinas de *Penicillium*). Nenhuma dessas classificações é inteiramente satisfatória e muitas se complementam (BETINA, 1989; TURNER, ALDRIDGE, 1983; STEYN, 1998; BENNETT; KLICH, 2003). Com relação a sua origem biossintética, podemos classificar as micotoxinas em quatro grupos: a) policetideos; b) terpenos; c) substâncias derivadas do ácido shikímico; d) metabolismo de aminoácidos (tabela 1). Esta é uma classificação bastante aceita. A síntese das micotoxinas realiza-se mediante reações químicas específicas a partir de uns poucos metabólitos primários: acetil co-enzima A, ácido mevalônico, alfa-aminoácidos e intermediários do ácido shikímico. A diversidade estrutural se deriva de umas poucas reações químicas: condensação, oxidação, redução, alquilação e halogenação (TURNER, ALDRIDGE, 1983; STEYN, 1998).

**Tabela 1 Micotoxinas representativas das principais categorias biossintéticas de metabólitos secundários de acordo com Steyn, (1998) .**

<b>Categoria biossintética</b>	<b>Micotoxinas representativas</b>
<b>Policetideos</b>	
Di-	Moniliformina
Tetra-	Patulina, ácido penicílico
Penta-	Citrinina, ocratoxinas
Hexa-	Maltorizina
Hepta-	Rugulosina, viomelleina, xantomegnina
Octa-	Ergocromos, luteoskirina
Nona-	Citrioviridina, fumonisinas, zearalenona
Deca-	Aflatoxinas, ácido norsolorínico
Acido tetrâmico	Ácido ciclopiazônico, ácido tenuazônico
<b>Dicetopiperazinas</b>	
Simples	Acido aspergílico, equinulinas
Modificadas	Fumitremógenos, roquefortina, verruculotoxina
<b>Peptídios</b>	Ergotamina, fomopsinas
<b>Terpenos</b>	
Mono-	Viridicatumtoxina
Sesqui-	Tricotecenos
Di-	Penitrems, alfatrem, janthitrems

As micotoxinas compõem uma mistura de toxidez, carcinogenicidade e mutagenicidade resultantes da atividade metabólica secundária dos fungos toxígenos que

podem ser produzidas em uma ampla variedade de produtos alimentícios (*commodities*) e sob uma variedade grande de situações, sendo reconhecidamente tóxicas para outras formas de vida (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; DILKIN, 2002; ROSA, 2002). São compostos orgânicos de baixo peso molecular e não possuem imunogenicidade (DILKIN, 2002). A presença das micotoxinas nos alimentos e rações é potencialmente perigosa para a saúde de homens e animais, pois além de não estimular o sistema imune, já que não é reconhecido como estranho ao organismo, possuem vários efeitos tóxicos e grande estabilidade frente ao aquecimento (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; PITTET, 1998).

O manejo inapropriado dos cultivos à colheita causa perdas na quantidade e qualidade com perdas na pós-colheita variando entre 9% nos Estados Unidos e 50% em alguns países em desenvolvimento (PIMENTEL, 1991). Muitas das perdas são consequência da invasão dos grãos por microrganismos, artrópodes e certos vertebrados. Já a ocorrência de micotoxinas em alimentos é um problema de grande interesse em todo o mundo e ainda mais grave (WOOD 1992), chegando a afetar mais de 25% da produção anual de grãos (LAWLOR; LYNCH, 2001). Foi estimado que o custo anual, relacionado com a contaminação de grãos por micotoxinas, para a indústria agropecuária, está em torno de centenas de milhões de dólares. Um fator perigoso que deve ser observado é a contaminação fúngica e de micotoxinas dos produtos agrícolas aliados a exposição crônica dos animais a esses metabólitos, via rações animais (KUBENA et al., 1999; FRAGA et al., 2007). Vários são os critérios para avaliar o impacto econômico das micotoxinas. Considera-se a perda de vida humana e animal, gastos com tratamentos médicos e tratamentos veterinários, perdas na produção animal, de alimentos e de ração, além de gastos relacionados com pesquisa visando minimizar o impacto e a severidade dos problemas ocasionados pelas micotoxinas (HUSSEIN, BRASEL, 2001).

### **2.2.3 Aspectos climáticos para micotoxinas**

A contaminação de alimentos por micotoxinas pode ocorrer a campo, na colheita, no transporte, no armazenamento e/ou na manufatura dos produtos (MONACI, PALMISANO, 2004). Os fungos toxigênicos estão presentes no ambiente e com isso os cultivares ficam sujeitos a albergarem estes fungos. Por sua vez, eles podem ou não germinar, crescer e elaborar suas toxinas de acordo as condições específicas exigidas pelo tipo de fungo, considerando-se que a variação regional e sazonal está diretamente associada com o tipo de toxina produzida no campo. Estas condições ótimas para o crescimento do fungo são extremamente variáveis (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; COOK et al., 1986; FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKY, 1991; FRISVAD; SAMSON, 1992; WOOD, 1992; BILGRAMI, CHOUDHARY, 1998; OSWEILLER, 1998; CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002; DILKIN, 2002). Alguns fatores que influenciam a produção de micotoxinas são: atividade de água ( $A_a$ ), temperatura, tempo, quebra nos grãos, níveis de dióxido de carbono e oxigênio, composição do substrato, nível de inóculo, prevalência de cepas toxigênicas, interações microbianas e vetores invertebrados, composição do substrato, temperatura, teor de água, pH, competição microbiana, danos causados por insetos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta (WATSON, 1987; BULLERMAN et al., 1984; LACEY, 1989; FRISVAD, SAMSON, 1992; SCUSSEL, 1998). Os parâmetros físicos de maior importância que condicionam o desenvolvimento dos fungos nos cereais são atividade de água ( $a_w$ ) e temperatura (Tabela 2). Em geral, períodos mais quentes e úmidos favorecem o desenvolvimento dos fungos (FROHLICH, MARQUARDT; OMINSKY, 1991).

**Tabela 2 Efeitos da Atividade de água ( $a_w$ ) e do aquecimento espontâneo sobre a colonização de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., entre outros fungos, sobre grãos de cereais armazenados**

$A_a$	T máxima (°C)	Germinação (%)	Fungos predominantes		
			<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	Outros fungos
< 0,60	Ambiente	90 – 100			
0,75	Ambiente	75 – 90	<i>A. restrictus</i>		
0,85	Ambiente	45 – 76	<i>E. amstelodami</i> <i>E. rubrum</i> <i>E. repens</i>		
0,87	Ambiente	Não definida		<i>P. brevicompactum</i>	
0,88	Ambiente	Não definida		<i>P. verrucosum</i>	
0,89	Ambiente	Não definida		<i>P. expansum</i> <i>P. granulatum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. rugulosum</i>	
0,90	25	15 – 45	<i>A. versicolor</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. funiculosum</i> <i>P. hordei</i> <i>P. janthinellum</i> <i>P. variabile</i> <i>P. capsulatum</i>	
0,92	30	Não definida		<i>P. piceum</i>	
0,93	35	Não definida		<i>P. rugulosum</i>	
<b>0,95</b>	<b>50</b>	<b>0 – 15</b>	<i>A. candidus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. terreus</i> <i>Em. nidulans</i>	<i>P. purpurogenum</i>	<i>Absidia corymbifera</i>
> 0,95	60	0	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. emersonii</i> <i>T. termophilus</i>	<i>Malbranchea</i> <i>Cinnamomea</i> <i>Rhizomucor</i> sp <i>Thermomyces</i> sp.

Fonte: LACEY E MAGAN, 1991

A  $a_w$  mede a disponibilidade de água num alimento para o crescimento microbiano. A maioria das espécies de armazenamento, incluindo as toxigênicas, tem uma  $a_w$  mínima para seu desenvolvimento de 0,70 (LACEY, 1989).

Dos microrganismos capazes de colonizar os grãos, os fungos são os mais tolerantes a baixas atividades aquosas e, portanto mais importantes na deterioração dos grãos (CAST, 1989; CAST, 2003). As bactérias constituem a microbiota predominante antes da colheita e são os primeiros colonizadores, seguido pouco depois pelas leveduras e fungos filamentosos. Os fungos chamados de campo que se destacam são *Aureobasidium pullulans*; *Cladosporium* spp; *Alternaria alternata*, *Verticillium lecanii*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, espécies de *Curvularia*, *Phoma*, *Penicillium funiculosum*, *P. oxalicum*, *Fusarium semitectum* e *F. verticillioides*. Estes microrganismos requerem alta  $a_w$  ou umidade relativa para desenvolver e não competem com outros nos sistemas de armazenamento (LACEY, MAGAN, 1991; OMINSKI et al., 1996).

Nos produtos estocados em depósitos ou moinhos, a associação com fatores da natureza não é observada, pois a produção de toxinas ocorre de acordo com as condições de

armazenagem e distribuição para o mercado (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002; DILKIN, 2002). Didaticamente, os fungos podem ser divididos em fungos de campo, que crescem sob condições que ocorrem antes da colheita e fungos de armazenamento, que normalmente desenvolve-se na pós-colheita (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; OSWEILLER, 1998). Fatores não-naturais como danos mecânicos durante a colheita e alterações nos grãos por insetos e fatores naturais como umidade e temperatura tornam a safra mais suscetível a invasão fúngica e a formação de toxina no campo (KROGH, 1976; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; WOOD, 1992; OSWEILLER, 1998). Os fungos que se desenvolvem e produzem toxinas nos grãos e outros concentrados durante o período de armazenamento são influenciados por fatores relacionados, principalmente, com umidade e temperatura inadequadas, combinadas com longos períodos de permanência nos armazéns (KROGH, 1976; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; OMINSKI et al., 1996; OSWEILLER, 1998; FAO, 2001). No campo, o ambiente está controlado pelas flutuações diurnas e noturnas de luz e temperatura. No armazenamento dos grãos, o ambiente é estável e a  $a_w$  é o fator predominante. Nos grãos colhidos, os fungos provenientes do campo são mais frequentes que os fungos típicos do armazenamento (JIMENEZ et al, 1985; ABRAMSON et al, 1990 a,b)

Os grãos armazenados sob diferentes condições desenvolvem microbiotas características, que podem utilizar-se para indicar as condições nas quais um produto foi armazenado. As relações  $a_w$ /temperatura são muito parecidas entre as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, embora as espécies de *Penicillium* sejam favorecidas pelas temperaturas mais baixas (BULLERMAN et al, 1984; OMINSKI et al., 1996). Os fungos do armazenamento mais característicos são das espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, seguidos por *Mucor*, *Rhizopus* e *Wallemia*.

#### **2.2.4 Principais micotoxinas**

São reconhecidas mais de cem espécies de fungos produtores de micotoxinas que podem se desenvolver em um grande número de substratos destinados, tanto à alimentação humana, quanto a animal, e produzir um grande número de micotoxinas (MIDIO; MARTINS, 2000). Este número é desconhecido, embora alguns autores afirmem que existam cerca de 300 micotoxinas reconhecidas (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; PITTET, 1998; GONÇALEZ et al. 2001; DILKIN, 2002; MIDIO; MARTINS, 2000; PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004) com pouco mais da metade tendo suas estruturas químicas definidas. (OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; BENNETT; KLICH, 2003).

Cerca de trinta espécies de fungos foram associadas com a ocorrência natural de micotoxicoses em animais (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980). As micotoxinas presentes nos alimentos in natura, ração animal e forragens e também em alimentos processados a partir de produtos contaminados, quando ingeridas, podem ser metabolizadas pelo organismo e causar as micotoxicoses. Nos produtos processados a partir de animais contaminados previamente por micotoxinas, podem estar presentes na forma do composto inicial, ou podem ter sido previamente transformadas em outro metabólito tóxico no organismo animal, contaminando assim, carne, ovos e leite (MOSS, 1991; DALCERO et al., 1998; OLIVEIRA, FERRAZ, 2007). A maioria das micotoxinas ainda não teve definido seu impacto biológico sobre a saúde humana e animal (OSWEILLER, 1998). As toxinas mais estudadas e que comprovadamente têm propriedades tóxicas acentuadas e estão largamente distribuídas nos alimentos são: toxinas do ergot, aflatoxinas, estrigmatocistina, ocratoxinas, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, patulina, rubratoxinas, esporodesminas e ácido ciclopiazônico

(CRUZ, ROSA, 1981; ALEXOPOLUS et al., 1996; PITTET, 1998; GONÇALEZ et al. 2001; HUSSEIN, BRASSEL, 2001; DALCERO et al., 2002; BENNETT, KLICH, 2003; DILKIN, 2002; PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004). A maioria das espécies produtoras de micotoxinas são saprófitas e umas poucas são patogênicas facultativas de vegetais (KALE, BENNET, 1992; PITT, 2000). (tabela 3)

**Tabela 3 Exemplos de micotoxinas, seus principais fungos produtores, commodities afetados e efeitos biológicos no homem e animais.**

Micotoxinas	Principais Fungos Produtores	Principais commodities contaminados	Efeitos biológicos em animais	Efeitos biológicos no homem
Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	amendoim, pistache, milho, amêndoa, leite e seus derivados	hepatotoxicidade, hepatocarcinoma e hemorragia	hepatocarcinogênese, cirrose em crianças, síndrome de Reye, degeneração da gordura de vísceras
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	grãos de café, arroz, cevada, produto animal (rins, carne)	nefrotóxico e hepatotóxico	nefropatia dos Balcãs, tumor renal
Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	maça, suco de maça	hepatotóxico, afeta rins, baço e cérebro	provável ação carcinogênica, mutagênica, teratogênica e fetotóxica
Tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol, toxina T2)	<i>Fusarium graminearum</i>	trigo, cevada, arroz, sorgo	vômito, diarreia, perda de peso, descamação de pele e hemorragia	ATA (aleucia tóxica alimentar)
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	milho, sorgo, trigo	efeitos estrogênicos, infertilidade	câncer cervical
Fumonisinias	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	milho e seus derivados	Leucoencefalomalácia equina, edema pulmonar em suínos	câncer de esôfago
Alcalóides do Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	centeio, milho, grama	gangrena nas extremidades, convulsões	ergotismo (gangrena nos membros)

Fonte: GONÇALEZ et al. 2001

As principais micotoxinas e órgãos alvos na espécie suína são: aflatoxinas no fígado; zearalenona no sistema reprodutor; ocratoxina A nos rins; fumonisinias nos pulmões; tricotecenos no trato digestório (DILKIN, 2002).

Enquanto todas as micotoxinas são de origem fúngica, nem todos os componentes tóxicos produzidos por fungos são chamados de micotoxinas. O alvo e a concentração dos metabólitos são também importantes. Produtos fúngicos que são tóxicos para bactérias são chamados de antibióticos e, os que são tóxicos para plantas, chamam-se fitotoxinas (pode referir-se também a toxinas produzidas por plantas). Micotoxinas são produzidas por fungos e são tóxicas para vertebrados e outros grupos de animais mesmo em baixas concentrações. Outro metabólito fúngico de baixo peso molecular não considerado micotoxina e tóxico apenas em alta concentração é o etanol (BENNETT; KLICH, 2003).

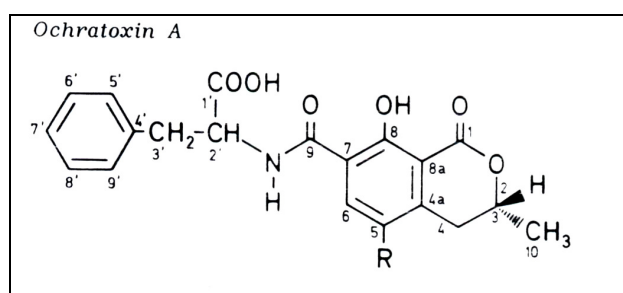
### 2.2.5 Características climáticas para fungos produtores de ocratoxina A

A OTA é uma potente toxina nefrotóxica e carcinogênica (KROGH, 1977; KROGH et al., 1979; GOLINSKI et al., 1985; COOK et al., 1986; NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1989; LINDNER, 1990; HALD, 1991; KUIPER-GOODMAN, 1991; LACEY et

al., 1992; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; STORMER, 1992; PITTET, 1998; OSWEILLER, 1998; BARISIC et al., 2002; MÜLLER et al., 2004). Muito já se sabe sobre ela devido a muitas pesquisas realizadas. Sabe-se que causa defeitos congênitos em ratos, hamsters e camundongos com dose letal oral em 50% (LD<sub>50</sub>) de 22 mg/kg em ratos, 3.6 mg/kg em pintos de um dia e aproximadamente 6 mg/kg em suínos. A carcinogenicidade em camundongos e ratos têm sido bem estudada. Em relação a saúde pública humana e animal, a ocratoxina é a mais importante das toxinas produzidas pelo gênero *Penicillium*. (ABRAMSON, 1997; CLEAR, PATRICK, GABA, 2000; KUIPER-GOODMAN et al., 1993). Estes conhecimentos tiveram origem na década de 60, quando uma grande mortandade de perus ocorreu na Inglaterra. Os estudos, então, tomaram um ritmo mais acelerado, avançando significativamente no campo das micotoxinoses. A grande importância do estudo e conhecimento da ocratoxina está relacionada com a sua possível implicação como agente causador de uma nefropatia nos homens, por ela ser nefrotóxica para animais de laboratório. Esta micotoxina já foi descrita como o principal causador de nefropatia em suínos. Nos homens, estudos avaliando o risco de exposição já estão bem difundidos em muitos países da Europa e alguns outros do hemisfério norte. (ELLING; MOLLER, 1973; KROGH, 1976; KUIPER-GOODMAN, 1991; KUIPER-GOODMAN et al., 1993; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; ABRAMSON, 1997; GODIN et al., 1997; CLEAR, PATRICK, GABA, 2000; CREPPY, 2002; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002; GROSSO et al., 2003).

A ocratoxina A é o metabólito primário mais abundante e mais tóxico dentre as ocratoxinas encontradas na natureza. Existem as formas A, B, C, D, além dos seus grupamentos metil e etil-ésteres (KROGH, 1977; COOK et al., 1986; LINDNER, 1990; LACEY et al., 1992; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998). A ocratoxina A é produzida por algumas espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (KROGH, 1977; GOLINSKI et al., 1985; COOK et al., 1986; LINDNER, 1990; LACEY et al., 1992; PITTET, 1998; OSWEILLER, 1998). Entretanto, nem todas as cepas destes fungos são produtoras de ocratoxina, inclusive a espécie *Aspergillus ochraceus* (KROGH, 1977; COOK et al., 1986; MARQUARDT; FROHLICH, 1992).

A estrutura da ocratoxina A é caracterizada quimicamente por ser um derivado diidro-isocumarínico ligado através de seu grupo 7-carboxílico à L-β-fenilalanina por um grupo amida conforme observado na fig.1 (KROGH et al., 1976; ELLING, 1977; KROGH, 1977; LINDNER, 1990; STORMER, 1992; OSWEILLER, 1998). (Figura 2)



**Figura 1** Estrutura química da ocratoxina A. (7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3-metil-isocumarina ligado através do grupo 7-carboxílico por um ligante amida a L-fenilalanina) (STORMER, 1992; WHO IARC 1993).

A primeira espécie produtora de OTA descoberta foi o *Aspergillus alutaceus* (atualmente conhecido como *Aspergillus ochraceus*) e, posteriormente, foram descobertos outros membros deste grupo que também a produziam (KROGH, 1976; SCOTT, 1978; PITTET, 1998; PITT, 2000). Entre o gênero *Penicillium*, foi descrito inicialmente a espécie *Penicillium verrucosum*, relacionado quase que exclusivamente aos grãos produzidos em



zonas temperadas (PITT, 2000). Atualmente sabe-se que a ocratoxina A é produzida por apenas algumas espécies relacionadas ao *Aspergillus ochraceus*, todas classificadas em *Aspergillus* subgênero *Circumdati* seção *Circumdati* (WHO, 2001). Excetuando o *A. ochraceus*, todas as outras espécies são incomuns em alimentos e não são conhecidos como causadores de esporulação. Por essa razão, a única espécie de alguma importância na produção de ocratoxina A do *Aspergillus* seção *Circumdati* é o *A.ochraceus* (WHO, 2001). Ocasionalmente, isolados da espécie *Aspergillus niger* podem produzir ocratoxina A. Entretanto é relatado que *Aspergillus carbonarius* é o produtor mais comum, e uma fonte muito mais importante (PITT, 2000; WHO, 2001).

Muitas descobertas aconteceram nas últimas quatro décadas de pesquisa e investimentos para determinar a relação entre a produção de micotoxinas e as condições de  $a_w$  e temperatura ótima, em meios de cultivo ou em cereais esterilizados em autoclave (Tabela 4). Os efeitos que produzem a  $A_a$  e a temperatura sobre a produção de micotoxinas diferem daqueles produzidos sobre a germinação e crescimento (NORTHOLT et al., 1995). Em geral, o crescimento fúngico ocorre numa faixa mais ampla de  $a_w$  (1,0 a 0,80) em comparação com a produção de micotoxinas (1,0 a 0,95) (NORTHOLT et al, 1979). Alguns estudos têm demonstrado que as espécies de *Penicillium* podem crescer e produzir micotoxinas, sobre uma faixa de temperaturas mais ampla que as espécies de *Aspergillus*. Uma espécie fúngica pode requerer diferentes condições de  $a_w$  e temperatura para a produção de duas micotoxinas diferentes ou, uma mesma toxina fúngica pode ser produzida em diferentes condições ambientais por duas espécies (KROGH, 1987).

**Tabela 4 Atividade de água mínima para o crescimento e a produção de micotoxinas por alguns fungos toxicogênicos.**

Espécies fúngicas	Micotoxinas	Atividade de água mínima	
		Crescimento	Produção de toxina
<i>A. flavus</i>	Aflatoxina	0,78 - 0,84	0,82 - 0,87
<i>A. parasiticus</i>			
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina	0,77	0,85
<i>P. aurantiogriseum</i>		0,82 - 0,85	0,87 - 0,90
<i>P. viridicatum</i>		0,80 - 0,81	0,83 - 0,86
<i>A. ochraceus</i>		Ácido penicílico	0,85 - 0,88
<i>P. cyclospium</i>			

Fonte: LACEY E MAGAN, 1991

**Tabela 5 Potencial toxicogênico das principais espécies de *Aspergillus* e teleomorfos que contaminam produtos agrícolas.**

Espécies	Micotoxinas
<i>A. candidus</i>	Acido kojico, candidulina, terfenilina, xantoacina
<i>A. clavatus</i>	Citochalasina E, patulina, ascladiol, clavatul, triptoquivalinas
<i>A. carbonarius</i>	Rubrofusarin B, ocratoxina A
<i>A. carneus</i>	Citrinina
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> , ácido aspergílico, ácido ciclopiazônico, aflavininas
<i>A. fumigatus</i>	Gliotoxinas, fumigaclavinas, fumitoxinas, fumigatinas, fumagilinas
<i>A. niger</i>	Ocratoxinas, malforminas, naptoquinonas
<i>A. nomius</i>	Aflatoxinas B e G, ácido aspergílico, ácido kójico
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas, ácido penicílico, ácido kójico, Acido secalônico A, xantomegnina, viomeleina
<i>A. oryzae</i>	Acido ciclopiazônico, ácido kójico, ácido 3-nitropropiónico
<i>A. parasiticus</i>	Ocratoxina, Aflatoxinas B e G, ácido aspergílico, ácido kójico
<i>A. tamaritii</i>	Ácido ciclopiazônico, ácido kójico
<i>A. terreus</i>	Citrinina, patulina, citreoviridina, ácido terreico

Fonte: FRISVAD, SAMSON, 1991; PITT, HOCKING, 1997.

O gênero *Aspergillus* é considerado como sendo um dos principais produtores de toxinas, possui grande potencial degradador e muitas espécies possuem o caráter saprófita (Tabela 5). Podem crescer e produzir toxinas em substratos com baixa atividade de água (xerofílicos), além de reduzirem a qualidade nutritiva dos grãos e, conseqüentemente, o seu valor de mercado, representando um perigo potencial aos consumidores (DIONELLO et al., 2000).

Muitos estudos relacionam estes elementos vistos acima e apontam estreita relação entre a quantidade de ocratoxina A produzida por algumas espécies de fungos e parâmetros como atividade de água, temperatura, tempo de estocagem, tipo de substrato, presença de microflora competitiva, cepa de fungo e integridade da semente (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; WOOD, 1992; MILANEZ; SCHOENLEIN-CRUSIUS; OKINO, 2002; PARDO et al., 2004). As cepas também podem influenciar na produção da toxina, já que a quantidade de ocratoxina A varia (KROGH 1977, COOK, 1986; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; MILANEZ; SCHOENLEIN-CRUSIUS; OKINO, 2002). Observa-se que condições ótimas para o crescimento fúngico podem não ser as mesmas para a produção de seus metabólitos secundários (RAPER & FENNELL, 1965).

Como visto, a combinação das condições climáticas com as condições de manejo dos produtos vegetais influi diretamente sobre a produção de micotoxinas. Em geral as condições de campo são mais desfavoráveis em países de climas quentes e úmidos, como o Brasil, ou em épocas que apresentem estas características, enquanto que as condições de armazenamento podem estar presentes em todos os lugares do mundo (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; KROGH, 1976; OMINSKI et al., 1996; DILKIN, 2002; FAO, 2004).

Especificando mais para os fungos produtores de ocratoxina, como os do gênero *Penicillium*, se desenvolvem em cereais a baixas temperaturas e, portanto, são os maiores produtores de ocratoxina nas áreas de baixa temperatura, predominante nos países de clima temperado (COOK et al., 1986; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; WHO, 2001). Como os cereais são amplamente utilizados na alimentação animal na Europa, e a ocratoxina A é relativamente estável *in vivo*, esta micotoxina é também encontrada em alguns produtos de origem animal naquela região, especialmente em rins e fígados suínos (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; FAO, 2003). Já o *Aspergillus ochraceus* é, provavelmente, o mais importante produtor de ocratoxina em países de clima tropical e subtropical (FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; DILKIN, 2002). Considera-se, em geral, uma atividade de água ótima para o crescimento e germinação do *Aspergillus ochraceus* entre 0,95 a 0,99, com limite mínimo de 0,79 (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; WHO, 2001; PARDO et al., 2004; FAO, 2001). A temperatura de crescimento do *A. ochraceus* varia de 8 a 37°C, com crescimento ótimo em torno de 28°C (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; WHO, 2001; PARDO et al., 2004; FAO, 2001). Essa temperatura ótima de crescimento assemelha-se a da formação de aflatoxinas. Entretanto, a ocratoxina A continua apresentando um considerável crescimento aos 15°C, diferente das aflatoxinas que tem uma formação muito baixa nessa faixa. Em relação à formação de ocratoxina B, ocratoxina C e um de seus produtos derivados da hidrólise, o ácido diidro-isocumarínico, a quantidade de ocratoxina B formada a 28°C no final de 17 dias de incubação foi 25 vezes menor que a quantidade de ocratoxina A. Nesse período não foi detectada a formação de ocratoxina C e o ácido diidro-isocumarínico apresentou-se em muito baixa concentração (TRENK; BUTZ; CHU, 1971). Em um experimento realizado no Brasil, a produção e o crescimento ótimo de *A. ochraceus* em cevada ocorreu com uma atividade de água de 0,82 a 25 e 30°C (RIBEIRO et al., 2006). O *Penicillium verrucosum* é um fungo de crescimento lento com capacidade de desenvolvimento em baixa atividade de água e a baixas temperaturas.

Desenvolve-se de forma ótima em atividade de água menor que 0,80 (WHO, 2001) e temperatura ótima de 20°C, variando de 0 a 30°C (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; COOK et al., 1986; WHO, 2001; FAO, 2001). De forma geral, o crescimento fúngico e a produção dos seus metabólitos secundários apresentam um maior desenvolvimento em grãos estocados quando encontram um teor de umidade nos grãos maior que 16% e uma umidade do ar maior que 85% (COOK et al., 1986; FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; OSWEILLER, 1998; DILKIN, 2002). A espécie *Aspergillus ochraceus* cresce lentamente num pH de 2,2 e, em melhor velocidade, com pH entre três e dez (WHO, 2001). Uma importante característica da ocratoxina A é sua estabilidade térmica e sua resistência ao tratamento térmico. É altamente estável em alimentos contaminados e estocados, podendo ser recuperada da amostra previamente contaminada, cerca de 45% da toxina após três meses de armazenamento. Apesar da ocratoxina A no seu estado purificado ser foto-sensível, o efeito da luz sobre as toxinas aderidas aos cereais tem pouca importância, apresentando níveis similares em amostras estocadas no escuro ou não. Isso indica que a remoção desta toxina de cereais pode ser muito difícil, tendo como melhor forma de proteção, a prevenção da formação de toxina através de procedimentos de manipulação satisfatórios (TRENK; BUTZ; CHU, 1971).

### 2.3 Ocratoxina em Alimentos

Muitos alimentos podem albergar a ocratoxina sendo que os alimentos vegetais mais comuns são os secos e armazenados, onde geralmente encontram um substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; HALD, 1991; KUIPER-GOODMAN, 1991; WHO, 2001; DILKIN, 2002; FAO, 2001). Estudos nos países mediterrâneos e europeus referenciam a presença em grande parte dos alimentos produzidos nestas regiões. Entre os produtos alimentícios estão temperos como a páprica, cúrcuma e pimentas, além de frutas secas como pistache e amendoins. (SCOTT, 1978; ROSA, 1999; PETZINGER, WEIDENBACH, 2002; GHALI et al., 2008). Cerca de 57% das 6476 amostras de alimentos examinados apresentaram OTA acima do limite de 0,01 mg/kg. A legislação europeia permite até 5 mg OTA/kg. Destas, apenas uma apresentou 31,8 mg/kg. Outro estudo com 2374 amostras de centeio (rye), trigo (wheat), cevada (barley), aveia (oat), milho (maize), apresentou níveis de 3 ppm de OTA em 1,4% das amostras (PETZINGER, WEIDENBACH, 2002). Em muitos países com tecnologia suficiente para evitar a contaminação da toxina em grãos, ela tem sido encontrada. Entre os alimentos que sofrem a ação espoliadora do fungo e podem apresentar a ocratoxina, temos o milho, trigo, aveia, amendoim, arroz, cevada, sorgo, semente de algodão, e, ocasionalmente, as silagens de alguns destes grãos e seus produtos derivados (KROGH, 1977; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; COOK et al., 1986; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; OSWEILLER, 1998; JORGENSEN, 1998; WHO, 2001; COSTA; GERMANO; GERMANO, 2006). Um dos estudos realizados em relação ao substrato afirmava que as sementes oleaginosas proporcionavam melhores condições para o crescimento dos fungos quando comparados a outros grãos (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Um trabalho realizado no Brasil sugere uma contaminação natural de arroz por ocratoxina, indicando ainda a permanência desta toxina mesmo no arroz parboilizado (COELHO, FURLONG, ALMEIDA, 1999). Outros produtos como queijos, temperos, azeitonas pretas e carnes processadas também já foram relacionados com a presença do *Aspergillus ochraceus* (WHO, 2001). Devido a falta ou insuficiência de informações a respeito das contaminações através dos fungos nos alimentos, algumas estatísticas foram desconsideradas com o passar do tempo de acordo com o surgimento de conhecimentos mais detalhados sobre a ecologia dos fungos. O avanço das pesquisas permitiu que alguns fungos tivessem suas classificações alteradas. Assim, os

estudos apontaram para o fato de que a contaminação por ocratoxina A encontrava-se muito mais disseminada do que descrito inicialmente (Tabela 6) (WHO, 2001).

**Tabela 6 Produtos alimentícios com presença de ocratoxina A e suas respectivas referências.**

Produto Alimentício	Referência
Azeite	MIRAGLIA, BRERA, 2002; PAPACHRISTOU, MARKAKI, 2004
Cacau, chocolate	MIRAGLIA, BRERA, 2002; BONVECHI, 2004; TARUFI et al., 2004
Café	VON STEGEN et al., 1997; LEONI et al., 2000; ROMANI et al., 2000; OTTENEDER, MAJERUS, 2001; VARGA et al., 2001; FAZEKAS et al., 2002; LOMBAERT et al., 2002; MIRAGLIA, BRERA, 2002; PARDO et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007
Cereais e seus derivados	CAMPBELL et al., 2000; VARGA et al., 2001; BERETTA et al., 2002; CZERWIECK et al., 2002; FAZEKAS et al., 2002; JORGENSEN, JACOBSEN, 2002; MIRAGLIA, BRERA, 2002; PALERMO et al., 2002; BLESÁ et al., 2004
Cerveja	VISCONTI et al., 2000; FILALI et al., 2001; SOLEAS et al., 2001, MIRAGLIA, BRERA, 2002; ODHAV, NAICKER, 2002; TANGNI et al., 2002
Derivados de carne (fiambres, defumados)	CHIAVARO et al., 2002, MIRAGLIA, BRERA, 2002
Especiarias	VRABCHEBA, 2000; MIRAGLIA, BRERA, 2002
Figos e frutas secas	MIRAGLIA, BRERA, 2002; MACDONALD et al., 2003
Milho	MACHINKI et al., 2001; PUNTARIC et al., 2001
Outros	MILANEZ, SABINO, 1989; MIRAGLIA, BRERA, 2002; MAGNOLI et al., 2002; ALMEIDA et al., 2006
Tecidos suínos	DRAGACCI et al., 1999; JORGENSEN, PETERSON, 2002; MIRAGLIA, BRERA, 2002; CANELA et al., 2008
Uvas e derivados	ZIMMERLI, DICK, 1996; MIRAGLIA, BRERA, 2002; Serra et al., 2003; ABRUNHOSA et al., 2001; OTTENEDER, MAJERUS, 2000; BELLI et al., 2002; BELLI et al., 2004; SHUNDO et al., 2006

Estas espécies são muito difundidas em alimentos tropicais, e tem uma importante característica que é a resistência a temperaturas elevadas, não sendo eliminados pelos processos de secagem dos grãos. Um exemplo é o fungo *Aspergillus carbonarius*, que constitui uma importante fonte de ocratoxina A em frutas secas de parreiras, vinhos e provavelmente café (ROSA, 1999; PITT, 2000; RIZZO, 2002; ROSA et al., 2002; MAGNOLI et al., 2003; DALL'ASTA et al., 2004; MAGNOLI et al., 2004; ROSA et al., 2004). Esta toxina é particularmente perigosa para a indústria avícola e suinícola por que os monogástricos não tem habilidade para degradar a ocratoxina rapidamente, quando comparada aos ruminantes. Os plantéis formados por animais monogástricos são os mais susceptíveis aos efeitos nefrotóxicos destas toxinas, se comparado com os ruminantes. (MAGNOLI et al., 1998; SCOTT et al. 1998; OLIVEIRA et al., 2007). Um perigo que está inerente a contaminação destes animais é que eles fazem parte da cadeia alimentar dos humanos, e com isso existe a possibilidade real de que resíduos da toxina presentes nos tecidos destes animais possam ser ingeridos pelos homens ao se alimentarem com produtos derivados destes animais. (SCOTT et al. 1998; VILAR, OLIVEIRA, STAMFORD, 2002). Os ruminantes são menos susceptíveis que outros animais, tendo como principais efeitos adversos a diminuição da produção leiteira que adquirem uma característica transitória e reversível. Na Europa, queijos, ovos, carnes, produtos derivados e grãos estocados estão na lista de produtos que tem sido apreendidos com níveis de ocratoxina A preocupantes. Nesta região, a ocratoxina foi encontrada em suínos em grandes níveis como contaminante natural no sangue destes animais e já está sendo a principal preocupação dos produtores devido as perdas elevadas. Estudos em órgãos como o fígado de codornas e aves demonstram a presença de micotoxinas e alertam para o envolvimento na cadeia alimentar do homem (DWIVEDI, BURNS, 1984; DWIVEDI, BURNS, MAXWELL, 1984; VILAR, OLIVEIRA, STAMFORD,

2002; GATHUMBI et al, 2003; CARDOZO et al., 2009). Em humanos já detectaram a presença da toxina no sangue associada a doença renal em partes da Europa (SCOTT et al. 1998). O milho é uma das espécies vegetais mais cultivadas no Brasil e é o principal componente das rações usadas na suinocultura industrial. A presença de fungos no milho seja no campo, seja no armazenamento, constitui uma importante fonte natural para a produção de micotoxinas (ASEVEDO et al., 1994; FURLONG et al., 1999). Rações para animais de estimação também estão sujeitos a contaminação fúngica (DALCERO et al., 2002; ROSA, 2002; CAMPOS et al., 2008).

Os fungos consomem grande parte da energia e proteína armazenada nos grãos. Uma carga de milho severamente afetado pode perder até 10% de sua energia metabolizável e 5% de sua proteína. Além disso, as micotoxinas deterioram os grãos ou a ração, reduzindo sua palatabilidade. A deterioração fúngica provoca danos no germe dos grãos, descoloração, alteração nutricional e perda de matéria seca (NETTO et al., 2002).

As aves que são a grande fonte proteica de origem animal da população brasileira e de muitos países tem grande interferência da ocratoxina A, além de outras toxinas, devido a sua presença constante em rações. Estudos em vários países demonstram que a ocorrência de micotoxinas, em especial a ocratoxina A, está presente de forma disseminada, e apesar de representar menor presença que outras toxinas como a aflatoxina, sempre estão presentes, representando um problema em várias regiões (ELLING et al., 1975; DALCERO et al., 1997; DUARTE, CARVALHO, ROSA, 1997; DALCERO et al., 1998; ROSA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007). Se a micotoxina já vem presente na ração destes animais, a contaminação é inevitável pois estes se alimentam exclusivamente desta ração fornecida (KROGH et al., 1976).

Apenas para se ter uma idéia do potencial de contaminação, os cultivares ocupam mais de 47 milhões de hectares do território brasileiro, produzindo mais de 176 milhões de toneladas de grãos neste último ano de 2008, sendo que o milho é a segunda maior cultura em quantidade (CONAB, 2009). As forragens representam 65 a 80% da dieta fornecida a ruminantes em grande parte do mundo. Assim, a qualidade da forragem afeta de maneira significativa o rendimento leiteiro, ganho de peso, eficiência alimentar e outros aspectos do desempenho de ruminantes (NETTO et al., 2002).

Como visto, a temperatura influencia diretamente na existência ou não de determinados fungos produtores de ocratoxina A (FURLONG et al., 1999). Fungos da espécie *Penicillium* produzem ocratoxina A em países de clima temperado e frio e espécies *Aspergillus* são mais presentes em países de clima tropical. Quase todos os cereais podem albergar fungos produtores de OTA, e problemas no manejo pré e pós colheita são os principais fatores de risco para o surgimento desta toxina. Os grãos utilizados na alimentação animal chegam a ter concentrações elevadas como os dados apresentados pelo Conselho de Agricultura dos Estados Unidos da América (RIZZO, 2002). A contaminação por micotoxinas é difícil de se evitar, pois existem inúmeros fatores que atuam em conjunto, favorecendo a contaminação da cultura ou da forragem por fungos e à medida que ocorrem alterações do padrão climático mundial, fenômenos do tipo el niño e la niña, são encontrados fungos produtores de micotoxinas em áreas consideradas anteriormente livres destes patógenos (NETTO et al., 2002).

## **2.4 Mecanismos de Ação da Ocratoxina A**

A ocratoxina A tem algumas características na sua molécula que a levam a um status de risco sanitário elevado. As micotoxinas em geral são metabólitos secundários, e até hoje são descritas como substâncias que não exercem influência sobre o metabolismo e o crescimento fúngico diretamente (PITT, 2000). A maioria apresenta-se com peso molecular

entre 50 e 500 Dalton e, desta forma, essas pequenas moléculas não demonstram propriedades antigênicas, não induzindo assim a resposta do sistema imunológico humano (ELLING, 1977; PIER, 1992; PITT, 2000). O principal perigo das micotoxinas na dieta humana reside na sua inabilidade do nosso organismo para detectá-las biologicamente (PITT, 2000). Algumas características químicas, físicas e físico-químicas da ocratoxina A estão representadas no quadro 1.

### **Quadro 1: Características químicas, físicas e físico-químicas da ocratoxina A.**

#### **Ocratoxina A**

- Nome (chemical abstract): L-Phenilalanine, N-[(5-chloro-3, 4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)-carbonyl]-R-
- Nome sistemático (IUPAC): N-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl]carbonyl]-3-phenyl-L-alanine
- Sinonímia: (-)-N-[(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl) carbonyl]-3-phenylalanina
- N° registro no CAS: 303-407-9

#### **Características e propriedades físico-químicas**

- Descrição: cristais brancos (recristalizados de xileno); intensa fluorescência em luz ultravioleta, emitindo fluorescência verde e azul, em soluções ácidas e alcalinas, respectivamente.
- Peso molecular: 403,84 Dalton
- Ponto de fusão: 169°C – recristalizada de xileno e em benzeno como 90°.
- Absorbância UV máxima (benzeno): 213,332 nm ( $\epsilon$  36.800, 6.400)  
(etanol): 215,333 nm ( $\epsilon$  34.000, 2.400)
- Emissão de fluorescência: máxima a 467 nm em etanol a 96% e de 428 nm em etanol absoluto
- Reação ótica:  $[\alpha]_D^{21} -46.8^\circ$  (c=2,65 mmol/L [1,07 g L<sup>-1</sup>] em clorofórmio) e  $[\alpha]_D^{20} -118^\circ$  (c=1,1 mmol/L em clorofórmio).

#### **Solubilidade**

- A forma de ácido livre é moderadamente solúvel em solventes orgânicos como: clorofórmio, etanol, metanol e xileno.
- Água 1 mg ml<sup>-1</sup> a 19°C
- DMSO (dimetilsulfóxido):  $\geq 100$  mg ml<sup>-1</sup> a 19°C
- Etanol 90%: 10 a 50 mg ml<sup>-1</sup> a 19°C
- Metanol: moderadamente solúvel
- Acetona: 50 a 100 mg ml<sup>-1</sup> a 19°C
- Tolueno: não avaliado.
- Clorofórmio: não avaliado.

Fonte: KUIPER-GOODMAN, 1991; WHO, 1993; THE MERCK INDEX, 1976; ROSA, 1999.

Existe uma relação da farmacocinética da ocratoxina A com suas propriedades de ligação com a albumina e esta varia entre as diferentes espécies animais, inclusive o homem, devido às diferenças na fisiologia destes (GALTIER, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Fatores como a constante de dissociação, a porcentagem de toxina livre ou não ligada e a meia-vida desta toxina após injeção intravenosa têm sido avaliadas, embora permaneça desconhecida a relação entre a ligação das proteínas, a baixa taxa de depuração da toxina (*clearance*) para a circulação sistêmica e a toxicidade da ocratoxina A (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Quanto a absorção e distribuição, a ocratoxina A parece ser absorvida de forma passiva através da membrana lipídica do trato gastrointestinal na sua forma não ionizada ou parcialmente ionizada (GALTIER, 1991, MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GODIN et al., 1997; BERGER et al., 2003). A ocratoxina A é uma micotoxina com propriedades de um ânion orgânico e acredita-se que sua entrada nas células tubulares renais ocorra na porção média e terminal do túbulo proximal através do sistema de transporte orgânico (FRIIS; BRINN; HALD, 1988; ; GALTIER, 1991; STORMER, 1992; WHO, 2001). O grupo hidroxifenólico no anel diidro-isocumarínico e o grupo carboxílico em fenilalanina são os responsáveis primários pela absorção da ocratoxina A, pois são eles que dão as

propriedades de ácido fraco da molécula (GALTIER, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GODIN et al., 1997). A maioria dos eletrólitos de propriedade química ácido fraco tem na difusão da forma não ionizada o principal mecanismo de transferência gastrointestinal (GALTIER, 1991; GODIN et al., 1997). Alguns trabalhos sugerem que na maioria das espécies animais, a ocratoxina A é absorvida primariamente pelo estômago. Outros ainda relatam que a absorção máxima ocorre no esôfago e, em menor grau, no jejuno (GALTIER, 1991). No sangue dos animais e dos homens, a toxina está firmemente ligada às proteínas plasmáticas, não sendo descritas filtração glomerular. Segundo estudos esta penetra na célula através da membrana peritubular (FRIIS; BRINN; HALD, 1988; WHO, 2001). A ligação com as proteínas plasmáticas evitaria sua reabsorção pelos enterócitos através de sua membrana basolateral (BERGER et al., 2003). A secreção tubular renal e a reabsorção da micotoxina poderiam facilitar sua persistência residual nos rins (GALTIER, 1991). Outro fator que pode influenciar na taxa de absorção da ocratoxina A pelos animais é o pH da digesta. Com pH mais ácidos, a taxa de absorção seria maior nas paredes do trato gastrointestinal. Presume-se que o baixo pH do rúmen, particularmente nos animais alimentados com dietas com maior concentração de grãos e menor concentração de silagem poderia facilitar a absorção direta da ocratoxina A do rúmen para o sangue (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Resíduos de ocratoxina A geralmente não são encontrados nos ruminantes porque ela é clivada no rúmen por protozoários e enzimas bacterianas próprios deste ambiente, sendo detectado em menor escala apenas traços de ocratoxina  $\alpha$  que é um produto não tóxico derivado da degradação da toxina pela flora natural dos ruminantes (GALTIER, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Como descrito, a alta afinidade de ligação entre a ocratoxina A e constituintes do plasma são responsáveis por facilitar a absorção passiva de formas não ionizadas pelo sistema digestivo. Esta afinidade é um fator importante que afeta a toxidez da ocratoxina A, atuando também no atraso da sua eliminação através da limitação da transferência da toxina da corrente sanguínea para as células hepáticas e renais, contribuindo assim para prolongar sua meia-vida. Além da albumina do plasma, existem estudos que evidenciam a existência de uma molécula de baixo peso molecular (20.000 Dalton) que se liga mais especificamente a ocratoxina A, sendo relevante no aspecto da nefrotoxicidade dos efeitos em mamíferos, pois as suas moléculas poderiam passar facilmente pela membrana glomerular normal, possibilitando o acúmulo de ocratoxina A nos rins, fato que não acontece na ligação com a albumina (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Dentre algumas espécies estudadas, bovinos, suínos e humanos possuem uma maior afinidade de ligação entre a ocratoxina A e a albumina sérica do que espécies como aves, ratos e ovinos (GALTIER, 1991; WHO, 2001). Os suínos tem uma sensibilidade alta se comparado aos animais destinados a alimentação humana produzidos em maior escala. Assim, a taxa de biotransformação de ocratoxina A em suínos é baixa, com uma meia-vida após a ingestão de cerca de 89 horas (DRAGACCI et al., 1999) e após injeção intravenosa de cerca de 150 horas (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Já a meia-vida avaliada para codornas foi de 12 horas, para o rato de 170 horas e para o macaco de 840 horas (35 dias) após injeção de ocratoxina A via intravenosa. Esses valores sugerem uma forte ligação entre a molécula de ocratoxina com as proteínas plasmáticas do sangue de animais, principalmente os suínos, e também uma forte correlação positiva devido a meia-vida desta molécula ser maior e com isso proporcionar um maior tempo de permanência no organismo destes animais, antes de sua eliminação (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GALTIER, 1991; WHO, 2001).

Os metabólitos secundários aparecem a partir de derivados formados pelo metabolismo primário e as cinco principais vias metabólicas são: via dos aminoácidos; via do ácido shikimico para a biossíntese de aminoácido aromático; via biossintética dos policetídeos para a acetil-coenzima A (CoA); via do ácido mevalônico para a CoA e polissacarídeos e peptideopolissacarídeos. Segundo Galtier (1991), a hidrólise da ocratoxina A no seu derivado

isocumarínico (ocratoxina  $\alpha$ ) é a principal via metabólica. Essa detoxificação ocorre através da ação de carboxipeptidases bacterianas presentes no estômago de ruminantes e no intestino grosso de outros animais. A 4-hidroxiocratoxina A é o principal metabólito hepático e a razão entre esse metabólito e a ocratoxina A excretada na urina pode estar relacionada com o potencial carcinogênico da toxina, visto que o metabólito é um agente imunossupressor quase tão efetivo quanto a ocratoxina A.

Os problemas decorrentes da presença da ocratoxina A no organismo de um animal ou de uma pessoa são cumulativos, afetam a proteção e o equilíbrio natural dos sistemas imunológicos e estão diretamente ligados ao período silencioso da doença, que é longo, até o aparecimento repentino dos sintomas (CRUZ, ROSA, 1981; BARISIC et al., 2002). Esta toxina entra nas células e tem a capacidade de inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial (LINDNER, 1990; STORMER, 1992; BARISIC et al., 2002; WHO, 2001), interfere no acúmulo de ácido p-aminohipúrico, que é um parâmetro para a via de transporte aniônico e também prejudica a via de transporte catiônica (STORMER, 1992; WHO, 2001).

As micotoxinas podem provocar o aumento da glicemia com o acúmulo de glicogênio no fígado ao inibir a ativação de diferentes enzimas participantes do metabolismo do glicogênio e da glicose, como a fosforilase-quinase, enzima chave na gliconeogênese renal, exercendo um efeito negativo neste processo (LINDNER, 1990; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; STORMER, 1992; CERAIN et al., 2000; WHO, 2001). A diminuição da síntese de proteína DNA e RNA é um dos principais efeitos da contaminação por ocratoxina A pois é uma toxina que tem a característica de ser um potente inibidor da fenilalanina-tRNA ligase após agregar-se ao grupo L-fenilalanina da ocratoxina A (LINDNER, 1990; STORMER, 1992; MALAGUTTI et al., 2005). Testes em ratos de laboratório em estado de avançada gestação evidenciam a interferência da ocratoxina A sobre o DNA, induzindo a formação de adutos e demonstrando a genotoxicidade desta molécula. Estes diferentes adutos foram importantes nos rins e no fígado dos animais testados e na sua cria, indicando também a contaminação transplacentária desta micotoxina, constituindo uma séria ameaça quanto a exposição dos indivíduos (PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1998). As lesões dos rins estão relacionadas com a perda de atividade de diversas enzimas do túbulo contornado proximal. A ocratoxina A provoca a liberação de alanina-aminopeptidases e leucina-aminopeptidases, como resultado da inibição do transporte aniônico e, também, inibe a enzima fosfoenolpiruvatocarboxinase, bloqueando, assim, a gliconeogênese nos rins. A diminuição da atividade desta enzima é considerada por alguns pesquisadores um indicador específico e altamente sensível de ocratoxina A em suínos (KROGH et al., 1988).

Fatores como a via de introdução, com o tempo decorrente da entrada da ocratoxina A no organismo e com a perfusão sanguínea do órgão atingido determinam a distribuição da ocratoxina A pelos tecidos. Através da via oral, a maior concentração de ocratoxina A foi encontrada após 24 horas principalmente no trato gastrointestinal seguido de significantes níveis de ocratoxina A nos rins, fígado, cérebro, músculos, pele e gordura (KROGH; HALD; PEDERSEN, 1973; KROGH, 1976; MADSEN; MORTENSEN; HALD, 1982; GALTIER, 1991). Em ratos, existe maior possibilidade de retenção de resíduos em órgãos com menor perfusão como a pele, músculos, gordura, olhos e certas glândulas (GALTIER, 1991). Em alguns animais como ratos e coelhos, bem como nos humanos, a transferência da ocratoxina A para o leite já foi determinada. Nos ruminantes, apenas foram observados resíduos no leite devido ao metabolismo desta micotoxina pela microflora intestinal (CREPPY, 2002). A prevenção contra a toxicidade da ocratoxina A através de aspartame já foi relatada em trabalho técnico (CREPPY, BAUDRIMONT, ANNE, 1998). Um trabalho já apontou para efeitos imunotóxicos deletérios em ratos após ingestão via oral (ALVAREZ et al., 2004) e em bodes (BIRO et al., 2001). Pode ainda ocorrer, experimentalmente, a transferência placentária da toxina e também a presença no leite de matrizes de suínos (GALTIER, 1991). Com relação



aos mecanismos de defesa celular, estes são ativados após a exposição da célula a situações de hipertermia, cirurgia, anestesia, dano tecidual, isquemia, diminuição da reperfusão sanguínea, inflamação, injúria oxidativa e uma variedade de outros estímulos (BARISIC et al., 2002). A ocratoxina A interfere em muitos processos ao nível celular como a síntese protéica e o metabolismo energético. Observações realizadas posteriormente à exposição natural ou experimental à ocratoxina A demonstraram um grande número de alterações morfológicas e bioquímicas primariamente nos túbulos proximais renais e, em menor extensão, no fígado, no cérebro e em outros tecidos (BARISIC et al., 2002).

Quanto a excreção das micotoxinas, é importante observar as rotas de eliminação, já que através delas consegue-se observar as fases e o tempo de duração desde sua entrada no organismo até sua eliminação. A toxina, após a circulação enterohepática, é excretada nas fezes e urina em vários metabólitos ainda não totalmente identificados. A toxina não atravessa a placenta em fetos de fêmeas suínas. O transporte da toxina nos rins é mediado por um sistema de transporte orgânico renal de caráter aniônico, podendo o próprio metabolismo renal contribuir para a detoxificação (GALTIER, 1991; MONACI, PALMISANO, 2004). Apesar da evolução do conhecimento sobre os efeitos da ocratoxina A, o preciso mecanismo de ação da toxina é desconhecido (STORMER, 1992; MONACI, PALMISANO, 2004).

## **2.5 Quadro Clínico e Achados Anatomopatológicos em Suínos**

Os suínos criados em regime intensivo são animais altamente sensíveis a alterações seja no manejo, seja no ambiente. Eles necessitam de bons controles na granja para que não fiquem expostos a infecções microbianas. Além de todo o cuidado com o seu manejo, o arraçamento deve ser feito para que todo o potencial genético seja aproveitado da melhor maneira possível, diminuindo custos e aumentando o aproveitamento dos insumos. Assim, o alimento que entra na granja deve ser de boa qualidade para que problemas de origem fúngica não estejam presentes para que não aumentem os custos com perdas como a diminuição da eficiência de conversão alimentar, por exemplo (SOBESTIANSKY et al., 1999). A micotoxicose aguda nos animais ocorre devido a ingestão de altos níveis de micotoxinas e resultam em sintomas similares a um envenenamento. Inicialmente começa com vômito, diarreia, prostração e morte pode ser repentina e drástica. A micotoxicose aguda pode ser ocasionalmente confundida com doença viral ou bacteriana aguda devido a rapidez e severidade dos sintomas. Quando isso acontece, falhas nos tratamentos terapêuticos indicam o erro no diagnóstico. A recuperação da forma aguda é rara devido aos danos causados no fígado e outros órgãos vitais (KROGH, 1976; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; OSWEILLER, 1998; DRAGACCI et al., 1999; PITT, 2000; DILKIN, 2002; WILCOX, 2008). Entretanto, a ocorrência de micotoxicoses nos animais que mais se percebe é a forma crônica. Esta se dá pela ingestão de níveis sub-agudos de micotoxinas e a apresentação clínica dos sintomas geralmente está ausente, ocorrendo no máximo, redução no ganho de peso e perda de apetite. Pode causar também redução da resistência natural contra doenças e infecções e se torna assim um fator complicador para o diagnóstico e tratamento de doenças nos animais de uma forma geral (RUTQVIST et al., 1978; KROGH et al., 1979; COOK et al., 1986; OSWEILLER, 1998; CURTUI et al., 2001; DILKIN, 2002; WILCOX, 2008). Animais contaminados por ocratoxina podem demonstrar de forma lenta e incompleta sinais de recuperação desta micotoxicose quando arraçados com alimentos livres de micotoxinas (MADSEN; MORTENSEN; HALD, 1982; HALD, 1991).

Os suínos são um dos grupos animais que apresentam maior sensibilidade à ação da ocratoxina A. Sua intoxicação, assim como da grande parte dos animais, se dá através da ingestão de grãos contaminados por fungos produtores desta toxina (KROGH, 1976; HERRMAN, 1991; DRAGACCI et al., 1999; WHO, 2001; MALAGUTTI et al., 2005;

PFOHL-LESZKOWICK, MANDERVILLE, 2006). Assim como os outros animais, o grau de intoxicação vai depender de alguns fatores. Ao ingerir o alimento contaminado, os animais suscetíveis como os suínos podem iniciar um processo de intoxicação que varia da forma aguda à crônica, dependendo da concentração e duração da exposição à toxina e da idade e estado nutricional do animal (KROGH, 1976; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; WOOD, 1992; DRAGACCI et al., 1999; PITT, 2000; LAWLOR; LYNCH, 2001, KELLER et al., 2007). A fisiologia e a estrutura dos órgãos, principalmente os órgãos alvos que são os rins e o fígado, podem ser afetados até o ponto de levar a óbito em casos extremos, além do efeito deletério nos tecidos musculares (KROGH, 1976; DRAGACCI et al., 1999 PITT, 2000). A dose letal 50% (DL50) de ocratoxina A para os suínos é de 1,0 a 6,0 mg/kg de peso vivo, enquanto que para camundongos é de 46 a 58 mg/kg pv e, para os ratos adultos, de 20 a 30 mg/kg pv (MARQUARDT; FROHLICH, 1992).

Os animais podem sofrer de intoxicações simultâneas por diferentes micotoxinas. Algumas interagem sinergicamente e outras antagonicamente. Esta condição é facilitada pela possibilidade da ocorrência de mais de uma micotoxina em um mesmo produto alimentício (KROGH; HALD; PEDERSEN, 1973; TAPIA; SEAWRIGHT, 1985; HARVEY et al., 1989; BRAUNBERG et al.; 1992; SPEIJERS; SPEIJERS, 2004). Alguns estudos apresentam dados que demonstram efeitos aditivos ou uma leve tendência para os efeitos sinérgicos entre a ocratoxina A e a citrinina (KROGH; HALD; PEDERSEN, 1973; MANNING et al., 1985; BRAUNBERG et al., 1994; SPEIJERS; SPEIJERS, 2004), entre a ocratoxina A e a aflatoxina (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; TAPIA; SEAWRIGHT, 1985), entre a ocratoxina A e a toxina T-2 (tricoteceno) (HARVEY et al., 1994) e entre a ocratoxina A e o ácido penicílico (STOEV et al., 2001) entre outros, enquanto outros estudos não encontraram evidências para qualquer tipo de efeito significativo (MANNING et al., 1985). No Brasil, a nefropatia micotóxica suína aguda já foi diagnosticada em Santa Catarina quando 400 suínos morreram em um intervalo de sete dias devido à ingestão de milho contaminado por *Aspergillus ochraceus* (CRUZ et al., 1984). Esta mesma patologia causada por citrinina também já foi observada no estado do Rio de Janeiro devido a ingestão de restos de cervejaria compostos por cevada contaminada por *Penicilium citrinum* (ROSA et al., 1985). Também no Sul do país pesquisadores determinaram quantidades de ocratoxina A em sangue de suínos (SANTURIO, MALLMANN, 1993; MALLMANN et al., 1994).

Os sinais clínicos mais comuns em suínos com ocratoxicose são: polidipsia, poliúria, anorexia, vômito, diarréia, enterite, desidratação, depressão, diminuição da taxa de ganho de peso e diminuição na ingestão de ração. Outros exames podem constatar alterações como proteinúria, glicosúria, redução da função imunológica e alterações nos níveis bioquímicos séricos, além de rins pálidos e aumentados, degeneração tubular e fibrose cortical. (SZCZECZ et al., 1973; KROGH, 1976; THACKER; CARLTON, 1977; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; WHO, 1984; TAPIA; SEAWRIGHT, 1985; MANNING et al., 1985; COOK et al., 1986; MARQUARDT et al., 1988; PIER, 1992; STORMER, 1992; HARVEY et al., 1994; OSWEILLER, 1998). Nota-se que estes sinais clínicos podem ser confundidos com inúmeras outras patologias, devendo assim, o médico veterinário atentar-se para os fatores ambientais e para um bom histórico durante o questionamento na anamnese.

**A consequência de alimentar suínos com cereais contaminados por micotoxinas como a ocratoxina A é, primariamente, o desenvolvimento de nefropatia resultando na baixa produção e possível morte dos animais e, secundariamente, a presença de resíduos (ocratoxina A) em órgãos e tecidos nos animais produtores de carne, representando assim um problema de Saúde pública** (KROGH, HALD E PEDERSEN 1973; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; MORTENSEN et al., 1983; WHO, 1984).

O estudo dos órgãos alterados macroscopicamente por laboratórios de anatomia patológica é uma importante ferramenta no diagnóstico da OTA. Não se constitui, porém,

num fator determinante para fechar um diagnóstico (KROGH et al., 1976; KROGH, 1977; RUTQVIST et al., 1978; KROGH et al., 1979; GOLINSKI et al., 1984; ELLING et al., 1985; COOK et al., 1986; HARVEY et al., 1989, HARVEY et al., 1994; STOEVE et al., 2001; BARISIC et al., 2002). É muito válido para o dimensionamento das lesões e, muitas vezes, para indicar os casos suspeitos de determinadas patologias (ELLING et al., 1985; COOK et al., 1986; STOEVE et al., 2001; BARISIC et al., 2002). Lesões nos rins de suínos abatidos em matadouros inspecionados no Brasil dificilmente são examinados no aspecto microscópico posteriormente a condenação do órgão. Desde 1978 a Dinamarca tem indiretamente controlado através do exame macroscópico o nível de ocratoxina A em suínos após o abate. Ao constatarem alterações sugestivas, os rins examinados são testados quimicamente para ocratoxina A e se tiverem níveis iguais ou superiores a 25 µg/kg de rim suíno, suas carcaças são condenadas (KROGH, 1976; JORGENSEN, 1998). Observou-se que a meia-vida dos resíduos de ocratoxina A variava conforme o tecido estudado, sendo que o rim apresentou a maior meia-vida, seguido pelo fígado, músculo e gordura, propondo-se então que o rim possa ser utilizado como um indicador na inspeção de carnes (KROGH et al., 1976). Para o diagnóstico definitivo deve-se correlacionar os achados anatomopatológicos, o exame clínico e a detecção da toxina no alimento ou no animal através de métodos analíticos, o que em geral não é avaliado (COOK et al., 1986; MILICEVIC et al., 2007, 2008). São relacionadas alterações renais como a degeneração e atrofia tubular, fibrose periglomerular e fibrose intersticial, descamação e necrose das células epiteliais dos túbulos contornados proximais, estendendo-se para os néfrons, dilatação dos túbulos contornados e coletores, redução das bordas em escova. Essas alterações são variáveis, não sendo, portanto, condição específica para a presença da ocratoxina A (KROGH; HASSELAGER; FRIIS, 1970; SZCZECH et al., 1973; ELLING, 1977; RUTQVIST et al., 1978; KROGH et al., 1979; GOLINSKI et al., 1984; TAPIA; SEAWRIGHT, 1985; ELLING et al., 1985; COOK et al., 1986; ROUSSEAU et al., 1987; GALTIER, 1991; HALD, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; HARVEY et al., 1994; DRAGACCI et al., 1999; STOEVE et al., 2001). Macroscopicamente, pode-se visualizar com maior frequência o aumento de tamanho, cor alterada de leve a pronunciadamente pálida e com pontos esbranquiçados, superfície lisa ou com vesículas, e ao corte, grandes quantidades de tecido conectivo no córtex, com cistos entre eles (ELLING; MOLLER, 1973; RUTQVIST et al., 1978; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; HALD, 1991; STOEVE; HALD; MANTLE, 1998). A análise sanguínea quanto à presença de resíduos de ocratoxina A tem sido muito estudada e correlacionada aos achados histopatológicos (RUTQVIST et al., 1978; KROGH et al., 1979; MORTENSEN, HALD, MADSEN, 1983; GOLINSKI et al., 1984). Demonstrou-se em um estudo que as concentrações de ocratoxina A no sangue e no plasma foram, respectivamente, cinco e treze vezes maior que as concentrações nos rins (RUTQVIST et al., 1978; HULT et al., 1979).

## **2.6 Métodos Analíticos para Detecção da Ocratoxina A**

A ocratoxina A pode ser identificada em diferentes tecidos, principalmente o renal e o hepático e também no sangue e urina. Portanto, o diagnóstico definitivo é realizado através da análise da presença da micotoxina no alimento dos animais intoxicados ou ainda sobre os dos tecidos dos animais suspeitos de contaminação por micotoxinas (CHU, 1992; WHO, 2001; DILKIN, 2002; BLESA et al., 2004; PATERSON, VENÂNCIO, LIMA, 2004). Existe uma tecnologia crescente dos métodos analíticos, o que possibilita a realização de exames cada vez mais específicos e sensíveis (NGILORITI; KROLL, 1990; DILKIN, 2002). Já foram desenvolvidos diversos protocolos usando as técnicas de cromatografia em camada delgada - CCD (GATENBECK; HULT; RUTQVIST, 1977; HULT et al., 1979; HULT et al., 1980; NGILORITI; KROLL, 1990; OMINSKI et al., 1996), cromatografia líquida de alta eficiência

– CLAE (HUNT; PHILP; CROSBY, 1979; MARQUARDT et al., 1988; MALLMANN et al., 1994; OMINSKI et al., 1996; ENTWISLE et al., 1997; VALENTA, 1998; CURTUI et al., 2001; BIRÓ et al., 2002; FILALI et al., 2002; DOMIJAN et al., 2003; BLESA et al., 2004; KÖLLER et al., 2004; MONACI et al., 2004; TÁRIN; ROSELL; GUARDINO, 2004; CECCI et al., 2007), radioimunoensaio - RIA (ROUSSEAU et al., 1987; FUKAL, 1990) e ELISA (MORGAN et al., 1986; BIRÓ et al., 2002; MATRELLA et al., 2006). A Organização Mundial de Saúde considera a técnica de cromatografia líquida como a mais indicada para a análise da ocratoxina A (WHO 2001; MATRELLA et al., 2006). Os detectores mais usados na CLAE são os fotométricos, baseados na absorbância, no ultravioleta e no visível. Os detectores de fluorescência, utilizados como método de detecção específico, são sensíveis para substâncias que fluorescem. Este tipo de detector pode detectar quantidades de ordem picograma. Também são utilizados detectores por índice de refração, os quais acompanham continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra. A resposta deste detector é moderada, geralmente de ordem micrograma (ZIMMERLI, DICK, 1995; PERES, 2002; BLESA et al., 2004). O método fluoroespectrofotométrico é baseado na diferença entre o espectro fluorescente de excitação da ocratoxina A e da ocratoxina  $\alpha$ , utilizando carboxipeptidase A para clivar ocratoxina A em ocratoxina  $\alpha$  e fenilalanina. A quantificação da ocratoxina A é feita a partir da perda de intensidade fluorescente a 380nm, que é o pico de excitação máxima da ocratoxina A (GATENBECK; HULT; RUTQVIST, 1977; HULT et al., 1979; HULT et al., 1980). Pode-se utilizar acoplada à técnica de CLAE, um espectrômetro de massa para confirmar a presença da ocratoxina (JORGENSEN; VAHL, 1999). Algumas técnicas utilizam colunas de imunoafinidade para melhorar a qualidade das amostras e diminuir interferentes (UENO et al., 1991; SHARMAN, MACDONALD, GILBERT, 1992; ZIMMERLI, DICK, 1995; SCOTT, TRUCKSESS, 1997; PASCALE, VISCONTI, 2000).

## 2.7 Legislação

O impacto das micotoxinas na saúde humana e animal é atualmente reconhecido e se estima que as mesmas causem graves perdas econômicas, estimadas em milhões de dólares em todo o mundo (VAN EGMOND, 1995; PERAICA et al., 1999). Frequentemente mudanças de atitudes frente questões de cunho legislativo são motivadas por pressões econômicas no nosso país e em muitos outros. O aumento da concorrência e a alta produtividade de países emergentes como o Brasil tem motivado o surgimento de barreiras estritamente econômicas disfarçadas por motivos de ordem sanitária.

Fatores que tem influenciado as decisões tomadas pelas autoridades sanitárias para estabelecer os limites aceitáveis para certas micotoxinas não tem sido embasados necessariamente por conhecimentos científicos (VAN EGMOND, 1995; CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002; BENNETT; KLICH, 2003; PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004). Alguns destes fatores podem estar relacionados com a disponibilidade de dados toxicológicos, a disponibilidade de dados analíticos de inspeções nos produtos, a distribuição das micotoxinas sobre os gêneros alimentícios, a disponibilidade de métodos para a análise, a existência de legislação em países com os quais se relacionam comercialmente, o suprimento suficiente de alimentos, entre outros (VAN EGMOND, 1995).

Através de um sistema integrado é que o controle do risco associado com a contaminação das micotoxinas seria possível para garantir a segurança dos alimentos processados, que, sem a aplicação das boas práticas de manufatura, prevenção e controle da qualidade em todos os pontos da produção não se torna adequado qualquer tipo de controle. Deve-se ainda respeitar um modelo de controle para cada tipo de toxina específica. Um programa adequado para assegurar um alimento livre de micotoxinas deve considerar os seguintes passos:

- 1- Estabelecer limites regulatórios.
- 2- Estabelecer programas de monitoramento.
- 3- Adotar um plano de amostragem adequado.
- 4- Controle na etapa do processamento.
  - a) Boas práticas de manufatura.
  - b) Controle de qualidade.
- 5- Descontaminação mediante tratamentos específicos
  - a) Avaliação do produto final.
  - b) Aceitação do uso do produto tratado.

A avaliação de risco da ocratoxina A em alimentos ocorre oficialmente através de uma junta de especialistas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) que se reúne regularmente para as reavaliações pertinentes. Desde 1970 os contaminantes de alimentos têm sido avaliados pelos comitês dos órgãos mundiais, entre eles, o *Codex Alimentarius*. São as resoluções tomadas a partir destes encontros que estabelecem os níveis a serem seguidos pela comunidade internacional para o comércio dos seus produtos (HERRMAN, 1991; WHO, 2001). A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação estima que um quarto de todos os grãos destinados a alimentos produzidos no mundo esteja contaminado em alguma proporção por micotoxinas. Isso se traduz em aumento dos custos para os produtores de grãos: menor rendimento, valor nutritivo e incremento nos custos de transporte; para os pecuaristas: menor rendimento dos animais, problemas na reprodução, aumento na incidência de enfermidades, gastos com pessoal veterinário, aumento dos custos de descontaminação e perdas nos mercados; para os distribuidores: aumento nos custos de processos como de secagem, detoxificação e capacidade de armazenamento; e para as indústrias: perdas do produto, custos de supervisão e análise de micotoxinas nos produtos (POSTUPOLSKI et. al, 1999; FINK-GREMMELS, 1999; OSWEILER, 2000; HUSSEIN E BRASEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003).

Em relação à ocratoxina A, tem-se dado atenção especial desde 1993, quando a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) classificou esta toxina como um carcinógeno humano do grupo 2B, baseado em suficientes evidências para carcinogenicidade em estudos em animais de laboratório (WHO, 1993; PITTET, 1998; DRAGACCI et al., 1999). O comitê para aditivos alimentares da Organização Mundial da Saúde estabeleceu em 1991 que para uma taxa de ingestão tolerável de ocratoxina A, poderia ser aplicado um nível mais baixo de efeito observado de 0,008 mg/kg de peso corporal por dia. Baseado neste dado foi estabelecido uma ingestão tolerável semanal provisória de 112 ng/kg de peso corporal (HERRMAN, 1991). Em 2001, o limite da ingestão tolerável semanal provisória passou para 100 ng/kg de peso corporal (WHO, 2002).

Apesar da grande importância econômica, poucos são os países que possuem uma legislação que aborde os limites de tolerância para micotoxinas em alimentos. O estabelecimento de limites regulatórios varia de um país a outro, dependendo da exposição, fatores políticos, sociais e econômicos. Devido ao aumento na exportação de produtos alimentícios se faz necessário estabelecer limites regulatórios nacionais e internacionais (Marquardt et al., 1988). Em 1995, cerca de 60 países enquadravam-se nesse grupo, embora a maioria regulasse apenas os níveis para aflatoxinas, deixando de estabelecer doses máximas para outros tipos de micotoxinas como a ocratoxina A, por exemplo (VAN EGMOND, 1995). Atualmente o quadro não se alterou muito. Cerca de 90 países possuem regulamentação ou propostas sobre limites de micotoxinas em seus alimentos; 77 países tem algumas

regulamentações, embora 13 não possuam nenhuma regulamentação vigente (FAO, 1997; BOUTRIF, CANET, 1998; KOE, 1999).

A presença de aflatoxinas em alimentos foi regulamentada no Brasil, em 1976, pela Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (BRASIL, 1977), que prevê o máximo de 30 µg/kg (SILVA et. al., 1996). No MERCOSUL, apenas o Uruguai possui limite para ocratoxina A em arroz, cevada, café e milho que é de 50µg/kg (FONSECA, 2009). A legislação sobre aflatoxina refere-se aos produtos naturais e não contempla as demais micotoxinas. Porém, vários governos já instituíram limites regulamentares para micotoxinas em alimentos e rações animais para venda ou importação. Os países do MERCOSUL estabeleceram a Resolução nº56/94, que foi internalizada pela Portaria nº183 (de 21/3/96) do Ministério de Agricultura e Abastecimento. A Resolução nº 56/94 do MERCOSUL determina o máximo de 20 µg/kg para o somatório das aflatoxinas B1 + B2 + G1 + G2, desde que a aflatoxina B1 seja inferior a 15 µg/kg. Para o leite permite limite máximo de 0,5 µg/L (ppb) (fluído) e 5,0 µg/L (em pó) para aflatoxina M1; para o milho e farinhas de sêmola, amendoim e pasta de amendoim o limite é de 20 µg/kg para aflatoxinas B1+B2+G1+G2 (BRASIL, 1996; 2002). Em alimentos infantis aflatoxinas não devem ser detectadas, e nas rações animais é permitido no máximo 100 µg/kg (SILVA et. al., 1996). Esses limites estabelecidos no âmbito do MERCOSUL são compatíveis com outros países e são comparáveis aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial de Saúde - OMS e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO (WHO, 2002).. Quanto às outras micotoxinas, existem discussões sobre a zearalenona, a ocratoxina A e a patulina. Os tricotecenos constam da lista de prioridades e para fumonisina ainda não há dados suficientes (VILAR, OLIVEIRA, STAMFORD, 2002).

Na legislação comum a todos os membros da União Européia, a ocratoxina A tem limites para cereais crus (5µg/kg), produtos derivados de cereais para consumo direto (3µg/kg) e frutas secas (10µg/kg) (CEE, 2002). Entretanto, alguns países da União Européia possuem legislações mais restritivas e específicas como o caso da Grécia que especifica limites para café cru, suco e produtos de maçã (20 µg/kg), a Itália para café cru (8 µg/kg), café torrado e moído (4µg/kg), cacau e produtos derivados (0,5 µg/kg), carne de suíno e derivados (1µg/kg) e cerveja (0,2 µg/kg), a Dinamarca para rins suínos (25 µg/kg ou ng/g) e a Suécia para rações para aves (200µg/kg) e para suínos (100µg/kg) (FONSECA, 2009). Em relação à regulação na Dinamarca, o limite máximo permitido de concentração de ocratoxina A no rim foi alterado em 1980 para 25 ng/g, o que corresponde a 125 ng/ml de sangue ou 219 ng/ml de soro (MADSEN; MORTENSEN; HALD, 1982).

Os dados sobre as pesquisas realizadas no mundo sobre a ocratoxina A foram revisados pelo comitê da FAO entre 1996 e 2001. O continente que mais produziu material científico sobre a ocratoxina A foi a Europa com 85% do total, seguido pela América do Sul (7%), América do Norte (6%), África (1%) e Ásia (1%). Entre as pesquisas levantadas, as concentrações de ocratoxina A em diferentes gêneros alimentícios foram altamente variáveis (FAO, 2001).

A necessidade de regulamentos que estabeleçam limites máximos de tolerância de micotoxinas em alimentos e rações é geralmente, reconhecida nos países desenvolvidos enquanto muitos países em desenvolvimento não possuem nenhuma legislação (Tabela 7). Frequentemente, países que possuem uma legislação sobre determinado produto costumam estabelecer barreiras comerciais em relação a países que não possuem tais leis, para que sejam minimizados os problemas com este tipo de contaminação (WOOD, 1992; VAN EGMOND, 1995; SABINO, 1999, ABIPECS, 2009). Alguns países como os Estados Unidos já vem impondo limites para alguns produtos em relação a determinadas micotoxinas (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004).

Atualmente está em consulta pública uma nova proposta para adequação das normas promovida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**Consulta Pública nº 100, de 21 de dezembro de 2009**). As regras dispõem sobre limites máximos tolerados (LMT) de micotoxinas em alimentos que para ocratoxina A tem os seguintes produtos contemplados e respectivos níveis (em µg/kg): Cereais e produtos a base de cereais, Café torrado, Café solúvel, Vinho, Condimento e especiarias (10,0); Alimentos infantis a base de cereais (2,0); Produtos de cacau e chocolate (5,0) e Frutas secas e desidratadas (10,0).

**Tabela 7: Níveis máximos de micotoxinas tolerados nos cereais e em alimentos a base de milho para consumo animal (continua).**

<b>País</b>	<b>Produtos</b>	<b>Micotoxinas (µg/kg)</b>
Dinamarca	Cereais e subprodutos	Ocratoxina A: 5
França	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> : 10
	Cereais	ZEA: 200
Países Baixos	Cereais e subprodutos	Ocratoxina A: 5
	Todos os alimentos	Todas as micotoxinas: 0
Romênia		AFB <sub>1</sub> : 0 - ZEA: 30
		Patulina:30
Suíça		Ocratoxina A: 5
	Milho e cereais	AFB <sub>1</sub> : 2
		AFB <sub>2</sub> AFG <sub>1</sub> AFG <sub>2</sub> : 5
Uruguai	Produtos a base de cereal	Ocratoxina A: 2
	Produtos a base de milho	FB <sub>1</sub> y FB <sub>2</sub> : 1000
	Cereais e milho	Ocratoxina A: 50
	Milho e aveia	ZEA: 200

Fonte: BOUTRIF E CANET, (1998).

Dentre as recomendações práticas para controle de micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, toxina T-2, vomitoxina, fumonisina) está o monitoramento constante de grãos ou da própria planta, por meio de análises laboratoriais. Este monitoramento é o ponto fundamental num programa de controle de micotoxinas (WOOD, 1992; SABINO, 1999). Entretanto, é necessário que os laboratórios estejam qualificados para examinar lotes de grãos que são importados ou exportados entre os países (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980). Sem informações toxicológicas não se pode determinar se a substância em questão induz perigo ou não e para isso, é necessário monitorar os níveis de contaminação por micotoxinas dos produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal e colaborar com as ações de assistência técnica visando à prevenção e controle de micotoxinas nas fases de cultivo, colheita e pós-colheita (SABINO, 1999). Um efetivo programa de controle pode reduzir as quantidades de ocratoxina A consumidas através de produtos derivados de suínos (BÜCHMANN; HALD, 1985) e evitar problemas de ordem judicial no que se refere a presença de micotoxinas nos alimentos (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; BENNETT; KLICH, 2003).

Ainda hoje, apesar de todo o desenvolvimento tecnológico, continua sendo necessário o estabelecimento de padrões de monitoramento e que sejam aplicadas medidas para o controle específico das diferentes micotoxinas nos diversos tipos de alimentos, desde cereais até produtos industrializados de origem animal. Eliminar por completo o risco da presença de micotoxinas nos alimentos é improvável, mas a minimização de sua presença deve ser buscada o mais rápido possível.

## **2.8 Prevenção**

Na indústria animal, a redução nas taxas de crescimento e na conversão alimentar devido à contaminação da dieta de suínos por ocratoxina A tem resultado em perda financeira

significativa para os produtores (MADSEN, 1982). Na suinocultura em específico, faz-se necessário a conscientização do suinocultor em utilizar rações de boa qualidade e livres de ocratoxina A e outras micotoxinas (JORGENSEN; PETERSEN, 2002), já que as micotoxinas são consideradas contaminantes naturais de alimentos e sua formação é frequentemente inevitável (BENNETT; KLICH, 2003). As rações dos animais podem estar contaminadas devido a microbiota já existentes nos grãos que as compõem, levando a possibilidade da intoxicação crônica destes (KELLER, et al., 2007). Muitas micotoxinas, como a ocratoxina A, são altamente estáveis em condições de alta temperatura (cozimento) e processamento, podendo persistir em um produto por muito tempo após os fungos terem desaparecido (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; PITTET, 1998). Alguns fatores que provavelmente afetam a formação das micotoxinas são: umidade, temperatura, tempo, danos no grão, concentração de oxigênio e gás carbônico, composição do substrato, quantidade de fungos, prevalência de cepas toxigênicas, interações microbiológicas e presença de vetores invertebrados (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GODIN et al., 1997).

As medidas de prevenção podem ser usadas na pré-colheita, na pós-colheita ou durante a estocagem (FAO, 2001). O uso de boas técnicas de manejo certamente auxilia na minimização do problema, mas não é totalmente como solução definitiva (OMINSKI et al., 1996; PITTET, 1998; DILKIN, 2002; FAO, 2001). A redução da umidade dos cereais através da secagem e o adequado armazenamento destes grãos são de fundamental importância para reduzir os níveis de contaminação (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; DILKIN, 2002; JORGENSEN; PETERSEN, 2002; FAO, 2001). Um teor de umidade na estocagem abaixo de 15% pode controlar efetivamente a produção de ocratoxina A nos grãos (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). O ideal é que a  $A_w$  nos grãos esteja abaixo de 0,8 (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; FAO, 2001).

O desenvolvimento de tecnologias na área dos produtos químicos e na biogenética tem trazido importantes benefícios para a indústria de alimentos e para o consumidor ao desenvolverem plantas mais resistentes aos fungos e pragas e substâncias químicas mais eficazes no controle destes (BIGELIS, 1992; BENNETT; KLICH, 2003; FAO, 2001). Ainda, com a conscientização ecológica, o aumento do interesse por antifúngicos de origem biológica em detrimento dos produtos químicos vem crescendo e alguns produtos têm sido desenvolvidos com esta finalidade (TUPINAMBÁ et al., 2004). Monitoramento dos grãos através de técnicas de amostragem adequadas, análises micotoxicológicas, uso de extratos naturais de plantas medicinais como antimicrobianos, irradiação gama ou por feixe de elétrons, adsorventes químicos ou orgânicos, métodos físicos (secagem dos grãos, fumigação, aeração, refrigeração, estocagem hermética e uso de atmosfera modificada) fazem parte das boas práticas para evitar ou controlar a proliferação de fungos e também de micotoxinas (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; MADSEN, 1982; PASTER et al., 1988; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GODIN et al., 1997; PITTET, 1998; FAO, 2001; CREPPY, 2002; DILKIN 2002). É importante notar que nem todos os processos são aprovados ou permitem resultados consideráveis (FAO, 2001).

Se alimentos de qualidade inferior com presença de ocratoxina A forem usados durante o período de produção dos suínos, eles apresentarão menor ganho de peso e conversão alimentar se comparados com animais alimentados com produtos de melhor qualidade e livres desta micotoxinas. Entretanto, para reduzir a concentração da ocratoxina A na carne suína no momento do abate os suinocultores podem utilizar um artifício de manejo que é alimentar esses animais nas semanas que antecedem com rações de boa qualidade (MADSEN, 1982; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; WOOD, 1992; JORGENSEN; PETERSEN, 2002).

## **2.9 Micotoxicoses em Humanos Transmitidas por Alimentos de Origem Animal**



As doenças transmitidas/veiculadas por alimentos de origem animal contaminados constituem um grande problema para a Saúde Pública dos diversos países do Mundo. Os microorganismos presentes nos alimentos podem causar diversos malefícios para os consumidores, com agravantes que podem levar até a morte. As doenças de origem alimentar causadas por bactérias concentram atualmente a maioria dos estudos em saúde humana. Avaliações indicam que o número total de pessoas afetadas por fungos é menor que o número total de afetados por infecções bacterianas, virais e por protozoários. Entretanto, as doenças fúngicas constituem um importante problema de saúde quando abordado pelo lado crônico das doenças. As contaminações alimentares pelas toxinas produzidas por fungos nos alimentos são responsáveis por um grande número de mortes e é o maior problema quando se fala em doenças crônicas (PITT, 2000; BENNETT; KLICH, 2003). A falta de informações e o entendimento da ecologia de muitos fungos e da produção de suas micotoxinas é um agravante para o estudo da micotoxicologia (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004). Com isso, o levantamento estatístico do número de pessoas afetadas por micotoxicoses ainda é precário e desconhecido (BENNETT; KLICH, 2003). Os efeitos tóxicos das micotoxinas são mais conhecidos na prática da medicina veterinária. Micotoxicoses resultam de uma maneira geral da contaminação dos alimentos, obtidos na região ou importados, o que leva a notar a possibilidade do grande espalhamento do problema caso haja contaminação do produto alimentício pelas micotoxinas. Assim, países desenvolvidos ou não podem sofrer com as micotoxinas. Uma coisa é certa no estudo das micotoxinas, elas costumam ser negligenciadas nos livros-texto de medicina humana e não são adequadamente cobertas nos currículos das muitas escolas de medicina (PERAICA et al., 1999).

As micotoxicoses são adquiridas pelos homens principalmente via alimentar, mas pode em menor escala ser transmitida respiratória e dérmica, entre outras. Elas são exemplos de intoxicação por via natural, assemelhando-se às patologias causadas pela exposição a resíduos de pesticidas ou metais pesados (BENNETT; KLICH, 2003). Alimentos como o arroz que são consumidos numa faixa de mais de 70 kg /habitante/ano no Brasil podem albergar uma ou mais toxinas (PERAICA et al., 1999; DESJARDINS et al., 2000; REICHARDT et al., 2001). A maior parte das micotoxicoses tem caráter crônico, resultados da exposição por um longo período de tempo e da ingestão de pequenas quantidades de toxina, induzindo doenças como o câncer de fígado e de rim (PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1988; PITTET, 1998). Os sintomas de micotoxicoses dependem de muitos fatores como o tipo de micotoxinas, quantidade e duração da exposição, idade, saúde, e sexo do indivíduo exposto, entre outras em menor grau de importância. As micotoxicoses podem aumentar a vulnerabilidade para doenças microbianas, piorar os efeitos da desnutrição e interagir sinergicamente com outras toxinas (BENNETT; KLICH, 2003). Por estes fatores pode-se notar que as populações das nações menos desenvolvidas estão mais sujeitas ao desenvolvimento das micotoxicoses, agravado ainda pelas condições climáticas favoráveis e problemas de manejo desde a produção até o armazenamento e distribuição dos grãos (BENNETT; KLICH, 2003; PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004).

**Os programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas revelam que a ingestão de carne e subprodutos de suínos contaminados contribui para a exposição humana, sendo importante que se estabeleçam ações de vigilância sanitária com vistas a segurança dos alimentos** (KROGH, 1976; RUTQVIST et al., 1978; FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991; DRAGACCI et al., 1999; CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002;). Estudos epidemiológicos foram realizados também sobre as doenças ocupacionais, pois podem ser causadas também por micotoxinas. Ambientes como fábricas processadoras ou distribuidoras de café, trigo, milho, ou outro grão em que as micotoxinas possam se desenvolver possibilita a exposição dos trabalhadores a grandes quantidades de partículas suspensas no ar (HALSTENSEN et al., 2004; TARÍN; ROSELL;

GUARDINO, 2004). Outros estudos já detectaram a presença de fungos e bactérias em sistemas de circulação de ar de prédios e casas, constituindo uma fonte de intoxicação, mesmo que incomum (HENDRY; COLE, 1993; SKAUG; EDUARD; STORMER, 2000; TARIN; ROSELL; GUARDINO, 2004; PORTNOY et al., 2005).

Ao examinar os dados estatísticos sobre a ocratoxina A e outras micotoxinas de uma maneira geral, nota-se que os países mais desenvolvidos possuem maior ocorrência (JIMENEZ et al., 1999). Esta incongruência de situação deve-se ao fato de que nestes países, prioritariamente de clima temperados a frio, do nordeste até a região central da Europa e o Canadá, existe uma maior quantidade de dados estatísticos, devido a maior quantidade de pesquisa realizada na área, o que faz com que a ocorrência seja virtualmente maior (BOZIC et al., 1995; WHO, 2002).

A ocratoxina A foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos da América como contaminante natural de alimentos em 1969 em amostras de milho (SHOTWELL; HESSELTINE; GOULDEN, 1969). A exposição do homem à ocratoxina A pode ocorrer diretamente pelo consumo de grãos contaminados ou indiretamente pelo consumo de tecidos de animais expostos a toxina (FUKAL, 1990). Produtos como cereais, sementes oleaginosas e frutas (trigo, cevada, aveia, milho, café, frutas secas, uvas, condimentos e ervas) e derivados (farinha, pães e produtos de padaria, cerveja, vinho) e produtos de origem animais ou derivados contaminados são os principais alimentos consumidos pelos homens que podem servir de porta de entrada para a ocratoxina A (FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991; BOZIC et al., 1995; DRAGACCI et al., 1999; VRABCHEVA et al., 2000).

**Os produtos derivados de carne suína são considerados rotas prováveis de exposição e contaminação humana por micotoxinas** (KROGH, 1976; FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991; DRAGACCI et al., 1999). Um dos primeiros relatos da presença de ocratoxina A no sangue humano levantou como hipóteses para a entrada desta toxina na cadeia alimentar os grãos contaminados e os produtos suínos no final da década de 80 (FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991).

Devido à ocorrência da ocratoxina A em uma ampla variedade de alimentos, a sua presença no sangue humano tem sido sugerida como um indicador para avaliar indiretamente sua exposição (PITTET, 1998; VRABCHEVA et al., 2000). Pelo fato da ocratoxina A ser solúvel em gordura e não excretada rapidamente, ela acumula-se nos depósitos de gordura dos animais afetados, e é transferida para as pessoas que irão ingerir este suíno contaminado (PITT, 2000).

Na Alemanha, 57% das amostras de sangue humano testadas foram positivas para ocratoxina A; na França, 20%; na Tunísia, 82%; na Suíça, 100% das amostras testadas demonstraram concentrações mensuráveis de ocratoxina A (com o menor limite de detecção); na Argélia 62%; no Canadá, 40%; enquanto que no Marrocos, os exames revelaram que 60% das amostras testadas foram positivas para ocratoxina A, sendo que destas, 61,5% eram homens e 56% eram mulheres. Estes dados revelam que em muitos países o sangue de pessoas saudáveis freqüentemente contém ocratoxina A, confirmando uma difundida e continuada exposição. (KUIPER-GOODMAN, 1991; FILALI et al., 2002).

De acordo com pesquisas, a presença de ocratoxina A na Europa central deve-se a presença constante desta toxina em muitos gêneros alimentícios europeus, especialmente pães e alimentos baseados em farinha de trigo e, por sua vez, a presença da toxina nos animais que tem sua dieta baseada nos cereais. (WHO, 2001).

Suspeita-se que a ocratoxicose esteja relacionada com a nefropatia endêmica dos Balcãs (NEB), pois são notadas muitas semelhanças nas alterações histopatológicas e funcionais nos rins tanto de humanos acometidos pela doença, quanto de animais acometidos pela nefropatia induzida por ocratoxina A, notadamente os suínos (KROGH, 1976; PERAICA et al., 1999; MIDIO, MARTINS, 2000; WHO, 2001; FAO, 2001).

Em alguns países dos Bálcãs, a incidência de tumores no trato urinário chega a ser mais de 100 vezes maior que em áreas não afetadas por doenças renais (GODIN et al., 1997). Desde a metade da década de 50 que se conhece esta síndrome, sendo a região a pioneira na descoberta e nos estudos sobre a mesma. (KROGH et al., 1976; GODIN et al., 1997; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002; BRANCO, 2006). As mulheres são mais afetadas que os homens e também possuem maior índice de mortalidade decorrente dessa patologia (STUDER-ROHR, SCHLATTER, DIETRICH, 2000; WHO, 2001). Estas áreas apresentam contaminação freqüente dos cereais com a ocratoxina A e também uma grande presença desta toxina no sangue da população (WHO, 2001; FAO, 2001). Um estudo revelou que a população daquela região encontrava-se exposta cronicamente aos riscos de contaminação pela OTA. A totalidade das amostras de sangue analisadas em um grupo de voluntários apresentou quantidades significativas de OTA, variando de 0,2 a 10,4 µg de ocratoxina A por litro de soro sanguíneo, com uma média de 1,59µg/L (PETKOVA-BOCHAROVA et al., 2003).

O risco de exposição e a contaminação dos homens com a ocratoxina A são elevados, mas os estudos não descartam a possibilidade de uma etiologia multifatorial para o surgimento da NEB (VRABCHEVA et al., 2000; WHO, 2001; FAO, 2001).

A nefropatia endêmica dos Bálcãs é caracterizada pelo aparecimento tardio dos sinais e sintomas clínicos e resulta de exposição contínua a ocratoxina A, sendo comum a ocorrência de outras doenças. O estágio inicial da nefropatia humana é caracterizado por alterações no epitélio tubular, semelhante a que ocorre na nefropatia dos suínos (ELLING; MOLLER, 1973; KROGH, 1976; WHO, 2001). Também se observaram achados como degeneração tubular, fibrose intersticial e hialinização do glomérulo junto com a enzimúria (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002), aumento da uremia e anemia como primeiros sintomas clínicos, lenta e progressiva falência renal, posterior manifestação clínica da injúria renal (GODIN et al., 1997; WHO, 2001), episódios freqüentes de dor de cabeça, dor lombar e perda de peso (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002). É interessante notar que a maioria dos pacientes encontrava-se na faixa etária média de 50 anos, caracterizando-se mais uma vez como uma doença de caráter crônico (WHO, 2001; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002).

Cerca de um terço das pessoas que morreram com NEB apresentam papilomas e/ou carcinomas de pelve renal, ureter ou bexiga. Afeta principalmente os túbulos renais, provocando uma lesão bilateral não-inflamatória nos rins (KROGH et al., 1976; GODIN et al., 1997; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002).

Cada país estabelece suas próprias normas sanitárias. No Canadá, a exposição humana à ocratoxina A apresenta um nível de contaminação menor que 1,5 ng/kg de peso corporal por dia, sendo de baixo risco de exposição a esta toxina (KUIPER-GOODMAN, 1991). Na Itália, análises revelaram que 78% das amostras de rins de suínos apresentaram ocratoxina A em níveis maiores que 0,05 ng/g. Entretanto, nenhuma das concentrações excedeu o limite das normas da Itália, que estabelece 1ng de ocratoxina A/g em carne suína e produtos derivados, que corresponde a 25 ng/g em rins suínos (MATRELLA et al., 2006).

Um monitoramento da contaminação de diversas espécies de fungos em diferentes fases do processamento do café realizado no Brasil mostrou que todas elas apresentavam algum grau de contaminação por *Aspergillus ochraceus* (PEREIRA et al., 2004). O comitê das Nações Unidas para a alimentação concluiu que a ingestão tolerável de ocratoxina A para um nível mais baixo de efeito observado deve ser de 100ng/kg de peso corpóreo por semana (WHO, 2002). Micotoxicoses agudas podem causar problemas graves e algumas vezes fatais. A possibilidade da intoxicação deveria ser considerada sempre que uma doença aguda ocorre em muitas pessoas sem presença de infecções por um agente etiológico conhecido, e quando seu quadro clínico não responde a uma terapia medicamentosa. Muitas das micotoxicoses descritas são consequências da ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas e apenas

o controle adequado dos alimentos industrializados pode evitar o aparecimento de problemas relacionados a estas toxinas (PERAICA et al., 1999)

**Tabela 8 Ocorrência de ocratoxina A em amostras de sangue humano <sup>a</sup>**

PAÍS	ANO	Incidência de amostras positivas	Média de concentração (ng/ml)	faixa de concentração das amostras positivas (ng/ml)
Bulgária	1984-90	9/125 (7) <sup>b</sup>		1,0 – 10,0
Canadá	1994	144/144 (100)	0,88	0,29 – 2,37
Croácia	1997			
	Zagreb	29/50 (58)	0,26	0,20 – 1,28
	Rijeka	18/50 (36)	0,17	0,20 – 0,82
	Osijek	50/50 (100)	0,68	0,20 – 1,65
	Split	27/49 (55)	0,25	0,20 – 1,39
	Varazdin	24/50 (48)	0,59	0,20 – 15,9
Tchecoslováquia	1990	35/143 (24)	0,14	0,10 – 12,6
República tcheca	1994	734 / 809 (91)	0,23	0,10 – 13,7
	1995	404/413 (98)	0,24	0,10 – 1,9
Dinamarca	1986-88	78/144 (54)	1,8	0,10 – 13,2
França	1991 - 92			
	Assácia	97/500 (19)		0,10 – 12
	Aquitaine	385/2055 (19 )		0,10 – 160
	Rhone-Alpes	75/515 (15)		0,10 – 4
Alemanha	1977	84/164 (51 )	0,4	0,10 – 4
	1985	89/141 (63 )	0,3	0,10 – 2
	1988	142/208 (68 )	0,75	0,10 – 8
Hungria	1995	291/355 (82 )		0,20 – 10
	1997	213/277 (77 )		0,1 – 1,4
Itália	1992	65/65 (100 )	0,5	0,1 – 2
Japão	1992-96	156/184 (85 )	0,068 <sup>c</sup>	0,004 – 0,278
Polônia	1983-84	25/397 (6 )	0,2	1-13
	1984-85	52/668 (8 )	0,3	1-40
Serra Leoa	1996	12/36 (33 ) <sup>d</sup>		1,5-18
Suécia	1989			
	Visby	29/99 (29 )	0,26	0,3 – 7
	Uppsala	3/99 (3 )	0,02	0,3 – 0,8
	Ostersund	6/99 (6 )	0,03	0,3 – 0,8
Suíça	1992 - 93			
	Norte dos Alpes	251/252 (100 )		0,06 -0,75
	Sul dos Alpes	116/ 116( 100)		0,11 – 0,75
Tunísia	1993-95	73/140 (52 )		0,1 – 8,8

<sup>a</sup> - média de valores foram calculados para todas as amostras analisadas, incluindo aquelas com concentrações abaixo do detectável (consideradas zero)

<sup>b</sup> – figuras nos parênteses são percentagens

<sup>c</sup> Média das positivas

<sup>d</sup> Bebês não amamentados (acima dos 5 anos de idade)

Fonte: PETKOVA-BOCHAROVA et al., 2003

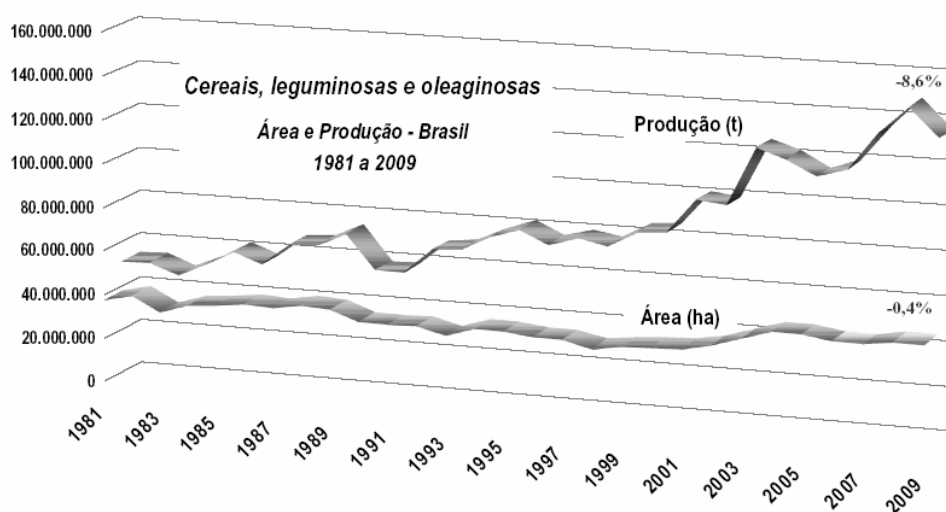
## 2.10 Fatores Epidemiológicos da produção de alimentos envolvidos com micotoxinas no Brasil

O Brasil é um país de grande extensão territorial e grande população também. É o quinto maior país do mundo em extensão territorial, ocupando uma área de 8.547.403 km<sup>2</sup> no planeta Terra. Os países maiores que ele são: Estados Unidos, China, Canadá e Rússia. A população estimada atualmente no Brasil é de 191.796.025 de pessoas (IBGE, 2009). Isso denota uma importância tão grande quanto seu tamanho em relação a produção de alimentos. Seu clima propicia o surgimento de muitas doenças tropicais e também o desenvolvimento de muitas espécies fúngicas. A maior biodiversidade destes fungos ocorrem nos trópicos (latitudes de aproximadamente 23° norte e 23° sul). Em grande parte do nosso país predominam as áreas tropicais que são quentes e úmidas e, na maioria, as condições

climáticas são bastante favoráveis (de 70 a 100% de umidade e mais de 25°C) para a rápida proliferação de fungo. Verifica-se que os cuidados contra a contaminação e o crescimento de espécies toxígenas nos produtos agrícolas destas regiões devem ser redobrados devido ao maior risco de produção de micotoxinas (ALMEIDA et al., 2000; SABINO et al., 1988).

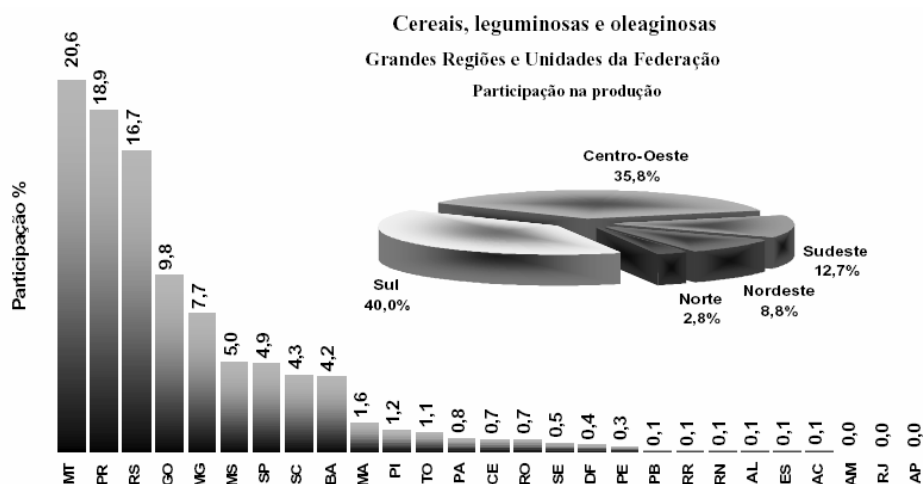
É importante notar alguns dados estatísticos da produção de alimentos no Brasil, pois alguns deles são a base da alimentação de suínos na confecção de rações e por isso, importantes na cadeia epidemiológica da ocratoxina, pois como se sabe, a intoxicação dos animais se dá via ingestão de alimentos contaminados por esta micotoxina. Segue uma descritiva de dados compilados do IBGE em relação a alimentos, animais e população no campo, que serão discutidos em seguida.

Em relação ao milho em grãos, a produção nacional em 2009, para ambas as safras, totaliza 50.098.557 toneladas indicando, em agosto, um decréscimo de 1,1% sobre a estimativa de julho e está assim distribuída: 33.770.649 toneladas da 1ª safra (67,0% do total) e 16.327.908 toneladas da 2ª safra (33,0% do total), que registram reduções na produção de 0,4% e 2,4%, respectivamente, na comparação com a avaliação anterior. Para o milho 2ª safra, que apresenta a maior variação, as reduções absolutas foram verificadas nos estados de Goiás (226.040 t) e do Mato Grosso do Sul (143.901 t), em função, principalmente, de redução no rendimento médio (figura 3)



**Figura 2 Área e Produção de Cereais, leguminosas e oleaginosas no Brasil de 1981 até 2009 (Fonte: IBGE, 2009).**

Entre as Grandes Regiões, esse volume da produção de cereais, leguminosas e oleaginosas esperado para 2009, em relação à safra anterior, acha-se assim distribuído: Região Sul, 53,4 milhões de toneladas (-13,0%); Centro-Oeste, 47,7 milhões de toneladas (-6,1%); Sudeste, 17,0 milhões de toneladas (-3,6%); Nordeste, 11,7 milhões de toneladas (-6,3%) e Norte, 3,7 milhões de toneladas (-1,9%). Observa-se, na figura a seguir, que o Mato Grosso suplanta, em 1,7 pontos percentuais, o Estado do Paraná, alcançando, nesse ano, a posição de maior produtor nacional de grãos (figura 4)



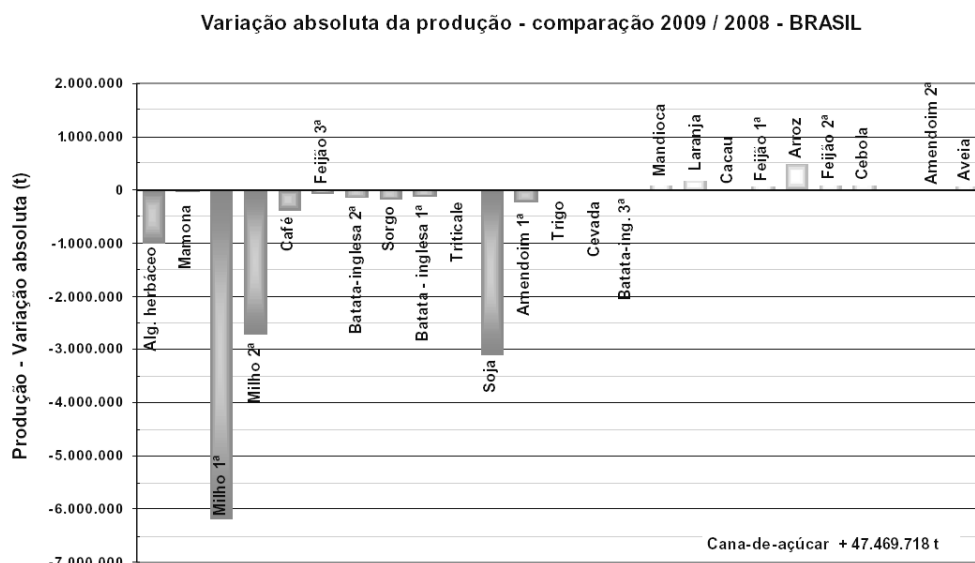
**Figura 3: Participação na produção de cereais, leguminosas e oleaginosas divididos por Regiões e por Estados brasileiros no ano de 2009 ( Fonte: IBGE, 2009)**

**MILHO (em grão)** – É o principal ingrediente nas rações de suínos dentro da suinocultura industrial brasileira. A produção nacional de milho em grão em 2009, para ambas as safras, totaliza 50.098.557 toneladas indicando, neste mês, um decréscimo de 1,1% sobre a estimativa de julho e está assim distribuída: 33.770.649 toneladas da 1ª safra (67,0% do total) e 16.327.908 toneladas da 2ª safra (33,0% do total), que registram reduções na produção de 0,4% e 2,4%, respectivamente, na comparação com a avaliação anterior. Para o milho 2ª safra, que apresenta a maior variação, as reduções absolutas foram verificadas nos estados de Goiás (226.040 t) e do Mato Grosso do Sul (143.901 t), em função, principalmente, de redução no rendimento médio.

A abertura de novos mercados para os derivados da cana-de-açúcar e do arroz incentivaram os acréscimos das áreas destinadas ao cultivo destes produtos agrícolas que tiveram variação positiva, quando comparadas à safra anterior, de 6,6% e 0,7%, respectivamente. A ampliação dos canaviais é um processo que se intensificou, nos últimos cinco anos, devido à necessidade de se ter uma alternativa ao petróleo que atingiu elevados preços até 2008. Para se ter um bom exemplo desta expansão dos canaviais pelo Brasil, basta observarmos as características de várias regiões do Brasil, que antes eram basicamente de pecuária extensiva e que hoje se transformaram em grandes áreas de plantação de cana de açúcar. Em viagens pelo interior paulista e matogrossense, pode-se observar que a cana vem substituindo de forma bem rápida os pastos para os animais.

Pela figura 5, percebe-se que milho, para ambas as safras, e soja foram as culturas que apresentaram maior retração da produção, em termos absolutos, quando comparadas às respectivas produções alcançadas em 2008. No caso do milho ocorreu decréscimo na área plantada em 2009 (-4,8%) que pode ser creditado, em parte, aos grandes estoques nacionais observados em 31/dez/2008, superior em 118,2% ao de 31/dez/2007, resultados divulgados pela Pesquisa de Estoques, como também aos baixos preços praticados na época do plantio e incertezas sobre a demanda futura do produto. No caso da soja a área plantada foi 2,0% maior que a de 2008, mas os altos preços dos insumos na época do plantio fizeram com que os produtores investissem menos em tecnologia, o que associado às condições climáticas irregulares, determinaram um decréscimo de 7,1% no rendimento médio da cultura, passando de 2.817 kg/ha alcançados na safra de 2008 para 2.618 kg/ha na presente estimativa para 2009. A crise de crédito afetou os contratos futuros da cultura do algodão, que teve sua área de plantio reduzida em 22,0% quando comparadas a 2008. Salienta-se que o elevado custo de produção e a má distribuição das chuvas, também foram comuns para a safra 2009 de milho e

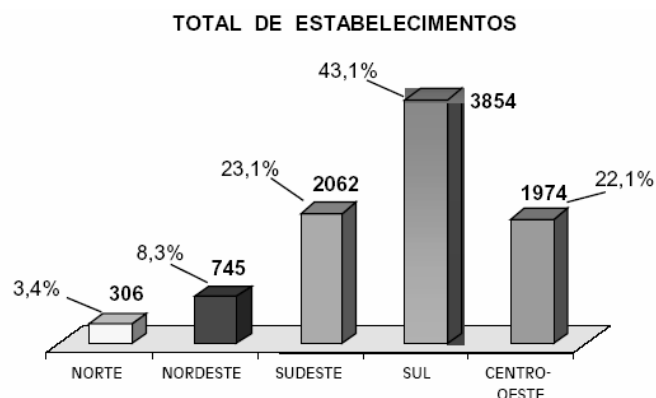
algodão, determinando declínio no rendimento médio destas culturas em comparação à safra de 2008 em, respectivamente, -10,8% e -4,7%.



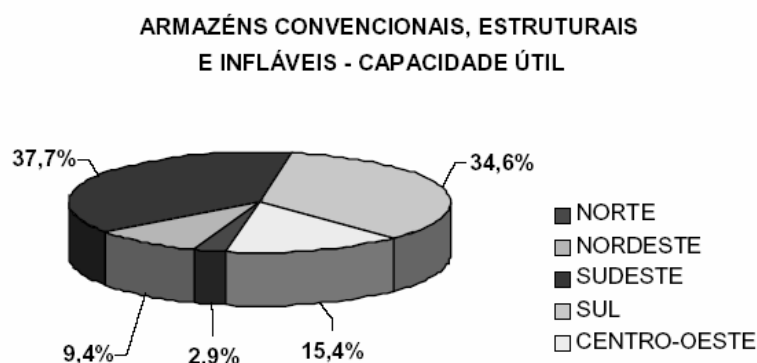
**Figura 4: Variação absoluta da produção – comparação 2009 / 2008 (Fonte: IBGE, 2009)**

O Brasil, maior potência mundial na produção de alimentos, celeiro mundial, precisa cuidar não só de produzir bem, mas também de ter bons serviços de armazenagem para que se tenha perdas mínimas na qualidade nutricional, sendo um dos principais objetivos dos países produtores de grãos. Não adianta que vastas áreas sejam cultivadas se, no momento da colheita e pós-colheita, estes grãos não recebam os devidos cuidados. As corretas práticas de manejo dos produtos consistem em: secar os grãos com sistemas eficientes de ventilação, construção de estruturas de armazenagem em ambientes controlados criando uma concentração adequada de gases e/ou praguicidas, entre outras técnicas. Porém, no Brasil não se tem conseguido a excelência no armazenamento de seus produtos (DUNKEL, 1992; DIONELLO et al., 2000; BUENO et al., 2004; FONSECA, 2009). Uma regulamentação que está em vias finais para tentar ajustar o problema de armazenamento no Brasil são as condições estabelecidas pelo Sistema Nacional de Certificação de Unidades Armazenadoras (SNCUA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que deu um prazo para as unidades armazenadoras se adequarem até o dia 31 de dezembro. Poderão ser feitos serviços remunerados de armazenamento de produtos agropecuários, emissão de títulos de crédito e comercialização somente pelas unidades com a documentação correta. A diretoria do Departamento de Infraestrutura e Logística do MAPA informa que a certificação garante a competência técnica das unidades, já que fica claro que a modernização e profissionalização dará mais credibilidade ao setor armazenador e, além disso, permite que se reduza as perdas de grãos na safra.

Os resultados da Pesquisa de Estoques do segundo semestre de 2008 indicam que a rede armazenadora de produtos agrícolas em operação no país apresentou um decréscimo de 0,4% no número de estabelecimentos ativos, comparativamente ao primeiro semestre de 2008. No final do segundo semestre de 2008 esta rede contava com 8 941 estabelecimentos ativos, dos quais 43,1% encontravam-se na região Sul, 23,1% na região Sudeste, 22,1% na Centro-Oeste, 8,3% na Nordeste e 3,4% na região Norte (Figura 6). Quanto à capacidade útil das unidades armazenadoras, constatou-se que as dos **tipos armazéns convencionais, estruturais e infláveis** somaram 78 393 222 metros cúbicos, sendo que, deste total, um pouco mais de 70,0% estava concentrado nas regiões Sudeste e Sul (Figura 7).

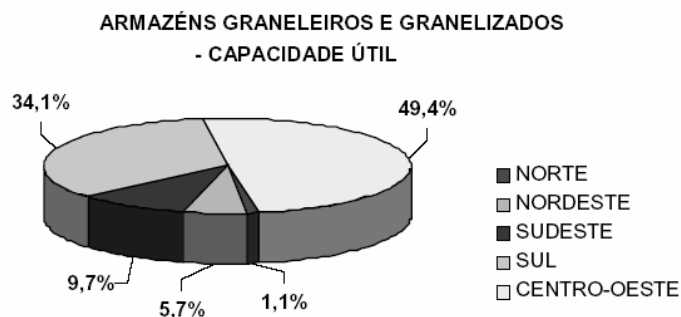


**Figura 5: Total de estabelecimentos armazenadores de grãos no Brasil em 2008 (Fonte: IBGE, 2009)**



**Figura 6: Capacidade útil dos armazéns existentes no Brasil do tipo convencionais, estruturais e infláveis em 2008 (Fonte: IBGE, 2009)**

As unidades armazenadoras dos tipos **armazéns graneleiros e granelizados** totalizaram 52 898 658 toneladas de capacidade útil, sendo que a região Centro- Oeste deteve 49,4% desta capacidade de armazenamento e a Sul 34,1%. Os **silos para grãos** apresentaram 43 701 611 toneladas de capacidade útil total no país, detendo a região Sul 54,9% deste total e as regiões Centro-Oeste e Sudeste 26,5% e 13,5%, respectivamente (Figura 8).

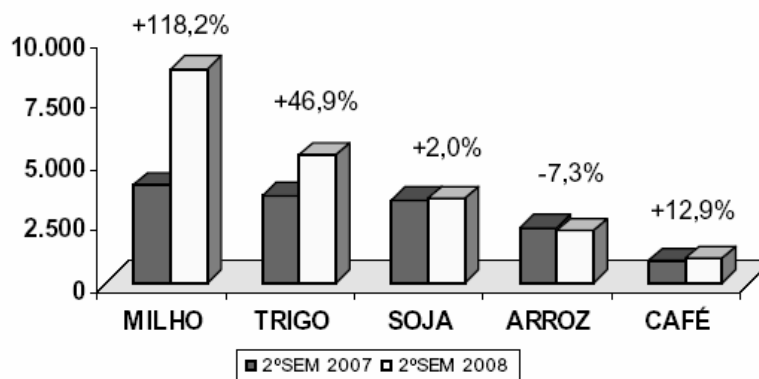


**Figura 7: Capacidade útil dos armazéns graneleiros e granelizados existentes no Brasil em 2008 (Fonte: IBGE, 2009)**

Os maiores estoques registrados em 31 de dezembro de 2008 foram os de milho em grão (8 768 606 t), de trigo em grão (5 259 534 t), de soja em grão (3 463 087 t), de arroz em



casca (2 122 259 t) e os de café em grão (1 015 400 t). Quando comparados os estoques dos principais produtos com os existentes em 31 de dezembro de 2007, os estoques de milho, trigo, café e soja apresentaram variações positivas de 118,2%, 46,9%, 12,9% e 2,0%, respectivamente, enquanto o estoque de arroz em casca apresentou queda de 7,3%.



**Figura 8 Maiores estoques de grãos em 2008 no Brasil (Fonte: IBGE, 2009)**

Os produtos investigados pela pesquisa do IBGE e seus respectivos estoques em 31 de dezembro de 2008 encontram-se na Tabela 9 abaixo.

**Tabela 9: Estoque de grãos e sementes no Brasil totalizados no ano de 2008.**

<b>Produto</b>	<b>Estoque em 31/12/2008 (ton.)</b>
Algodão (em pluma)	274.274
Algodão em caroço	6.851
Caroço de algodão	293.268
Semente de algodão	1.081
Arroz em casca	2.122.259
Arroz beneficiado	134.334
Semente de arroz	12.639
Café em côco	16.247
Café em grão	1.015.400
Feijão preto em grão	16.382
Feijão de cor em grão	33.361
Milho em grão	8.768.606
Semente de milho	148.407
Soja em grão	3.463.087
Semente de soja	72.115
Trigo em grão	5.259.534
Semente de trigo	181.149

Fonte: IBGE, 2009

Pelos resultados verificados acima, segundo dados do IBGE, a capacidade de armazenamento brasileira está aquém do volume total de produção anual. Esta é uma análise direta, sem levar em conta armazéns não cadastrados pela CONAB. Mesmo assim, podemos ter idéia da situação crítica de armazenagem dos nossos produtos em grãos. Se formos

analisar a situação em que se encontram estes depósitos de alimentos, podemos ter revelações ainda piores, pois como se sabe, nem todos os armazéns, silos e depósitos em geral permitem uma correta armazenagem dos grãos em relação a teores de umidade e temperatura correta de armazenamento.

Em outro aspecto, vale a pena analisarmos e compararmos os resultados apresentados sobre a pecuária como um todo nas três grandes cadeias de animais existentes no país para se ter uma maior idéia do que ocorre quando um problema, mesmo que aparentemente pequeno (diga-se de valor percentual baixo), pode apresentar implicações bastante relevantes. Abaixo segue o quadro 3 que apresenta os animais abatidos no Brasil no 1º trimestre de 2009.

**Quadro 2: Animais abatidos e peso total das carcaças, segundo os meses - Brasil no 1º Trimestre de 2009**

Meses	Bovinos		Suínos		Frangos	
	Número de cabeças abatidas (mil cabeças)	Peso total das carcaças(t)	Número de cabeças abatidas (mil cabeças)	Peso total das carcaças (t)	Número de cabeças abatidas (mil cabeças)	Peso total das carcaças (t)
Total	6 446	1 507 082	<b>7 332</b>	<b>696 819</b>	1 121 768	2 326 724
Janeiro	2 195	515 406	<b>2 410</b>	<b>229 196</b>	378 546	792 684
Fevereiro	2 027	473 332	<b>2 338</b>	<b>222 244</b>	347 777	723 135
Março	2 223	518 344	<b>2 574</b>	<b>245 378</b>	395 445	810 904

Fonte - IBGE/DPE/COAGRO - Pesquisa Trimestral do Abate de Animais

Nota - 1) Os dados divulgados são oriundos de estabelecimentos que estão sob inspeção federal, estadual ou municipal.

2) Resultados preliminares

Este quadro nos mostra que a criação de suínos ainda é pequena se comparada as criações de bovinos e aves. Porém, muito se pode crescer ainda no Brasil, visto que mercados mundiais clamam por alimentos de origem animal e os suínos são uma grande força em países que te por tradição seu consumo. A carne suína é a mais consumida no Mundo, mas no Brasil alguns preconceitos culturais ainda impedem uma maior expansão desse mercado. Os suínos, que chegaram ao Brasil através das mãos dos colonizadores portugueses no ano de 1532, tiveram sua produção voltada a produção de gorduea animal. Em 1950, as grandes indústrias de óleo vegetal tornaram a produção de suínos tipo banha obsoleta e sem mercado a curtíssimo prazo. A partir disso, os produtores de suínos voltaram sua produção para a obtenção de carne, trazendo novas raças ao Brasil, novas técnicas de manejo, maior controle sanitário, melhores instalações, melhor nutrição dos animais e claro, melhor genética. Criaram-se associações para fortalecer os suinocultores, distanciando-se a cada dia dos antiquados criadores de porcos. Atualmente o Brasil exporta carne suína para a Rússia, Hong Kong, Ucrânia, Angola, Argentina e Cingapura. Alguns outros grandes mercados encontram-se em negociação, por motivos de barreiras sanitárias muitas vezes injustificáveis técnica e sanitariamente. Em relação a maio, o volume de vendas cresceu 4,2%, e a receita, 0,6%. Parece claro, diante desses números, que a disseminação global da gripe A (H1N1) não prejudicou significativamente o mercado. Na comparação com junho de 2008, o volume registrou salto também de 4,2%, mas a receita recuou 30%. Em junho último, o preço médio dos embarques foi 3,4% menor que o de maio e ficou 32,9% abaixo de junho de 2008. A queda dos preços no mercado internacional, de maneira geral, e em particular na Rússia, principal destino das exportações brasileiras de carne suína tem desanimado os exportadores. Segundo a ABIPECS, os baixos preços, aliados à valorização cambial, têm significado

prejuízo para todos. A crise global provocou uma queda abrupta de preços que não vem sendo corrigida com o tempo. Ainda assim, as empresas já acreditam que os embarques poderão alcançar 600 mil toneladas em 2009, ante as 529.418 do ano passado e as 606.513 de 2007. No primeiro semestre, foram 294.478 toneladas, 8,8% acima de igual intervalo do ano passado, mas a receita caiu 17,6%, para US\$ 583,1 milhões.

Saindo das estatísticas, e voltando a falar especificamente da ocratoxicose, estes dados são relevantes de serem discutidos nesta tese devido ao fato de que com o aumento do consumo, maior a produção e com isso maior é a necessidade de se produzir alimento de qualidade e maior é a necessidade de se ter controles efetivos sobre as doenças relacionadas a ingestão do consumo de suínos, direta ou indiretamente através de seus subprodutos. Assim, a atenção voltada para doenças como as micotoxinas vem assumindo um papel relevante no cenário de prevenção de doenças de longa duração, pois com o aumento do consumo no Brasil de carne suína que hoje está na faixa dos 13 kg por ano por pessoa, com tendência a aumentar, é importante observar que doenças como a ocratoxina A pode causar tendem a aumentar também se medidas de controle não forem deflagradas.

Apenas para se ter uma noção, milhares de pessoas podem estar envolvidas nos processos de contaminação fúngica e no processo de produção de alimentos no Brasil. Este dado é importante para se ter noção de que o alimento que ingerimos não está em nossas mesas por mágica, o que, incrivelmente algumas pessoas acreditam por ignorar os processos produtivos. Assim como crianças acham que o leite vem da padaria. Mais de 16 milhões de pessoas estão envolvidas diretamente em atividades agrícolas em nosso país, o que se distribui por um pouco mais de 5 milhões de propriedades. É um número bastante grande e denota a necessidade tão grande quanto de se fornecer a este pessoal adequada informação para que o produto final que chega a mesa do consumidor tenha uma qualidade adequada para o consumo.

No **anexo 1** pode-se observar as variações de número de pessoas envolvidas na agricultura divididos por Estados da Federação e por regiões.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa na área da micotoxicologia abrange diversas modalidades de conhecimento e para tanto, responde por uma vasta e intensa correlação destes diferentes conhecimentos. Em específico nesta tese, estão os estudos na parte de cromatografia e na correlação estatística dos achados com a parte da microbiologia que trata das micotoxinas.

A pesquisa foi realizada nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ, contando com o apoio financeiro do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ e de bolsa-auxílio da CAPES.

#### 3 Material

##### 3.1.1 Amostras

As amostras foram coletadas com a colaboração essencial dos médicos veterinários dos serviços de inspeção veterinária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A extensão da pesquisa acabou por inviabilizar algumas coletas, mas, mesmo assim, foram obtidas um total de 400 amostras, coletadas em 4 estados brasileiros, cada um com 100 amostras. Os estados onde foram coletadas as amostras de sangue de suínos foram: Santa Catarina (Região Sul), Mato Grosso (Região Centro-Oeste), Rio de Janeiro (Região Sudeste) e Bahia (região Nordeste), contemplando assim quatro regiões geográficas brasileiras. Cabe

relatar que nos matadouros em que foram retiradas as amostras, o sexo dos animais não foi classificado de maneira individual, e pelos documentos que eu tive acesso, principalmente as guias de trânsito animal (GTA) emitida para a movimentação dos animais no território brasileiro, existe uma tendência de se estabelecer dentro de um lote uma quantidade igual de machos e fêmeas, isto é, 50% machos e outros 50% fêmeas. Isto impossibilitou uma divisão mais fidedigna entre os sexos para efeito de comparação de resultados na discussão deste trabalho.

### 3.1.2 Equipamentos

Para os procedimentos tanto no laboratório quanto nos locais de coleta das amostras, foram utilizados os seguintes materiais:

- Luvas de látex para procedimento tamanho G;
- Ponteiras de micropipeta 1 ml e 2ml;
- Tubo de vidro de 10 ml;
- Tubos com tampa (Eppendorf) de 1,5 ml e 2 ml.
- Estantes para tubos
- Estante para eppendorfs

Os equipamentos utilizados envolvidos neste projeto foram os seguintes:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters Associates, Inc., Miliford, M.A. – EUA) equipado com uma bomba Waters (modelo 510, solvent delivery system, 50/60Hz), injetor Rheodyne (Rheodyne®, Cotati, Califórnia – EUA) com “loop” fixo de 20µL e detector de fluorescência Agilent (modelo 1100 series), equipado com *workstation* com software Varian e Chemstation Plus (Agilent - Alemanha).
- Coluna analítica de fase reversa Microsorb MV C18, G8 (Variam™, Walnut Creek, CA – EUA) de 15 X 4,6 mm, de partícula esférica 5µ de diâmetro.
- Espectrofotômetro Shimadzu modelo 2001 (Shimadzu Co. ®, Kyoto, Japan).
- Agitador de tubos tipo vórtex certomart® MV (B.Braun Biotech International GmbH, Melsurgen – Alemanha)
- Autoclave
- Freezer
- Aquecedor com temperatura controlada (banho-maria)
- Centrífuga modelo nº 5403 com rotor de 24 cm e velocidade máxima de 11.000 rpm (Netheler – GmbH – Hamburg – Alemanha)
- Centrífuga para tubos de ensaio com velocidade de 3.000 g

### 3.1.3 Padrão

O padrão de ocratoxina (OTA) proveniente da SIGMA Co. (St. Louis, USA) foi analisado espectrofotometricamente e quantificado segundo metodologia preconizada pela AOAC (AOAC, 1995) através da absorvância. A solução estoque permaneceu armazenada em metanol (MeOH) a temperatura de -18°C em frasco âmbar. Esta solução foi preparada no laboratório de acordo com procedimentos de segurança dentro de uma capela com fluxo contínuo de ar para evitar contaminação do padrão.

### **3.1.4 Reagentes e Soluções**

a) Os reagentes utilizados foram: ácido acético (grau HPLC), metanol (grau HPLC Merck, Brasil), acetonitrila (grau HPLC) e diclorometano (grau HPLC - Ominisolv Merck) e ácido tricloroacético(PA).

b) Fase móvel

A fase móvel foi preparada seguindo a metodologia descrita por Curtui, Gareis (2001). Era formada por acetonitrila, água Milique e ácido acético na proporção 57:41:2; volume/volume.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Coleta do material**

O animal pesquisado foi o suíno comercial obtido de granjas integradas com grandes empresas e abatidos em matadouros sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal. As amostras foram retiradas durante o abate desses animais nos matadouros de suínos de quatro Estados, compondo quatro diferentes regiões do território brasileiro. Foram coletadas amostras de sangue de cada animal individualmente. O sangue foi coletado no momento da sangria, após a insensibilização, diretamente no tubo de ensaio sem anticoagulante e colocado em seguida em estantes apropriadas para que permanecessem em repouso. Este repouso foi de no máximo 12 horas em temperatura ambiente para a separação do soro dos elementos constitutivos do sangue. A obtenção do soro poderia ser feita apenas por decantação natural ou também com o auxílio de centrifugação para agilizar o processo de acordo com a estrutura e possibilidade de utilização de uma centrífuga. As amostras de soro foram enviadas via correios dos matadouros de origem no sistema sedex para diminuir o tempo de permanência em caixa isotérmica. As amostras recebidas passaram todas por uma triagem para verificar as condições de conservação e armazenamento e só depois eram registradas para serem processadas. A grande maioria não apresentou incomformidades no momento da chegada ao laboratório. As que apresentaram alterações foram devido a falhas no armazenamento e estas foram descartadas.

As amostras foram recebidas no laboratório do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ, onde foram, após a triagem, armazenadas em freezer para o registro e o preparo do material de análise. Todo o registro foi feito em livro próprio e a ordem de análises seguiu de acordo com a disponibilidade do laboratório. Após os procedimentos iniciais de registro, foi iniciado o processo de extração da ocratoxina. Após a obtenção do extrato, este seguia para o laboratório de cromatografia para análise através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Cabe notar que a coleta inicial do sangue nos matadouros foi realizada de maneira aleatória ao acaso, isto é, sem distinção da presença ou não de lesões macroscópicas em órgãos como os rins e fígado. Isto foi conduzido desta maneira para evitar uma prevalência dirigida já que estudos indicam que as lesões sugestivas de ocratoxina A quando presentes nos tecidos renais e hepáticos principalmente caracterizam a presença de ocratoxina no sangue também.

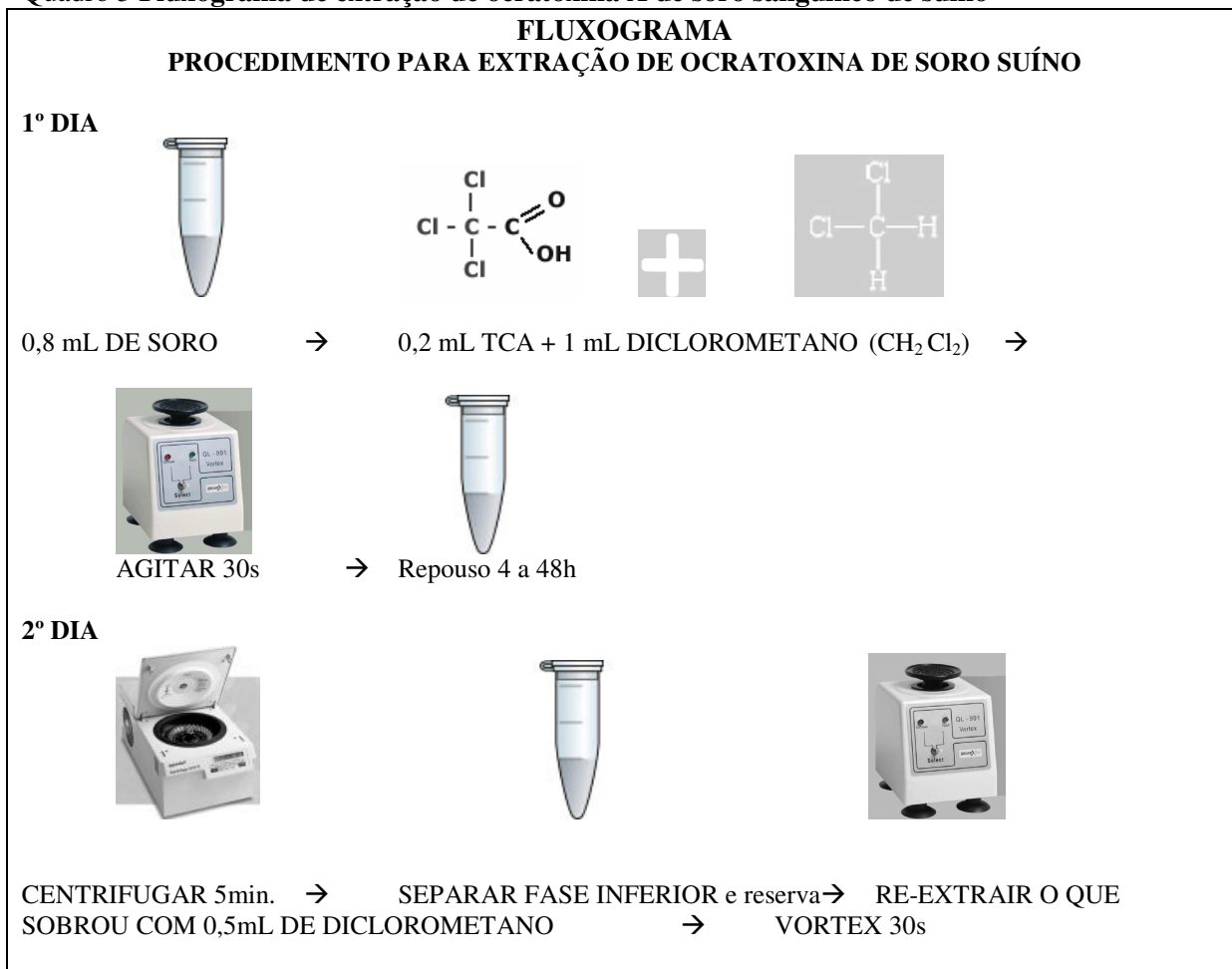
### **3.2.2 Procedimentos para cromatografia**

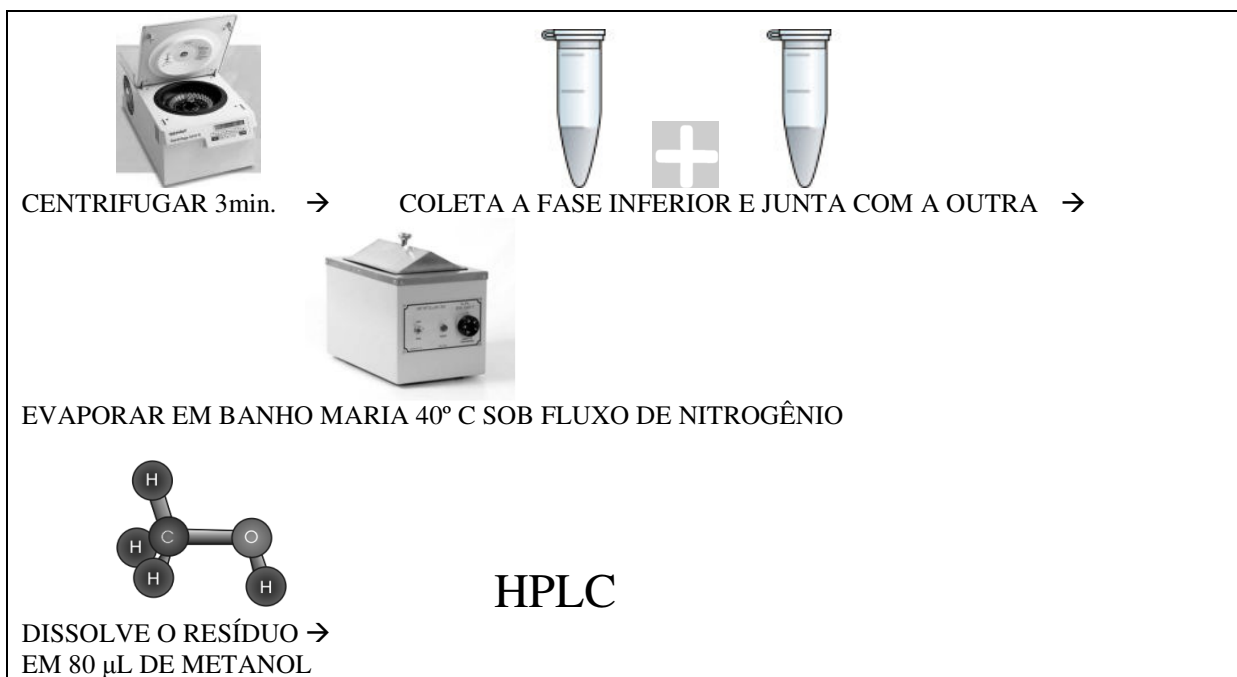
O procedimento analítico utilizado para a detecção de OTA se realizou segundo Curtui e Gareis (2001), o qual baseou-se na extração da micotoxina sem a utilização de coluna de imunoafinidade (Fig.2). O método descrito consistia nos seguintes passos:

I) Coleta de 50 ml de sangue por punção jugular

- II) Repouso de 10 a 12 horas em temperatura ambiente  
 III) Centrifugação a 3000 g / 15 min  
 IV) Soro estocado a -20° C  
 V) Colocar uma alíquota de 0,8 ml de soro, 0,2 ml TCA 15% e 1 ml diclorometano em um microtubo de 2 ml. Em seguida era homogeneizado no vórtex (agitador) por 30 segundos e deixar em repouso, em temperatura ambiente de 4 a 48 horas (Figura 3).  
 VI) Centrifugar a 16060 g/5 min. Então, três camadas são formadas.  
 VII) Retirar com cuidado a camada inferior (diclorometano), colocar num tubo de 1,5 ml e reservar (Fig.3). Submeter a camada formada entre as duas fases (compacta) com a camada superior (ácida) a uma nova extração, adicionando 0,5 ml de diclorometano.  
 VIII) Homogeneizar por 30 segundos esta nova mistura e centrifugar a 16060 g/3 min. Novamente eram formadas três camadas. A camada inferior era adicionada ao extrato de diclorometano e as outras duas eram desprezadas.  
 IX) Evaporar o diclorometano até a secagem em evaporador a temperatura de 40° C sob baixo fluxo de nitrogênio.  
 X) Segue para cromatografia realizada com fase móvel de acetonitrila, água e ácido acético (57:41:2; v/v) e taxa de fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup> com passagem de 20 min/ amostra a 25°C.

Quadro 3 Fluxograma de extração de ocratoxina A de soro sanguíneo de suíno





A fase móvel foi preparada imediatamente antes do início das análises. Para seu preparo foram usados acetonitrila (Grau Lichosorlv), água (Milique) e ácido acético (57:41:2; v/v), sendo misturados dentro de uma capela de fluxo contínuo e homogeneizados em banho de ultra-som. Apesar da metodologia original ter uma taxa de fluxo e tempo de passagem da amostra, bem como um tempo de retenção e uma proporção de fase móvel específico, estes fatores podem ser alterados de acordo com o equipamento utilizado e as condições do laboratório de uma forma geral. E foi o que ocorreu no caso desta tese. A taxa de fluxo utilizada foi de 0,5 ml/min, com duração de passagem de 15 minutos por amostra. Foi injetado, de cada amostra, um volume de 20 µl e o mesmo volume para o padrão pois é o volume total do loop utilizado. O padrão foi injetado antes, durante e depois de cada dia de análises para garantir a calibração das leituras. O detector de fluorescência foi calibrado em níveis de excitação e emissão de fluorescência de ondas de 330 e 460 nm, respectivamente. Os tempos de retenção registrados para a OTA em nossas condições de laboratório foi cerca de 5,37 minutos. Para a quantificação da toxina, foram considerados os tamanhos dos picos formados pelas amostras (altura) dentro do tempo de retenção obtido do padrão, quando comparados com o valor de altura médio dos padrões. A obtenção da curva de calibração para o padrão foi obtida a partir da diluição de 1 ppb do padrão em diferentes concentrações, o que resultou na curva de calibração utilizada pelo sistema integrador computadorizado para obtenção das concentrações das amostras. Já o teste de recuperação foi realizado a partir de uso de amostras de padrão externo, injetando em amostras de soro sanguíneo previamente analisados e livres de OTA e que seguiram então para o procedimento padrão de extração desta toxina. Assim, de acordo com a diferença entre o que foi injetado na amostra e do resultado obtido após a cromatografia é que se obteve os índices de recuperação desta análise.

### 3.2.3 Cálculo da concentração de ocratoxina A em amostras de soro suíno

$$\text{OTA ng ml}^{-1} = \frac{h_1 \times V_f \times M}{V_i \times V_a \times h_2}$$

Onde:

$h_1$  = altura (mm) do pico de ocratoxina A na amostra  
 $V_f$  = volume final do diluente do extrato ( $\mu\text{l}$ )  
 $M$  = massa de ocratoxina A contida no volume de padrão injetado  
 $V_i$  = volume injetado da amostra em  $\mu\text{l}$   
 $V_a$  = volume inicial da amostra em ml  
 $h_2$  = altura (mm) do pico do padrão injetado  
O valor da massa do padrão foi calculado por espectrofotometria e foi de  $0,0737 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

A comparação de análises realizadas por diferentes laboratórios para a presença de ocratoxina A mostrou a dificuldade de se padronizar uma metodologia, visto que houve uma diferença de resultados devido aos limites de detecção, a sensibilidade e os modelos matemáticos para o cálculo dos valores encontrados (KUIPER-GOODMAN, 1991; CREPPY, 2002). Mesmo assim, resultados encontrados mostraram que houve pouca variação entre os laboratórios avaliados (KUIPER-GOODMAN, 1991).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Agora que já foram discutidos os fatores epidemiológicos da produção de alimentos e da produção brasileira de grãos e carnes, serão discutidos os aspectos relativos a esta pesquisa, que ganha agora mais importância após entendermos que quaisquer fatores que corroborem para a quebra da produção tem que ser avaliados. Assim, a ocratoxina presente nos tecidos de suínos pode ser um problema de acordo com o que foi encontrado nesta pesquisa. Vejamos. Procurou-se coletar amostras diferenciadas em matadouros oficiais em quatro estados brasileiros que possuem importância geoeconômica dentro da Federação. Estas amostras não puderam ser acompanhadas de seus respectivos órgãos de eleição para a ação da ocratoxina A devido ao fato de que não se pode ter um acompanhamento das ações de coleta e envio do material por diversos motivos externos a nossa vontade. Assim, tivemos que nos contentar em examinar o sangue dos animais abatidos, o que não chegou a empobrecer o trabalho que se lê, porém, deixou de enriquecer ainda mais a análise epidemiológica que se gostaria mais completa. Todos os matadouros pediram sigilo das informações resultantes desta análise, e como tivemos apenas um matadouro por Estado para ser avaliado não se colocou nesta tese a origem das amostras. Os resultados foram repassados para os médicos veterinários oficiais de cada matadouro como contrapartida ao auxílio desde a coleta até o envio do material coletado. Ficaram de analisar os resultados e nos fornecer alguma informação de medida adotada, porém até o presente momento não se obteve resposta. O pedido para auxílio na coleta do material foi requisitada de forma oficial para uma série de estabelecimentos com serviço de inspeção federal e aqueles que se prontificaram a ajudar receberam o protocolo de coleta do sangue que foi enviada por correio eletrônico e um resumo do que seriam os objetivos deste trabalho. Esta parceria foi fundamental para a realização desta pesquisa. Assim que as amostras chegavam ao laboratório eram imediatamente analisadas quanto ao seu aspecto de conservação e se estavam aptas ou não para serem processadas. Era realizada a identificação dos eppendorfs e entravam na fila para serem processadas. Neste ínterim, eram conservadas congeladas conforme protocolo que foi seguido para a análise. Após a etapa de extração, as amostras eram devidamente armazenadas congeladas em um freezer específico para elas, o qual era mantido lacrado por cadeado para evitar algum tipo de problema como mistura de amostras ou abertura frequente com consequente perda de temperatura. De uma forma geral, o processamento nesta primeira parte foi bem sucedido, pois não foram observadas perdas significativas de amostras nesta etapa.



Algumas amostras chegaram ao laboratório sem condições de análise, com o vial rompido e o conteúdo perdido. Porém, como se trabalhou com um número acima do descrito neste trabalho, pode-se ter este descarte por perdas, totalizando as cem amostras de cada coleta. As amostras que porventura sobraram foram descartadas para efeito de cálculos estatísticos. Assim que todas as amostras foram extraídas, a segunda fase do processamento teve início. As amostras seguiram para a análise cromatográfica no laboratório de micotoxicologia do prédio de Sanidade Animal da UFRRJ. Este laboratório, exclusivo para as análises cromatográficas, dispunha de um aparelho de HPLC com uma bomba contínua de fluxo ajustável e um detector de fluorescência que permitiu a leitura das análises numa estação central de análise de dados (chem station) por meio de um software específico e devidamente registrado (original).

Antes de se explicar sobre esta etapa, é importante observar-se alguns conceitos de o que é e como se proceder a uma análise cromatográfica.

Cromatografia é um processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido colocado sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, e passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura. Existem quatro tipos principais de cromatografia: cromatografia em papel, cromatografia de camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência. A seleção do tipo de cromatografia adequada depende do material a ser isolado e, freqüentemente, diversos métodos cromatográficos podem ser usados seqüencialmente para que seja obtido um composto na forma pura.

A cromatografia em papel (CP) é uma das técnicas mais simples e que requer menos instrumentos para sua realização, porém é a que apresenta as maiores restrições para sua utilização em termos analíticos. Atualmente encontra-se com uso muito restrito devido a outras tecnologias mais modernas. A cromatografia em camada delgada (TLC) tem como fase estacionária uma camada fina formada por um sólido granulado (sílica, alumina, poliamida, etc.) depositado sobre uma placa de vidro, alumínio ou outro suporte inerte. Pequenas quantidades de solução das amostras são suficientes para a análise nesta técnica. É importante notar que a polaridade do solvente deverá ser de acordo com a substância que se deseja separar. Como somente a base da placa fica submersa, o solvente começa a molhar a fase estacionária e sobe por capilaridade. A revelação da placa é feita com a aplicação de um reativo que de cor às substâncias de interesse. É uma técnica muito utilizada como triagem. No caso desta tese não se utilizou esta técnica como triagem pois o objetivo foi de passar todas as amostras em HPLC, porém em uma rotina ela é bastante usada ainda. A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com poder de resolução excelente, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. Dependendo do tipo de substância a ser analisada e do detector empregado, consegue-se detectar cerca de 10-12g do composto por mL de solução. Essa sensibilidade permite que pequenas quantidades de amostra possam ser analisadas. A fase estacionária da cromatografia gasosa é um material, líquido ou sólido, que propicia a separação da mistura através de processos físicos e químicos. A fase estacionária líquida é um líquido pouco volátil que recobre um suporte sólido, separando as substâncias presentes na amostra através das diferenças de solubilidade e volatilidade. Como fase móvel é utilizado um gás, denominado gás de arraste, que transporta a amostra através da coluna de separação até o detector, onde os compostos separados são detectados. Os gases mais utilizados são o hélio (He), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e argônio (Ar). A pureza do gás de arraste interfere no resultado, acusando impurezas na ordem de partes por milhão (ppm) ou partes por bilhão (ppb). As colunas cromatográficas utilizadas podem ser de níquel, aço inox

ou de vidro. O comprimento e o diâmetro da coluna a ser usada irão depender do material a ser analisado. As colunas recheadas analíticas possuem diâmetro interno (d.i.) de cerca de 1,0 a 4,0 mm e comprimento de 1,0 a 3,0 m, enquanto que as colunas recheadas preparativas apresentam d.i. de 5,0 a 100,0 mm, possibilitando a injeção de maior volume de amostra. Já, as colunas capilares têm d.i. variando de 0,15 a 0,75 mm e comprimento de 10,0 a 100,0 m, sendo as mais utilizadas as de sílica fundida, pois esta é altamente inerte e flexível. Já os detectores de CG podem ser: detector de condutividade térmica (DCT), usado para compostos orgânicos, inorgânicos, derivados de petróleo etc.; detector de ionização de chama (DIC), utilizados apenas para compostos orgânicos com baixa sensibilidade para formaldeído e ácido fórmico; detector de captura de elétrons (DCE), usado principalmente na detecção de pesticidas e drogas e; detector fotométrico de chama (DFC) apresenta alta estabilidade para compostos sulfurados e fosforados. Existe um aparelho de cromatografia gasosa no laboratório utilizado para esta pesquisa, porém para o tipo de amostra analisada ele não é o indicado devido a sua estrutura química e física.

Finalmente, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se desenvolveu muito nos últimos anos, recebendo o nome de cromatografia líquida por que a sua fase móvel é um solvente. Os componentes de um cromatógrafo líquido são: bomba, coluna cromatográfica, detector e o registrador. É um método utilizado para separação de espécies iônicas ou macromoléculas e compostos termolábeis. A fase móvel da CLAE deve ser um solvente que respeite algumas características impostas por esse método analítico. A principal característica é que a fase móvel dissolva a amostra sem qualquer interação química entre ambas. Esta fase deve ter alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que se possa fazer análises de alta sensibilidade, pois as impurezas podem interferir na detecção do analito por ultravioleta (UV). A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Embora existam vários solventes, três deles são mais utilizados: água, metanol e acetonitrila. **Nesta pesquisa utilizou-se água, acetonitrila e ácido acético como solventes da fase móvel.** Como fase estacionária utiliza-se sólidos ou semirígidos, cujas partículas porosas esféricas ou irregulares apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão até 350 bar. A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que resiste a todas as pressões em que ela vai ser usada. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio. As colunas geralmente utilizadas são: octadecil (C18, RP18, ODS), octil (C8, RP8), CN (cianopropil) e NH<sub>2</sub> (amina). **A coluna usada neste experimento foi uma C18.** Quanto aos detectores, sua sensibilidade é determinada a partir da relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera este sinal. A linearidade é a faixa linear do sistema, onde o sinal do detector é diretamente proporcional à concentração do soluto. Os detectores mais usados na CLAE são os fotométricos, baseados na absorvância no ultravioleta no visível. Os detectores de fluorescência, utilizados como método de detecção específica, são sensíveis para substâncias que fluorescem. Este tipo de detector pode detectar quantidades de ordem picograma. Também são utilizados detectores por índice de refração (COLLINS et al., 1995; CIOLA, 1998). Como já citado anteriormente, o detector utilizado nesta pesquisa foi o de fluorescência. A cromatografia líquida de alta eficiência com a detecção fluorimétrica é o método mais utilizado para a quantificação de ocratoxina A e a separação desta substância comumente ocorre através do uso de uma coluna de fase reversa C18 juntamente com uma fase móvel eluída de forma isocrática com a presença de acetonitrila. **Desta maneira foi realizada também neste trabalho.** Neste processo a fase de limpeza da amostra é importante para que se gerem picos no cromatograma claros o suficiente para a leitura fidedigna. Deste fato, muitas das extrações são precedidas por uma coluna denominada coluna de imunoafinidade. Estas colunas auxiliam nesta limpeza da amostra, possibilitando uma qualidade de análise muito mais próxima a realidade. A cromatografia de imunoafinidade, em

que as colunas contém anticorpos seletivos imobilizados para ocratoxina, tem uma metodologia simplificada para sua utilização na limpeza das amostras de uma forma geral. Assim, observamos que o uso da coluna apresenta muitas vantagens pois a OTA se liga especificamente ao anticorpo e a matriz interferente pode ser removida quase que completamente. Os cromatogramas de duas amostras foram colocados nos anexos desta tese para se visualizar a diferença entre amostra em que se utilizou IAC e amostra que não foi usada a coluna (ANEXO 3). É importante notar que o uso da coluna de imunoafinidade pode ser mais ou menos importante de acordo com o processo de extração utilizado na técnica aplicada e também com o material de origem de onde será extraída a OTA (JIMENEZ et al., 1999; CASTELLARI et al., 2000; LIZAZID et al., 2007; MILICEVIC et al., 2007). A cromatografia de imunoafinidade fundamenta-se na interação fraca que envolve apenas ligações covalentes principalmente de Van der Waals e eletrostáticas, entre um anticorpo e um antígeno. Depois de serem produzidos, os anticorpos são purificados pelo processo clássico de precipitação com sulfato de amônio, que por sua vez é removido por diálise, por cromatografia de troca iônica ou permeação em gel. Os anticorpos usados podem ser monoclonais ou policlonais e são considerados como reagentes ou como grupos funcionais ligados a um suporte sólido com características próprias e singulares, não causando problemas diferentes dos de outros grupos funcionais químicos. Os anticorpos monoclonais resultam, como já foi referido, de um único clone de linfócitos. São de pureza elevada e mais sensíveis às condições de ligação do que os anticorpos policlonais. Aqueles anticorpos podem apresentar reações cruzadas com outras moléculas, pelo que a sua especificidade deverá ser comprovada. A característica mais importante exigida para os anticorpos a utilizar nas colunas de imunoafinidade, é a sua especificidade, afinidade, estabilidade face às condições de lavagem, e reversibilidade. É também essencial que o complexo aflatoxina-anticorpo possa ser dissociado para libertar a toxina. O suporte inerte sólido onde os anticorpos são imobilizados na coluna por uma ligação covalente, é constituído por agarose gel, trisacril, poliacrilamida ou celulose, previamente activados por uma reação com brometo de cianogênio ou com carbonildiimidazol, formando-se o imunoadsorvente. Na ativação do suporte são introduzidas ligações do tipo isoureia, pelo brometo de cianogênio, ou do tipo uretano, quando o reagente é o carbonildiimidazol. Este é considerado melhor reagente de ativação do suporte uma vez que a ligação uretano, ao contrário da ligação isoureia, não se encontra ionizada e é de grande estabilidade. O imunoadsorvente é então transferido para uma coluna, à qual é aplicada a amostra ou o extrato aquoso a analisar. Por um processo de interação imunoquímica, as moléculas do analito (hapteno) vão ser fixadas aos anticorpos imobilizados, enquanto os componentes interferentes não ligados ao suporte, que possam encontrar-se na coluna, são eliminados por lavagem da coluna com uma solução salina de tampão fosfato. A quantidade de analito que é retido por um processo de imunoafinidade é sempre inferior à quantidade máxima calculada. A especificidade do anticorpo para o analito faz diminuir os interferentes eluídos da coluna, sendo o eluato isolado praticamente puro. As colunas podem ser reutilizadas regenerando-as por vários processos entre os quais podemos referir a lavagem com tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, contendo 0,02% de azida de sódio. Embora o IAC, seja uma técnica quer de extração quer de purificação da amostra considerada por vários investigadores superior a muitas outras, é necessário não esquecer a fragilidade das colunas e o perigo de contaminação de uma extração/purificação para outra (no caso das colunas serem reutilizadas) e, por outro lado, o número de moléculas que podem ser controladas, dado este sistema ser restrito, devido à falta de anticorpos disponíveis no comércio. Uma outra desvantagem é o custo elevado dos kits.

De acordo com o que foi colocado anteriormente, para este trabalho com soro sanguíneo suíno as colunas de imunoafinidade foram utilizadas em algumas amostras apenas, pois a técnica apresentou-se como suficiente para extrair a OTA sem o uso da coluna de

imunoafinidade, com prejuízos na quantificação perfeitamente aceitáveis. Apesar disso, algumas amostras foram submetidas a estas colunas de limpeza e utilizadas para uma comparação dos resultados na utilização ou não da coluna de imunoafinidade. Os resultados podem ser observados na tabela 10.

**Tabela 10: Concentração de amostras de soro suíno divididos por faixas de concentração demonstrando a taxa de recuperação entre análise utilizando e não utilizando a Coluna de Imunoafinidade (IAC)**

FAIXAS FAIXA	AMOSTRAS ID	ANÁLISE SEM IAC Concentração HPLC	ANÁLISE COM IAC Concentração IAC	RECUPERAÇÃO (%) Variação (%)
<1	96 MT	<b>0,160</b>	0,130	81,25
	66 RJ	<b>0,446</b>	0,278	62,33
	7 RJ	<b>0,707</b>	0,586	82,88
	54 MT	<b>0,911</b>	0,800	87,81
	81 RJ	<b>0,934</b>	0,760	81,37
>1<5	21 SC	<b>2,111</b>	2,100	99,47
	91 MT	<b>1,217</b>	1,050	86,28
	07 BA	<b>3,079</b>	2,560	83,14
	02 BA	<b>4,512</b>	3,100	68,71
	85 BA	<b>2,390</b>	1,886	78,91
>5<25	43 SC	<b>9,317</b>	7,876	84,53
	43 MT	<b>10,037</b>	8,232	82,02
	01 BA	<b>13,153</b>	10,302	78,32
	73 BA	<b>15,685</b>	10,786	68,77
	92 RJ	<b>20,556</b>	16,934	82,38
>25<75	16 SC	<b>28,558</b>	25,992	90,92
	85 SC	<b>31,807</b>	33,943	106,71
	50 MT	<b>45,149</b>	38,980	86,34
	61 BA	<b>54,320</b>	42,493	78,23
	50 RJ	<b>63,748</b>	48,329	75,81
>75	73 SC	<b>90,281</b>	83,671	92,68
	38 MT	<b>78,207</b>	66,392	84,89
	40 SC	<b>274,560</b>	285,982	104,16
	89 SC	<b>145,710</b>	128,395	88,12
	70 RJ	<b>118,689</b>	106,987	90,14
<b>Média =</b>			<b>84,25</b>	
<b>Desvio Padrão =</b>			<b>10,16738524</b>	

Através desta tabela pode-se observar que os índices de recuperação estão dentro do esperado em níveis aceitáveis acima de 80%. Isto está de acordo com a metodologia aplicada por CUTUI, GAREIS (2001). Todas as amostras foram utilizadas e examinadas em triplicata e os resultados descritos acima são as médias destas triplicatas. Ainda, o teste de imunoafinidade nesta tese usou “kits” que foram previamente testados com padrões para verificar se estavam ou não degradados por armazenamento prolongado ou por terem sido submetidos a temperaturas inadequadas. É necessário também testar o comportamento do “kit” diante de cada tipo diferente de matriz para verificar se nesta não existem substâncias capazes de interferir nos resultados, o que foi realizado com alimentos para cães, aves e

também vinho. Toda a metodologia do funcionamento dos kits de imunoafinidade podem ser observados nos manuais que seguem com os kits. De uma forma geral, existem absorvantes no gel da coluna que se ligam com a toxina testada e o retém. Assim, no momento da passagem de uma amostra contaminada, a toxina específica para o kit será retida e os outros elementos serão eluídos. Em seguida, utilizando metanol, esta coluna será submetida ao desligamento desta adsorção e a toxina será eluída juntamente com o solvente para um vial apropriado para posterior análise.

O método utilizado para obter resultados confiáveis deve ser muito bem avaliado, pois muitas vezes os resultados obtidos através da análise a partir destes métodos podem implicar em punições para algum órgão ou empresa do setor alimentício ou mesmo para a tomada de medidas punitivas contra alguém. As perícias legais e forenses, por exemplo, precisam ter uma acurácia na sua metodologia que não deixe dúvidas nos seus resultados (MAURER, 1998). A razão de ser de um laboratório é produzir resultados analíticos confiáveis. A análise deve estar voltada a obter resultados com exatidão e precisão adequada para a finalidade a que se destinam. Um bom programa de controle e segurança de qualidade analítica abrange: uso de métodos analíticos validados, confirmação da identidade do composto de interesse, escolha de métodos de quantificação adequados, emprego de amostras de referência e testes de recuperação na rotina de controle de qualidade e participação em testes de proficiência. A validação do método analítico escolhido pode ser executado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. No caso desta tese, o método foi validado no próprio laboratório, através de testes de recuperação com a comparação com um método independente (CURTUI, GAREIS, 2001). O teste de recuperação foi realizado fazendo-se a adição do componente de interesse à matriz (OTA) seguida da execução do método sendo avaliado. O teor medido do componente adicionado foi dividido pelo valor efetivamente adicionado e multiplicado por 100, obtendo-se assim a percentagem de recuperação. Este resultado e metodologia do teste de recuperação podem sofrer críticas, pois o analito (composto de interesse sendo analisado) não sendo parte integrante da amostra, pode ter sua extração facilitada que se comparado a uma amostra que o contenha naturalmente, por ter sido nela produzido ou ainda, com ela produzido. Porém, os resultados deste tipo de teste de recuperação podem fornecer um panorama do comportamento do método com relação ao composto de interesse no tipo de matriz usado no teste.

Para a análise nesta tese procurou-se conhecer ainda algumas outras propriedades do método analítico empregado. O limite de detecção foi analisado e encontrou-se dentro de um limite desejável de acordo com trabalhos na área. Existem diversas definições para limite de detecção. Pode ser a menor concentração do analito da qual podemos estar confiantes na sua medição, ou é a menor concentração do analito da qual temos 95% de confiança que será detectada pelo método. Outra definição é ainda fornecida pelo Codex Alimentarius, que declara ser o limite de detecção convencionalmente aceito como três vezes o desvio padrão do branco da amostra. Aplicando ainda uma convenção, o limite de quantificação foi obtido também para esta análise como sendo cinco vezes o limite de detecção.

A confirmação da identidade da OTA nesta tese foi obtida através de alguns parâmetros. Cabe colocar a importância da cromatografia como sendo um poderoso método de separação de compostos, mas não de identificação. A cromatografia apenas fornece dados auxiliares na identificação de compostos. Existem algumas técnicas que auxiliam na identificação dos compostos pesquisados e são decisivas em casos negativos, isto é, para comprovar que um composto com certo tempo de retenção (cromatografia líquida ou gasosa) ou distância de retenção (cromatografia em camada delgada ou em papel) não é o que se julgava ser. Foi utilizada nesta tese a comparação do tempo de retenção ou distância de retenção do composto com o dos padrões (uma coincidência de tempos de retenção entre o analito e o padrão significa que o analito talvez seja o mesmo composto que o padrão. Caso negativo pode-se

afirmar que não é; e a co-cromatografia onde foi adicionado uma quantidade de OTA padrão na amostra e depois verificou-se o pico aumentar ou surgir outro pico. No primeiro caso, temos um “presuntivo positivo” e a análise merece progredir para uma etapa de confirmação de identidade. No segundo caso, é negativo. Como já colocado anteriormente, algumas amostras passaram por colunas de imunoafinidade, o que é uma prova comprobatória que a reação é mesmo com a substância analisada. As amostras positivas após esta etapa foram todas confirmadas pela detecção de fluorescência, fornecendo a confirmação de identidade através da razão entre as absorvâncias ou fluorescências na cromatografia líquida.

Seguindo a metodologia, a etapa de quantificação requereu a elaboração de uma curva de calibração, onde foi estabelecida a correlação entre o sinal do detector e quantidade do componente de interesse. Os sistemas usados para quantificação são: (a) normalização, (b) padronização externa, (c) padronização interna e (d) método de adições. (COLLINS et al., 1995). O sistema utilizado neste trabalho foi o de padronização externa, pois apenas um composto nos interessava. O padrão foi cromatografado separadamente em quantidades conhecidas para possibilitar o traçado de uma curva padrão que relacionou a área com o peso do composto. Para se obter uma melhor precisão foram mantidas as mesmas condições cromatográficas durante a análise, amostras e padrão foram alternados, o volume de injeção para os padrões e para a amostra foram os mesmos (para evitar distorções dos picos) e foi utilizado padrão de alta pureza. Alguns fatores foram corrigidos no decorrer do experimento, pois ao montar a curva observou-se que, inicialmente, ela não passava pelo zero, o que poderia ser presença de impurezas, adsorção irreversível, degradação no injetor ou na coluna. Estes fatores eram indesejáveis e conseguiu-se eliminá-los após alguns acertos.

Pode-se parecer de certa forma simples elaborar uma curva de calibração. No entanto, a exatidão dos resultados repousam na confiabilidade da curva elaborada. Preparação e diluição das soluções padrão e das amostras são geralmente as maiores causas de erros. Durante a calibração podem aparecer: (a) erros sistemáticos (determinados); (b) erros aleatórios (indeterminados); (c) erros devidos ao uso de uma matriz para o padrão diferente da matriz das amostras (erros determinados ou indeterminados). Um ponto freqüentemente discutido é o número de pontos necessário em uma curva de calibração. Análises estatísticas demonstraram que um número maior que seis pontos é desnecessário. Isto porque a faixa de confiabilidade ou invólucro de segurança em nível de 95% de confiança de uma curva de calibração não diminui de maneira vantajosa para o analista quando este toma mais que seis pontos. No entanto, o alargamento do invólucro de confiança aumenta acentuadamente quando menos de seis pontos são usados para a curva de calibração (VALENTE SOARES 2001).

O resultado da aplicação e ajuste desta metodologia pode-se observar no anexo 2 e na tabela 11. Antes, para reafirmar, o limite de detecção foi definido como sendo de 0,062 µg/L e o limite de quantificação ( 3x maior ) foi de 0,186 µg/L.

**Tabela 11: Níveis de ocratoxina A em amostras de soro suíno obtidas em quatro Estados brasileiros divididos por número de amostras.**

Faixa de Concentração (µg/L)	Ocratoxina A em soro suíno (µg/L)							
	Estados Brasileiros *							
	SC		MT		BA		RJ	
	N. amostras	Média ± DP	N. amostras	Média ± DP	N. amostras	Média ± DP	N. amostras	Média ± DP
< LQ	40	--	29	--	64	--	32	--
LD - < LQ	zero	--	2	0,17 ± 0,02	zero	--	3	0,16 ± 0,02
LQ < 1	zero	--	5	0,62 ± 0,28	zero	--	28	0,59 ± 0,24
1 - < 5	8	4,01 ± 0,89	13	3,20 ± 1,39	20	2,73 ± 0,94	10	1,74 ± 0,89
5 - < 25	23	9,87 ± 4,77	44	11,14 ± 5,69	14	11,10 ± 4,35	17	5,89 ± 5,89
25 - < 75	17	44,24 ± 16,71	6	46,79 ± 15,02	2	51,39 ± 4,13	8	42,59 ± 11,14
≥ 75	12	75,45 ± 53,61	1	--	zero	--	2	115,39 ± 4,65

É importante esclarecer novamente que as amostras foram coletadas de forma aleatória, sem interferência de alterações visuais no exame ante mortem ou no pós mortem ao exmae das vísceras e órgãos. Isso credita ainda mais o caráter investigativo do trabalho e consolida o fator não vinculado da pesquisa, sem a presença de amostras direcionadas por alterações sugestivas de doenças.

Nota-se ainda que os Estados amostrados possuem características climáticas diferentes entre si. O Estado de Santa Catarina é naturalmente mais frio e seu clima favorece em muito a presença de fungos nos grãos e com isso, a maior oportunidade destes em produzirem micotoxinas. Não é por menos que ao analisar os dados encontrados podemos observar que a maior quantidade de amostras positivas em níveis acima de 5 µg/L foi este Estado. Entretanto, não se pode afirmar que o clima mais frio proporcionou a maior presença de OTA nas amostras, até por que os principais fungos produtores de OTA em nosso país é do gênero *Aspergillus* e o de clima temperado é do gênero *Penicillium*.

Já o Estado do Mato Grosso apresentou a segunda maior quantidade de positivos. Este é um Estado dos mais quentes do Brasil, porém sua infraestrutura de armazenamento ainda sofre devido a grande produção e produtividade frente ao número insuficiente de armazéns para estocagem dos grãos. Assim, o surgimento de fungos e micotoxinas na pós-colheita é um fator importante para ser observado neste Estado e é um fator de risco para a produção de alimentos para alimentação de suínos.

O Estado da Bahia com seu clima quente e úmido nas regiões da coleta foram fatores que tiveram pequena influência nos resultados, podendo concluir que no momento das coletas o clima não interferiu de forma significativa nos resultados. Os animais abatidos e amostrados nesta oportunidade apresentaram o maior grau de negatividade para a presença de ocratoxina A entre todos os outros Estados amostrados. As amostras com detecção desta micotoxina não representam risco ao consumo no Estado da Bahia.

O Estado do Rio de Janeiro, grande centro consumidor de alimentos em geral, tem por característica própria uma baixa concentração de rebanhos no seu território. Fatores como falta de incentivos fiscais, presença de matadouros oficiais, pequena área para plantio de grãos para rações, e custos de produção mais altos que nos Estados vizinhos fazem com que o Rio de Janeiro não tenha uma grande área suinícola no Estado, estão entre os fatores a serem observados quanto aos índices de presença de ocratoxina A em tecido suíno abatidos no Estado. Assim, por ter menor quantidade de animais no plantel e pela proximidade dos produtores aos órgãos fiscalizadores e reguladores, existe menores chances de distribuição de fungos e suas toxinas nas rações destes animais.

**No Estado de Santa Catarina, das 100 amostras analisadas:** 40 amostras apresentaram níveis abaixo do limite detectável, Nenhuma amostra entre o LD e o LQ, Nenhuma amostra acima do limite de quantificação e abaixo de 1 µg/L, 8 amostras estavam na faixa de 1 a 5 µg/L, 23 amostras na faixa de 5 a 25 µg/L, 17 amostras na faixa de 25 a 75 µg/L, 12 amostras na faixa maior de 75 µg/L.

**No Estado de Mato Grosso, das 100 amostras analisadas,** 29 amostras apresentaram níveis abaixo do limite detectável. 2 amostras entre o LD e o LQ, 5 acima do limite de quantificação e abaixo de 1 µg/L 13 amostras na faixa de 1 a 5 µg/L, 44 amostras estavam na faixa de 5 a 25 µg/L, 6 amostras na faixa de 25 a 75 µg/L, 1 amostra na faixa maior de 75 µg/L.

**No Estado da Bahia, das 100 amostras analisadas,** 64 amostras apresentaram níveis abaixo do limite detectável. Nenhuma amostra entre o LD e o LQ, Nenhuma amostra entre o limite de quantificação e 1 µg/L, 20 amostras estavam na faixa de 1 a 5 µg/L, 14 amostras na faixa de 5 a 25 µg/L, 2 amostras na faixa de 25 a 75 µg/L, Nenhuma amostra na faixa maior de 75 µg/L.

**No Estado do Rio de Janeiro, das 100 amostras analisadas,** 32 amostras tiveram níveis abaixo do mínimo detectável, 3 amostras entre o LD e o LQ, 28 amostras estavam na faixa acima do limite de detecção e abaixo de 1 µg/L 10 amostras estavam na faixa de 1 a 5 µg/L, 17 amostras na faixa de 5 a 25 µg/L, 8 amostras na faixa de 25 a 75 µg/L, 2 amostras na faixa maior de 75 µg/L.

Das amostras analisadas, 165 amostras apresentaram níveis abaixo do limite detectável (41,25%), 5 amostras entre o LD e o LQ ( 1,25%), 33 amostras entre o limite de quantificação e 1µg/L ( 8,25%), 51 amostras estavam na faixa de 1 a 5 µg/L (12,75%), 98 amostras na faixa de 5 a 25 µg/L ( 24,5%), 33 amostras na faixa de 25 a 75 µg/L (8,25%) e 15 amostras na faixa maior de 75 µg/L ( 3,75%).

A concentração média das amostras acima do limite de detecção foi de 23,729 µg/L. Se forem considerados apenas os valores acima do limite de quantificação temos a média das médias em 26,673 µg/L.

Para realizar comparações dos dados obtidos nesta tese com alimentos destinados a suínos, buscou-se levantar trabalhos realizados no Brasil e especificamente nos Estados estudados sobre a ocorrência de OTA nestes produtos. Na busca dentro deste período determinado da tese constatou-se que ainda são escassos os trabalhos em cima destes materiais e até mesmo inexistentes em alguns locais. Porém já existem dados interessantes relativos a esta micotoxina. É importante o estudo mais aprofundado de sua ocorrência tanto no sangue dos suínos quanto em alimentos que estão sujeitos a seu risco de exposição.



**Tabela 12: Níveis de ocratoxina A em alimentos destinados ao consumo de suínos provenientes de literatura e suas relações com os níveis de ocratoxina A encontrados em soro em quatro Estados brasileiros.**

Estados brasileiros	Alimento	Níveis de OTA em alimentos ( $\mu\text{g/L}$ )	Literatura	Níveis de OTA em soro de suíno no presente estudo ( $\mu\text{g/L}$ )	
				Faixas	Média $\pm$ DP
SC	ração para suínos	1,73%	Santurio et al., 1992		
	produtos derivados do trigo	2/79 – 101	Furlong et al., 1999	0 - <b>274,56</b>	24,78 $\pm$ 43,83
	produtos derivados do arroz	2/47 - 27	Furlong et al., 1999		
	farinha de milho	3/54 - 12	Vieira et al., 1999		
MT	milho	0/36 – 0	Henningen e Dick, 1995	0 - <b>78,21</b>	8,94 $\pm$ 13,99
BA	**café em grão torrado	33/47 – 1,75	Prado et al., 2000	0 - <b>54,32</b>	3,12 $\pm$ 8,07
RJ	trigo	1/18 - 40	Duarte, Carvalho, Rosa, 1997		
	alimento para aves	1,3 a 80	Rosa et al., 2006	0 - <b>118,69</b>	7,91 $\pm$ 19,69
	alimento para aves	17 a 197	Fraga et al., 2006		
	alimento para suínos	36 - 120	Rosa et al., 2009		

\* soro suíno - 13,8% - 0,06 a 0,46 - Santurio e Mallmann, 1993

Os resultados obtidos neste estudo estão relacionados com os dados relatados por outros autores quanto aos níveis de OTA encontrada em alimentos destinados à alimentação animal estudado em diferentes Estados brasileiros. Segundo esses estudos, as amostras de Santa Catarina variaram de níveis de 2-101  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  OTA em alimentos como rações para suínos, farinha de milho, trigo e arroz e subprodutos (SANTURIO et al., 1992, FURLONG et al. 1999, VIEIRA et al., 1999). Rosa et al (2009) informaram os níveis de OTA da alimentação de suínos no Estado do Rio de Janeiro, que variou entre 36 y 120  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Por outro lado, relataram níveis de OTA em milho no Estado de Mato Grosso não excedeu 36  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . (Henningen e Dick, 1995) enquanto que no Estado da Bahia não há relatos de contaminação por OTA em alimentos destinados aos suínos como também não foram relatados sintomas relacionados a estes animais para predizer a presença de OTA em alimentos. Um dos primeiros trabalhos realizados com a colaboração de pesquisadores brasileiros foi o de Mallman et al (1994) que determinaram a presença de OTA em soro suíno através de cromatografia de camada delgada com uma taxa de recuperação de 92,5%, maior que a encontrada neste trabalho de tese que foi de 82%. Das 444 amostras estudadas pelos autores referidos, 32,21% apresentaram concentrações de OTA acima de 0,6ng/ml. Estas amostras foram coletadas no Norte da Alemanha entre 236 propriedades. O método de extração usado foi descrito por Mortensen et al., (1983) e modificado por Hasert (1988) e o método de identificação e quantificação foram descritos por Nesheim et al. (1973). A concentração média entre os positivos foi de 4,69 ng/ml, variando de 0,6 a 37 ng/ml. A observação na placa de cromatografia não permitiu diferenciação em amostras positivas acima

de 30 ng/ml e abaixo de 0,6 ng/ml. Não realizaram nenhum outro tipo de teste para comprovação da substância, como cromatografia em camada delgada.

Em um estudo na Sérvia, a taxa de contaminação por OTA em soro suíno foi de 31% (28/90). As concentrações nos positivos variou bastante indo de 0,22 a 220,8 ng/ml com um nível médio de  $3,70 \pm 23,59$  ng/ml. O sangue foi coletado de três diferentes regiões do país, mostrando grande variação entre estas. A média de uma região foi de 0,19 ng/ml, enquanto a das outras duas foi de 2,33 ng/ml e 8,58 ng/ml, esta última apresentando o maior nível de OTA de 220,8 ng/ml. Do total de 90 amostras, 62 estiveram abaixo do limite de detecção (sinal/ruído: 3/1) que foi estimado em 0,1 ng OTA/ml, e a taxa de recuperação foi de 95%. Ao analisar as amostras, quarenta (16, 6%) continham OTA a baixos níveis (0,01 – 0,1 ng/g). Em oito amostras (8,8%) houve variação entre 1 – 5 ng/g, enquanto o resto das amostras positivas (6,6%) continham mais de 5 ng/g. Neste trabalho também foram analisados rins e fígados. Nas amostras de fígado, OTA foi detectada em 24 de um total de 90 (26,6%). sendo a maior concentração de 14,5 ng/g. Já nos rins, a frequência de contaminação foi maior que no soro e no fígado, variando entre as três regiões estudadas em 26,6%, 36,6% e 33,3%. com uma concentração máxima de 52,5 ng/g (MILICEVIC et al., 2008). A metodologia utilizada neste trabalho foi a mesma utilizada na tese, excetuando que foi utilizado um HPLC com espectrofotômetro de massa.

Além de existirem muitos trabalhos na área animal, a cromatografia em micotoxicologia aponta muitos aspectos da contaminação em humanos. Um método para determinação de ocratoxina A em plasma humano foi desenvolvido por Jimenez et al. (1999) com o uso da técnica de HPLC. Este foi inicialmente desenvolvido por Creppy et al.(1991) e modificado quanto as dimensões de coluna, fase móvel e ondas de detecção e emissão para a detecção fluorométrica. Usaram pré-coluna e a fase móvel foi 30:30:40 (v/v) de metanol:acetonitrila:acetato de sódio com injeção de 25 µl e velocidade de fluxo de 1,5 ml/min e com a análise realizada a 40° C. O tempo de retenção foi de 5,2 min, o que se assemelhou ao tempo de retenção médio desta tese. Os limites de detecção e quantificação do método para o padrão foi de 0,4 e 0,6 ng/ml e para o plasma foi de 0,52 e 0,78 ng OTA/ml, respectivamente. Foi um valor acima do encontrado para esta tese que foi de 0,062 µg/L para o limite de detecção e o de 0,186 µg/L para o limite de quantificação. Esta metodologia foi utilizada para analisar plasma de pacientes saudáveis e de pacientes que faziam hemodiálise. Os resultados mostraram que existe perigo de exposição humana no Norte da Espanha para a OTA, com um percentual de 53,3% de amostras positivas ( 0,5-4,0 ng/ml) entre os pacientes saudáveis e de 77,8% (0,5-11,7 ng/ml) nos pacientes que faziam hemodiálise (JIMENEZ et al.; 1999).

Um trabalho experimental avaliou os efeitos da OTA adicionada a dieta de 64 suínos em crescimento e procurou relacionar estes efeitos sobre parâmetros como ganho de peso final e diário, eficiência do alimento, alterações hematológicas, histopatológicas e no sistema imune. Após 119 dias, os suínos foram abatidos e coletaram rim, fígado, músculo semimembranoso e urina, além de separarem a carne de alguns animais de cada grupo para prepararem linguiça que foram analisadas posteriormente. A OTA no rim, fígado e músculo foi detectada através do método de Jorgensen e Petersen (2002) e as amostras de urina através do método de Pascale e Visconti (2000). Os resultados demonstraram diminuição na eficiência alimentar, provavelmente conectada a alteração da síntese proteica causada pela OTA, determinando a redução no crescimento. Também demonstraram alterações nos rins e fígados reafirmando a preferência por estes órgãos como seus alvos principais. Também demonstraram a preferência pelo tecido muscular ao adiposo ao compararem a concentração de OTA entre músculo e linguiça crua. A presença de OTA na urina demonstrou a correlação entre a ingestão de OTA e sua concentração na urina, sugerindo que este método não invasivo possa ser utilizado de forma mais rápida e direta nos animais ao invés da análise dos

alimentos que estes suínos ingerem (MALAGUTTI et al., 2005). Em comparação a esta tese, não foram realizadas coletas oficiais de órgãos e vísceras com fins de estudo epidemiológico e nem a coleta de urina, o que pode ser muito eficiente em granjas, antes do abate.

Outro estudo realizado na Sérvia, em uma região de importância para a indústria suína durante três meses de investigação com um total de 60 amostras de suínos de diferentes pontos desta região demonstrou que 34 amostras (56,6%) foram positivas com níveis de OTA chegando aos 33,3ng/ml. A média de concentração foi de  $2,91 \pm 4,91$  ng/ml. A análise realizada para identificação de OTA foi um método espectrofluorimétrico que utilizou soro retirado de amostras de sangue com anticoagulante citrato de sódio e teve um limite de detecção de 2 ng/ml de OTA e taxa de recuperação de 78% (MILICEVIC et al., 2007). Foi realizada uma pesquisa no Sul da Itália numa cidade de nome Apulia para investigar a presença de OTA na cadeia produtiva da carne suína. Um total de 20 amostras de ração para suínos foram obtidas de 10 propriedades diferentes em Apulia. Estas amostras foram analisadas em HPLC e dentre as que apresentaram maior concentração de OTA, foram escolhidos cinco animais no momento do abate e retiradas amostras de rim, fígado, bexiga, intestino, estômago, linfonodos e músculo para serem analisadas. Foi usado um HPLC com injetor de 100µl de capacidade, colunas C18 e fase móvel com água, acetonitrila e ácido acético (49,5:49,5:1) e fluxo de 0,9 ml/min com detector de fluorescência calibrado para níveis de excitação e emissão de fluorescência de ondas de 333 e 477 nm, respectivamente. Foi também utilizada colunas de imunoafinidade para limpeza dos extratos. OTA foi encontrada nos rins ( 23,9-27,5 ng/g), bexiga (9,8-11,5 ng/g) e fígado (3,2-5,3 ng/g). A OTA na ração dos suínos apresentou concentração variando de 149 a 327 µg/kg de peso seco com limite de detecção e quantificação de 0,1 µg/kg e 0,3 µg/kg, respectivamente. A taxa de recuperação para a metodologia em HPLC com detecção por fluorescência foi de 85%. A coluna utilizada, a fase móvel e a taxa de recuperação deste trabalho são semelhantes aos utilizados nesta tese (CECCI et al., 2007).

Observa-se até agora que a grande maioria dos estudos é proveniente do continente europeu. Lá existem legislações específicas para a ocratoxina A e as pesquisas andam em ritmo acelerado. Através destas pesquisas sabe-se que a Europa apresenta alimentos contaminados por OTA de forma disseminada, quase que como uma epidemia; na verdade já uma endemia. A diferença para o Brasil talvez seja simplesmente relacionada ao fato de que não se procura pesquisar esta micotoxina. Talvez com o incremento das pesquisas tenham-se mais dados em nosso país sobre sua ocorrência. Cerca de 57% dos alimentos amostrados em uma pesquisa continham OTA acima do nível de detecção de 0,01 µg/kg. Apesar disso, muito poucas amostras excederam o limite considerado satisfatório e aceitável na União Européia que é de 5 µg de OTA/kg de alimento. Dos alimentos estudados, 2374 eram de cereais e derivados e apenas 1,4% das amostras apresentaram níveis acima de 3 ppm de OTA. Em relação ao café torrado, 50-75% das 240 amostras continham entre 0,3 e 0,6 µg de OTA / litro de café. Cerca de 70% das cervejas alemãs continham concentrações acima de 0,03 µg/l devido ao uso de trigo contaminado (PETZINGER, WEIDENBACH, 2002).

Outra vertente dos estudos sobre micotoxinas é relacionar secreções dos animais com as concentrações destas no sangue e órgãos e tentar chegar a correlações ou influências da sua presença. Um estudo para determinar os parâmetros espermatozoides em reprodutores suínos também avaliou o tecido sanguíneo e constatou que no período estudado de 5 semanas os níveis plasmáticos da OTA ficou abaixo dos 0,2 ng/ml nos grupos controle e experimental. Os reprodutores pesavam cerca de 250 kg e receberam 20 µg por dia de OTA durante 6 semanas e depois durante mais 9 semanas foram coletadas amostras semanais de sangue, além das amostras de sêmen e das análises clínicas. Foram coletados 2 ml de sangue que passaram por uma fase de preparação e limpeza com adição de ácido cítrico, diclorometano, solução tampão de bicarbonato de sódio e depois de centrifugação foram direto para as análises com ELISA

que teve um limite de detecção de 0,042 ng/ml de OTA em solução tampão (BIRO et al., 2001). Um levantamento na Romênia baseou-se na coleta de sangue, rim, fígado e músculo de 52 suínos durante o abate comercial para levantamento de micotoxinas, entre elas a OTA. As coletas foram divididas em 3 regiões distintas com uma significativa indústria suinícola. Coletaram 50 ml de sangue e utilizaram a mesma técnica deste experimento. A taxa total para OTA foi de 86,8% com o coeficiente de variação de 9,6% e o limite de detecção (sinal/ruído: 3/1) foi estimado em 0,1 ng OTA/ml. Das amostras estudadas, 98% foram positivas no nível de 0,05 – 13,4 ng OTA/ml e 92% foram positivas acima ou igual a 0,1 ng/ml. A média de concentração encontrada neste levantamento foi de 2,43 ng/ml. Nos rins a incidência foi de 79% das amostras com média de 0,54 ng de OTA/g. No fígado, 75% continham traços de OTA, com uma média de 0,16 ng/g. A incidência em músculo foi bem mais baixa, totalizando 17% com média de 0,15 ng/g. Apesar destes valores parecerem elevados, está dentro do encontrado na União Européia, em outros estudos. E ainda, nenhuma das amostras ultrapassou o limite máximo permitido na legislação européia de 5 ng de OTA /g. A distribuição entre os tecidos seguiu um padrão pré-estabelecido que é soro > rim > fígado > músculo conforme publicações de KROGH et al.(1974; 1976) e Patterson et al. (1976) (CURTUI et al., 2001). Um outro trabalho para determinação de OTA em rim e músculo de suínos mostrou-se eficiente, rápido, simples e sensível, necessitando apenas de 2,5 g de amostra e 15 ml de solvente não-orgânico. Usaram CLAE com detector de fluorescência, extração com pré-coluna SPE e absorção por imunoafinidade com colunas ochraprep (MONACI et al., 2004). A OTA pode ser frequentemente encontrada em sangue humano e leite na Europa e Canadá, o que indica uma continuada e disseminada exposição a esta micotoxina. Porém, esta não é uniforme, variando significativamente entre indivíduos e regiões. Os níveis de OTA são maiores em amostras de leite humano de mulheres que vivem em áreas rurais que se comparadas as mulheres que vivem em áreas urbanas ou com pouca agricultura. A exposição a OTA pode ocorrer potencialmente também pela inalação de conídios de fungos ou de poeira na agricultura, representando assim uma adicional fonte de exposição a trabalhadores do campo. Estas afirmações podem ser dadas a partir dos resultados de um estudo que procurou investigar os níveis de OTA em amostras de sangue de 106 trabalhadores de fazendas e compará-los com 104 trabalhadores urbanos (controles) e também correlacionar a exposição com a inalação de conídios de *Penicillium verrucosum* numa cidade da Noruega. Para o estudo do soro, usaram a técnica que é bastante usada descrita por Zimmeri e Dick (1995), com o uso de colunas de imunoafinidade para limpeza do extrato e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Todas as amostras foram positivas quanto a presença de OTA, com uma média desta toxina no soro de 397 ng/l. Não houve diferença significativa entre os trabalhadores rurais e da cidade, e também nenhuma diferença quanto a idade, sexo e se fumantes ou não. Este índice de 100 % corrobora para a indicação do grande espalhamento da OTA em países como a Noruega (SKAUG, 2003). Um outro grupo de pesquisadores também da Noruega estudou a exposição em trabalhadores de fazendas quanto ao risco de contaminação por OTA durante a manipulação e a estocagem de grãos e a importância das práticas na agricultura e a influência do clima neste risco. Todas as amostras de grãos examinados continham OTA com uma média de concentração de 4 µg/kg, sendo que 30 % das amostras apresentaram níveis de 3 a 30 vezes maiores que a média. Eles afirmaram que o risco de contaminação de trabalhadores está ligado principalmente na fase da secagem e armazenagem dos grãos e que o fungo não pára de crescer quando estocado, e ainda que o principal risco de contaminação ocorreu em épocas de chuva e frio naquela região(HALSTENSEN et al., 2004).

A importância desta tese tem relação direta entre a qualidade dos alimentos e a Saúde das pessoas que o ingerem. Assim está altamente envolvido com a Segurança Alimentar, tema

tão abordado e discutido atualmente. A presença de uma toxina tão poderosa e que produz efeitos tão importantes quanto a ocratoxina A é um fator relevante e suficiente para justificar e estimular o Estudo realizado e também trazer novas perspectivas em relação a esta toxina no território brasileiro. Os prejuízos econômicos da presença desta toxina no plantel de suínos do Brasil deve ser estudado pois a presença na maioria das amostras analisadas nos faz pensar que se mais amostras forem estudadas, novos desafios serão mostrados. Apesar de muitas amostras, ainda são insuficientes os dados obtidos para uma análise mais aprofundada do tema. Entretanto, se pode ter noção de que o problema existe e que esforços devem ser realizados em conjunto de órgãos oficiais e empresas privadas para viabilizarem uma vigilância mais constante nos produtos susceptíveis a presença de ocratoxina.

## 5 CONCLUSÕES

- **Esta pesquisa relaciona a contaminação em soro suíno em quatro Estados de diferentes regiões do Brasil;**
- **Pode-se confirmar a presença da ocratoxina A em suínos criados no Brasil;**
- A utilização ou não de colunas de imunoafinidade apresentaram diferença na retenção da ocratoxina A;
- O limite de detecção foi de 0,062 µg/L e o limite de quantificação foi de 0,186 µg/L;
- **Foi encontrada uma relação direta entre os altos níveis de OTA em soro sanguíneo encontrados em Santa Catarina e Rio de Janeiro com os maiores níveis de OTA em alimentos destinados a suínos nos mesmos estados;**
- O maior nível de amostras positivas com limites acima de 5 µg/L ocorreu no Estado de Santa Catarina (52%);
- O Estado de Mato Grosso apresentou o maior número de amostras positivas para ocratoxina A acima do limite detectável pela técnica utilizada (69%);
- O Estado da Bahia foi o que apresentou maior quantidade de amostras abaixo do limite detectável (64%);
- A concentração média de ocratoxina A no soro sanguíneo suíno das amostras com níveis acima do limite de detecção foi de 23,729 µg/L. Se forem considerados apenas os valores acima do limite de quantificação temos a média das médias em 26,673µg/L.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA M.L., ACCENSI F., BRAGULAT M.R., CABAÑES F.J. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 903-906, 2001.
- ABRAMSON, D. Toxicants of the Genus *Penicillium*. In: D'MELLO, J. P. F. (Org.). **Handbook of Plant and Fungal Toxicants**. New York: CRC Press, 1997. p. 303-317.
- ABRAMSON, D.; MILLS, J. T.; SINHA, R. N. Mycotoxin production in amber durum wheat stored at 15 and 19% moisture content. **Food Additives and Contaminants**, v. 7, p. 617-627, 1990.
- ABRAMSON, D.; SINHA, R. N.; MILLS, J. T. Mycotoxin formation in HY-320 wheat during granary storage at 15 and 19% moisture content. **Mycophatologia**, v. 11, p. 181-189, 1990.
- ABRUNHOSA, L., PATERSON, R. R., KOZAKIEWICZ, Z., LIMA, N., VENÂNCIO, A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 240-242, 2001.
- ALEXOPOLUS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: Jhon Wiley and Sons Inc., 1996. 254 p.
- ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R.B.A.; SARGEANT, K.; O'KELLEY, J. A toxic factor in Brazilian groundnut meal. **Veterinary Record**. v. 73, n. 17, p. 428-429, 1961.
- ALMEIDA, A.P.; ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Ochratoxin A in raisins samples marketed in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 65, p. 171-175, 2006.
- ÁLVAREZ, L; GIL, A.G.; EZPELETA, O.; GARCÍA-JALÓN, J.A.; CERAIN, L.A. Immunotoxic effects of ochratoxin A in wistar rats after oral administration. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, n.5, p.825-834, 2004.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists, **Official Methods of Analysis**..Sec. 972-26 - 976-22. Gaithersburg, MD, 1995.
- ASEVEDO, I.G.; GAMBALE, W.; CORREA, B.; PAULA, C.R.; ALMEIDA, R.M.A.; SOUZA, V.M. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp isolated from stored maize. **Revista de Microbiologia**.v.25, n.1, p.46-50, 1994.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA – ABIPECS. Relatório Anual 2004. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 01 fev. 2009.
- BARISIC, K.; PETRIK, J.; RUMORA, L.; CEPELAK, I.; GRUBISIC, T.Z.; Expression of Hsp70 in kidney cells exposed to ochratoxin A. **Archives of toxicology**. v.76, n.4, p.218-226, 2002.
- Bellí, N., Marín, S., Duaigues, A., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2004a). Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 591-594.
- BELLÍ, N., MARÍN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A. J. **Review: Ochratoxin A (OTA) in Wines, Musts and Grape Juices: Occurrence, Regulations and Methods of Analysis**. *Food Science and Technology International*. v. 8, p. 325-335, 2002.

- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**. v.16, n.3, p.497-516, 2003.
- BERETTA, B., DE DOMENICO, R., GAIASCHI, A., BALLABIO, C., GALLI, C. L., GIGLIOTTI, C. Ochratoxin A in cereal-based baby foods: occurrence and safety evaluation. **Food Additives and Contaminants**. v. 19, p. 70-75, 2002.
- BERGER, V.; GABRIEL, A.F.; SERGENT, T.; TROUET, A.; LARONDELLE, Y.; SCHNEIDER, Y.J. Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2). *Proceedings of EUROTOX 2002*, The XL congress of the European societies of Toxicology. Hungary. **Toxicology Letters**. v.140-141, p.465-476, 2003.
- BETINA, V. Mycotoxins as secondary metabolites. In: BETINA V. (Org.). **Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects**. New York: Elsevier, 1989. p. 25-47.
- BIGELIS, R. Fungal metabolites in food processing. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. **Handbook of Applied Mycology: Foods and feeds**. New York: Marcel Dekker, INC., 1992. p.415-443.
- BILGRAMI, K. S., CHOUDHARY, A. K. Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. In: SINHA, K.K., BHATNAGAR, D. (Org.), **Mycotoxins in agriculture and food safety**, New York: Marcel Dekker, 1998. p. 1-43.
- BIRO, K.; BARNA-VETRO, H.; PEESI, T.; SZABO, E.; WINKLER, G.; FINK-GREMMELS, J.; SOLT, LASZLO. Evaluation of spermatological parameters in ochratoxin A – challenge boars. **Theriogenology**. v.60, p.199-207, 2001.
- BLESA, J., SORIANO, J. M., MOLTÓ, J. C., MAÑES, J. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). **Journal of Chromatography A** 1054, 397-401, 2004.
- BLESA, J.; BERRADA, H.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.1046, n.1-2, p.127–131, 2004.
- BLOUNT, W. P. Turkey X disease, **Journal British Turkey Feeding**, v. 9, n. 2, p. 52-77, 1961.
- BOUTRIF, E.; CANET, C. Mycotoxin prevention and control. FAO programs. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 149, p. 681-694, 1998.
- BOZIC, Z., DUANCIC, V., BELICZA, M., KRAUS, O., & SKLJAROV, I. Balkan endemic nephropathy: still a mysterious disease. **European Journal of Epidemiology**, v. 11, p. 235-238, 1995.
- STUDER-ROHR, I; SCHLATTER, J.; DIETRICH, D.R. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. **Archives of Toxicology**. v. 74, p. 499-510, 2000.
- BRANCO, E.L.C. Balcãs: Eterna instabilidade político-geográfico. Disponível em: <<http://www.eduqnet.net/balcas.htm>>. Acesso em: 03 fev. 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 183, de 21 de março de 1996. **Adota o regulamento técnico MERCOSUL sobre seus limites**.
- BRASIL. Ministério da Saúde. RDC 274 da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. **Aprova o regulamento técnico sobre limites máximo de aflatoxina admissíveis no leite, no**



**amendoim, no milho, constante do anexo desta resolução.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 out. 2002.

BRAUNBERG, R.C.; BARTON, C.; FRIEDMAN, L. In vitro effects of the nephrotoxins ochratoxin A and citrinin upon biochemical function of porcine kidney. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.22, n. 4, p.464 - 470, 1992.

BRAUNBERG, R.C.; BARTON, C.N.; GANTT, O.O.; FRIEDMAN, L. Interaction of citrinin and ochratoxin A. **Natural Toxins**. v.2, n.3, p.124-131, 1994.

BÜCHMANN, N.B.; HALD, B. Analysis, occurrence and control of ochratoxin A residues in Danish pig kidneys. **Food additives and contaminants**, v.2, n.3, p.193-199, 1985.

BULLERMAN, L. B.; SCHROEDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.

CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**. v.36, n.3, p.319-323, 2002.

CAMPBELL, H., CHOO, T. M., VIGIER, B., & UNDERHILL, L. Mycotoxins in barley and oat samples from eastern Canada. *Canadian Journal of Plant Science* 80, 977-980, 2000.

CAMPBELL, I. M. Secondary metabolism and microbial physiology. **Advances in Microbiological Physiology**, v. 25, p. 198-201, 1984.

CAMPOS, S.G. Micotoxicose. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. v.5, n.16, p.28-29, 1999.

CAMPOS, S.G.; CAVAGLIERI, L. R, FERNÁNDEZ JURI, M. G, DALCERO, A. M., KRÜGER, C.D., KELLER, L.A.M., MAGNOLI, C.E., ROSA, C.A. R. Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 92, p.377–383, 2008.

CANELA, R.; VILADRICH, R.; VELAZQUEZ, C.A.; SANCHIS, V. A survey of porcine kidneys and chicken liver for ochratoxin A in Spain. **Mycopathologia**. v.125, n.1, p.29-32, 1994.

CARDOZO, S.V.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; KRUGER, C.D.; ROSA, C.A.R.; FERREIRA, A.M.R.; MACEDO, H.W.; LOPES, C.W.G. Alterações hepáticas na aflatoxicose experimental em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) em fase inicial de crescimento. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.30, n. 4, p. 210-214, 2008.

CAST. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. In: **Task Force Report 139**. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2003.

CAST. Mycotoxins. Economic and health risks. In: **Task Force Report 116**. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 1989. 199 p.

CASTELLARI, M., FABBRI, S., FABIANI, A., AMATI, A., GALASSI, S. Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 888, p. 129-136. 2000.

CECCI, E.; BOZZO, G.; BONERBA, E.; DI PINTO, A.; TANTILLO, M.G. Ochratoxin A detection by HPLC in target tissues of swine and cytological and histological analysis. **Food Chemistry**. n.105, p.364-368, 2007.

CERAIN, A.L.; JIMÉNEZ, A.M.; EZPELETA, O.; BELLO, J. Efectos tóxicos de la ocratoxina A. **Reviews in Toxicology**. v.17, p.61-69, 2000.

- CHIAVARO, E., LEPIANI, A., COLLA, F., BETTONI, P., PARI, E., SPOTTI, E. Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. **Food Additives and Contaminants** 19, 575-581. 2002.
- CHU, F.S. Recent progress in analytical techniques for mycotoxins in feedstuffs. **Journal of Animal Science**. v.70, n.12, p.3950-3963, 1992.
- CLEAR, R. M., PATRICK, S. K., GABA, D. Prevalence of fungi and fusariotoxins on barley seed from western Canada, 1995 to 1997. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 22, p. 44-50, 2000.
- COELHO, C.S.P.; FURLONG, E.B.; ALMEIDA, T.L. Migração de micotoxinas durante a parboilização do arroz. **Brazilian Journal of Food Technology**. p. 39-44, v.2; n.1,2, 1999.
- COMISSÃO ECONÔMICA EUROPÉIA (CEE). DIRETIVA 2002/26/CE de 13 de março de 2002. Fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial do teor de ocratoxina A nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**. L.75, p.38-43, 16 mar. 2002. Disponível em: <[http://europa.eu.int/eur-lex/pt/consleg/pdf/2002/pt\\_2002L0026\\_do\\_001.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pt/consleg/pdf/2002/pt_2002L0026_do_001.pdf)>. Acesso em: 20 jan 2006.
- COOK, W.O.; OSWEILER, G.D.; ANDERSON, T.D.; RICHARD, J.L. Ochratoxicosis in Iowa swine. **Journal the American Veterinary Medical Association**. v.188, n.12, p.1399-1402, 1986.
- COSTA, T.P.; GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Segurança alimentar e a cerveja: o perigo das micotoxinas. **Higiene Alimentar**. v.19, n.137, p.39-46, 2006.
- CREPPY, E. E., BAUDRIMONT, I., ANNE, M. How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin A. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 23, supl. 2, p. 165-172, 1998.
- CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**. v.127, n.1-3, p.19-28, 2002.
- CRUZ, L. C. H.; ROSA, C. A. R. Aborto micótico em bovinos. Considerações sobre o diagnóstico e revisão de literatura relevante. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.4, n. 1, p. 16-19, 1981.
- CRUZ, L.C.H.; ROSA, C.A.R.; CAMPOS, J.C.; TURATTI, J.A. Ocratoxicose em suínos no Estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.6, n.1, p.17, 1984.
- CURTUI, V.G.; GAREIS, M. A simple HPLC method for the determination of the mycotoxins ochratoxin A and B in blood serum of swine. **Food Additives and Contaminants**. v.18, n.7, p.635-643, 2001.
- CURTUI, V.G; GAREIS, M.; USLEBER, E.; MÄRTLBAUER, E. Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenona. **Food Additives and Contaminants**. v.18, n.8, p.730-738, 2001.
- CZERWIECKI, L.; CZAJKOWSKA, D.; WITKOWSKA-GWIAZDOWSKA, A. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. **Food additives and contaminants**. v.19, n.11, p.1051-1057, 2002.
- DALCERO, A., MAGNOLI, C., CHIACCHIERA, S., PALACIOS G., REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxinyvalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, p. 179-184, 1997.

- DALCERO, A., MAGNOLI, C., LUNA, M., ANCASI, G., REYNOSO, M., CHIACCHIERA, S., MIAZZO, R., PALACIO, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**. v.141, p.37-43, 1998.
- DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIO, G.; ROSA, C.A.R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *nigri* in Argentina. **Food additives and contaminants**. v.19, n.11, p.1065-1072, 2002.
- DALL'ASTA, C., GALAVERNA, G., DOSSENA, A., MARCHELLI, R. Reverse-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. **Journal of Chromatography A** 1024, 275-279, 2004.
- DESJARDINS, A. E., MANANDHAR, H. K., PLATTNER, R. D., MANANDHAR, G. G., POLING S. M., MARAGOSIC. M. *Fusarium* species from nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1020-1025, 2000.
- DI PAOLO, N. et al. Acute renal failure from inhalation of mycotoxins. **Nephron**. v.64, n.4, p.621-625, 1993.
- DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**. v.64, n.2, p.187-191, 2002.
- DOMIJAN, A.M.; PERAICA, M.; MILETIC-MEDVED, M.; LUCIC, A.; FUCHS, R. Two different clean-up procedures for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in urine. **Journal of Chromatography B**. v.798, n.2, p.317-321, 2003.
- DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; BIRE, R.; FREMY, J.M.; COULON, S. A French monitoring programme for determining ochratoxin A occurrence in pig kidneys. **Natural Toxins**. v.7, n.4, p. 167-173, 1999.
- DUARTE, R.R.; CARVALHO, E.C.Q.; ROSA, C.A.R. Aflatoxina em fígados de frangos de corte, com esteatose, abatidos industrialmente no Estado de Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.4, p.117-120, 1997.
- DUNKEL, F. V. The stored grain ecosystem. **Journal of Stored Products Research**., v. 28, p. 73:87, 1992.
- DWIVEDI, P.; BURNS, R.B. Pathology of ochratoxicosis in young broiler chickens. **Research in Veterinary Science**. v.36, n.1, p.92-103, 1984.
- DWIVEDI, P.; BURNS, R.B.; MAXWELL, M.H. Ultrastructural study of the liver and kidney in ochratoxicosis A in young broiler chicks. **Research in Veterinary Science**. v.36, n.1, p.104-116, 1984.
- ELLING, F. Demonstration of ochratoxin A in kidneys of pigs and rats by immunofluorescence microscopy. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section A**. v.85 A, n.2, p.151-156, 1977.
- ELLING, F.; HALD, B.; JACOBSEN, C.; KROGH, P. Spontaneous cases of toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section A**. v.83, n.6, p.739-741, 1975.
- ELLING, F.; MØLLER, T. Mycotoxic nephropathy in pigs. **Bulletin of the world health organization**. v.49, n.4, p.411-418, 1973.

- ELLING, F.; NIELSEN, J.P.; LILLEHOJ, E.B.; THOMASSEN, M.S.; STORMER, F.C. Ochratoxin a-induced porcine nephropathy: enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure. **Toxicol.** v.23, n.2, p.247-254, 1985.
- ENTWISLE, A.C.; JORGENSEN, K.; WILLIAMS, A.C.; BOENKE, A.; FARNELL, P.J. An intercomparison of methods for the determination of ochratoxin A in pig kidney. **Food Additives and Contaminants.** v.14, n.3, p.223-236, 1997.
- FAO. Manual on the Application of the HACCP System in Mycotoxin Prevention and Control. **Food and Nutrition** paper 73, 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em 10 mar 2009.
- FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **Food and Nutrition** paper 81, 2004. Disponível em <<ftp://ftp.fao.org>> Acesso em 10 mai 2009.
- FAO,. Estrategia de la FAO relativa al enfoque de calidad e inocuidad de los alimentos basado en la cadena alimentaria: documento marco para la formulación de la futura orientación estratégica. **COAG/2003/5**, 2003. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org>> Acesso em 10 jul 2008.
- FAZEKAS, B.; TAR, A. K.; ZOMBORSZKY-KOVACS, M. Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. **Acta Veterinaria Hungarica.** v. 50, p. 177-188, 2002.
- FILALI, A., OUAMMI, L., BETBEDER, A. M., BAUDRIMONT, I., SOULAYMANI, R., BENAYADA, A., CREPPY, E. E. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. **Food Additives and Contaminants** v.18, p. 565-568, 2001.
- FILALI, A.; BETBEDER, A.M.; BAUDRIMONT, I.; BENAYADA, A.; SOULAYMANI, R.; CREPPY, E.E. Ochratoxin A in human plasma in Marocco: preliminary survey. **Human & Experimental Toxicology.** v.21, n.5, p.241-245, 2002.
- FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins: their implications in human and animal health. **The Veterinary Quarterly.** v.21, n.4, p.115-120, 1999.
- FLEURAT-LESSARD, F. Qualitative reasoning and integral mangment of the quality of stored grain: a promising new approach. **Journal of Stored Products Research,** v. 38, p. 191-218, 2002.
- FONSECA, H. **Micotoxinas on line.** Disponível em <<http://www.micotoxinas.com.br>>. Acesso em: 29 jan 2009.
- FRAGA, M. E.; CURVELLO, F. A.; GATTI, M. J.; CAVAGLIERI, L. R.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. R. Potential aflatoxin and ochratoxin A producing by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications,** v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.
- FRIIS, C.; BRINN, R.; HALD, B. Uptake of ochratoxin A by slices of pig kidney cortex. **Toxicology.** v.14, n.52, p.209-217, 1988.
- FRISVAD, J.C; SAMSON, R.A. Filamentous fungi in food and feeds. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. **Handbook of Applied Mycology: Foods and feeds.** New York: Mercel Dekker, INC., 1992. p.31-68.
- FROHLICH, A.A.; MARQUARDT, R.R.; OMINSKI, K.H. Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: A Canadian perspective. **International agency for research on cancer.** v.115, p.139-143, 1991.

- FUKAL, L. A survey of cereals, cereal products, feedstuffs and porcine kidneys for ochratoxin A by radioimmunoassay. **Food Additives and Contaminants**. v.7, n.2, p.253-258, 1990.
- FURLONG, E.B.; SOARES, L.A.S.; VIEIRA, A.P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região do Rio Grande do Sul. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, p. 105-111, 1999.
- GALTIER, P. Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. **International agency for research on cancer**. v.115, p.187-200, 1991.
- GATENBECK, S.; HULT, K.; RUTQVIST, L. A fluorospectrophotometric method for ochratoxin analysis and the spontaneous occurrence of ochratoxin A in pig kidneys in Sweden. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**. v. 56, n.3-4, p.257-260, 1977.
- GATHUMBI, J. K.; USLEBER E., NGATIA, T.A., KANGETHE, E. K. MÄRTLBAUER, E. Application of Immunoaffinity Chromatography and Enzyme Immunoassay in Rapid Detection of Aflatoxin B1 in Chicken Liver Tissues. **Poultry Science**. v. 82, p.585–590, 2003.
- GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. **Food Control**. v.19, p.921-924, 2008.
- GODIN, M.; FILLASTRE, J.-P.; SIMON, P.; FRANCOIS, A.; LE ROY, F.; MORIN, J.-P. Is ochratoxin A nephrotoxic in human beings? **Advances in Nephrology**. v.26, p.181-206, 1997.
- GOLINSKI, P.; HULT, K.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J.; CHELKOWSKI, J.; KNEBLEWSKI, P.; SZEBIOTKO, K. Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of polish swine. **Applied and Environmental Microbiology**. v.47, n.6, p.1210-1212, 1984.
- GOLINSKI, P.; HULT, K.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J.; CHELKOWSKI, J.; SZEBIOTKO, K. Spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in porcine kidney and serum samples in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**. v.49, n.4, p.1014-1015, 1985.
- GROSSO, F.; SAID, S.; MABROUK, I.; FREMY, J.M.; CASTEGNARO, M.; JEMMALI, M.; DRAGACCI, S. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. **Food and Chemical Toxicology**. v.41, n.8, p.1133-1140, 2003.
- HALD, B. Porcine nephropathy in Europe. **International agency for research on cancer**. v.115, p.49-56, 1991.
- HALSTENSEN, A.S.; NORDBY, K-C; ELEN, O.; EDUARD, W. Ochratoxin A in grain dust – estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. **Annals of Agriculture Environmental Medicine**. v.11, p.245-254, 2004.
- HARVEY, R.B.; HUFF, W.E.; KUBENA, L.F.; PHILLIPS, T.D. Evaluation of diets contaminated with aflatoxin and ochratoxin fed to growing pigs. **American Journal of Veterinary Research**. v.50, n.8, p.1400-1405, 1989.
- HARVEY, R.B.; KUBENA, L.F.; ELISSALDE, M.H.; ROTTINGHAUS, G.E.; CORRIER, D.E. Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine. **American Journal of Veterinary Research**. v.55, n.12, p.1757-1761, 1994.

- HENDRY, K.M.; COLE, E.C. A review of mycotoxins in indoor air. **Journal of toxicology and environmental health**. v.38, n.2, p.183-198, 1993.
- HENKE, S. E.; BALLARDO, V. C.; MARTINEZ, B.; BALLEY, R. Survey of aflatoxin concentration in wild bird seed purchased in Texas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, p. 831-835, 2001.
- HERRMAN, J.L. Risk evaluation of ochratoxin A by the joint FAO/WHO expert committee on food additives. **International agency for research on cancer**. v.115, p.327-329, 1991.
- HULT, K.; HÖKBY, E.; HÄGGLUND, U.; GATENBECK, S.; RUTQVIST, L. Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden: use in evaluation of toxin content of consumed feed. **Applied and environmental microbiology**. v.39, n.4, p.828-830, 1980.
- HULT, K.; HÖKBY, E.; HÄGGLUND, U.; GATENBECK, S.; RUTQVIST, L; SELLYEY, G. Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed studies. **Applied and environmental microbiology**. v.38, n.5, p.772-776, 1979.
- HUNT, D.C.; PHILP, L.A.; CROSBY, N.T. Determination of ochratoxin A in pig's kidney using enzymic digestion, dialysis and high-performance liquid chromatography with post-column derivatisation. **The Analyst**. v. 104, n.1245, p. 1171-1175, 1979.
- HUSSEIN, S. H.; BRASSEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.
- JIMENEZ, A.M.; LOPEZ de CERAIN, A.; GONZALES-PEÑAS, E.; BELLO, J. A high performance liquid-chromatographic method for the determination of ochratoxin A in human plasma. **Chromatographia**. v.50, n. 7/8, p.457-460, 1999.
- JIMENEZ, M.; SANCHIS, V.; SANTAMARINA, P.; HERNÁNDEZ, E. *Penicillium* in pre-harvest corn from Valencia (Spain): Influence of different factors on the contamination. **Mycopathologia**, v. 92, p. 53-57, 1985.
- JORGENSEN, K., JACOBSEN, J. S. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-99. **Food Additives and Contaminants** 19, 1184-1189, 2002.
- JORGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**. v.15, n.5, p.550-554, 1998.
- JORGENSEN, K.; PETERSEN, A. Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. **Food Additives and Contaminants**. v.19, n.6, p.562-567, 2002.
- JORGENSEN, K.; VAHL, M. Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). **Food Additives and Contaminants**. v.16, n.11, p.451-456, 1999.
- KALE, S.; BENNET, J. W. Strain instability in filamentous fungi. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E. B.; ARORA, D. K. (Org.). **Handbook of applied mycology: Mycotoxins in ecological systems**. 5. ed. New York: Marcell Dekker, Inc., 1992. p. 311-331.
- KELLER, K. M.; QUEIROZ, B. D.; KELLER, L. A. M.; RIBEIRO, J. M. M.; CAVAGLIERI, L. R.; PEREYRA, M. I. G.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. R. The mycobiota and toxicity of equine feed. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 621-630, 2007.
- KLICH, M. A., PITT, J. I. **A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs**. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Division of Food Processing. Austrália: Academic Press, 1988. 549 p.

- KOE, W. J. Regulations of the European Union for mycotoxins in foods. **Archives Higijene Rada Toksikol**, v. 50, p. 37-46, 1999.
- KÖLLER, G.; ROLLE-KAMPCZYK, U.; LEHMANN, I.; POPP, P.; HERBARTH, O. Determination of Ochratoxin A in small volumes of human blood serum. **Journal of Chromatography B**, v.804, n.2, p.313–317, 2004.
- KROGH, P. Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. **Nordisk Veterinaermedicin**. v.28, n.9, p.452-458, 1976.
- KROGH, P. Ochratoxin A Residues in Tissues of Slaughter Pigs with Nephropathy. **Nordisk Veterinaermedicin**, v.29, n.9, p.402-405, 1977.
- KROGH, P. Ochratoxins in food. In: KROGH, P. (Org.). **Mycotoxins in food**. London: Academic Press, 1987. p. 97-121.
- KROGH, P., ELLING, F., HALD, B., JYLLING, B., PETERSEN, V. E. & SKADHAUGE, E. Experimental avian nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A contaminated feed. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology**, v. 84, p. 215-221, 1976.
- KROGH, P.; ELLING, F.; FRIIS, Chr.; HALD, B.; LARSEN, A.E.; LILLEHOJ, E.B.; MADSEN, A.; MORTENSEN, H.P.; RASMUSSEN, F.; RAVNSKOV, U. Porcine Nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A. **Veterinary Pathology**. v.16, n.4, p.466-475, 1979.
- KROGH, P.; ELLING, F.; HALD, B.; LARSEN, A.E.; LILLEHOJ, E.B.; MADSEN, A.; MORTENSEN, H.P. Time-dependent disappearance of ochratoxin A residues in tissues of bacon pigs. **Toxicology**. v.6, n.2, p.235-242, 1976.
- KROGH, P.; GYRD-HANSEN, N.; HALD, B.; LARSEN, S.; NIELSEN, J.P.; SMITH, M.; IVANOFF, C.; MEISNER, H. Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy: diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Journal of toxicology and environmental health**. v.23, n.1, p.1-14, 1988.
- KROGH, P.; HALD, B.; PEDERSEN, E.J. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. section B**. v.81, p.689-695, 1973.
- KROGH, P.; HASSELAGER, E.; FRIIS, P. Studies on fungal nephrotoxicity. II - Isolation of two nephrotoxic compounds from *Penicillium viridicatum* Westling: citrinin and oxalic acid. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. section B**. v.78, p. 401-413, 1970.
- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment of ochratoxin A residues in food. **International agency for research on cancer**. v.115, p.307-320, 1991.
- KUIPER-GOODMAN, T., OMINSKI, K., MARQUARDT, R. R., MALCOLM, S., MCMULLEN, E., LOMBAERT, G. A., MORTON, T. Estimating human exposure to ochratoxin A. In: CREPPY, E. E., CASTEGNARO, M., DIRHEIMER, G. (Org.) **Human Ochratoxicosis and its Pathologies**. Paris: Editions INSERM, 1993. p. 167-174.
- LACEY, J. Prevention of mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: NATORI, S., KASHIMOTO, K.; UENO Y. (Org.). **Mycotoxins and phycotoxins**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 161-168.

- LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. In: CHELKOWSKI, J. (Org.). **Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 77-118.
- LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, N.; MAGAN, I.C. Grain Fungi. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. **Handbook of Applied Mycology: Foods and feeds**. New York: Mercel Dekker, INC., 1992. p.121-177.
- LAWLOR, P.G.; LYNCH, P.B. Mycotoxins in pig feeds 2: clinical aspects. **Irish Veterinary Journal**. v.54, n.4, p.172-176, 2001.
- LEONI, L. A., SOARES, L. M., OLIVEIRA, P. L. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. **Food Additives and Contaminants**, v.17, p. 867-870, 2000.
- LINDBLAD, C.; BRUBEN, L. **Small farm grain storage**. 3. ed. Washington: VITA Publications, 1980. 250 p.
- LINDNER, E. 1990. **Toxicología de los Alimentos**. 2<sup>a</sup> ed. Ed.Acribia, Zaragoza.
- LINSELL, C.A. The mycotoxins and the human health hazards. **Pure and Applied Chemistry**. v. 49, p. 1765-1769, 1977.
- LOMBAERT, G., A., PELLAERS, P., CHETTIAR, M., LAVALEE, D., SCOTT, P. M., LAU, B. P. Survey of Canadian retail coffees for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 869-877. 2002.
- MACDONALD, S., ANDERSON, S., BRERETON, P., WOOD, R. Determination of ochratoxin A in currants, raisins, sultanas, mixed dried fruit, and dried figs by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 1164-1171. 2003.
- MADSEN, A.; MORTENSEN, H.P.; HALD, B. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs I. Influence on pig performance and residues. **Acta Agriculturae Scandinavica**. v.32, n.2, p.225-239, 1982.
- MAGNOLI, C., HALLAK, C., ASTORECA, A., PONSONE, L., CHIACCHIERA, S.M., PALACIO, G., DALCERO, A. Surveillance of Toxigenic Fungi and Ochratoxin A in Feedstuffs from Córdoba Province, Argentina. **Veterinary Res. Com.**, v. 29, p. 431-445, 2005.
- MAGNOLI, C., ASTORECA, A., PONSONE, L., COMBINA, M., PALACIO, G., ROSA, C.A., DALCERO, A. M. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 326-331, 2004.
- MAGNOLI, C., VIOLANTE, M., COMBINA, M., PALACIO, G., DALCERO, A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 179-184, 2003.
- MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S. M.; MIAZZO, R.; PALACIO, G.; ANGELETTI, A.; HALLAK, C.; DALCERO, A. The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Córdoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, p. 8-22, 2002.
- MAGNOLI, C.; DALCERO, A.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; SAENZ, M. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, p. 27-32, 1998.
- MAJERUS, P., MAX, M., KLAFFKE, H., PALAVINSKAS, R. Ochratoxin A in liquorice root, sweet liquorice and their products. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**. v. 96, p. 451-454, 2000.



- MALAGUTTI, L.; ZANNOTTI, M.; SCAMPINI, A.; SCIARAFFIA, F. Effects of ochratoxin A on heavy pig production. **Animal Research**, v.54, p.179-184, 2005.
- MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; BALDISSERA, M.A.; MICKWITZ, G. Determination of ochratoxin A in blood serum pigs by using thin layer chromatography. **Revista de Microbiologia**. v. 2, n. 25, p. 107-111, 1994.
- MANNING, R.O.; BROWN, T.P.; WYATT, R.D.; FLETCHER, O.J. The individual and combined effects of Citrinin and Ochratoxin A in broiler chicks. **Avian Diseases**. v.29, n.4, p.986-997, 1985.
- MARKAKI, P., DELPONT-BINET, C., GROSSO, F., DRAGACCI, S. Determination of Ochratoxin A in Red Wine and Vinegar by Immunoaffinity High-Pressure Liquid Chromatography. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 533-537, 2001.
- MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of animal science**. v.70, n.12, p.3968-3988, 1992.
- MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; SREEMANNARAYANA, O.; ABRAMSON, D.; BERNATSKY, A. Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in western Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.52, n.2, p.186-190, 1988.
- MATRELLA, R.; MONACI, L.; MILILO, M.A.; PALMISANO, F.; TANTILLO, M.G. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. **Food Control**. v.17, n.2, p.114-117, 2006.
- MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela editora e livraria LTDA, 2000. 295p.
- MILANEZ, T.V.; SABINO, M., Ochratoxina A em feijão comercializado no Estado de São Paulo e sua estabilidade no cozimento. **Revista de Instituto Adolf Lutz**. v. 49, n. 2, p. 131-135, 1989.
- MILANEZ, T.V.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; OKINO, L.K. Evaluation of Brazilian terrestrial *Aspergillus* strains for mycotoxin production. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.61, n.1, p.7-11, 2002.
- MILICEVIC, D.; JURIC, V.; MANDIC, M.; DORDEVIC, M. The presence of ochratoxin A residue in blood plasma of slaughtered swine. **Processing Natural Science**. v.113, p.55-62, 2007.
- MILICEVIC, D.; JURIC, V.; STEFANOVIC, S.; JOVANOVIC, M.; JAKOVIC, S. Survey of slaughtered pigs for occurrence of ochratoxin A and porcine nephropathy in Serbia. **International Journal of Molecular Science**. v.9, p. 2169-2183, 2008.
- MIRAGLIA, E.; BRERA, C. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. **Report on Tasks for Scientific Cooperation**, Directorate-General Health and Consumer Protection. 2002.
- MITTCHELL, R. The ecological basis for comparative primary production. In: LAWRENCE, R.; STINNER, B. R.; HOUSE, G. H. (Org.). **Agricultural ecosystems unifying concepts**. New York: John Wiley & Sons, 1984. p. 13-53.
- MONACI, L.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges **Anal Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 96–103, 2004.
- MONACI, L.; TANTILLO, G.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in pig tissues by liquid-liquid extraction and clean-up and high performance liquid chromatography. **Anal Bioanalytical Chemistry**. v. 378, p.1777-1782, 2004.

- MORGAN, M.R.A.; McNERNEY, R.; CHAN, H.W.S.; ANDERSON, H. Ochratoxin A in pig kidney determined by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.37, p.475-480, 1986.
- MORTENSEN, H.P.; HALD, B.; LARSEN, A.E.; MADSEN, A. Ochratoxin A contaminated for sows and piglets: pig performance and residues in milk and pigs. **Acta Agriculturae Scandinavica**. v.33, n.4, p.349-352, 1983.
- MORTENSEN, H.P.; HALD, B.; MADSEN, A. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs V. Ochratoxin A in pig blood. **Acta Agriculturae Scandinavica**. v.33, n.3, p.235-239, 1983.
- MOSS, M.O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: **Cereal grain: Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and storage**. CHELKOWSKI J., (Org.). Amsterdam: Elsevier, 1991.
- MÜLLER, G.; BURKERT, B.; MÖLLER, U.; DILLER, R.; ROHRMANN, B.; ROSNER, H.; KÖHLER, H. Ochratoxin A and some of its derivatives modulate radical formation of porcine blood monocytes and granulocytes. **Toxicology**. v.199, n.2-3, p. 251-259, 2004.
- MÜLLER, G.; BURKERT, B.; ROSNER, H.; KÖHLER, H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on human kidney cell lines. **Toxicology in Vitro**. v.17, n.4, p.441-448, 2003.
- NAGODAWITHANA, T.W. Products and uses of yeast and yeastlike fungi. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K.(Org.). **Handbook of Applied Mycology: Foods and feeds**. New York: Mercel Dekker, INC., 1992. p.553- 603.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS n<sup>o</sup>303-47-9) in F344/N rats (gavage studies). **National Toxicology Program Technical Report Service**. v.358, n.5, p.1-142, 1989.
- NETTO, D-P., ZANLUCHI, A.T.; SASSAHARA, M.; YANAKA, E.K. Micotoxinas em alimentação animal no período de maio/1997 a março/2001 no Laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina – Londrina – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 79-85, 2002.
- NGILORITI, E.M.; KROLL, J. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in animal tissues. **Die Nahrung**. v.34, n.1, p.97-98, 1990.
- NORTHOLT, M. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Occurrence of food-borne and factor for growth. In: SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. (Org.). **Introduction to food borne fungi**. The Netherlands: Central Bureau var Schimmelcultures Baarn (CBS), 1995. p. 248.
- NORTHOLT, M. D.; VAN EGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E. Penicilic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, v. 42, p. 476-484, 1979.
- ODHAV, B., NAICKER, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 55-61, 2002.
- OLIVEIRA, G., RIBEIRO, J., FRAGA, M., CAVAGLIERI, L., DIREITO, G., KELLER, K., DALCERO, A., ROSA, C. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, p. 355-362, 2007.

- OLIVEIRA, C.A.F.; FERRAZ, J.C.O. Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. **Food Control**, v. 18, p. 375–378, 2007.
- OMINSKI, K.H.; FROHLICH, A.A.; MARQUARDT, R.R.; CROW, G.H.; ABRAMSON, D. The incidence and distribution of ochratoxin A in western Canadian swine. **Food additives and contaminants**. v.13, n.2, p.185-198, 1996.
- OSWEILER, G. D. Mycotoxins contemporary issues of food animal health and productivity. **Veterinary Clinical North America Food Animal Practice**, v. 16, p. 511-530, 2000.
- OSWEILLER, G.D. Micotoxinas. In: OSWEILLER, G.D. (Org.). **Toxicologia Veterinária**. São Paulo: Ed.Artes Médicas, 1998. p.440-468.
- OTTENEDER, H., MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, p. 793-798, 2000.
- OTTENEDER, H., MAJERUS, P. Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, p. 431-435, 2001.
- PALERMO, D., PIETROBONO, P., PALERMO, C., ROTUNNO, T. Occurrence of ochratoxin A in cereals from Puglia (Italy). **Italian Journal of Food Science**, v. 14, p. 447-453, 2002.
- PAPACHRISTOU, A., MARKAKI, P. Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, p. 85-92, 2004.
- PARDO, E., MARÍN, S., RAMOS, A. J., SANCHIS, V. Occurrence of Ochratoxigenic Fungi and Ochratoxin A in Green Coffee from Different Origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, p. 45-49, 2004.
- PARDO, E.; MARÍN, S.; SOLSONA, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. **Food Microbiology**. v.21, n.3, p.267–274, 2004.
- PASCALE, M.; VISCONTI, A. Rapid method for the determination of ochratoxin A in urine by immunoaffinity column clean-up and high performance chromatography. **Mycopathologia**. v.152, p. 91-95, 2000.
- PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 257-265, 1988.
- PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research in Microbiology**. v.155, n.7, p.507–513, 2004.
- PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**. v.77, n.9, p.754-766, 1999.
- PEREIRA, R.T.G. et al. Fungos associados a frutos e grãos do cafeeiro em diferentes fases do processamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 4., 2004, Ouro Preto. **Anais...Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Micologia**, 2004. p.29.
- PERES, T.B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**. v.64, n.2, p.227-229, 2002.

- PETKOVA-BOCHAROVA, T., CHERNOZEMSKY, I. N., CASTEGNARO, M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. **Food Additives and Contaminants**, v. 5, p. 299-301, 1988.
- PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CASTEGNARO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; GARREN, L.; GROSSO, F.; NIKOLOV, I.; VRABCHEVA, T.; DRAGACCI, S.; CHERNOZEMSKY, I.N. Analysis of ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: a one month follow up study. **Medicine and Biology**, v.10, n.2, p.62-68, 2003.
- PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**. v.76, p.245-250, 2002.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I.N.; CASTEGNARO, M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. **Food additives and contaminants**. v.19, n.3, p.282-302, 2002.
- PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**. v.70, n.12, p.3964-3967, 1992.
- PIER, A.C.; RICHARD, J.L.; CYSEWSKI, S.J. Implications of mycotoxins in animal disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.176, n.8, p.719-724, 1980.
- PIMENTEL, D. World resources and food losses to pests. In: GORHAM J. R. (Org.). **Ecology and management of food industry Pests**. Arlington: FDA Technological Bulletin 4, 1991. p. 5-11.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. (2 ed.). London: Blackie Academic & Professional., 920p. 1997.
- PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**. v.56, n.1, p.184-192, 2000.
- PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. **Revue de Médecine Veterinaire**. v.149, p.479-492, 1998.
- PORTNOY, J.M.; KWAK, K.; DOWLING, P.; VANOSDOL, T.; BARNES, C. Health effects of indoor fungi. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**. v.94, n.3, p.313-322, 2005.
- POSTUPOLSKI, J.; RYBINSKA, K.; SZCZESNA, M.; KARLOWSKI, K.; LEDZION, E. The review of the European Union documents relating to contamination of aflatoxins in food. **Rocz. Panstw. Zakl. Hig.**, v. 50, p. 57-67, 1999.
- PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T.; BARROSO, R.E.S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 192-196, 2000.
- RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 686 p.
- REICHARDT, W.; BRIONES, A.; JESUS, R.; PADRE, B. Microbial population shifts in experimental rice systems. **Applied Soil Ecology**, v.17, p.151–163, 2001.
- RIZZO, A.; ESKOLA, M.; ATROSHI, F. Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.631-637, 2002.

- ROMANI, S., SACCHETTI, G., CHAVES LOPEZ, C., PINNAVAIA, G. G., DALLA ROSA, M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3616-3619, 2000.
- ROSA, C. A. R. **Micobiota tóxigena e ochratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. 2002. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- ROSA, C. A., MAGNOLI, C., FRAGA, M. E., DALCERO, A., SANTANA, D. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, p. 358-364, 2004.
- ROSA, C.A.R. **Micobiota tóxigena e ochratoxinas em uvas e produtos derivados**. Seropédica, 1999. 130f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. Ocorrência natural de nefropatia micotóxica suína causada pela ingestão de cevada contaminada com citrinina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.7, p.87-91, 1985.
- ROSA, C.A.R.; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.J.; GATTI M.; CAVAGLIERI, L.R.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M.; LOPES, C.W.G.; Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**. v.113, p.89-96, 2006.
- ROSA, R., PALACIOS, V., COMBINA, M., FRAGA, M. E., OLIVEIRA REKSON, A., MAGNOLI, C. E., DALCERO, A. M. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 408-414, 2002.
- ROSA, C ; KELLER, K ; KELLER, L ; GONZALEZPEREYRA, M ; PEREYRA, C ; DALCERO, A ; CAVAGLIERI, L ; LOPES, C . Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. **Toxicon**, v. 53, p. 283-288, 2009.
- ROUSSEAU, D.M.; CANDLISH, A.A.G.; SLEGGERS, G.A.; Van PETEGHEN, C.H.; STIMSON, W.H.; SMITH, J.E. Detection of ochratoxin A in porcine kidneys by a monoclonal antibody-based radioimmunoassay. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, n.3, p.514-518, 1987.
- ROUSSEAU, D.M.; VAN PETEGHEM, C.H. Spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in porcine kidneys in Belgium. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**. v.42, n.2, p.181-186, 1989.
- RUTQVIST, L.; BJÖRKLUND, N.E.; HULT, K.; HÖKBY, E.; CARLSSON, B. Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, n.6, p.920-925, 1978.
- SABINO, M. Normas e níveis de tolerância de micotoxinas no Brasil, no MERCOSUL e no mundo. In: SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Fundação Cargil, 1999. p.183-192.
- SANTURIO, J.M.; MALLMAN, C.A. Ocratoxina A em soro de suínos na região sul do Brasil. **A hora veterinária**. n. 74, p. 32-34, 1993.
- SARGEANT, K.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R.B.A.; ALLCROFT, R. The Assay of a Toxic Principle in Certain Groundnut Meals. **Veterinary Record**. v.73, n.46, p.1219-1223, 1961.

- SCHMIDT, H.; BANNIER, M.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. **Letters in Applied Microbiology**. v. 38, n.6, p. 464-469, 2004.
- SCHOENTAL, R. Climatic changes, mycotoxins, plagues, and genius. **Journal of the Real Society of Medicine**. v. 88, n.10, p.560-561, 1995.
- SCHOENTAL, R. Mycotoxins and the Bible. Perspectives in Biology and Medicine. **Journal of the Real Society of Medicine**. v.1, n.28, p.117-120, 1984.
- SCHOENTAL, R. Mycotoxins, porphyries and the decline of Etruscans. **Journal of Applied Toxicology**. v.11, n.6, p.453-454, 1991.
- SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., LAU, B. P.-Y., LEWIS, D. A., HAYWARD, S., RYAN, J. J., KUIPER-GOODMAN, T. 1998. Survey of Canadian human blood plasma for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, p. 555-562, 1998.
- SCOTT, P. M.; TRUCKSESS, M. W. Application of immunoaffinity columns to mycotoxins analysis. **Journal of AOAC International**, v. 80, p. 941-949, 1997.
- SCOTT, P.M. Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. **Journal of food protection**. v.41, n.5, p.385-398, 1978.
- SERRA, R; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENÂNCIO, A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.1, p.63– 68, 2003.
- SHARMAN, M.; MacDONALD, S.; GILBERT, J. Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up. **Journal of Chromatography**. v.603, n.1-2, p.285-289, 1992.
- SHOTWELL, O.L.; HESSELTINE, C.W.; GOULDEN, M.L.; Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. **Applied microbiology**, v.17, p.765-766, 1969.
- SHUNDO, L.; ALMEIDA, A.P.; ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; NAVAS, S.S.; LAMARDO, L.C.A. Ochratoxin A in wines and grape juice commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, p. 533-537, 2006.
- SILVA, L.C. **Fungos e Micotoxinas em Grãos Armazenados**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Disponível em: <[www.unioeste.br/agais/fungos.html](http://www.unioeste.br/agais/fungos.html)>. Acesso em: 20 nov. 2008.
- SINHA, R. N.; ABRAMSON, D.; MILLS, J. T. Interrelations among ecological variables in stored cereals and associations with mycotoxin production in the climatic zones of western Canada. **Journal of Food Protection**, v. 49, p. 608-614, 1986.
- SKAUG, M.A.; EDUARD, W.; STORMER, F.C. Ochratoxin A in air-borne dust and fungal conidia. **Mycopathologia**, v.151, n.2, p.93-98, 2000.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.; MORAES, N.; CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, S.J.O.; MORENO, A.M.; ROEHE, P.M. **Clínica e Patologia Suína**. 1 ed. Goiânia: Pfizer, 1999. p.464.
- SOLEAS, G. J., YAN, J., GOLDBERG, D. M. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2733-2740, 2001.

- SPEIJERS, G.J.A.; SPEIJERS, M.H.M. Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology Letters**. v.153, n.1, p.91–98, 2004.
- STEGEN, G., JORISSEN, U., PITTET, A., SACCON, M., STEINER, W., VINCENZI, M. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, v. 14, p. 211-216, 1997.
- STOEV, S.D.; HALD, B.; MANTLE, P.G. Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex or uncertain (mycotoxin) aetiology. **The Veterinary Record**. v. 142, n.8, p.190-194, 1998.
- STOEV, S.D.; VITANOV, S.; ANGUELOV, G.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CREPPY, E.E. Experimental Mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. **Veterinary Research Communications**. v.25, n.3, p.205-223, 2001.
- STORMER, F.C. Ochratoxin A – A mycotoxin of concern. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. **Handbook of Applied Mycology: mycotoxin in ecological systems**. New York: Mercel Dekker, INC., 1992. p.403-432.
- SZCZECH, G.M., CARLTON, W.W.; TUIE, J.; CALDWELL, R. Ochratoxin A toxicosis in swine. **Veterinary Pathology**. v.10, n.4, p.347-364, 1973.
- TAPIA, M.O.; SEAWRIGHT, A.A. Experimental combined aflatoxin B1 and ochratoxin A intoxication in pigs. **Australian Veterinary Journal**. v.62, n.2, p.33-37, 1985.
- TARÍN, A.; ROSELL, M.G.; GUARDINO, X. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins aflatoxins and ochratoxin A. **Journal of Chromatography A**. v.1047, n.2, p.235–240, 2004.
- THACKER, H.L.; CARLTON, W.W. Ochratoxin A mycotoxicosis in the guinea-pig. **Food and Cosmetics Toxicology**. v.15, n.6, p.563-574, 1977.
- The Merck Index**. 9.ed. Rahway, N.J., USA: Merck & CO., Inc., 1976.
- TRENK, H.L.; BUTZ, M.E.; CHU, F.S. Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspegillus ochraceus*. **Applied microbiology**. v.21, n.6, p.1032-1035, 1971.
- TUPINAMBÁ, G.S. et al. Avaliação de um antifúngico produzido por *Paenibacillus polymyxa* SCE2 contra fungos que causam micotoxicoses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 4., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Micologia, 2004. 120p. v. 2, p.38.
- TURNER, W. B.; ALDRIDGE, D. C. **Fungal metabolites II**. London: Academic Press, 1983. 455 p.
- UENO, Y., KAWAMURA, O., SUGIURA, Y., HORIGUCHI, K., NAKAJIMA, M., YAMAMOTO, K., SATO, S. Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. **IARC Scientific Publications** 115, 71-75, 1991.
- VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 75-92, 1998.
- VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials. **Food Additives and Contaminants**. v.12, n.3, p.321-330, 1995.
- VARGA, J., RIGO, K., TEREN, J., MESTERHAZY, A. Recent advances in ochratoxin research - I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. **Cereal Research Communications**, v. 29, p. 85-92, 2001.

VILAR, E.A.; OLIVEIRA, M.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Pesquisa micotoxicológica em fígado de aves produzidas e comercializadas em Pernambuco. **Curitiba**, v. 20, n. 2, p. 335-346, 2002.

VINING, L. C. Functions of secondary metabolites. **Annual Review Microbiology**, v. 44, p. 395-427, 1992.

VISCONTI, A., PASCALE, M., CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, p. 321-326, 2000.

VRABCHEVA, T. M. Mycotoxins in spices. **Voprosy Pitaniia**, v. 69, p. 40-43, 2000.

VRABCHEVA, T.; USLEBER, E.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAUER, E. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. **Journal of Agriculturae and food chemistry**. v.48, n.6, p.2483-2488, 2000.

WILCOX, R.A. Moldy feedstuffs and potential toxins. Boletim técnico n. 39. Disponível em: <[www.micotoxinas.com.br](http://www.micotoxinas.com.br)> Acesso em 23 jan 2009.

WOOD, G.E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. **Journal of Animal Science**. v.70, n.12, p.3941-3949, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Executive board EB110/6. Report on meetings of expert committees and study groups*. 19 abr. 2002. 110th Session. Report by the Secretariat.

WHO. Experimental ochratoxicosis A in pigs. **Australian Veterinary Journal**. v.61, n.7, p.219-222, 1984.

WHO IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some Naturally Occurring Substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **International Agency for Research on Cancer–IARC**, v. 56, 1993.

WHO. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Fifty-sixth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). Geneva. serie 47 paper 74, 2001.

ZIMMERLI, B., DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 655-668, 1996.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.666, n.1, 7, p.85-99, 1995.



## 7.2 ANEXO 1

**Tabela A1: Níveis de ocratoxina A em amostras de soro suíno obtidas em quatro Estados brasileiros**

Faixa de Concentração (µg/L)	Ocratoxina A em soro suíno (µg/L)							
	Estados Brasileiros *							
	SC		MT		BA		RJ	
	Faixa	Média ± DP	Faixa	Média ± DP	Faixa	Média ± DP	Faixa	Média ± DP
< LD		--		--		--		--
LD - < LQ	<b>zero</b>	--	0,185 0,159	<b>0,172</b> ± <b>0,018</b>	<b>zero</b>	--	0,159 0,153 0,184	<b>0,165</b> ± <b>0,016</b>
							0,426 0,706 0,757 0,655 0,752 0,676 0,289 0,926 0,949 0,955	
LQ - < 1	<b>zero</b>	--	0,911 0,234 0,942 0,625 0,726	<b>0,624</b> ± <b>0,285</b>	<b>zero</b>	--	0,809 0,693 0,705 0,189 0,259 0,445 0,495 0,202 0,535 0,433 0,588 0,934 0,409	<b>0,591</b> ± <b>0,236</b>



	5,745		16,882				
	7,632		6,666				
	5,812		10,037				
	6,159		11,376				
	23,495		9,596				
	12,807		6,712				
	11,975		18,578				
			9,469				
			7,483				
			9,846				
			18,229				
			7,256				
			24,433				
			11,269				
			7,303				
			21,634				
			18,404				
			20,250				
			12,740				
			20,012				
			5,941				
			5,512				
			7,999				
			8,970				
			8,992				
			10,346				
			9,019				
	38,007					43,376	
	32,608					35,977	
	41,583					33,675	
	28,558		67,466			36,378	
	36,657		27,427			29,829	
	42,045	<b>44,236</b>	60,452	<b>46,797</b>	54,319	36,378	<b>42,598</b>
	72,267	±	45,149	±	48,474	29,829	±
25 - < 75	64,134	<b>16,712</b>	35,256	<b>15,019</b>		63,748	<b>11,145</b>
	30,294		45,033			51,819	
	68,080					45,979	
	27,212						
	29,383						
	74,762						
	27,866						

	52,042							
	31,806							
	54,713							
	121,357							
	115,383							
	80,801							
	274,560							
	77,522							
	114,558	<b>75,447</b>	78,206	--	<b>zero</b>	<b>zero</b>	118,689	<b>115,397</b>
≥ 75	153,066	±					112,106	±
	108,907	<b>53,611</b>						<b>4,654</b>
	90,281							
	84,685							
	100,327							
	145,709							

---

\* SC = Santa Catarina; MT = Mato Grosso; BA = Bahia; RJ = Rio de Janeiro  
DP = Desvio Padrão  
ND = Não Detectável

### 7.3 ANEXO 3

Figura 9: Cromatograma da amostra 53 sem passagem pela IAC.

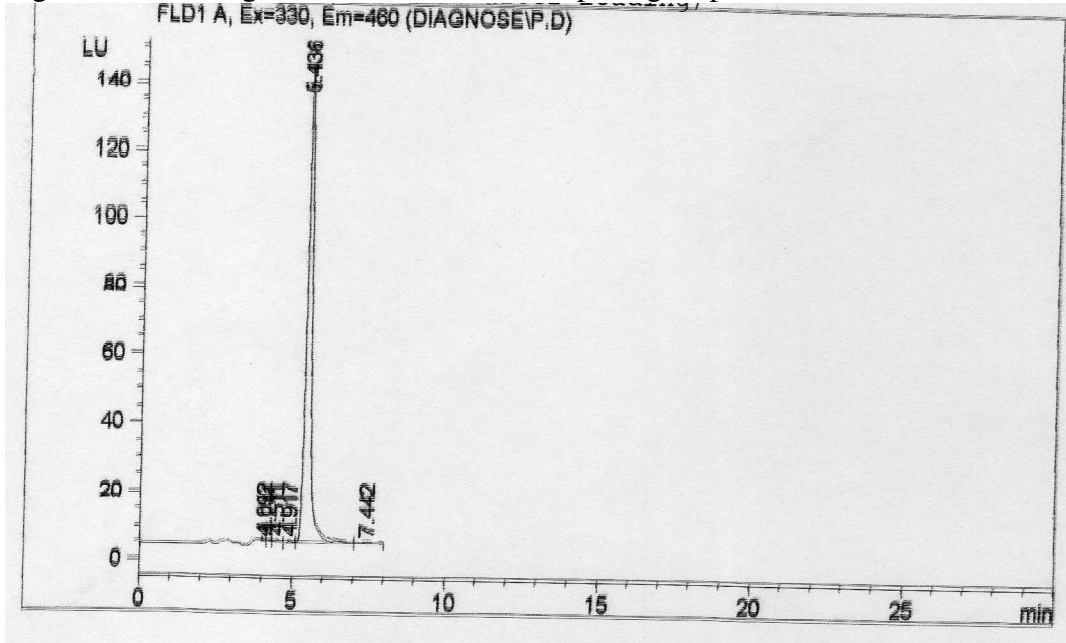


Figura 10: Cromatograma da amostra 53 com passagem por IAC.

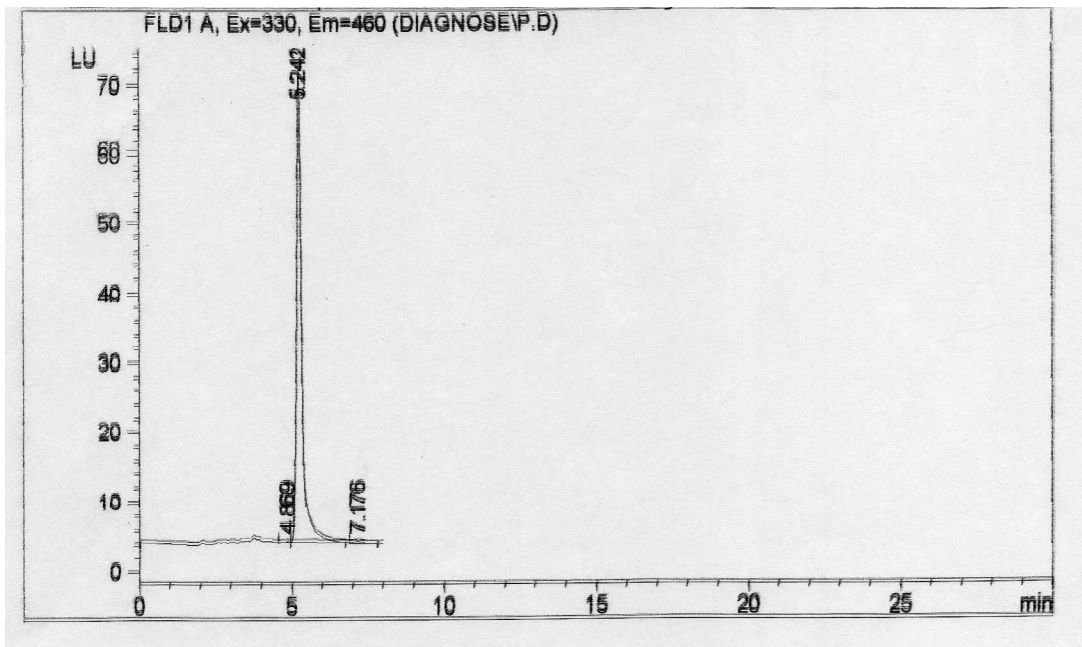


Figura 11: Cromatograma da amostra 372 sem passagem por IAC.

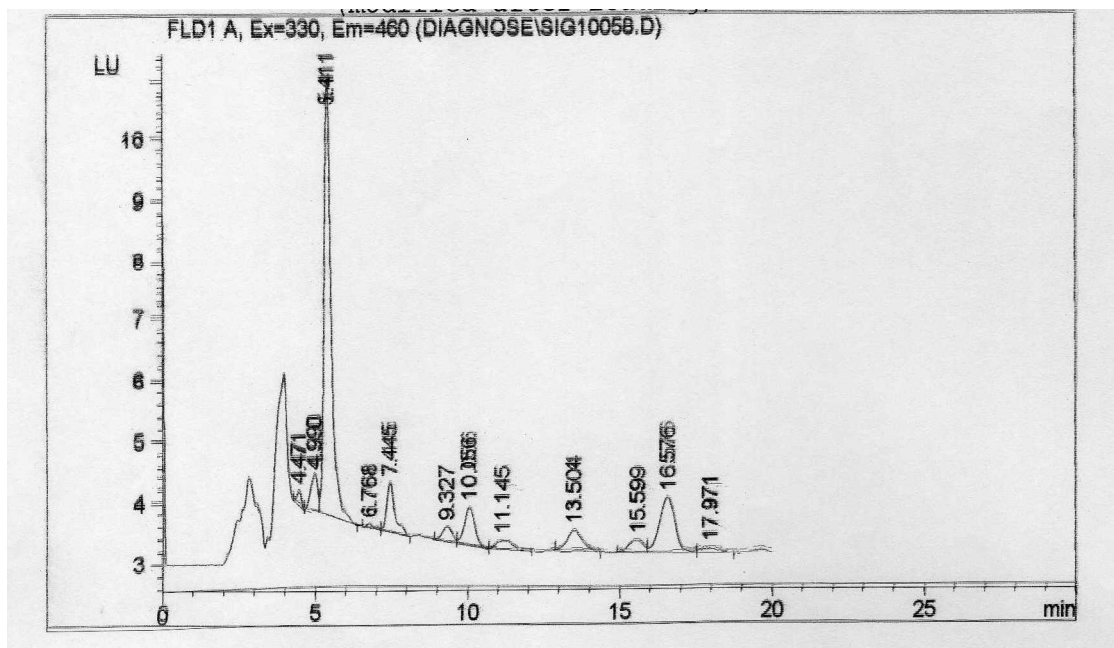


Figura 12: Cromatograma da amostra 372 com passagem por IAC.

