

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

**TESE**

**Monitoramento de Aflatoxinas, Fungos Toxigênicos e  
Níveis de Contaminação em Matérias Primas e Alimentos  
Balanceados. Aflatoxicose Natural em Cães no Estado do  
Rio de Janeiro**

**Sergio Gaspar de Campos**

**2007**



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

**MONITORAMENTO DE AFLATOXINAS, FUNGOS  
TOXIGÊNICOS E NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO EM MATÉRIAS  
PRIMAS E ALIMENTOS BALANCEADOS. AFLATOXICOSE  
NATURAL EM CÃES NO ESTADO DO  
RIO DE JANEIRO**

**SERGIO GASPAR DE CAMPOS**

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

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor** em  
Ciências Veterinárias, Área de  
Concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ  
Março de 2007

636.7084  
C198m  
T

Campos, Sérgio Gaspar de, 1954-  
Monitoramento de aflatoxinas, fungos  
toxigênicos e níveis de contaminação em  
matérias primas e alimentos balanceados.  
Aflatoxicose natural em cães no Estado do  
Rio de Janeiro / Sérgio Gaspar de Campos.  
- 2007.  
78 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha  
Rosa.

Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 70-78.

1. Cão - Alimentação e rações - Teses.  
2. Cão - Alimentação e rações -  
Contaminação - Teses. 3. Fungos  
patogênicos - Teses. 4. Rações -  
Contaminação - Teses. I. Rosa, Carlos  
Alberto da Rocha, 1953- II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Instituto de Veterinária. III. Título.

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

**SÉRGIO GASPAR DE CAMPOS**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 27 / 03 / 2007



Carlos Alberto da Rocha Rosa (Ph.D.) UFRRJ  
(Orientador)



Ana Maria Catalina Dalocero (D.Sc.) UNRC



Lilia Renée Cavagliari (D.Sc.) UNRC



Glória Maria Direito (D.Sc.) UFRRJ



Eulógio Carlos de Queiroz Carvalho (D.Sc.) UENF

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai, JAIR CHAVES DE CAMPOS, onde quer que ele esteja ...

À minha mãe, CALINE GASPAR DE CAMPOS, meus irmãos e familiares, pela base de sustentação em todos esses anos de estudo e trabalho.

“Ciência, do ponto de vista meramente formal, é o saber perfeito e, ocorre quer na qualidade, quer na plenitude desta qualidade. A qualidade apresenta-se com evidência, verdade e certeza. No que se refere à plenitude, o conhecimento perfeito é aquele que operacionalmente segue o seu curso até o máximo como sistema. Isto representa dizer, que a ciência é sistemática prosseguindo, de elo em elo, sem omissão, sempre. Praticamente sem nunca atingir a totalidade do conhecimento, como seu ideal, procura a ciência não saltar etapas no sistema, porque isto a comprometeria com possíveis falsos resultados”.

Minha eterna gratidão aos que tornaram a junção dos elos, uma tarefa menos árdua.

Ao Professor Doutor CARLOS ALBERTO DA ROCHA ROSA, que desde o primeiro momento acreditou no seu saber e se dispôs a operacionalizá-lo, sem o que não teríamos chegado a entender uma parte da ciência.

Ao Professor Doutor FRANCISCO DE ASSIS BARONI, que também desde de o início esteve junto ao projeto, pela ajuda sempre presente na garantia da qualidade e plenitude visando o conhecimento perfeito.

Às Doutoras ANA MARIA DALCERO, LILIA CAVAGLIERI, SOFIA NOEMI CHULZE, CARINA MAGNOLI, ADRIANA TORRES e equipe do Laboratório de Micologia da Universidade Nacional de Rio Cuarto (UNRC), Argentina.

Aos colegas do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman, (IMMVJV), Serviço de Patologia Animal, na pessoa da Médica Veterinária ANA LUIZA PIMENTA e equipe.

Aos Professores Doutores MARCELO ELIAS FRAGA e GLÓRIA MARIA DIREITO.

E a todos que de alguma maneira participaram da execução do presente trabalho: MARIA ANGÉLICA SILVA DA SILVEIRA, LUIZ JORGE SOARES e GILBERTO FLAUSINO, Doutorando Médico Veterinário CEZAR DANIEL KRÜGER, Estagiários e Monitores RÔMULO DE ASSIS SILVARES, LUCAS SOARES GABRIG, LUIZ ANTÔNIO MOURA KELLER, KELLY MOURA KELLER, FÁBIO FIOROTTI DE SOUZA, FÁBIO AUGUSTO COSTA F. REBOUÇAS, MARCOS BERMAN, LEANDRO R. LEITÃO e RAPHAEL RIBEIRO SCHERER.

## BIOGRAFIA

**SÉRGIO GASPAR DE CAMPOS**, filho de Jair Chaves de Campos e Caline Gaspar de Campos, nasceu em 03 de novembro de 1954, em Volta Redonda, estado do Rio de Janeiro.

Iniciou suas atividades escolares no Grupo Escolar Trajano de Medeiros, concluindo seus estudos no Colégio Municipal Getúlio Vargas, no ano de 1975.

Em 1976 iniciou seus estudos de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), concluindo o mesmo em 06 de janeiro de 1980, como primeiro aluno da turma.

Ingressou em 1987 no Curso de Pós-graduação *Lato sensu* em Patologia Clínica, do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária da UFRRJ, concluindo-o em 1990.

No período de 1993 a 2001, desenvolveu atividades de Vice-Diretor e Diretor do Instituto de Veterinária da UFRRJ, assumindo por várias vezes após este período a função de Chefe do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária.

As atividades didáticas iniciaram-se em 1980 como Professor horista, passando por mérito nos anos subsequentes pelas categorias de Professor Auxiliar níveis 1, 2, 3 e 4, Professor Assistente níveis 1, 2, 3 e 4 e Professor Adjunto níveis 1, 2, 3 e 4, em 1999, lecionando as disciplinas de Microbiologia Geral e Micologia Veterinária, entre outras.

Em fevereiro de 2003 foi selecionado para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal, iniciando as suas pesquisas em março deste mesmo ano.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Hipóteses e objetivos .....	2
1.1.1 Hipóteses .....	2
1.1.2 Objetivos gerais .....	3
1.1.3 Objetivos específicos .....	3
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 Alimentos balanceados .....	4
2.1.1 Generalidades .....	4
2.2 Fungos toxigênicos e micotoxinas .....	9
2.2.1 Generalidades .....	9
2.3 Aspectos ecológicos do crescimento e da produção de micotoxinas por fungos no armazenamento .....	10
2.4 Micobiota tóxigena em produtos vegetais e rações .....	14
2.5 Regulamentações e legislação .....	16
2.6 Impacto econômico e social das micotoxinas .....	19
2.7 Gênero <i>Aspergillus</i> .....	19
2.7.1 Generalidades .....	19
2.7.2 Classificação e identificação .....	19
2.7.3 Seção <i>Flavi</i> : biologia e habitat .....	22
2.8 Aflatoxinas .....	23
2.8.1 Generalidades e importância .....	23
2.8.2 Fatores que afetam a produção .....	24
2.8.3 Efeitos biológicos e toxidez das aflatoxinas .....	24
2.8.4 Aflatoxicose em cães .....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
3.1 Estudo da micobiota em alimentos balanceados para cães .....	27
3.1.1 Amostragem de rações para alimentação de cães .....	27
3.1.2 Determinação da atividade de água ( $A_w$ ) .....	28
3.1.3 Contagem, isolamento e identificação da micobiota das amostras .....	28
3.1.4 Identificação das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> .....	28
3.2 Estudo da incidência natural de micotoxinas em alimentos balanceados para cães .....	29
3.2.1 Extração e detecção das aflatoxinas .....	29
3.2.2 Equipamentos .....	29
3.2.3 Padrões .....	30
3.2.4 Reagentes, soluções e acessórios para cromatografia .....	30
3.3 Determinação da capacidade toxigênica das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> (seção <i>Flavi</i> ) .....	30
3.3.1 Cepas .....	30
3.3.2 Produção das aflatoxinas .....	31
3.3.3 Extração e detecção das aflatoxinas .....	31
3.4 Análises estatísticas .....	31
3.5 Episódio de intoxicação natural em cães do estado do Rio de Janeiro .....	31
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
4.1 Estudo da micobiota em alimentos balanceados para cães .....	33
4.1.1 Micobiota isolada de amostras de rações para alimentação de cães ....	33

4.2	Análise da atividade de água ( $A_w$ ) das amostras de ingredientes utilizados para produção de ração para alimentação de cães .....	49
4.3	Avaliação da capacidade aflatoxigênica das espécies isoladas a partir de amostras de rações destinadas à alimentação de cães .....	50
4.3.1	Capacidade aflatoxigênica da microbiota isolada de amostras de rações envolvidas em um episódio de intoxicação natural em cães no estado do Rio de Janeiro .....	50
4.3.2	Avaliação da capacidade aflatoxigênica da microbiota isolada das amostras de rações de cães obtidas no comércio do estado do Rio de Janeiro .....	50
4.3.3	Avaliação da capacidade aflatoxigênica da microbiota isolada de amostras de ingredientes e ração terminada de cães obtida em uma linha de produção de uma indústria .....	52
4.4	Determinação de aflatoxinas em amostras de ração destinadas à alimentação de cães .....	53
4.4.1	Determinação de aflatoxinas em amostras de rações envolvidas em um episódio de intoxicação natural em cães no estado do Rio de Janeiro .....	53
4.4.2	Determinação de aflatoxinas em amostras de ração para cães obtidas no comércio do estado do Rio de Janeiro .....	54
4.4.3	Determinação de aflatoxinas em amostras de ingredientes e ração para cães obtidas em linha de produção industrial .....	57
4.5	Episódio de intoxicação natural aguda de cães por aflatoxinas .....	65
4.5.1	Quadro evolutivo .....	65
4.5.2	Bioquímica sérica .....	65
4.5.3	Achados de necropsia (macroscopia) .....	66
4.5.4	Achados histopatológicos .....	66
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
5.1	Intoxicação natural .....	69
5.2	Alimentos balanceados comerciais de diferentes qualidades .....	69
5.3	Ingredientes e alimentos terminados da linha de produção .....	69
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Decomposição dos grãos de cereais e agentes de mudança, em um ecossistema de grãos armazenados .....	7
<b>Figura 2.</b> Paços na decomposição de materiais primários que conduzem a deteriora do grão .....	8
<b>Figura 3.</b> Manejo integrado no controle de micotoxinas .....	17
<b>Figura 4.</b> Estruturas químicas das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	23
<b>Figura 5.</b> Prevalência dos gêneros de fungos isolados por amostras de rações e alimentos para cães, suspeitas em um processo de intoxicação natural em 2001 ....	34
<b>Figura 6.</b> Frequência de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> isoladas a partir de amostras de rações do grupo A (GA) .....	35
<b>Figura 7.</b> Frequência de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> isoladas a partir de amostras de rações do grupo B (GB) .....	35
<b>Figura 8.</b> Valores mínimos, máximos e médio de unidades formadoras de colônias por grama (ufc/g) de ração para cães, em meios de DRBC, DG18 e DCPA .....	37
<b>Figura 9.</b> Valores de ufc/g de ração para cães dos Grupos Standard (GS), Premium (GP) e Super Premium (GSP), em meios de DRBC, DG18 e DCPA .....	37
<b>Figura 10.</b> Valores de ufc/g de ração destinadas à alimentação de filhotes e adultos em meios de DRBC, DG18 e DCPA .....	38
<b>Figura 11.</b> Frequência relativa das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> , isoladas a partir de rações destinadas à alimentação de cães filhotes e adultos, comercializadas no estado do Rio de Janeiro .....	39
<b>Figura 12.</b> Frequência das espécies de <i>Aspergillus</i> distribuídas por finalidade de ração para cães .....	40
<b>Figura 13.</b> Frequência de espécies pertencentes ao gênero <i>Aspergillus</i> , isoladas a partir de amostras de rações para cães, agrupadas nas categorias Standard (GS), Premium (GP) e Super Premium (GSP) .....	41
<b>Figura 14.</b> Frequência relativa de isolados fúngicos, obtidos a partir de amostras de matérias primas, e da ração terminada em uma linha de produção de alimentos balanceados para cães .....	46
<b>Figura 15.</b> Distribuição das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> isoladas das matérias primas e da ração terminada .....	47

<b>Figura 16.</b> Número de espécies fúngicas isoladas de amostras de ingredientes e ração .....	49
<b>Figura 17.</b> Valores de atividade de água observados nas amostras de ingredientes e ração terminada, durante os meses de março a dezembro de 2005 .....	50
<b>Figura 18.</b> Capacidade aflatoxígenas (AFT) das cepas de <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> , isoladas a partir de amostras de rações envolvidas em episódio de intoxicação natural em cães no estado do Rio de Janeiro .....	51
<b>Figura 19.</b> Capacidade aflatoxígenas (AFT) das cepas de <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> isoladas a partir de amostras de rações Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro .....	51
<b>Figura 20.</b> Capacidade aflatoxígenas (AFT) das cepas de <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> isoladas a partir de amostras de rações destinadas a filhotes e adultos de categorias Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro .....	52
<b>Figura 21.</b> Capacidade aflatoxígena (AFT) de cepas de <i>A. flavus</i> isolados de amostras de ingrediente e rações para cães obtidas de uma linha de produção industrial .....	53
<b>Figura 22.</b> Curva de calibração dos padrões de aflatoxinas para o kit ELISA na concentração de 0, 0,3, 1,0, 3,0 e 8,0 ng/g, onde foram encontrados valores de $R_2 = 0,9973$ (Logit/Log) e de $R_2 = 0,9737$ (Linear/Log) .....	54
<b>Figura 23.</b> Número de amostras positivas e negativas para aflatoxinas totais determinadas por ELISA em amostras de ração destinadas à alimentação de filhotes (RCF) dos grupos Standard (RCFS), Premium (RCFP) e Super Premium (RCFSP) .....	56
<b>Figura 24.</b> Correlação entre os valores obtidos nas análises por ELISA e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	58
<b>Figura 25.</b> Correlação entre os valores de aflatoxinas totais obtidos por ELISA e os valores de AFB <sub>1</sub> obtidos por CLAE, em amostras de milho como ingrediente de ração para cães .....	59
<b>Figura 26.</b> Correlação entre os valores de aflatoxinas totais obtidos por ELISA e os valores de AFB <sub>1</sub> obtidos por CLAE, em amostras de milho moído como ingrediente de rações para cães .....	60
<b>Figura 27.</b> Correlação entre os valores de aflatoxinas totais obtidos por ELISA e os valores de AFB <sub>1</sub> obtidos por CLAE, em amostras de farelo de milho e glúten 21%, utilizados como ingrediente de rações para cães .....	61
<b>Figura 28.</b> Cromatogramas em fase normal de sílica gel e detecção por ultravioleta (350 nm); cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de ingredientes: A. amostra de sorgo (S6) com pico de AFB <sub>1</sub> em RT = 7,22; B. amostra de sorgo (S7) com pico de AFB <sub>1</sub> em RT = 7,5; e, C. padrão de aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	63

<b>Figura 29.</b> Correlação entre os valores de aflatoxinas totais obtidos por ELISA e os valores de AFB <sub>1</sub> obtidos por CLAE, em amostras de farelo de sorgo como ingrediente de rações para cães .....	64
<b>Figura 30.</b> Quadro evolutivo com morte dos 62 animais observados .....	65
<b>Figura 31.</b> Achados de necropsia e histopatologia em canino com aflatoxicose. A-C = Animal necropsiado mostrando icterícia, petéquias e/ou sufusões. B = Fígado com bordos aumentados, superfície rugosa, de consistência ora normal, ora levemente diminuída, de tonalidade amarelo pardacenta, com focos avermelhados em padrão noz-moscada. D = Estômago com hemorragia da mucosa. E-F-H = Hepatite aguda foi do tipo esteatohepatite, onde predominaram alterações degenerativas e colestáticas (HE 200x); G = Rins com degeneração vacuolar e presença de pigmento biliar em graus variados no epitélio tubular (HE 200x) .....	67

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Micotoxinas representativas das principais categorias biossintéticas de metabólitos secundários .....	10
<b>Tabela 2.</b> Efeitos da Atividade de água ( $A_w$ ) e do aquecimento espontâneo sobre a colonização de <i>Aspergillus sp.</i> e <i>Penicillium sp.</i> , entre outros fungos, sobre grãos de cereais armazenados .....	13
<b>Tabela 3.</b> Atividade de água mínima para o crescimento e a produção de micotoxinas por alguns fungos toxicogênicos .....	14
<b>Tabela 4.</b> Níveis máximos de micotoxinas tolerados nos cereais e em alimentos à base de milho para consumo animal .....	18
<b>Tabela 5.</b> Potencial toxicogênico das principais espécies de <i>Aspergillus</i> e teleomorfos que contaminam produtos agrícolas .....	20
<b>Tabela 6.</b> Subgêneros, seções e teleomorfos de <i>Aspergillus</i> .....	21
<b>Tabela 7.</b> Frequência de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> isoladas a partir de amostras de rações dos grupos A e B .....	34
<b>Tabela 8.</b> Contagem total dos fungos filamentosos isolados de amostras de rações para cães .....	36
<b>Tabela 9.</b> Fungos filamentosos isolados de amostras de rações para alimentação de cães .....	38
<b>Tabela 10.</b> Espécies do gênero <i>Aspergillus</i> isoladas de amostras de rações de cães .....	39
<b>Tabela 11.</b> Contagem de colônias de fungos (UFC/g) isoladas no meio diclorán rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) .....	42
<b>Tabela 12.</b> Contagem de colônias de fungos (UFC/g) isoladas no meio diclorán glicerol 18% Ágar (DG18) .....	43
<b>Tabela 13.</b> Contagem de colônias pertencentes ao gênero <i>Fusarium</i> (UFC/g) isoladas no meio de Nash-Snyder (NS) .....	44
<b>Tabela 14.</b> Distribuição dos gêneros de fungos isolados das matérias primas e da ração terminada .....	46
<b>Tabela 15.</b> Valores absolutos e frequência relativa de isolamentos de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> , a partir das amostras de ingredientes e ração terminada, e dentro do gênero por ingredientes vegetais e ração terminada .....	48

<b>Tabela 16.</b> Valores médios dos parâmetros, desvio padrão (SD), mediana, limites inferior e superior, moda e 90º percentil das concentrações de aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> , detectadas em amostras de ração e alimentos para cães dos Grupos A, B e C .....	54
<b>Tabela 17.</b> Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA, em rações Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro .....	55
<b>Tabela 18.</b> Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA, em rações para filhotes Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro .....	56
<b>Tabela 19.</b> Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA, em rações para adultos Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro .....	57
<b>Tabela 20.</b> Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em milho como ingrediente de rações para cães .....	58
<b>Tabela 21.</b> Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em milho moído como ingrediente de rações para cães .....	60
<b>Tabela 22.</b> Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em farelo de milho e glúten 21% utilizado como ingrediente de rações para cães .....	61
<b>Tabela 23.</b> Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em farelo de sorgo utilizado como ingrediente de rações para cães .....	62
<b>Tabela 24.</b> Valores médios, frequência absoluta e relativa e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em ração terminada para cães .....	64
<b>Tabela 25.</b> Valores médios de parâmetros bioquímicos séricos de 25 cães naturalmente intoxicados por aflatoxinas em rações do Grupo A .....	66

## LISTA DE ABREVIACÕES

A <sub>a</sub>	Atividade de gua
ABG	Agar Batata Glicose
AF	Aflatoxina
AFPA	Agar <i>Aspergillus flavus-parasiticus</i>
AFS	Aflatoxinas
a <sub>w</sub>	Atividade hídrica
CLA	Agar Folha de Cravo
CYA	Agar Czapeck Extrato de Levedura
CY20S	Agar Czapeck Extrato de Levedura Sacarose 20%
DG18	Dicloran 18% Glicerol
DRBC	Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
fco	Farinha de carne e ossos
fgm	Farinha de milho e Glúten 21%
fs	Farelo de Sorgo
fva	Farinha de vísceras de ave
GA	Grupo A
GB	Grupo B
GC	Grupo C
G25N	Agar Nitrato Glicerol 25%
HPLC	Cromatografia líquida de alta resoluao
IACs	Colunas de Imunoafinidade
m	Milho
mm	Milho moído
NS	Meio de Nash-Snyder
PB	Proteína Bruta
ufc	Unidade formadora de colnia

## RESUMO

CAMPOS, Sergio Gaspar de. **Monitoramento de aflatoxinas, fungos toxigênicos e níveis de contaminação em matérias primas e alimentos balanceados. Aflatoxicose natural em cães no estado do Rio de Janeiro.** Seropédica: UFRRJ, 2007. 78p. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal).

Os alimentos balanceados comerciais constituem um elemento importante na indústria de cães no Brasil. Sua composição inclui misturas de cereais produzidos nas granjas, tais como sorgo, milho e algumas oleaginosas. Todos os alimentos destinados a cães estão suplementados com gorduras, vitaminas, minerais, antioxidantes e farinhas de diversas origens incorporados, em alguns casos como pellets. Ao possuir suficientes nutrientes e condições de umidade adequadas são suscetíveis a contaminação por fungos durante a pré e pós-colheita, no armazenamento, na manufatura e no processamento destes ingredientes. Os fungos filamentosos mais comumente encontrados em grãos armazenados incluem as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, capazes de produzir deteriora e diferentes micotoxinas. Espécies de *Aspergillus* como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* são as mais toxicógenas podendo produzir aflatoxinas, consideradas como carcinógenos tipo 1A. Os alimentos destinados a cães possuem quantidades importantes de cereais e, portanto podem concentrar quantidades importantes de toxinas. Em cães e gatos os efeitos das micotoxinas são severos e podem produzir a morte, além de levar a perda de nutrientes, alterar as propriedades organolépticas e diminuir a vida média do produto no mercado. Por outro lado a presença de espécies toxicogênicas poderia indicar a contaminação com várias micotoxinas e, esta situação representa um risco potencial para a saúde dos animais. Baseado no exposto anteriormente, os objetivos deste trabalho foram caracterizar morfológicamente a microbiota, detectar a incidência natural de micotoxinas em ingredientes e alimentos balanceados para cães, isolar microrganismos com potencialidades toxicogênicas e estabelecer parâmetros para prevenir e/ou controlar as micotoxicoses em cães. Um total de 230 amostras (117 alimentos suspeitos de produzir intoxicação natural (AIN), 43 de alimentos comerciais (AC) de três qualidades diferentes, 70 ingredientes da linha de produção (ALP) de ingredientes e rações destinadas à alimentação de cães) foram analisadas. O isolamento de fungos se realizou pelo método de disseminação em superfície. Os meios de cultivo utilizados foram Ágar Diclorán-Rosa de Bengala Cloramfenicol (DRBC), Ágar Diclorán Cloramfenicol 18% Glicerol (DG18) e Ágar Nash-Snyder. Se determinou a média do número de colônias por triplicata e se expressou como unidades formadoras de colônias por grama de alimento (UFC/g). Os AIN e alguns ALP (milho, milho moído, farinha de sorgo, farinha de milho e glúten) apresentaram contagens fúngicas superiores a  $10^4$  UFC/g. As amostras de AC não superaram este valor. Cada cepa foi isolada e identificada a nível de gênero. As espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* prevaleceram em todas as amostras analisadas, sendo as espécies aflatoxicogênicas, *A. flavus*/*A. parasiticus*, as de maior frequência. Estas cepas foram avaliadas em sua habilidade de produzir aflatoxinas. Dos 100% das cepas isoladas de AIN, 80% de AC e 70% de ALP, foram capazes de produzir aflatoxinas em níveis que variaram entre 2 e 66,25 ng/g. Se determinou a incidência natural de aflatoxinas em todas as amostras de alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência. Os AIN e algumas amostras de ingredientes de ALP, principalmente aquelas compostas por milho, apresentaram níveis de aflatoxinas superiores a 20 ppb. Os estudos histopatológicos e bioquímicos dos órgãos dos animais

afetados evidenciaram a causa morte (aflatoxicose), assim como também os estudos micotoxicológicos realizados: a carga fúngica e os níveis de aflatoxinas encontrados, foram superiores aos permitidos pelas regulamentações nacionais e internacionais em vigência. Os alimentos comerciais pertencentes a distintas qualidades são alimentos aptos para o consumo mas, potencialmente perigosos em condições de armazenamento inadequado devido à capacidade aflatoxicogênica das cepas estudadas. Quanto aos ingredientes e alimentos terminados da linha de produção, aqueles compostos por milho não cumpriram com os valores de fungos e aflatoxinas permitidos pela legislação. Embora a ração terminada se ajuste ao requerido pela regulamentação, provavelmente pelo processamento recebido, apresenta um risco potencial já que mais de 80% das espécies de *A. flavus* foram capazes de produzir aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. É importante então destacar a necessidade de realizar um controle adequado dos ingredientes utilizados na elaboração de alimentos compostos, como também as condições ambientais onde se armazenam as rações destinadas aos cães, para preservá-los da indesejada contaminação fúngica e a conseqüente produção de micotoxinas.

**Palavras-chave:** Fungo, micotoxina, ração.

## ABSTRACT

CAMPOS, Sergio Gaspar de. **Aflatoxins survey, toxicogenic fungi and contamination level in raw material of balanced feedstuff. Natural aflatoxicoses in dogs of Rio de Janeiro State.** Seropédica: UFRRJ, 2007. 78p. (Thesis, Doctor in Veterinary Science, Health Animal).

The commercial feed constitutes an important element in the pet industry in Brazil. Its composition includes cereal mixtures produced in farms such as sorghum, maize and some oily seeds. All feed destined to pets are supplemented with fats, vitamins, minerals, antirust and flours of diverse origins incorporated in some cases as pellets. When conditions of nutrients and moisture are adequate, fungal contamination could be present during pre and post harvest, storage, manufacture and processing of these ingredients. The filamentous stored grain fungi more commonly found include the species belonging to *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* genera. They are able to produce different mycotoxins. Species of *Aspergillus* such as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomius* are able to produce aflatoxins, considered as carcinogen type 1A. The pet foods have important amounts of cereals and therefore, they can concentrate important amounts of toxins. In dogs and cats the effects of mycotoxins are severe and can produce death, besides the loss of nutrients, to alter the organoleptic properties and to diminish the average life of the product in the market. On the other hand, the presence of toxicogenic species could indicate the contamination with several mycotoxins and this situation represents a potential risk for the animal health. On the basis of these antecedents the objectives of this work were 1) to characterize the mycoflora, 2) to detect the natural incidence of mycotoxins from raw materials and compound feed for dogs and 3) to establish parameters to prevent and/or to control micotoxicoses. A total of 230 samples (117 suspected foods to produce natural poisoning (AIN), 43 commercial foods (AC) of 3 different qualities, 70 ingredients of the production line (ALP)) of ingredients and rations destined to the feeding of dogs were analyzed. The fungal isolation was made by the surface spread method. The culture media were dicloran-rose-bengal-chloranphenicol agar (DRBC), dicloran-chloranphenicol 18% glicerol agar (DG18) and Nash-Snyder agar. The average of the number of colonies by triplicate was determined and it was expressed as colony forming units/gram of feed (UFC/g). AIN and some ALP (maize, ground maize, flour of sorghum, maize flour and gluten) obtained fungal counts over than  $10^4$  UFC/g. The AC samples were not over this value. Each strain was isolated and identified at the species level. The species belonging to the *Aspergillus* genera were predominant in all of the analyzed samples, having aflatoxicogenic species *A. flavus*/*A. parasiticus* those of greater frequency. These strains were evaluated in their ability to produce aflatoxins by the TLC method. The 100% of isolated strains of AIN, 80% of AC and 70% of ALP were able to produce aflatoxins at levels that varied from 2 and 66.25 ng/g. The natural incidence of aflatoxins in all feed samples was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). AIN and some samples of ALP ingredients, mainly those containing maize, obtained aflatoxins levels over than 20 ppb. The hystopatological and biochemical studies of the affected animals organs demonstrated the death cause (aflatoxicosis), and were confirmed by the mycological studies: the fungal counts and aflatoxins levels were over the allowed ones by national and international regulations in use. The commercial feed of different qualities are feeds in conditions to be consumed, but have a potential risk if they are in inadequate storage conditions due to the

aflatoxicogenic ability of the studied strains. As far as the ingredients and finished feed of the production line, those made up of maize did not fulfill the values of fungi and aflatoxins allowed by the legislation. Although the finished ration adjusts to the required regulation, probably by the processing, it presents a potential risk since more of 80% of the species of *A. flavus*, were able to produce aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. It is important then to emphasize the need to a suitable control of the used ingredients in the compound feed elaboration and the adequate environmental conditions to preserve the pet food of undesired fungal contamination and the consequent production of their mycotoxinas.

**Key words :** Fungy, mycotoxin, pet food.

# 1 INTRODUÇÃO

A micologia de alimentos, como parte da microbiologia, foi por muito tempo negligenciada em função da pouca importância dada aos fungos contaminantes. Este grupo de microrganismos era visto apenas pelo aspecto estético e de deterioração. Como agentes infecciosos, produzindo micoses superficiais e, muitas vezes, micoses profundas de caráter deformante, os fungos patogênicos sempre tiveram sua importância reconhecida. Mais recentemente, alguns fungos considerados saprófitas de vida livre, foram comprometidos como causa morte por infecções micóticas oportunistas, em muitos casos, na síndrome de imunodeficiência adquirida.

Entretanto, a partir do momento em que se descobriu a importância que revestia a ação potencial tóxica destes microrganismos como contaminantes de alimentos constituintes da dieta básica dos animais e do homem, causando de perdas substanciais a economia e riscos à saúde animal e humana, a micologia de alimentos deixou de ser um ponto apenas de interesse dos micologistas e tomou seu lugar na ciência e tecnologia de alimentos, na sanidade animal e na saúde coletiva.

Desde o tempo em que o homem primitivo começou a cultivar vegetais e a estocar alimentos, a contaminação fúngica tem demandado sua atenção. Os fungos têm lentamente invadido, acidificando, fermentando, descolorindo e deteriorando os alimentos e, assim, transformando nutritivos produtos agrícolas em produtos tóxicos e insalubres. Os produtos fúngicos têm ampliado cada vez mais sua importância no cenário mundial, com suas propriedades antibióticas, anabolizantes, estrogênicas, carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, etc., ao ponto das micotoxinas serem consideradas como "poluentes ambientais". Estas substâncias têm sido consideradas como um dos principais fatores de risco, seja pela sua ingestão, pelo contato direto ou pela inalação junto a partículas vegetais ou poeira. Espécies fúngicas até então consideradas inócuas e saprófitas de vida livre têm sido, na atualidade, identificadas como toxígenas.

Quantificar e qualificar o crescimento de fungos filamentosos é muito difícil quando se compara com a aplicação da técnica para bactérias e leveduras. Essas dificuldades residem, principalmente, nas características morfológicas desses microrganismos, pois suas hifas não se destacam facilmente do substrato, além de serem formadas por vários segmentos que podem transformar-se em colônias isoladas. Outro fator importante está relacionado ao grande número de conídios que podem ser produzidos (conidiogênese), pois estas estruturas podem aumentar o número de células viáveis sem um aumento correspondente de biomassa.

Em geral, tem sido demonstrado que os propágulos fúngicos constituem um indicador da condição higiênica sanitária das rações, sendo que as contagens não devem exceder os valores de  $1 \times 10^4$  ufc  $g^{-1}$ . A legislação brasileira atual, seja por parte da área da Agricultura ou da Saúde, não enquadraram a contaminação fúngica em nenhum limite máximo tolerado, e consideram os fungos como simples agentes de deterioração. Entretanto, entende-se, com a ótica da modernidade e pautados na luz do conhecimento, que deva ser considerado dois pontos fundamentais: a quantidade de propágulos fúngicos em um produto vegetal ou ração (carga fúngica em ufc  $g^{-1}$ ) e a concentração de micotoxinas nestes produtos. Embora, a grande maioria das micotoxinas sejam produtos extracelulares, as estruturas fúngicas as contêm em sua superfície e, principalmente, em concentrações mais elevadas no citoplasma celular de hifas conídios e esporos.

Hoje, considera-se que um dos aspectos mais importantes foi a mudança que a comunidade científica deu ao conceito de micotoxicose. O que a tem preocupado não é a contaminação por altos níveis de micotoxinas de ocorrência rara e esporádica, mas a ocorrência destes produtos tóxicos em pequenas quantidades em produtos vegetais básicos e subprodutos industrializados. A ingestão diária e constante de pequenas quantidades destes compostos através de alimentos básicos, sem dúvida, possui papel importante na indução ou modulação de patologias nos animais e no homem. As subdoses de micotoxinas têm sido consideradas imunossupressoras, teratogênicas e carcinogênicas, modulando e modificando mecanismos bioquímicos, alterando e inativando enzimas e a biossíntese de macromoléculas importantes no equilíbrio fisiológico do organismo animal.

Ao considerar a microbiota contaminante, geralmente não se refere apenas a uma espécie fúngica. Esta contaminação geralmente é plural, estando algumas espécies, concorrendo e coexistindo, no mesmo substrato. A diversidade metabólica destes microrganismos obriga a se considerar as mesclas de micotoxinas, de seus potenciais efeitos sinérgicos e aditivos. Deve-se considerar ainda, a possível interação destes compostos com outras substâncias, medicamentos e resíduos concorrentes no organismo humano e animal, de efeitos imprevisíveis.

Assim, a ingestão de alimentos com uma carga fúngica baixa ( $<10^5$  ufc  $g^{-1}$ ), dependendo da capacidade toxicófora deste microrganismo contaminante, pode ser nociva à saúde. Há fungos que são excelentes produtores de toxinas e podem produzi-las em grandes concentrações. A ingestão de massa fúngica é, desde há muito tempo, considerada como um risco de exposição e, esta preocupação tem sido a cada dia mais evidente.

Pesquisas conduzidas com grãos, matérias-primas e alimentos terminados para animais, têm indicado que todas as regiões do mundo estão sujeitas a surtos de micotoxicoses. Em regra, em qualquer lugar onde se encontrem grãos e alimentos também é possível verificar a contaminação por fungos e, conseqüentemente com micotoxinas. Por suas características continentais, o Brasil dispõe de uma grande variação climática, sendo fácil prever a ocorrência de altos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas. Os fatores extrínsecos e intrínsecos predisponentes para o complexo substrato/fungo/ambiente/micotoxina são exuberantes. Alia-se, principalmente a este aspecto, a falta de capacidade e condições adequadas para o armazenamento das safras de grãos. Apesar de nosso país ser uma região de alto risco por dispor de todas as condições favoráveis à proliferação dos fungos, não se possui um diagnóstico epidemiológico adequado sobre a extensão e importância deste problema.

Há poucos relatos sobre a microbiota contaminante de rações destinadas à alimentação de cães, bem como, poucos relatos na literatura científica sobre a contaminação destes alimentos com micotoxinas, principalmente com aflatoxinas. Por outro lado, são frequentes os relatos de episódios de intoxicação natural de cães por aflatoxinas em todo o mundo.

O objetivo deste trabalho foi o de estudar a microbiota toxígena contaminante de rações obtidas do comércio e da indústria, destinadas a alimentação de cães no estado do Rio de Janeiro conforme a seguir:

## **1.1 Hipóteses e objetivos**

### **1.1.1 Hipóteses**

- Diferentes fungos toxigênicos contaminam as matérias primas destinadas à produção de alimentos balanceados para cães.

- As micotoxinas de maior incidência e toxidez em insumos utilizados em rações para cães são as aflatoxinas, principalmente a aflatoxina B<sub>1</sub>.

### **1.1.2 Objetivos gerais**

- Caracterizar morfológicamente a micobiota e detectar a incidência natural de micotoxinas em ingredientes e alimentos balanceados para cães. Isolar microorganismos com potencialidades toxicógenas e estabelecer parâmetros para prevenir e/ou controlar as micotoxicoses em cães.

### **1.1.3 Objetivos específicos**

- Estudo da incidência de fungos e micotoxinas.
- Realizar uma amostragem representativa, ao acaso, no comércio do Rio de Janeiro e em uma indústria durante o processamento de alimento balanceado para cães.
- Realizar amostragem dos ingredientes e do alimento terminado, nas diferentes etapas de produção em uma planta industrial de alimento balanceado para cães.
- Isolar e identificar a micobiota geral e toxigênica.
- Detectar a incidência natural de aflatoxinas em alimentos balanceados para cães.
- Determinar o perfil toxigênico das espécies isoladas.
- Analisar estatisticamente os resultados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Alimentos balanceados

#### 2.1.1 Generalidades

Grande parte das rações animais, comumente consideradas como alimentos balanceados, formula-se atualmente à base de cereais e, incluem todos os nutrientes necessários para uma alimentação considerada adequada. No alimento balanceado que é consumido por cães, os cereais constituem-se na matéria prima principal. Entretanto, estes ingredientes constituem-se em um substrato ótimo para o crescimento de fungos (GONZÁLEZ *et al.*, 1998).

As rações são elaboradas em forma de farinhas e vários tipos de pellets. Naquelas sob a forma de farinhas, muitos dos ingredientes como os cereais devem ser triturados perfeitamente antes de agregar-se à ração, de modo que cada porção de alimento contenha os requerimentos mínimos necessários, para garantir um bom crescimento (MURRAY *et al.*, 1997).

No caso dos pellets, a mistura alimentícia deve comprimir-se com um equipamento especializado para formar partículas de pequeno tamanho. Este processo se realiza com máquinas que trituram o alimento, ao que se junta calor e vapor, através de orifícios de diâmetro específico em recipientes metálicos (MAYNARD *et al.*, 1984).

Com a finalidade de incrementar a dureza dos pellets, agregam-se com frequência certos aglutinantes à mistura de alimentos. Entre os quatro aglutinantes mais importantes se encontram a bentonita de sódio, produtos celulósicos, derivados da lignina e sub-produtos da indústria cerealista (amido, dextrinas e farelos). Estes produtos se adicionam em baixas proporções (2,5%) dependendo da formulação do alimento. Quando os pellets passam por uma trituradora especial, resulta um tipo intermediário entre farinhas e pellets. Devido ao seu tamanho pode administrar-se a animais jovens, geralmente se utilizam como alimento indicador desde o primeiro dia de vida (MURRAY *et al.*, 1997).

Há determinados componentes que são básicos. Para o aporte de cada um deles podem utilizar-se alimentos diferentes, sempre que satisfaçam aos requerimentos nutritivos. Uma ração constituída aproximadamente por 40 nutrientes dietéticos, grande parte dos insumos devem conter de 20 a 25 ingredientes para prover as necessidades mínimas do animal.

#### a. Componentes básicos da dieta

Segundo NORTH & BELL (1993), entre os componentes básicos de uma ração, se encontram os seguintes:

- carboidratos: incluem grãos de cereais entre outros ingredientes e constituem a maior parte da ração. Normalmente essa fonte é suprida por milho ou misturas de milho e sorgo, milho e aveia ou sorgo e cevada, geralmente baseada na disposição do produto no mercado e nos preços dos mesmos. O milho é uma das fontes mais ricas de energia dos alimentos, bastante usada nos alimentos avícolas, principalmente por sua alta digestibilidade. Na indústria avícola há demanda de grãos de uma maior qualidade duros e coloridos, os que se caracterizam por sua dureza e alta produção de

pigmentos carotenóides são chamados de xantofilas, que originam a cor amarela dos depósitos de gordura nos frangos e na gema do ovo;

- gorduras: geralmente juntam-se gorduras e óleos complementares para elaborar dietas ricas em energia, além de reduzir o pó das misturas e melhorar o sabor. Podem-se utilizar gorduras animais e vegetais hidrolisadas;
- subprodutos dos moinhos: adicionam-se aqueles resultantes da moagem do trigo, arroz e milho, entre outros;
- material de folhas verdes: as farinhas de alfafa dessecada, gramíneas verdes e outras plantas, são adicionadas principalmente em rações para aves como fonte de caroteno, xantofila e fatores de crescimento desconhecidos;
- proteína animal: incluem as farinhas de carne, fígado, ossos, subprodutos avícolas, pescados, subprodutos lácteos, etc.;
- proteína vegetal: com exceção dos cereais de grãos, os suplementos de proteínas de origem vegetal compreendem o componente maior, da maioria das rações. As pastas de óleo de soja, são as mais utilizadas por sua grande disponibilidade e valor nutricional alto. As pastas de sementes de algodão, girassol, amendoim, etc., em seu estado cru, não podem utilizar-se satisfatoriamente, devendo submeter-se a calor ou outro tratamento que elimine certas substâncias tóxicas e aumente o valor nutricional;
- complemento de aminoácidos: grande quantidade de misturas de alimentos naturais são deficientes em um ou mais aminoácidos, pelo qual deve fazer-se um complemento de aminoácidos faltantes em forma pura. As rações devem assegurar o aporte de cinco aminoácidos críticos: metionina, cisteína, lisina, triptofano e arginina;
- macro-nutrientes: estes são fontes de cálcio, fósforo, sais (NaCl e KCl), magnésio e enxofre. Os minerais constituem uma parte importante dos requerimentos dos animais. Se bem que há suplementos que possuem cálcio, tais como as farinhas de carne, peixe ou ossos, as quantidades presentes são baixas, devido a isso, se necessita complementar as rações com macro-nutrientes em forma inorgânica;
- oligoelementos: o magnésio, ferro, zinco, cobre e outros, incluem-se nesta lista;
- complemento de antibióticos: certas rações, como as utilizadas para frangos de corte, incluem baixas concentrações de um antibiótico como estimulador do crescimento. Sua ação é indireta e altera o ambiente dos microrganismos no intestino, incrementando a atividade de certos constituintes do alimento;
- vitaminas: estas se adicionam como concentrados complementares;
- antioxidantes: para evitar o ranço, destruição das gorduras e das vitaminas lipossolúveis A, D e E, se adicionam antioxidantes a muitas misturas de alimentos, em especial se esses devem ficar armazenados;
- medicamentos e fármacos: como complementos se agregam agentes coccidiostáticos e outros fármacos às rações de aves de iniciação, engorda e crescimento;
- outros: estes incluem fontes complementares de xantofilas, hormônios, enzimas, pellets, saborizantes, etc., sendo usado sob certas condições.

## **b. O ecossistema dos grãos armazenados**

Os grãos de cereais, frutos oleaginosos e seus produtos derivados, são à base da alimentação humana e animal. O armazenamento desses produtos constitui uma complexa fase intermediária entre o produtor, processador e consumidor, permitindo equilibrar as flutuações anuais entre dois fatores, a oferta e a demanda dos grãos, no mercado interno e externo. O manejo correto da matéria prima armazenada com perdas mínimas na qualidade nutricional, é o principal objetivo desta prática, isso depende das condições políticas e sócio-econômicas dentro e fora do país produtor de grãos (FLEURAT-LESSARD, 2002).

O manejo inapropriado dos cultivos à colheita causa perdas na quantidade e qualidade; as perdas pós-colheita oscilam entre 9% nos Estados Unidos e 50% em alguns países em desenvolvimento (PIMENTEL, 1991). Muitas das perdas são conseqüências da invasão dos grãos por microrganismos, artrópodes e certos vertebrados.

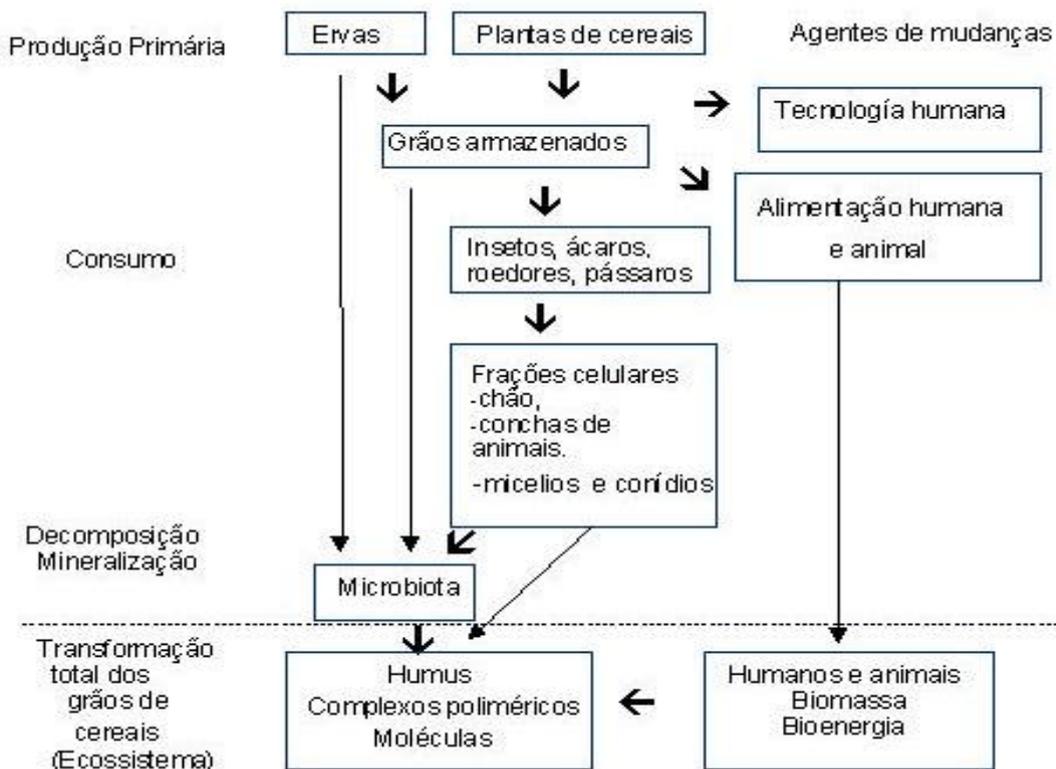
Na atualidade, o mundo se divide em dois grandes grupos: países desenvolvidos com excesso de produção de grãos, tais como a Austrália, Canadá, a Comunidade Européia e os Estados Unidos e, países em desenvolvimento com necessidades alimentícias variáveis, como os países da Ásia, África e América do Sul. Ironicamente estes países são os que possuem climas tropicais ou subtropicais, que favorecem o ataque dos grãos por diferentes organismos que atuam na decomposição. O manejo dos grãos armazenados requer o conhecimento de diferentes aspectos políticos, sócio-econômicos e meteorológicos, assim como daqueles relacionados ao sistema físico do armazenamento e dos organismos depredadores mais comuns. O potencial destrutivo depende do ambiente no qual vivem e se multiplicam e, de seu mecanismo fisiológico para interagir com outras variáveis bióticas e abióticas (SINHA *et al.*, 1986).

Os grãos de cereais podem ser armazenados em recipientes tão simples como bolsas, ou em “containers” mais sofisticados como silos, constituindo assim o ecossistema desses produtos. Em nosso país, esse dois tipos de armazenamento são utilizados desde o pequeno produtor, até o manipulador final dos grãos. O manejo desse se realiza com objetivos específicos segundo a escala de produção e comercialização considerada e, implica em três ecossistemas complexos:

- ecossistema do grão a campo: tende a aumentar a produção dos produtos de alta qualidade;
- ecossistema do grão armazenado: seu objetivo é preservar a matéria prima colhida do ataque de organismos predadores, com perdas mínimas na qualidade e quantidade;
- ecossistema dos animais de granja: com a finalidade de transformar os cereais em fontes de alimento para os homens e animais.

Nos países desenvolvidos, para a manutenção equilibrada do ecossistema dos grãos armazenados, se aplicam tecnologias que controlam continuamente os fatores ambientais (temperatura, umidade, aeração). Utilizam-se práticas de manejo dos produtos que 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. Ademais, possuem regulamentações políticas, econômicas e de mercado que asseguram a localização final do produto (DUNKEL, 1992).

Nos países em desenvolvimento, os fatores ambientais apresentam importantes inconvenientes devido à deficiência nos sistemas de conservação, que permitem um nível alto de atividade biológica, com conseqüentes perdas na qualidade e na quantidade dos grãos. Nesses países, a produção está regulada principalmente pela demanda local de grãos, como matéria prima na elaboração de alimentos de consumo humano e animal. Existem organismos que contribuem para a deterioração dos grãos, tais como, roedores, pássaros, besouros, ácaros, fungos filamentosos, leveduras, entre outros (Figura 1).

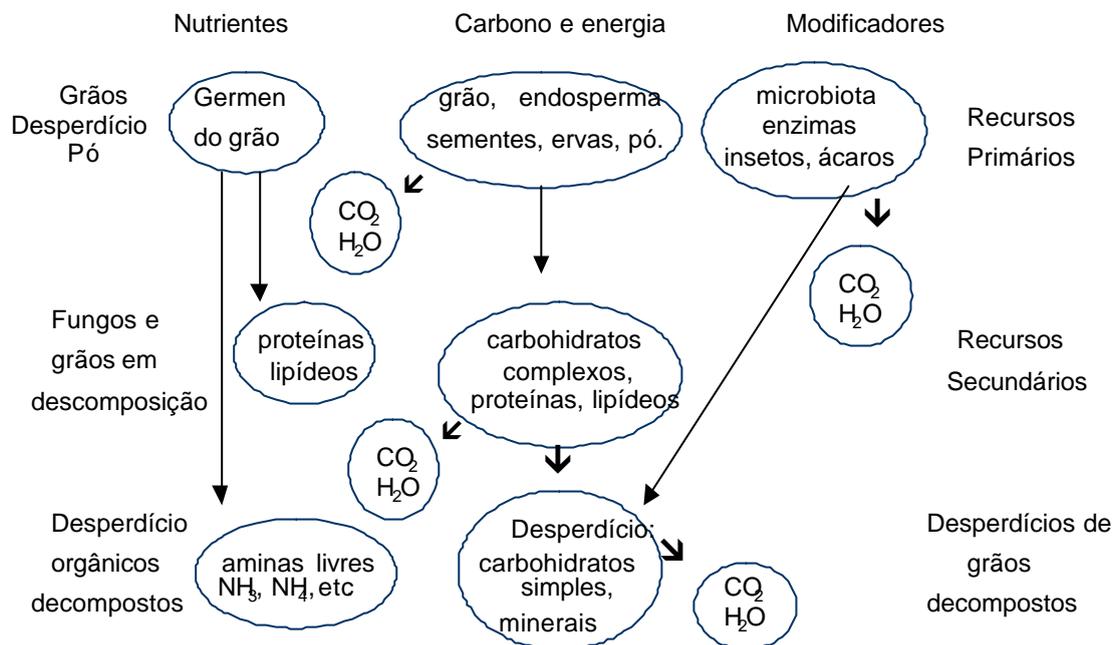


**Figura 1** Decomposição dos grãos de cereais e agentes de mudança (MITTCHELL, 1984), em um ecossistema de grãos armazenados.

Isto se soma às condições climáticas tropicais e subtropicais que favorecem a multiplicação de insetos cosmopolitas e, espécies fúngicas, diferente dos países desenvolvidos, donde o clima é temperado e estes organismos não são tão ubíquos. Os insetos, ácaros e fungos rompem a superfície dos grãos e favorecem a disseminação da microbiota presente na superfície dos grãos. Os principais microrganismos que decompõem pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e à bactéria *Erwinia* (MITTCHELL, 1984).

A maioria dos cereais tem uma relação carbono/nitrogênio dentro da faixa ótima de atividade microbiana, esta microbiota pode levar a decomposição dos grãos se as condições de temperatura e umidade forem adequadas. O processo de transformação e decomposição do grão consiste em uma transformação gradual da matéria orgânica do germe do grão, os carboidratos do endosperma e demais materiais associados, em CO<sub>2</sub>, ácidos graxos livres e numerosos compostos orgânicos e inorgânicos. Este processo transforma o grão em um produto nutricionalmente mais pobre, o qual não se destina ao

consumo humano, ficando para elaboração de alimentos para animais (ABRAMSON, 1991) (Figura 2).



**Figura 2.** Paços na decomposição de materiais primários que conduzem a deteriora do grão.

O manejo do ecossistema dos grãos armazenados nos países em desenvolvimento é consideravelmente mais difícil que nos países desenvolvidos (LINDBLAD & DRUBEN, 1980), devido a:

- uso de uma grande variedade de estruturas de armazenamento;
- presença de condições climáticas que favorecem o crescimento e a multiplicação de insetos, roedores e fungos;
- deficiente situação econômica do produtor;
- falta de conhecimento das práticas adequadas de armazenamento.

LINDBLAD & DRUBEN (1980) e DUNKEL *et al.* (1986) têm estabelecido estratégias simples para o armazenamento satisfatório de grãos de cereais:

- utilização de depósitos protegidos da chuva, da luz direta do sol e dos roedores;
- limpeza dos depósitos, removendo todo o resto de cereal da colheita anterior, insetos, roedores e material estranho, antes de colocar novo cereal;
- secar os grãos provenientes do campo, até um nível de umidade de 12-13%, antes do início do armazenamento;
- proteger os grãos da infestação por insetos, uso de inseticidas (químicos, biológicos, etc.) e depósitos herméticos;
- avaliar regularmente a infestação e determinar as condições desfavoráveis para corrigir o problema rapidamente.

SCUDAMORE *et al.* (1997) informaram que os alimentos balanceados para cães estavam mais contaminados que as matérias primas utilizadas em sua elaboração, e que a principal fonte de fungos e micotoxinas foi o milho e seus derivados.

## 2.2 Fungos toxigênicos e micotoxinas

### 2.2.1 Generalidades

A estrutura dos fungos filamentosos tem evoluído de modo a utilizar mais eficientemente formas de substratos sólidos, crescendo sobre sua superfície e penetrando nas matrizes sólidas. Estes organismos são capazes de secretar enzimas que desdobram macromoléculas complexas em compostos menores, para logo utilizá-los em seu crescimento e metabolismo. Os fungos podem absorver nutrientes de baixo peso molecular, e muitos deles podem também produzir e secretar compostos de baixo peso molecular, embora nem sempre associados ao processo de crescimento e metabolismo primário. Este tem sido definido como uma soma de reações químicas que provêm ao organismo de energia, produtos intermediários e macromoléculas chaves, tais como, proteínas e DNA, sendo estas reações metabólicas, basicamente as mesmas em todos os organismos vivos, embora que, o metabolismo secundário envolva processos biossintéticos cujos produtos finais, denominados metabólitos secundários, não sejam essenciais para o organismo produtor e estão restritos a espécies particulares. Em condições laboratoriais, em cultivos contínuos, esses compostos são produzidos durante a fase estacionária de crescimento e sua formação está associada a formas de diferenciação morfológica (MOSS, 1996).

Existe um contínuo debate entre os pesquisadores sobre a natureza do metabolismo secundário e o rol que esses compostos têm na biologia dos organismos que os produzem, mas muitos deles têm atividade biológica e podem ser tóxicos para microrganismos (antibióticos), plantas (fitotoxinas) ou animais (micotoxinas) (VINING, 1992).

As micotoxinas são compostos orgânicos, biologicamente ativos, que podem causar problemas de intoxicações agudas, subagudas ou crônicas, com efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos, entre outros (ROSA, 2002).

Os metabólitos secundários de origem fúngica possuem diversas estruturas químicas. Ademais, são sintetizados por diferentes vias a partir de um ou mais metabólitos provenientes do metabolismo primário. Na natureza há uma variação enorme no metabolismo secundário, que pode ser inter-genérica, inter-específica, e também, entre cepas de uma mesma espécie (CAMPBELL, 1984).

A produção de micotoxinas está restrita a um só grupo de espécies fúngicas, embora os fungos produtores possam pertencer a várias classes e ordens dentro do reino. Assim, encontramos fungos toxigênicos dentro da classe *Oomycetes*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes*, *Ascomycetes* e *Basidiomycetes* (SMITH & MOSS, 1985; ALEXOPOLUS *et al.*, 1996). Sem dúvida, as principais micotoxinas têm sido reconhecidas como produtos do metabolismo dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A maioria das espécies produtoras de micotoxinas são saprófitas; umas poucas são patogênicas facultativas de vegetais (KALE & BENNET, 1992; PITT, 2000).

Tem-se realizado tentativas para a classificação dos metabólitos secundários produzidos por fungos, tendo sido proposto uma classificação química (BETINA, 1989), em outros casos categorizado em base a sua origem biossintética, ou seja, metabólito primário a partir do qual se inicia a via biossintética (TURNER & ALDRIDGE, 1983; STEYN, 1998). Com relação a esse critério podemos classificar as micotoxinas em quatro grupos: a) policetídeos, b) terpenos, c) substâncias derivadas do ácido shikímico e d) metabolismo de aminoácidos (Tabela 1). 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.

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

Categoria biossintética		Micotoxinas representativas
Policetídeos	Di-	Moniliformina
	Tetra-	Patulina, ácido penicílico
	Penta-	Citrinina, ocratoxinas
	Hexa-	Maltorzina
	Repta-	Rugulosina, viomelleina, xantomegnina
	Octa-	Ergocromos, luteoskirina
	Nona-	Citrioviridina, fumonisinas, zearalenona
	Deca-	Aflatoxinas, ácido norsolorínico
Ácido tetrâmico		Ácido ciclopiazônico, ácido tenuazônico
Dicetopiperazinas	Simples	Ácido aspergílico, equinulinas
	Modificadas	Fumitremórgenos, roquefortina, verruculotoxina
Peptídeos		Ergotamina, fomopsinas
Terpenos	Mono-	Viridicatumtoxina
	Sesqui-	Tricotecenos
	Di-	Penitrem, alfatrem, janthitrem

### 2.3 Aspectos ecológicos do crescimento e da produção de micotoxinas por fungos no armazenamento

Os fatores que afetam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas incluem: 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. Dos parâmetros físicos que condicionam o desenvolvimento dos fungos nos cereais,  $a_w$  e a temperatura são os de maior importância. O primeiro mede a disponibilidade de água num alimento para o crescimento microbiano. A água disponível nos materiais higroscópicos, como o milho, também é indicada pela umidade relativa de equilíbrio (URE), a qual indica a umidade relativa da atmosfera inter-granular no equilíbrio com a quantidade de água no substrato. A maioria das espécies de armazenamento, incluindo as toxigênicas, tem uma  $A_a$  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). Estes organismos estão implicados nas perdas de matéria seca do grão, devido à utilização de reservas de carboidratos, proteínas e lipídios destruindo o poder de germinação, diminuindo o valor nutricional e a digestibilidade, com conseqüente produção de micotoxinas.

A colonização nos grãos em maturação começa pouco tempo depois do surgimento das espigas e, continua até o armazenamento; na colheita se produz uma mudança profunda nos fatores ecológicos, afetando a microbiota que provem do campo. As bactérias são os primeiros colonizadores, seguido pouco depois pelas leveduras e

fungos filamentosos. Os primeiros constituem a microbiota predominante antes da colheita, embora os fungos filamentosos o façam depois da colheita. Entre os fungos leveduriformes destacam-se: *Aureobasidium pullulans*; embora que os fungos filamentosos sejam referidos comumente como fungos de campo e, incluem os *Cladosporium sp.*; *Alternaria alternata*, *Verticillium lecanii*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, nas zonas de climas quentes se encontram também, espécies de *Curvularia*, *Phoma*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium oxalicum*, *Fusarium semitectum* e *Fusarium verticillioides*. Estes microrganismos requerem alta  $A_a$  ou umidade relativa para desenvolver e não são competitivos nos sistemas de armazenamento (LACEY & MAGAN, 1991; OMINSKI *et al.*, 1994).

No campo, o ambiente está controlado pelas flutuações diurnas e noturnas de luz e temperatura, embora no armazenamento dos grãos, o ambiente é estável e a  $a_w$  é o fator predominante. No momento da colheita se redistribui o inóculo proveniente do campo e se incorporam novas espécies. Os fungos do armazenamento, por exemplo *Penicillium sp.* são escassos antes da colheita, mas durante a mesma o inóculo se incrementa devido a contaminação com resíduos vegetais e terras provenientes do solo, apesar do número de espécies de *Eurotium* pareça não sofrer mudanças (FLANNIGAN, 1978).

Nos grãos colhidos, os fungos provenientes do campo são gradualmente sucedidos pelos fungos típicos do armazenamento (ABRAMSON *et al.*, 1990a,b). A presença de determinadas espécies, a dominância relativa de algumas e a produção dos metabólitos secundários variam de acordo com o estado de desenvolvimento do grão. Uma ampla variedade de fungos tem sido isolada dos grãos armazenados, sendo os mais característicos das espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, seguidos por *Mucor*, *Rhizopus* e *Wallemia*. Os gêneros extremamente xerófilos são *Eurotium*, *Aspergillus restrictus* e *Wallemia sebi*, os quais desenvolvem a uma  $A_a$  inferior a 0,70. Entre as espécies moderadamente xerofílicas estão *Aspergillus candidus* e *Aspergillus flavus* e as menos xerofílicas *Aspergillus fumigatus*, com ampla faixa de temperatura para o crescimento. Das espécies de *Penicillium*, as psicrotolerantes são *Penicillium aurantiogriseum* e *Penicillium verrucosum*, as mesófilas *Penicillium corylophilum* e *Penicillium rugulosum*, e as termófilas *Talaromyces termophilus*. Entre as espécies que requerem altas  $a_w$  para seu desenvolvimento se encontram *Fusarium sp.*, Mucorales e outros termófilos, tais como, *Rhizomucor pusillus* e *Malbranchea sp.* (LACEY *et al.*, 1980; HILL & LACEY, 1983). Em muitos casos as espécies de *Penicillium* não são identificadas ou recebem nomes diversos que resultam em sinônimos; isso deve-se à dificuldade em sua identificação e aos múltiplos sistemas utilizados para classificá-los (EL-BANNA *et al.*, 1987; FRISVAD & FILTENBORG, 1989; PITT & HOCKING, 1997).

Estas espécies diferem em seus requerimentos ecológicos, apresentam tolerância a baixas  $A_a$  e a altas temperaturas. São de ampla distribuição devido a que podem sobreviver a uma grande variedade de condições ambientais, tais como, as encontradas no armazenamento (JIMENEZ *et al.*, 1985).

Apresentam-se diferenças na microbiota dos grãos de cereais de acordo com as zonas geográficas e climas considerados. Sem dúvida, o padrão geral de colonização é semelhante para todos os grãos. Muitas das espécies encontradas em milho, sorgo, arroz e outros cereais em climas tropicais, são as mesmas isoladas em regiões temperadas; em geral se isola grande variedade de *Aspergillus*, embora sejam mais reduzidas as de *Penicillium* (PELHATE, 1988).

A variedade de espécies que se pode desenvolver sobre as matérias primas estão condicionadas principalmente pela  $A_a$ , pela temperatura e a composição gasosa da atmosfera inter-granular. Estes parâmetros determinam a taxa de crescimento destas espécies e sua habilidade para competir no ambiente. Para tanto, os grãos armazenados sob diferentes condições desenvolvem microbiotas características, que podem utilizar-se para indicar as condições nas quais um produto foi armazenado (Tabela 2). A temperatura dos grãos armazenados não está determinada pela temperatura ambiente, e sim pela respiração dos fungos, dos artrópodes e os próprios grãos. O aquecimento começa quando a  $A_a$  é de 0,85-0,90 e alcança um máximo a 65-70°C e 1,0 de  $A_a$ . A estes valores térmicos o crescimento microbiano começa a inibir-se. As reações  $A_a$ /temperatura são muito similares para as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, embora as espécies de *Penicillium* se vejam favorecidas pelas temperaturas mais baixas (OMINSKI *et al.*, 1994).

Durante os últimos 30 anos, se tem detectado e caracterizado numerosas micotoxinas produzidas pelos fungos que desenvolvem sobre grãos armazenados. Vários autores têm estudado a produção de micotoxinas sob condições de  $a_w$  e temperatura ótima, em meios de cultivo ou em cereais esterilizados em autoclave (Tabela 3). 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  $A_a$  (1,0 a 0,80), em comparação com a produção de micotoxinas (1,0 a 0,95) (NORTHOLT *et al.*, 1979). A temperatura tem notável influência sobre a  $A_a$ . Quando a temperatura é ótima, a  $A_a$  requerida para o crescimento pode ser baixa e, deve ser ótima nos extremos mínimos e máximos de temperatura (BULLERMAN *et al.*, 1984). 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).

A concentração de íons hidrogênio pode ser alterada nos grãos com alto conteúdo de umidade, pela incorporação de conservantes tais como: ácido propiônico e ácido láctico. Estas mudanças podem afetar os processos metabólicos, especialmente os relacionados com a esporulação e a morfogênese, modificando os limites de  $a_w$  nos quais ocorrem a germinação e o crescimento dos conídios fúngicos sobre a superfície dos grãos. Os fungos podem viver neste ambiente, em uma ampla faixa de pH desde 1,5 a 9,8 para *Aspergillus niger*, de 2,1 a 7,7 para *A. candidus*, e de 1,8 a 8,5 para *Eurotium repens*, com uma  $A_a$  próxima a 1,0.

O tipo de substrato é outro fator determinante na produção de micotoxinas, afetando tanto a qualidade como o tipo de metabólito tóxico produzido. MADHYASTHA *et al.* (1990), demonstraram que *P. verrucosum* produzia citrinina em milho e trigo, mas não se observou produção em frutos oleaginosos, embora que ocratoxina B fora produzida por *Aspergillus alutaceus* nesse substrato e não em cereais. A variabilidade na produção de toxinas em diferentes alimentos pode atribuir-se às características físicas e químicas do substrato. Os parâmetros físicos incluem disponibilidade de água, a qual determina a disponibilidade de oxigênio e ar residual no produto, a condutividade térmica, o que influi sobre a temperatura nos grãos. Entre as características químicas, destacam-se o conteúdo de proteínas, gorduras, aminoácidos e minerais.

**Tabela 2.** Efeitos da Atividade de água ( $A_a$ ) e do aquecimento espontâneo sobre a colonização de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, entre outros fungos, sobre grãos de cereais armazenados (LACEY & MAGAN, 1991).

$A_a$	Temperatura 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	ND		<i>P. brevicompactum</i>	
0,88	Ambiente	ND		<i>P. verrucosum</i>	
0,89	Ambiente	ND		<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>	
0,92	30	ND		<i>P. capsulatum</i>	
0,93	35	ND		<i>P. piceum</i>	
0,95	50	0-15	<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. rugulosum</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 sp.</i> <i>Thermomyces sp.</i>

*A.* = *Aspergillus*; *P.* = *Penicillium*; *Em.* = *Emericella*; *E.* = *Eurotium*; *T.* = *Talaromyces*.  
ND = não detectado.

**Tabela 3.** Atividade de água mínima para o crescimento e a produção de micotoxinas por alguns fungos toxicogênicos.

Espécies fúngicas	Micotoxinas	a <sub>w</sub> mínima	
		Crescimento	Produção de toxina
<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxina	0,78-0,84	0,82-0,87
<i>A. ochraceus</i> <i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. viridicatum</i>	Ocratoxina	0,77 0,82-0,85 0,80-0,81	0,85 0,87-0,90 0,83-0,86
<i>A. ochraceus</i> <i>P. cyclopium</i>	Ácido penicílico	0,85-0,88	0,97-0,99
<i>P. patulum</i> <i>P. expansum</i> <i>A. clavatus</i>	Patulina	0,81 0,82-0,84 -	0,95 0,99 0,99

Fonte: LACEY & MAGAN (1991).

A produção de micotoxinas é mais sensível do que o crescimento fúngico às concentrações de gases atmosféricos. Baixas concentrações de O<sub>2</sub> (< 0,1%) e/ou altas concentrações de CO<sub>2</sub>, previnem o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas na maioria dos casos (PASTER & BULLERMAN, 1988).

O dano mecânico causado durante a colheita ou por ação de insetos, rompe a cobertura da semente e facilita a penetração dos esporos fúngicos no grão.

#### 2.4 Micobiota toxígena em produtos vegetais e rações

Diversos trabalhos sobre a contaminação de alimentos e rações por fungos tóxicos foram publicados no Brasil nos últimos anos. *A. flavus* foi isolado em 86,6% de 90 amostras de milho provenientes de diversas regiões do país (ASEVEDO *et al.*, 1994). Estudos realizados em 130 amostras de milho recém-colhido e milho armazenado em São Paulo provenientes da colheita de 1991 demonstraram que *Fusarium sp.* foi o gênero fúngico dominante (84%), seguido de *Penicillium sp.* (55%) e *Aspergillus sp.* (41%) (POZZI *et al.*, 1995).

Outro estudo em 150 amostras de milhos recém-colhidos de várias regiões do Paraná demonstrou que a ocorrência natural de representantes dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foi de 98,7 a 100%, enquanto a ocorrência natural de espécies de *Aspergillus* foi de 2,7 a 27,7% nas regiões norte e centro-oeste do estado, respectivamente. As amostras provenientes do centro-sul do estado demonstraram a prevalência de espécies de *Fusarium sp.* (23,5 a 82,5% de espigas infectadas) e de *Penicillium sp.* (15 a 89% de espigas infectadas), segundo ONO *et al.* (1999).

ROSA (2002) estudou a micobiota toxígena de produtos vegetais e rações destinadas à alimentação de frangos de corte em quatro fábricas de ração do estado do Rio de Janeiro e observou que o gênero *Aspergillus sp.* foi prevalente (40,6%), seguido de *Penicillium sp.* (39,8%) e *Fusarium sp.* (14,7%), dentre outros.

MAIA & SIQUEIRA (2002) estudaram 100 amostras de ração para animais domésticos, sendo 45 para cães, 25 para gatos e 30 para pássaros. Estes autores detectaram aflatoxinas em 12% das amostras utilizando a metodologia de cromatografia em camada delgada de sílica. A concentração total de aflatoxinas foi de 15 a 374 ng/g, com média de 131 ng/g. Todas as amostras de ração que continham amendoim ou derivados foram positivas para aflatoxinas.

DALCERO *et al.* (1997, 1998) e MAGNOLI *et al.* (1998), pesquisaram a micobiota em rações para frangos de corte na Argentina durante o período de 1995 a 1997. As espécies de maior prevalência foram as pertencentes ao gênero *Penicillium sp.* em 98% das amostras, seguida de *Fusarium sp.* com 87% e *Aspergillus sp.* em 52%. Dentre as espécies do gênero *Aspergillus*, as mais freqüentemente isoladas foram: *A. flavus* (32%) e *Aspergillus parasiticus* (30%), *E. repens* (17%), *A. candidus* (15%), *Aspergillus tamarii* (11,5%), *Aspergillus terreus* (12%), *A. fumigatus* (9,5%), *A. niger* (5,5%), *Aspergillus parvulus* (1%) e *Aspergillus oryzae* (0,5%). MAGNOLI *et al.* (2002) estudaram a micobiota de 120 amostras de ingredientes de uma planta de produção em Córdoba (Argentina) onde detectaram a presença de espécies pertencentes a 15 gêneros fúngicos. Os gêneros predominantes foram *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.* em 67,5% das amostras, seguidos de espécies do gênero *Aspergillus sp.* em 57,5% das amostras analisadas. As contagens de ufc/g de ração para frangos esteve dentro da faixa compreendida entre  $2,0 \times 10^3$  a  $3,0 \times 10^5$  ufc/g de amostra. Estes autores ressaltaram que o valor limite que estabelece a qualidade higiênica de uma ração é considerado como o de  $1 \times 10^4$  ufc/g pelo Good Manufacture Practice (GMP, 2005).

OGUNDERO (1981) considerou em seus estudos a importância da alta incidência e abundância de espécies de *A. flavus* e *Aspergillus clavatus* como contaminantes de ração para frangos de corte na Nigéria. Este autor, em outro estudo, demonstrou uma alta prevalência destas espécies de *Aspergillus* e posteriormente enfatizou a alta capacidade toxígena das isolados, bem como, o alto poder de deterioração daquelas sobre os nutrientes constituintes da ração (OGUNDERO, 1987).

BAUDURET (1990) encontrou grande contaminação por fungos filamentosos em amostras de ração para frangos de corte na Islândia, constituída por: *A. flavus* (95%), *Aspergillus glaucus* (91%), *A. candidus* (72%), *A. niger* (64%), *A. restrictus* (40%), *A. fumigatus* (36%), *A. terreus* (36%), *Aspergillus wentii* (22%), *Aspergillus versicolor* (21%) e *Aspergillus ochraceus* (9%).

Fungos aflatoxígenos isolados de ração para aves na Índia apresentaram uma alta incidência com níveis variando de 76% e 86% para *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente. Em outro estudo com fungos toxígenos em rações para frangos de corte, BENKERROUM & TANTAOU-ELARAKI (2001) no Marrocos, observaram a prevalência de fungos em amostras de ração inicial, milho, cevada, trigo, farinha de peixe, soja e girassol. Identificaram 196 isolados fúngicos distribuídos em 10 gêneros, isto é, *Penicillium sp.* (35,7%), *Aspergillus sp.* (20,4%) *Fusarium sp.* (10,2%), *Alternaria sp.* (6,1%), *Mucor sp.* (18,9%) e outros gêneros (8,7%). As seis espécies de *Aspergillus* detectadas foram *A. niger* (14/40), *A. flavus* (10/40), *A. candidus* (5/40), *A. ochraceus* (4/40), *A. versicolor* (4/40) e *Aspergillus ornatus* (3/40).

As principais espécies fúngicas produtoras de micotoxinas em cereais destinados ao consumo animal pertencem aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* (HUSSEIN & BRASSEL, 2001).

SCUDAMORE *et al.* (1997), tem informado que os alimentos balanceados para cães estavam mais contaminados que as matérias primas utilizadas em sua elaboração. Após examinarem 330 amostras de ingredientes para a elaboração de ração animal, SCUDAMORE *et al.* (1998) relataram que a aflatoxina B<sub>1</sub> é a micotoxina mais comumente detectada e que o glúten de milho foi o ingrediente que mais apresentou-se contaminado com os níveis mais elevados de AFB<sub>1</sub> (41 ng/g).

SCUDAMORE *et al.* (1997), HENKE *et al.* (2001) e MAIA & SIQUEIRA (2002), informaram que as aflatoxinas têm sido detectadas em alimentos comerciais na América do Norte e do Sul, devido à incorporação de milho e de oleaginosas como ingredientes significativos de elaboração. Os alimentos comerciais para cães e gatos geralmente têm baixos níveis de aflatoxinas, entretanto, os percentuais de amostras positivas variaram segundo a qualidade da amostra. Quase todas as amostras positivas continham menos de 20 µg de aflatoxina B<sub>1</sub>/kg.

SHARMA & MÄRQUEZ (2001) estudaram os níveis de contaminação por aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e P<sub>1</sub>) em 35 rações para cães no México, utilizando um método com extração por colunas de imunoafinidade e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Estes autores relatam que AFB<sub>1</sub> foi detectada em 79% das amostras em níveis médios de 5 ng/g; AFB<sub>2</sub> em 26% das amostras com nível médio de 0,07 ng/g; AFG<sub>1</sub> em níveis médios de 0,05 ng/g em 63%; AFG<sub>2</sub> em 21% (0,03 ng/g); AFM<sub>1</sub> (x = 2,0 ng/g) em 63% das amostras; AFM<sub>2</sub> em 89% das amostras de ração em níveis médios de 0,14 ng/g; AFP<sub>1</sub> em 58% das amostras em níveis médios de 1,16 ng/g; e, Aflatoxicol em 47% das amostras com média de 0,3 ng/g. Os níveis mais elevados de aflatoxina B<sub>1</sub> foram de 39,7 ng/g de ração.

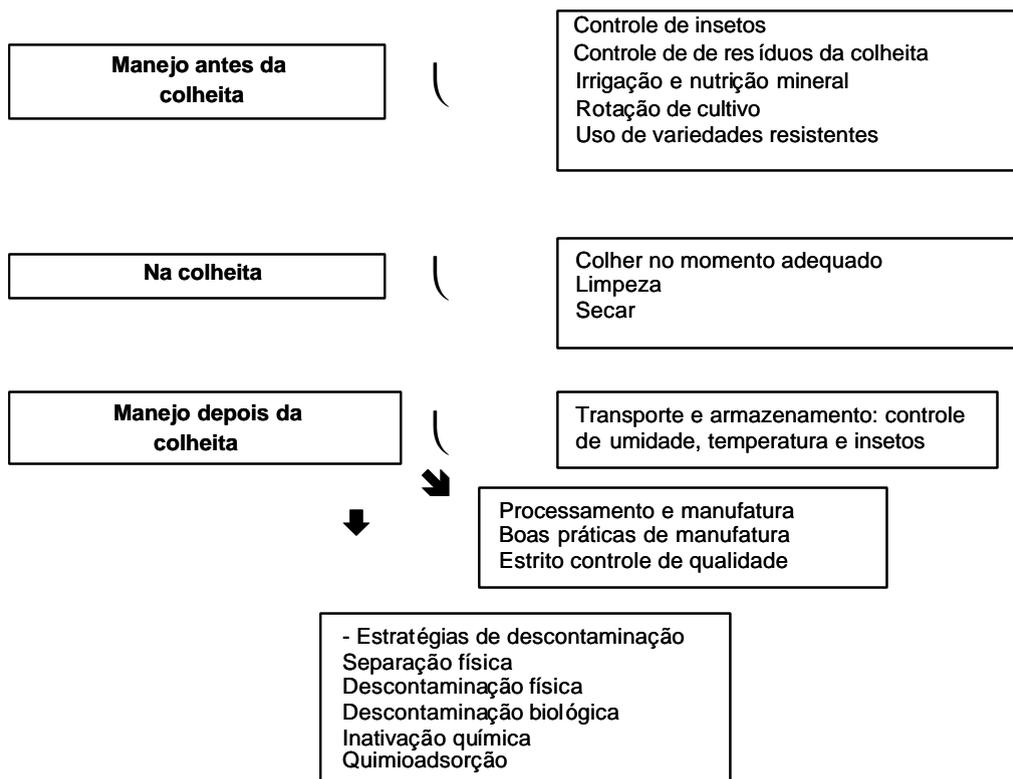
A contaminação com fungos toxicogênicos e micotoxinas nestes insumos foi avaliada em Portugal por MARTINS *et al.* (2003). Neste estudo se isolaram espécies toxicogênicas do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*, e se detectaram as micotoxinas fumonisinas (FBs), deoxinivalenol (DON) e ocratoxina A (OTA). Estes autores informaram que *A. flavus* foi prevalente em 14 a 16% de amostras em Portugal.

## 2.5 Regulamentações e legislação

O manejo de risco associado com a contaminação das micotoxinas, deveria envolver um sistema integrado. Os alimentos processados não são seguros se não se aplicam boas práticas de manufatura, prevenção e controle da qualidade em todos os pontos da produção (Figura 3). Cada um dos passos deste modelo deve adotar-se corretamente de acordo com a toxina específica.

Um programa adequado para assegurar um alimento livre de micotoxinas deve considerar os seguintes passos:

- estabelecer limites regulatórios;
- estabelecer programas de monitoramento;
- adotar um plano de amostragem adequado;
- controle na etapa do processamento;
- boas práticas de manufatura;
- controle de qualidade;
- descontaminação mediante tratamentos específicos;
- avaliação do produto final;
- aceitação do uso do produto tratado.



**Figura 3.** Manejo integrado no controle de micotoxinas (LÓPEZ-GARCÍA & PARK, 1998).

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. Atualmente, 90 países possuem regulamentação ou propostas sobre limites de micotoxinas em seus alimentos; 77 países têm algumas regulamentações, embora 13 não possuam nenhuma regulamentação vigente (FAO, 1997). Na maioria das normas vigentes estão referidas as aflatoxinas em diversos alimentos, principalmente aqueles destinados ao consumo humano (BOUTRIF & CANET, 1998; KOE, 1999). São poucos os países onde se estabelecem limites de micotoxinas no milho e alimentos à base de milho destinados ao consumo animal (Tabela 4). Menos frequentes são as regulamentações para patulina, ocratoxina A, fumonisina B<sub>1</sub>, deoxnivalenol, zearalenona e toxina T2. Obviamente, a necessidade de uma legislação que imponha limites para as toxinas fúngicas em alimentos é amplamente reconhecida pelos países industrializados do mundo.

No destino de um alimento não só é importante estabelecer limites regulatórios, bem como, adequar os planos de amostragem e as técnicas de análise. Em cada ponto de análise, desde a colheita até o consumo, devem aplicar-se planos de amostragem ao acaso adequados para cada produto (WOOD & TRUCKSESS, 1998). É importante ter em conta os chamados “hot spots” ou porções muito contaminadas do produto, se esses pontos não forem detectados, as toxinas podem ser redistribuídas no lote, resultando um alimento com elevadas concentrações dos metabólitos tóxicos. Quando se conhecem os níveis de micotoxinas em um alimento, se deve avaliar se este é apto para consumo humano ou animal, depois de aplicar algum tratamento, ou inadequado, e qualquer ponto da cadeia alimentícia.

**Tabela 4.** Níveis máximos de micotoxinas tolerados nos cereais e em alimentos à base de milho para consumo animal.

País	Produtos	Micotoxinas (µg/kg)
Argentina	Milho e subprodutos	AFB <sub>1</sub> : 5 AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 20
Bósnia	Milho, trigo, arroz e cereais	AFB <sub>1</sub> , AFG <sub>1</sub> : 1
Brasil	Milho	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 20 ZEA: 200
Bulgária	Cereais e subprodutos	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 2,5
China	Milho e óleo de milho	AFB <sub>1</sub> : 20
Costa Rica	Milho	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 35
Cuba	Cereais	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 5
Chipre	Cereais	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 10
Dinamarca	Cereais e subprodutos	Ocratoxina A: 5
República Dominicana	Milho e subprodutos	AFB <sub>1</sub> , AFG <sub>1</sub> : 0
	Milho importado	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 20
Egito	Cereais e subprodutos	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 10 AFB <sub>1</sub> : 5
	Milho	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 20 AFB <sub>1</sub> : 10
Finlândia	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 5
França	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> : 10
	Cereais	ZEA: 200 Ocratoxina A: 5
Alemanha	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> : 5 AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 4
Grécia	Milho	AFB <sub>1</sub> : 5 AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 10
Guatemala	Milho	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 20
Honduras	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 1
	Milho	AFB <sub>1</sub> : 1
Israel	Milho e subprodutos	AFB <sub>1</sub> : 5 AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 15
Itália	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> : 5 AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 10
Jamaica	Cereais	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 20
Jordânia	Cereais e milho	AFB <sub>1</sub> : 15 AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 30
Macedônia	Milho, trigo, arroz, cereais	AFB <sub>1</sub> , AFG <sub>1</sub> : 1
Nigéria	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> : 20
Países Baixos	Cereais e subprodutos	Todas as micotoxinas: 0
Rússia	Cereais	AFB <sub>1</sub> : 5 ZEA: 1000 Toxina T-2: 100 DON: 1000
Polónia	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> : 0
Romênia	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> : 0 - ZEA: 30 Patulina: 30 Ocratoxina A: 5
El Salvador	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 20
Servia	Milho, trigo, arroz, cereais	AFB <sub>1</sub> , AFG <sub>1</sub> : 1
África do Sul e Espanha	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> : 5 AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 10
Suécia	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 5
Suíça	Milho e cereais	AFB <sub>1</sub> : 2 AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 5 Ocratoxina A: 2
	Produtos à base de cereal	FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> : 1000
	Produtos à base de milho	
Taiwan	Cereais	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 50
Uruguai	Cereais e milho	Ocratoxina A: 50
	Milho e aveia	ZEA: 200
Estados Unidos	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> : 20
Zimbábue	Milho	AFB <sub>1</sub> : 5 AFG <sub>1</sub> : 4

Fonte: BOUTRIF & CANET (1998).

## 2.6 Impacto econômico e social das micotoxinas

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). A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, estima que a cada ano, 25% da produção agrícola, destinada a alimentos, é afetada pelas micotoxinas. Isso traduz-se 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 secado, detoxificação e capacidade de armazenamento; e, para os industriais: perdas do produto, custos de supervisão e análise de micotoxinas nos produtos (POSTUPOLSKI *et al.*, 1999; OSWEILER, 2000; HUSSEIN & BRASSEL, 2001).

Somente em alguns casos particulares é possível realizar uma análise direta das perdas econômicas produzidas pela presença das micotoxinas nos produtos agropecuários. Um exemplo disto foi a contaminação de milho por aflatoxinas nos Estados Unidos no ano de 1977, a qual representou uma perda ao redor de 111 milhões de dólares. Mas os custos são impossíveis de estimar quando as micotoxinas implicam em mortes humanas (SMITH & MOSS, 1985).

## 2.7 Gênero *Aspergillus*

### 2.7.1 Generalidades

As espécies do gênero *Aspergillus* são saprófitas e podem crescer sobre uma ampla faixa de substratos naturais (madeiras, têxteis, cimento, medicamentos, grãos de cereais e frutos de oleaginosas), dependendo das condições climáticas. Eles possuem grande versatilidade metabólica e habilidade para dispersar seus conídios no ambiente. Entretanto, muitas espécies são consideradas patógenas, alergênicas, toxicogênicas e decompositoras, outras são utilizadas na produção de alimentos fermentados. As espécies patogênicas representam risco real para a saúde, dado que podem produzir numerosas enfermidades tais como: aspergilose aviária e aborto micótico. Os conídios podem causar hipersensibilidade em pessoas sensibilizadas, como fibrose e pneumonia. Algumas são produtoras de micotoxinas e causadoras de importantes micotoxicoses em humanos e animais (PITT & HOCKING, 1997) (Tabela 5).

### 2.7.2 Classificação e identificação

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez por Antonio Micheli em 1729, quem aplicou o nome *Aspergillus* ao estado imperfeito do fungo (anamorfo) (MALLOCH & CAIN, 1972). RAPER & FENNEL (1965) propuseram os principais delineamentos para a classificação deste gênero; consideraram duas famílias: Eurotiaceae e Moniliaceae; dividindo o gênero em 18 grupos e 132 espécies com 18 variedades. Desde então, só se tem realizado revisões menores na taxonomia deste gênero. SAMSON & VAN REENEN-HOEKSTRA (1988) introduziram 42 taxas (taxones) adicionais e elaboraram uma revisão das espécies descritas desde 1945.

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

Espécies	Micotoxinas
<i>A. aculeatus</i>	Ácido secalônico B, D e F
<i>A. candidus</i>	Ácido kojico, candidulina, terfenilina, xantocina
<i>A. clavatus</i>	Citochalasin E, patulina, ascladiol, clavatul, triptoquivalinas
<i>A. carbonarius</i>	Rubrofusarin B
<i>A. carneus</i>	Citrinina
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> , aflatrem, ácido aspergílico, ácido ciclopiazônico, ácido kójico, aflavininas, ácido 3-nitropropiónico, paspalinas
<i>A. fumigatus</i>	Fumitremorginas A e C, gliotoxinas, fumigaclavinas, fumitoxinas, fumigatinas, fumagilinas, espinulosinas, triptoquivalinas, verruculogen
<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, ácido secalônico A, xantomegnina, viomeleina
<i>A. oryzae</i>	Ácido ciclopiazônico, ácido kójico, ácido 3-nitropropiónico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B e G, ácido aspergílico, ácido kójico, aflavininas
<i>A. tamarii</i>	Ácido ciclopiazônico, ácido kójico
<i>A. terreus</i>	Citrinina, patulina, citreoviridina, mevinolina, territrem, ácido terreico, terramide A
<i>A. ustus</i>	Austamida, austidiol, austinas, austocistina
<i>A. versicolor</i>	Sterigmatocistina, versicolorinas, nidulotoxinas
<i>A. wentii</i>	Metilxantonas, ácido 3-nitropropiónico, ácido kójico
<i>Eurotium amstelodami</i>	Equinulinas, auroglaucinas
<i>Eurotium chevalieri</i>	Equinulinas, auroglaucinas, xantocilina X
<i>Eurotium herbariorum</i>	Auroglaucinas, flavoglaucinas
<i>Eurotium repens</i>	Equinulinas, auroglaucinas, asperflavininas
<i>Eurotium rubrum</i>	Equinulinas, auroglaucinas, rubroglaucinas, gliotoxina

Fonte: FRISVAD & SAMSON (1991) e PITT & HOCKING (1997).

Recentemente se dividiu o gênero em seis subgêneros, cada um com uma ou mais seções, as quais correspondem os grupos anteriormente considerados por RAPER & FENNEL (1965), e se consideram mais de 200 espécies (GAMS & SAMSON, 1985; SAMSON, 1992; PITT & HOCKING, 1997) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Subgêneros, seções e teleomorfos de *Aspergillus*.

Subgênero	Seção	Sinônimo (grupo)	Espécies representativas	Teleomorfo
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>E. amstelodami</i> <i>E. chevalieri</i> <i>E. rubrum</i>	<i>Eurotium</i>
	<i>Restricti</i>	<i>A. restrictus</i>	<i>A. penicillioides</i> <i>A. restrictus</i>	Não conhecido
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigates</i>	<i>Neosartorya</i>
	<i>Cervini</i>	<i>A. cervinus</i>	<i>A. cervinus</i> <i>A. kanagawaensis</i>	Não conhecido
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	<i>A. ornatos</i>	<i>A. apicalis</i> <i>A. raperi</i>	<i>Scleroacleista</i> <i>Hemicarpeneteles</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i>	Não conhecido
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulellus</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Versicolores</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. caespitosus</i> <i>A. sydowii</i> <i>A. versicolor</i>	Não conhecido
	<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	<i>A. pumiceus</i> <i>A. ustus</i>	Não conhecido
	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	Não conhecido
	<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i>	<i>A. carneus</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Wentii</i>	<i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>	Não conhecido
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. carbonarius</i> <i>A. foetidus</i> <i>A. japonicus var. japonicus</i> <i>A. japonicus var. aculeatus</i> <i>A. niger var. niger</i> <i>A. niger var. Awamori</i>	Não conhecido
	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus-oryzae</i>	<i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. sojae</i> <i>A. tamarii</i>	Não conhecido
	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i> <i>A. auricomus</i> <i>A. ostianus</i> <i>A. sclerotiorum</i>	<i>Petromyces</i>
	<i>Candidi</i>	<i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i>	Não conhecido
	<i>Cremeri</i>	<i>A. cremeus</i>	<i>A. cremeo-flavus</i>	<i>Chaetosartorya</i>
	<i>Sparsi</i>	<i>A. sparsus</i>	<i>A. sparsus</i>	Não conhecido

Fonte: SAMSON (1992).

Todas as espécies deste gênero têm uma característica taxonômica em comum: a disposição de conídios em cabeças aspergulares e presença de célula pé na origem da estípede. Estas características estáveis, combinadas com outras primárias e secundárias constituem a base para a taxonomia clássica do gênero *Aspergillus*.

Os critérios diagnósticos utilizados para classificar as seções de *Aspergillus* se baseiam nas características macroscópicas e microscópicas das colônias desenvolvidas nos meios Ágar Extrato de Malte (MEA), Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA), Ágar Nitrato Glicerol 25% (G25N) e Ágar Czapek Extrato de Levedura Sacarose 20% (CY20S). As descrições macroscópicas se baseiam nos seguintes aspectos:

- diâmetro, textura e reverso das colônias;
- cor dos conídios e do micélio;
- produção de pigmentos;
- produção de esclerócios e/ou cleistotécios.

As características microscópicas são:

- forma, cor e tamanho da cabeça aspergilar;
- forma e tamanho da vesícula;
- longitude da estípede.
- presença de fiálide e/ou métula e disposição sobre a cabeça aspergilar;
- diâmetro, textura e tamanho dos conídios;
- forma e tamanho dos esclerócios, ascos e ascósporos, presença ou ausência de células de Hülle.

### 2.7.3 Seção *Flavi*: biologia e habitat

Para estabelecer os critérios taxonômicos na classificação desta seção, KLICH & PITT (1988) examinaram mais de 150 cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. tamaritii* e *Aspergillus nomius*. A ornamentação dos conídios resultou ser o critério morfológico mais efetivo para distinguir as duas primeiras espécies, os conídios de *A. flavus* são lisos a delicadamente rugosos, entretanto os de *A. parasiticus* são consistentemente rugosos. O perfil aflatoxigênico é outro critério para distinguir a espécie de *A. flavus* de *A. parasiticus* e *A. nomius*.

A espécie *A. flavus* está presente no solo e contamina uma ampla variedade de produtos agrícolas (amendoim, milho, sorgo, amêndoas, nozes, figos, pistache e sementes de algodão), no campo, no armazenamento, nas fábricas processadoras de alimentos e em sua distribuição. As espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, são produtoras de aflatoxinas, embora que *A. oryzae* e *A. tamaritii* não seja toxigênicas. As cepas de *A. flavus*, são produtoras de aflatoxinas do grupo B (AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>), embora que *A. parasiticus* e *A. nomius*, sejam produtores de aflatoxinas do grupo B e G (AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>). Nem todas as cepas são potencialmente toxicogênicas, ademais *A. parasiticus* é mais estável na produção destas toxinas que o *A. flavus*.

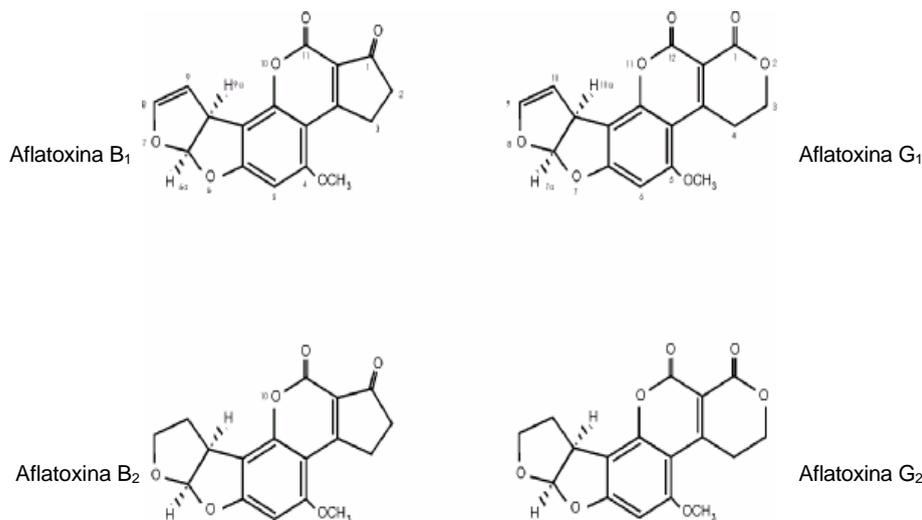
Com respeito ao seu habitat, *A. flavus*, é comum de regiões de clima temperado como contaminante de milho, sendo os esclerócios depositados no solo a principal fonte de contaminação deste cultivo. *A. parasiticus*, está adaptado a regiões de climas tropical e subtropical e, é um contaminante muito comum no solo e em amendoim (GOURAMA & BULLERMAN, 1995).

## 2.8 Aflatoxinas

### 2.8.1 Generalidades e importância

As aflatoxinas (AFs) são um grupo de toxinas estruturalmente relacionadas a outros metabólitos secundários produzidos por fungos. Estas toxinas foram descobertas no ano de 1960 depois de uma intoxicação aguda na Inglaterra, conhecida como enfermidade “x” dos perus. Nesta micotoxicose morreram milhares de perus e patos pequenos, depois de consumir farinha de amendoim proveniente do Brasil, contaminada com AFs (BLOUNT, 1961). Uma análise química realizada na farinha de milho mostrou a presença de uma série de compostos tóxicos que apresentavam fluorescência sob luz UV; estes compostos foram denominados aflatoxinas, já que se atribuiu sua síntese a espécie contaminante *A. flavus*.

São conhecidas quatro aflatoxinas principais: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. As do grupo B são bifurano cumarinas unidas a um anel de ciclopentanona, e as do grupo G são bifurano cumarinas unidas a uma lactona. Uma dupla ligação entre o C-8 e C-9 em forma de vinil éter, se encontra no anel furano terminal na AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> mas não na AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> (Figura 4). Esta pequena diferença estrutural se associa com grandes mudanças em sua atividade, dado que AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> são carcinogênicas e consideravelmente mais tóxicas que AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>. As aflatoxinas do grupo B fluorescem quando se expõem à luz ultravioleta de cor azul, e as do grupo G de cor verde. Os índices 1 e 2 designam o padrão de mobilidade cromatográfica (valor R<sub>f</sub>) destes compostos na Cromatografia em Camada Delgada (TLC).



**Figura 4.** Estruturas químicas das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

As aflatoxinas são compostos muito estáveis nos alimentos, altamente reativas a valores amplos de pH (pH < 3 e > 10) e quando se expõem a luz ultravioleta em presença de oxigênio. As reações que podem sofrer estas toxinas derivam da insaturação no anel furano e da estrutura lactona. São sensíveis aos agentes oxidantes, em particular aos alcalinos.

Tem-se caracterizado quimicamente moléculas derivadas das principais aflatoxinas, o hemiacetal AFB<sub>2a</sub> e AFG<sub>2a</sub>, derivados das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>, respectivamente. Em várias espécies animais que consomem alimentos contaminados com aflatoxinas, estas sofrem uma biotransformação em aflatoxina M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> (AFM<sub>1</sub> e AFM<sub>2</sub>) presentes no leite (GALTIER, 1998).

Também se tem isolado e caracterizado duas hidroxilas derivadas da AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, as aflatoxinas GM<sub>1</sub> e GM<sub>2</sub>, respectivamente. Tanto as aflatoxinas maiores (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) como as menores (AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFB<sub>2a</sub>, AFG<sub>2a</sub>, GM<sub>1</sub> e GM<sub>2</sub>) são de ocorrência natural.

### **2.8.2 Fatores que afetam a produção**

Apesar da produção das aflatoxinas ser em consequência da combinação de espécies fúngicas, substrato e ambiente, os fatores que afetam a produção são a temperatura, conteúdo de umidade do substrato e do ambiente, pH, luz, aeração e níveis de gases atmosféricos. A temperatura ótima para a produção depende do tipo de substrato considerado; em geral, sobre substratos naturais, fica entre 25 a 28°C, não se detectando toxinas abaixo de 8°C e acima de 42°C.

O período de incubação para obter a máxima quantidade de toxina depende da combinação cepa-substrato; se tem informado níveis máximos aos 15 dias a 20°C, aos 11 dias a 30°C e entre quatro e sete dias a 24°C.

O conteúdo de umidade do substrato e a umidade relativa do ambiente são parâmetros críticos na produção, sendo informado a máxima produção sobre grãos de milho com 25% de umidade a 25°C. A umidade relativa mínima para a produção varia entre 83 e 88%, aumentando em forma proporcional ao conteúdo de umidade até 99%.

Os grãos de cereais e frutos oleaginosos são melhores substratos que os meios de cultivo sintéticos ou complexos para a produção de aflatoxinas. Estes são ricos em fontes carbonadas, contendo glicose, frutose e sacarose, e em aminoácidos glicina e ácido glutâmico. Os minerais zinco e manganês, são essenciais para a produção de aflatoxinas; a mistura de ferro e cádmio estimula a produção, embora que o ferro iniba o crescimento fúngico e a produção de toxinas (GOURAMA & BULLERMAN, 1995).

### **2.8.3 Efeitos biológicos e toxidez das aflatoxinas**

A susceptibilidade dos animais às aflatoxinas variam de acordo com a espécie, raça, idade e estado nutricional do animal considerado. Os mais susceptíveis são os frangos, patos e porcos, embora as cabras, ratos, camundongos e gado bovino, sejam relativamente resistentes. A susceptibilidade às aflatoxicoses agudas se determina através da DL<sub>50</sub> (mg/kg de peso corporal). Para uma certa quantidade de animais se tem determinado a DL<sub>50</sub>: patos e coelhos 0,3 a 0,5, cães 1,0, porcos 0,62, macacos 2,2, frangos 6 a 16, camundongos 7 e ratos 9. Em estudos realizados com animais, a AFB<sub>1</sub> é mais tóxica, seguida por AFM<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>. Numerosas pesquisas sugerem que os metabólitos das aflatoxinas não são responsáveis diretos dos efeitos tóxicos. Durante sua transformação metabólica a AFB<sub>1</sub> pode-se conjugar com aminoácidos, ácido glucurônico e sais biliares em seu processo de eliminação. Durante a detoxificação hepática esta toxina é ativada irreversivelmente via citocromo P450, que medeia a oxidação a um exo-8,9-epóxido de AFB<sub>1</sub> (NEAL, 1998). A sensibilidade de uma espécie animal aos efeitos tóxicos desta micotoxina podia estar determinada pela capacidade de formação deste metabólito e/ou pela velocidade de detoxificação do epóxido de AFB<sub>1</sub> formado. A resposta biológica a AFB<sub>1</sub> em termos de genotoxicidade e citotoxicidade parecem dependentes da formação metabólica do composto exo-8,9-epóxido de AFB<sub>1</sub>, que permite a toxina unir-se covalentemente ao DNA, RNA, proteínas e outras moléculas. A união com o DNA produz a sobre-expressão de certo grupo de oncogênese, processo presumivelmente envolvido na indução de tumores malignos nos tecidos brancos. Ademais, as aflatoxinas principalmente conhecidas como

hepatotóxicas e hepatocarcinogênicas, possuem numerosos efeitos imunossupressivos observados nas intoxicações crônicas e derivados de sua capacidade de ação sobre o DNA e a síntese de proteínas. Estas toxinas inibem a resposta imune por células, a qual se manifesta na redução do peso do timo, da bolsa de Fabrício e do número de linfócitos T periféricos, com inibição da proliferação e diferenciação das células do sistema linfóide (OSWALD & COMÉRA, 1998; BONDY & PESTKA, 2000).

Existem evidências suficientes para envolver as aflatoxinas na produção do câncer hepático no mundo (PEERS *et al.*, 1976; LINSELL & PEERS, 1977). Em 1987 a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1986), declarou a AFB<sub>1</sub> como um carcinógeno da classe I, baseado em ensaios em animais. Os estudos sobre os possíveis casos de aflatoxicoses em humanos tem sido informados em muitos países, no sudeste da Ásia e África (PEERS *et al.*, 1976; LINSELL & PEERS, 1977; VAN RENSBURG *et al.*, 1985).

As aflatoxinas têm sido amplamente incriminadas como causas de carcinoma hepatocelular, hepatite aguda, síndrome de Reye, cirrose em crianças em mal estado nutricional e enfermidade de Kwashiorkor. Alguns informes científicos questionam o rol das aflatoxinas no câncer hepático, devido à estreita relação entre este e a hepatite B crônica de origem viral em populações da África e Ásia. Outros assumem que a hepatite B predispõe a iniciar um câncer por aflatoxinas. Embora o fígado seja o órgão principalmente afetado pelas aflatoxinas, em casos de aflatoxicoses, se tem observado em todos os animais expostos, lesões cancerosas nos rins, cólon, pulmões e glândulas lacrimais (RAMOS & HERNÁNDEZ, 1997).

Os primeiros sinais clínicos de intoxicação crônica em aves e mamíferos são mal estar geral, acompanhado por perda de apetite e de peso corporal, embora estes sinais clínicos não conduzam a um diagnóstico específico. Em observações patológicas de baixos níveis de intoxicação, revelam icterícia generalizada e cirrose hepática com proliferação celular dos condutos biliares e fibrose periportal. Nos casos de intoxicação aguda, se manifesta icterícia das membranas mucosas, hemorragias disseminadas, acúmulo de ácidos graxos no fígado. A patologia hepática é a principal característica na maioria das espécies pesquisadas, associado com um aumento dos níveis de fosfatase alcalina sérica, a qual constitui um bom indicador do mal funcionamento hepático associado com aflatoxicoses (RAMOS & HERNÁNDEZ, 1997).

#### **2.8.4 Aflatoxicose em cães**

GARLAND & REAGOR (2001) relatam que SEIBOLD & BAILEY (1952) descreveram um quadro epizootico de hepatite canina ocorrida no sudoeste dos Estados Unidos da América que foi, à época, denominada “Hepatite X”. Esta doença foi classificada, principalmente como subaguda, entretanto houve casos agudos e crônicos baseados nos achados histopatológicos e história clínica. A doença foi caracterizada por severos danos hepáticos, com história de depressão, anorexia e icterícia sem febre. Muitos dos animais apresentaram hemorragias em vários tecidos e órgãos. O fígado foi descrito, de maneira geral, como amarelado, verde-amarelado, vermelho-amarelado. As células do parênquima hepático mostraram evidente degeneração gorda, proliferação de dutos bilíferos e áreas de regeneração.

NEWBERNE *et al.* (1955) reproduziram em cães a “Hepatite X” a partir de lotes dos alimentos suspeitos, demonstrando em 1966 que a “Hepatite X” foi causada pela ingestão de alimentos naturalmente contaminados com aflatoxinas (NEWBERNE *et al.*, 1966). Intoxicando cães com 0,2 mg AFB<sub>1</sub>/dia durante 15 dias e observando-os por 13 dias, estes autores reproduziram lesões hepáticas de moderadas a severas nos animais

experimentados. Relataram ainda que animais alimentados com 500 ng/g de aflatoxinas durante 35 dias apresentaram, após eutanásia, lesões de mínimas a moderadas, sem contudo mostrarem algum sinal clínico. Dois terços dos cães que receberam uma única dose de 1 mg/kg de peso vivo de AFB<sub>1</sub> por injeção intraperitoneal foram a óbito após 14 dias e apresentaram lesões hepáticas de moderadas a severas (NEWBERNE *et al.*, 1966). As lesões macroscópicas produzidas incluíram hemorragias sub-serosas e sub-mucosas em ambas as cavidades torácicas e peritoneal e um fígado amarelo mosqueado. Necrose variável e hemorragias na vesícula, pâncreas, rins, timo, coração e glândulas adrenais. A microscopia evidenciou necrose das células hepáticas, esteatose, proliferação dos dutos biliares, fibrose e degeneração de hepatócitos.

NEWBERNE & WOGAN (1968) demonstraram que induziram experimentalmente tumores malignos em ratos com 80 semanas de exposição a 15 µg/AFB<sub>1</sub>, e que expressada como DL50 oral variou consideravelmente em coelhos (0,3 mg/kg de peso), visões (0,5-0,6 mg/kg de peso), cães (10 mg/kg de peso), sendo mais sensíveis que os camundongos (9 mg/kg de peso) e um hamsters (10,2 mg/kg de peso).

Desde 1975, no mínimo 11 epizódios de intoxicação em cães foram descritos (KETTERER *et al.*, 1975; KRISHNAMACHARI *et al.*, 1975; BOST & GASTIELLU, 1976; GREENE *et al.*, 1977; BASTIANELLO *et al.*, 1986; LIGGETT *et al.*, 1986; ONYEKWEODIRI & SHOYINKA, 1988; HAGIWARA *et al.*, 1990; GARLAND & REAGOR, 2001).

BASTIANELLO *et al.* (1986) relataram a ocorrência de casos naturais de aflatoxicoses em cães que foram alimentados com rações contaminadas com aflatoxinas em níveis de 100 a 300 ng/g.

KELLERMAN *et al.* (1988) em um experimento em pequena escala, intoxicou dois grupos de cães com dois animais cada, onde o primeiro grupo recebeu ração contaminada com 250 ng/g de AFB<sub>1</sub> e o segundo com a ração contendo 500 ng/g de AFB<sub>1</sub>. Estes autores relatam, que com a dieta contendo o menor nível, foram necessários seis meses de exposição para obtenção de óbitos, enquanto que com a dieta no nível mais elevado, obteve-se óbitos em apenas dois meses de exposição.

GARLAND & REAGOR (2001) descreveram um episódio de intoxicação aguda em cães do estado do Texas (EUA) por aflatoxinas em 1998. Estes autores relatam que 55 cães morreram intoxicados com rações contendo níveis de aflatoxinas da ordem de 100 a 300 ng/g, e que o período de exposição variou de 90 a 120 dias. Houve mais animais intoxicados e muitas mortes que não foram informadas. As rações envolvidas foram de 17 tipos fabricadas pela mesma indústria e o componente responsável pela contaminação foi o milho. Os sinais clínicos observados nos animais examinados no Texas Veterinary Medical Laboratory (TVMDL) incluíram anorexia, depressão, icterícia, morte súbita, melena, vômitos, diarreia e coagulopatia. As análises bioquímicas séricas mostraram elevados níveis de Alanina Aminotransferase (ALAT), Fosfatase Alcalina (FAS), Gama-glutamil Transferase (GGT) e Bilirrubina Total (BT). Os achados histopatológicos incluíram hiperplasia biliar, lipidoses, colestase e necrose.

BÖHN & RAZZAI-FAZELI (2005) estudaram os efeitos das micotoxinas sobre distintas espécies de animais de companhia e demonstraram que na exposição de cães entre 0,5-1 mg de AFB<sub>1</sub>/kg, os animais morriam em poucos dias, exibindo vômitos, depressão, poliúria e hepatite. CARVALHO *et al.* (2000) descreveram a distrofia hepática na aflatoxicose canina, em animais alimentados com ração comercial, apresentando anorexia, vômitos, diarreia sanguinolenta e ascite. Na macroscopia fígado megálico, consistência aumentada, superfície irregular e tonalidade amarelada. A histopatologia evidenciou desarranjo do padrão lobular hepático, por fibrose intralobular, hiperplasia ductal e bilestase ducto-canalicular.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Estudo da micobiota em alimentos balanceados para cães

##### 3.1.1 Amostragem de rações para alimentação de cães

###### a. Amostras de rações para cães envolvidos em um episódio de intoxicação natural

Durante os meses de fevereiro a junho de 2001, o Laboratório de Micologia do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), recebeu 117 amostras de rações e alimentos para cães (pacotes de 1 kg), suspeitas de envolvimento com um episódio de intoxicação natural em aproximadamente 480 cães em todo o estado do Rio de Janeiro. As amostras foram enviadas por criadores, clínicos veterinários de clínicas particulares do estado do Rio de Janeiro e do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitzman, município do Rio de Janeiro. As amostras foram divididas em três grupos, isto é: Grupo A (GA) composto de 87 amostras de ração de mesma marca com sabor de alho e suspeitas de causa de intoxicação, Grupo B (GB) composto por 22 amostras de ração não suspeita de variadas marcas e Grupo C (GC) composto por oito amostras de biscoitos para cães. Houve amostras enviadas pelo Instituto de Criminalística Carlos Eboli, Rio de Janeiro.

###### b. Amostragem no comércio do estado do Rio de Janeiro

Durante o período compreendido entre março e novembro de 2005, foram coletadas 49 amostras de rações para cães em estabelecimentos comerciais da cidade do Rio de Janeiro e de Seropédica, estado do Rio de Janeiro, agrupadas em rações “Standard”, “Premium” e “Super Premium”. As amostras foram agrupadas assim devido à quantidade e qualidade de Proteína Bruta (PB) presente na ração. Sendo o grupo “Standard” o de qualidade de proteína inferior e valores de PB menores do que 21%. O grupo “Premium”, seria o de qualidade de proteína média e valores de PB entre 21 e 28%. O grupo “Super Premium”, foi o grupo que apresentou a qualidade de proteína excelente e valores de PB acima ou igual a 28%.

Todas as amostras foram acondicionadas de forma adequada e estavam dentro do prazo de validade estabelecido pelo fabricante.

###### c. Amostragem na linha de produção de uma indústria de rações para cães

As amostras utilizadas no presente trabalho foram coletadas na indústria, cujos produtos são vendidos normalmente nas cidades circunvizinhas a Seropédica. Um total de sete amostras mensais foi coletado diretamente da linha de produção, em um período de 10 meses consecutivos (março a dezembro de 2005). A amostragem mensal foi de todos os ingredientes utilizados para a produção da ração, sendo coletadas amostras de: milho (m), milho moído (mm), farelo de sorgo (fs), farinha de milho e glúten 21% (fgm), farinha de vísceras de aves (fva), farinha de carne e ossos (fco) e ração (alimento terminado). As amostras primárias foram homogeneizadas várias vezes para obter uma amostra representativa de acordo com a metodologia descrita por DALCERO *et al.*

(1997), sendo que as amostras finais enviadas ao Laboratório de Micologia foram de 1 kg cada. Estas amostras no laboratório foram trituradas quando necessário em ambiente estéril e novamente homogeneizadas várias vezes, de modo a se conseguir sub-amostras de 200 g para as análises.

### 3.1.2 Determinação da atividade de água ( $A_a$ )

Para a determinação da atividade de água ( $A_a$ ) foi utilizado o equipamento AquaLab® modelo CX 2, com o procedimento descrito a seguir.

Primeiramente o aparelho foi ligado por cerca de uma hora, para a estabilização da temperatura. Após, a calibração foi feita utilizando-se uma solução de NaCl 6M, de atividade de água 0.760 e água destilada, cuja atividade de água é igual a um. Cada amostra foi colocada em recipiente próprio, preenchendo cerca de 1/3 de sua capacidade, sendo efetuadas duas leituras. Calculando-se a média aritmética das leituras, foi obtida a atividade de água das amostras.

### 3.1.3 Contagem, isolamento e identificação da micobiota das amostras

A contagem das unidades formadoras de colônias fúngicas se determinou pelo método de disseminação em superfície, homogeneizando 10 g de amostra em 90 ml de água peptonada a 0,1%, durante 30 minutos em agitação. Diluições seriadas 1/10 da solução anterior foram preparadas e as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  plaqueadas, em alíquotas de 0,1 ml (por triplicata), sobre quatro meios de cultivo sólidos: Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), utilizado como meio de contagem geral; Ágar *Aspergillus flavus-parasiticus* (AFPA), meio para o isolamento diferencial de fungos potencialmente aflatoxigênicos; Dicloran 18% glicerol (DG18), meio indicado para alimentos secos em geral e grãos de cereais estocados; e, o meio de Nash-Snyder (NS), para o isolamento das espécies de *Fusarium*. As placas DRBC e DG18, foram incubadas a 25°C por sete dias, as de AFPA durante 48 horas à mesma temperatura, e as de Nash-Snyder se incubaram à temperatura ambiente por sete dias, sob fotoperíodo de 12/12 horas de luz branca e luz negra. As placas contendo entre 10-100 colônias se utilizaram para a contagem, expressos em UFCg<sup>-1</sup> de alimento balanceado. Observaram-se à macroscopia e microscopia as colônias desenvolvidas, e se identificaram os gêneros de acordo com as chaves taxonômicas de PITT & HOCKING (1997) e BARNETT & HUNTER (1990). As cepas pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram repicadas para Ágar Batata Glicosado (ABG) e as do gênero *Fusarium* em Ágar Folhas de Chá (CLA), para sua posterior identificação.

### 3.1.4 Identificação das espécies do gênero *Aspergillus*

Para a identificação das espécies do gênero *Aspergillus* se utilizaram os meios de cultivo Ágar Extrato de Malte (MEA) e Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA). Para a identificação das espécies xerofílicas (*Eurotium* e *Emericella*) se utilizaram dois meios de cultivo de baixa atividade de água: Ágar Nitrito Glicerol 25% (G25N) e Ágar Czapek Extrato de Levedura Sacarose 20% (CY20S). Cada cepa foi inoculada nos meios de cultivo em três pontos equidistantes entre si, do bordo e do centro da placa. Os meios de cultivo foram incubados durante sete dias a 28 e 37 ± 1°C, de acordo com cada metodologia. A identificação foi realizada seguindo as chaves taxonômicas de KLICH & PITT (1988) e PITT & HOCKING (1997).

## 3.2 Estudo da incidência natural de micotoxinas em alimentos balanceados para cães

### 3.2.1 Extração e detecção das aflatoxinas

A detecção e quantificação das aflatoxinas (AFs) se realizaram seguindo a metodologia proposta por TRUCKSESS *et al.* (1994). A partir de 50 g de cada amostra foi feita a extração das toxinas com uma mistura de acetonitrila:água (90:10). Para a detecção e quantificação das mesmas toxinas foram tomados 200 µl do filtrado, derivatizando com 700 µl de ácido trifluoroacético:ácido acético glacial:água (20:10:70). As toxinas derivatizadas (20 µl da solução), foram analisadas usando um sistema de detecção com fluorescência por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE), em cromatógrafo Hewlett Packard. As separações cromatográficas foram feitas em uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µ de tamanho de partícula, Supelcosil LC-ABZ, Supelco) conectada a uma pré-coluna Supelguard LC-ABCZ (20 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula, Supelco). Como fase móvel se utilizou água:metanol:acetonitrila (4:1:1). O fluxo da fase móvel foi de 1 ml/min. A detecção foi obtida com excitação e emissão usada foi de 360 e 440 nm, respectivamente. As soluções padrão foram preparadas dissolvendo as aflatoxinas puras (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, pureza > 99%), AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, com metanol em concentrações de 5 a 20, 3 a 11, 5 a 18,5 e 4 a 14,5 ng/ml, respectivamente. A quantificação de aflatoxinas baseou-se nas medidas dos picos comparados com as soluções padrões de cada toxina.

Também foi utilizada a Cromatografia de Imunoafinidade que baseia-se na utilização de anticorpos como reativos de afinidade (CANDLISH *et al.*, 1991). Os anticorpos anti-micotoxinas são imobilizados sobre um suporte sólido como gel de agarose, (Sephacrose) e sob a forma de gel acondicionado em um cartucho plástico e mantido em um tampão fosfato (SCOTT & TRUCKSESS, 1997). O extrato bruto é passado através da coluna, e a micotoxina presente na amostra é ligada aos sítios de reconhecimento das imunoglobulinas (VAN EGMOND, 1995). As colunas de imunoafinidade (IACs) são usadas para purificar e concentrar uma determinada micotoxina. Soluções tampões ou até mesmo água são utilizadas para remoção das impurezas e interferentes, e depois da toxina estar seletivamente conjugada aos anticorpos na fase estacionária da coluna, é removida com um pequeno volume de solvente orgânico, como metanol ou acetonitrila. A detecção pode ser feita diretamente através de um fluorímetro. O fluorímetro utilizado pertence à série nº 0638, modelo Vicam 4. Utilizou-se a metodologia descrita no manual técnico da Vicam.

### 3.2.2 Equipamentos

- a) Cromatógrafos líquidos: Foram utilizados os cromatógrafos líquidos de alta eficiência (Waters Associates®, Inc., Miliford, MA, EUA) equipado com duas bombas Waters (modelo 510), injetor Rheodyne (Rheodyne®, Cotati, Califórnia, EUA) com *loop* fixo de 20 µl, detector de fluorescência Waters (modelo 420), de absorvância Lambda-Max Waters (modelo 481), integrador registrador (modelo 740) e detector de arranjo de diodos D-6000 Merck-Hitachi (Hitachi Ltd.®, Tóquio, Japão), equipado com workstation com software de controle D-6, do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ, e um sistema Hewlett-Packard® equipado

com detector de fluorescência. Ajustados para excitação de 330 nm e de emissão de 460 nm.

- b) Espectrofotômetro Shimadzu mod. 2001. (Shimadzu Co.®, Kyoto, Japão).
- c) Estufas BOD marca Ética (Ética<sup>MR</sup>, São Paulo, SP, Brasil), ajustadas para temperaturas de 5, 25 e 37°C, e uma estufa BOD horizontal equipada com agitador recíproco.
- d) Microscópio Wild M-20 (Wild-Leitz®, Heerbrugg, Switzerland) com ocular com escala micrométrica de 50 µm. (Wild-Leitz®, Heerbrugg, Switzerland).
- e) Agitador de tubos tipo Vortex (sem marca, Indústria Brasileira).
- f) Cromatovisor Prodicil (Prodicil<sup>MR</sup>, Curitiba, PR, Brasil) equipado com lâmpada de ultravioleta de 30 watts de comprimento de onda de 365 nm.

### 3.2.3 Padrões

Os padrões de Aflatoxinas foram obtidos da Sigma (Sigma Co.®, St. Louis, EUA), que depois de diluídos e quantificados segundo a metodologia descrita no AOAC (2000), foram armazenados em frascos âmbar e mantidos em freezer a -18°C. Assim, as micotoxinas foram diluídas em benzeno:acetoneitrila (98:2, v/v) ou metanol, de acordo com AOAC (2000), e preparadas soluções padrão estoques de cada uma.

### 3.2.4 Reagentes, soluções e acessórios para cromatografia

Os solventes utilizados tanto na cromatografia quanto no preparo dos padrões foram de grau Uvasol ou LiChrosolv (Merck®, Quimitra, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e submetidos à filtração, antes do uso, em membrana Millipore (Millipore®, Bedford, MA, EUA) tipo GVWP0047 de 0,47 µ de diâmetro de poro. Para a filtragem dos extratos utilizou-se membranas Millipore® de 0,22 µ antes da injeção no sistema CLAE. A água utilizada foi filtrada em sistema Milli-Q®. Foi utilizado metanol, clorofórmio, acetoneitrila, etanol, isopropanol, tolueno, acetona, acetato de etila, ácido fórmico, acetato de sódio, ácido clorídrico, ácido acético, ácido ortofosfórico, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, sulfato de sódio, fosfato monobásico de sódio, glicerol, Tween 20 (Polisorbato 20), glicose anidra, cromatofolhas de sílica gel 60G sem indicador de fluorescência, 20x20 (Merck-Quimitra) (GIMENO, 1979).

#### a. Cromatografia de imunoafinidade (Beacon Aflatoxin Plate Kit, Beacon Analytical Systems Inc.)

O Beacon Aflatoxin Plate Kit é um ELISA competitivo para a análise quantitativa de aflatoxina em nozes, grãos e produtos de grãos, sendo utilizado comparativamente com as técnicas anteriores.

## 3.3 Determinação da capacidade toxigênica das espécies do gênero *Aspergillus* (seção *Flavi*)

### 3.3.1 Cepas

Avaliou-se o perfil aflatoxigênico de todas as cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, isoladas das amostras de ingredientes e de alimentos balanceados adquiridos no

comércio, e de ingredientes e rações coletados na linha de produção na indústria no presente projeto.

### **3.3.2 Produção das aflatoxinas**

Para avaliar a capacidade das cepas para produzir aflatoxinas, foram colocados 22 g de arroz em frascos Erlenmeyer de 125 ml, hidratado com 10 ml de água destilada e se esterelizando em autoclave a 121°C por 30 minutos, durante dois dias consecutivos. Posteriormente se inoculou o arroz com 1 ml de uma suspensão conidial em água destilada estéril da cepa em estudo ( $10^3$  conídios/ml), colhidas desde um cultivo puro desenvolvido em APG, durante sete dias a 28°C. Inocularam-se três frascos Erlenmeyer por cepa, e se incubando em obscuridade a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante sete dias. Após o período de incubação, os grãos foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 30 minutos, para a destruição dos conídios.

### **3.3.3 Extração e detecção das aflatoxinas**

A detecção e quantificação das aflatoxinas foi realizada seguindo a metodologia proposta por SHOTWELL *et al.* (1966), com algumas modificações. A extração das toxinas se realizou adicionando aos cultivos 100 ml de clorofórmio e deixando em repouso durante 24 horas à temperatura ambiente. Foram realizados dois processos de limpeza do extrato: o primeiro com  $\text{CuSO}_4$ , cinco minutos e, o segundo com charcoal, um minuto. O extrato limpo foi evaporado em rotavapor a 60°C. As aflatoxinas se quantificaram sob luz ultravioleta de comprimento de onda larga (365 nm) por comparação visual com as soluções padrão de  $\text{AFB}_1$ ,  $\text{AFB}_2$ ,  $\text{AFG}_1$  e  $\text{AFG}_2$ .

As soluções estoque de aflatoxinas foram preparadas em benzeno:acetonitrila (98:2), armazenando-se em obscuridade a 4°C. As aflatoxinas foram determinadas a 350nm sob exposição a luz ultravioleta, comparando-se com os padrões de aflatoxinas  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$ ,  $\text{G}_1$  e  $\text{G}_2$ .

## **3.4 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparados utilizando os testes múltiplos de Duncan. Os resultados das contagens fúngicas foram transformados a  $\log_{10}$  (UFC  $\text{g}^{-1}$ ) para obter homogeneidade de variância. O teste de Scheffé se utilizou para comparar as médias dos distintos tratamentos quando determinadas as micotoxinas (QUINN & KEOUGH, 2002).

## **3.5 Episódio de intoxicação natural em cães do estado do Rio de Janeiro**

Durante os meses de fevereiro a maio de 2001, houve no estado do Rio de Janeiro, um episódio de mortalidade de cães com um quadro agudo de intoxicação. Relatou-se que mais de 480 animais foram acometidos em todo o estado. O aparecimento de sintomas e óbito dos animais ocorreu de cinco a 14 dias após o consumo de uma ração com sabor de alho.

Em conjunto com clínicas veterinárias particulares e com o Serviço de Patologia Animal do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (IMMVJV), localizado em São Cristovão, Rio de Janeiro, RJ, foram observados 62 casos com acompanhamento clínico e *post mortem*. Obteve-se, de clínicas veterinárias, os dados

médios relativos aos exames bioquímicos séricos de 25 dos 62 animais, para os seguintes parâmetros, os intervalos de normalidade em Unidades Sigma Frankel ou Unidades Sigma:

- Aspartato Amino Transferase (ASAT) 10 a 21 UI\*/ml (14,0)
- Alanina Amino Transferase (ALAT) 14 a 40 UI/ml (20,0)
- Fosfatase Alcalina (FAS) 0,71 a 1,50 u/ml (0,85)
- Bilirrubina Plasmática 0-0,37 mg/dl (0,13)
- Gama Glutamil Transferase (GGT) 0-2,26 UI/ml (0,92)

Os exames *post mortem* foram realizados no Serviço de Patologia Animal do IMMJV, sob a direção da Médica Veterinária Ana Luiza Pinheiro Pimenta. Após cada necropsia, fragmentos de tecidos apresentando alterações macroscópicas foram coletados e conservados em formol a 10% em solução de tampão fosfato até o momento de processamento. As preparações histológicas seguiram protocolo clássico de processamento, clivadas e, após emblocadas em parafina, cortadas em micrótomo (5  $\mu$ ) e coradas por Hematoxilina/Eosina.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo da microbiota em alimentos balanceados para cães

#### 4.1.1 Microbiota isolada de amostras de rações para alimentação de cães

##### a. Microbiota obtida de amostras de rações envolvidas em um episódio de intoxicação natural em cães no estado do Rio de Janeiro

As 117 amostras de rações e alimentos para cães, suspeitas de envolvimento com um episódio de intoxicação natural em aproximadamente 480 cães em todo o estado do Rio de Janeiro, recebidas no Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ, foram analisadas microbiologicamente, segundo a metodologia descrita por PITT & HOCKING (1997).

Os cultivos feitos em DRBC mostraram uma contagem média para fungos filamentosos de  $3,8 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$  ufc/g de ração para as amostras do GA, sendo o limite inferior da ordem de  $1,0 \times 10^2$  ufc/g detectado em oito amostras e o limite superior de  $5,4 \times 10^6$  ufc/g detectado em 10 amostras deste grupo. Os valores de ufc/g detectados nas amostras, quando inoculadas em meio DG18 foram de  $2,4 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^2$  ufc/g, sendo o limite inferior detectado em duas amostras de  $1,0 \times 10$  ufc/g e o limite superior de  $5,6 \times 10^5$  ufc/g detectado em oito amostras analisadas.

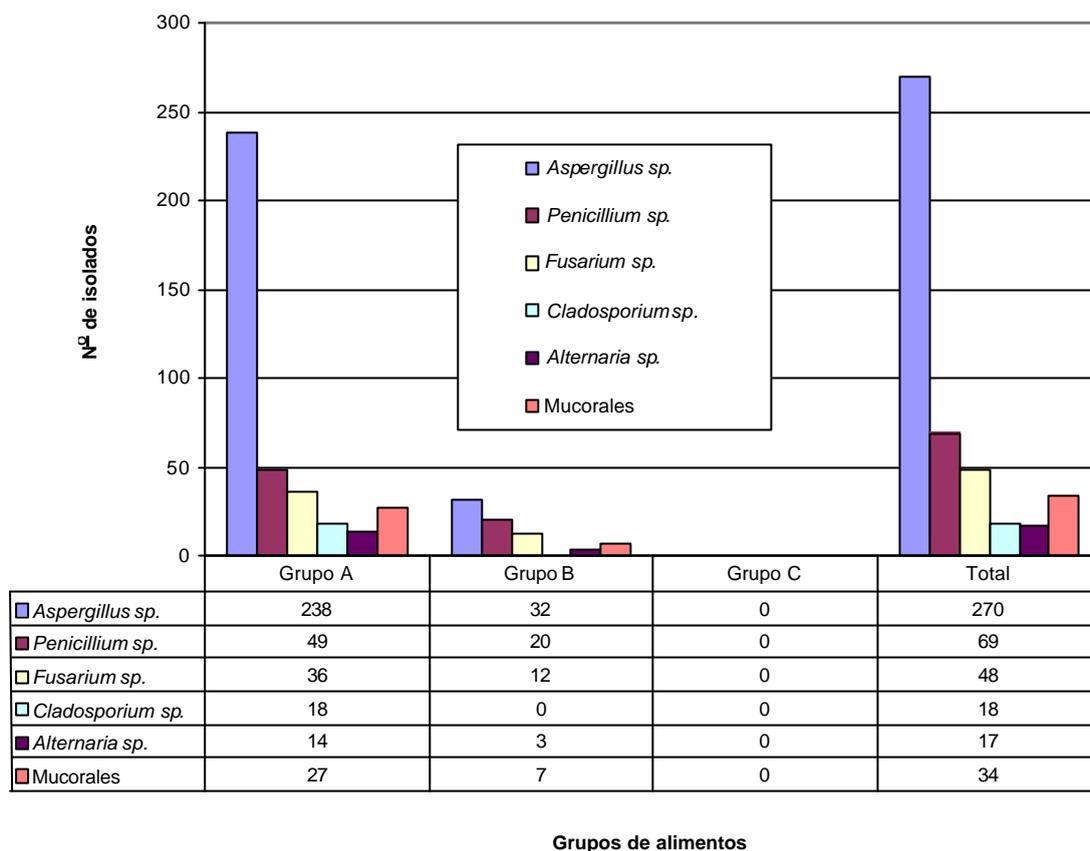
As amostras do GB, quando inoculadas em DRBC após diluição seriada, mostraram valores médios de ufc/g, para fungos filamentosos, da ordem de  $1,2 \times 10^2 \pm 1,5 \times 10$  ufc/g, cujo limite inferior foi de  $1,0 \times 10$  ufc/g em nove amostras e o limite superior foi de  $1,2 \times 10^3$  ufc/g em 18 amostras analisadas. As contagens em DG18 apresentaram valores médios para as amostras do GB da ordem de  $3,2 \times 10^2 \pm 1,2 \times 10^2$  ufc/g, onde o limite inferior foi de  $1,0 \times 10$  ufc/g e o limite superior foi de  $2,4 \times 10^3$  ufc/g.

As oito amostras do grupo C, quando inoculadas tanto em meio DRBC, bem como, em DG18, não apresentaram crescimento após sete dias de incubação.

As contagens de unidades formadoras de colônias estiveram acima do limite considerado como de condições higiênico-sanitário, que é de  $10^4$  ufc/g de alimento ou ração, segundo Good Manufacture Practices (GMP, 2005). As amostras de rações do GA, que estiveram envolvidas em um episódio de intoxicação natural, apresentaram índices de  $10^6$  ufc/g em 10 amostras analisadas. Os níveis observados no GB, embora considerados de caráter moderado, estiveram dentro do limite estabelecido (GMP, 2005).

A frequência dos gêneros de fungos isolados a partir das amostras do GA foram: *Aspergillus sp.* (59,21%), *Penicillium sp.* (15,13%), *Fusarium sp.* (10,53%), Mucorales (7,46%), *Alternaria sp.* (3,95%) e *Cladosporium sp.* (3,73%). A Figura 5 mostra os valores absolutos do número de isolados por gênero prevalente nas amostras dos grupos A, B e C analisadas. As espécies do gênero *Aspergillus* foram as prevalentes e estiveram presentes em 62,3% nas amostras do Grupo A e 43,24% nas do Grupo B.

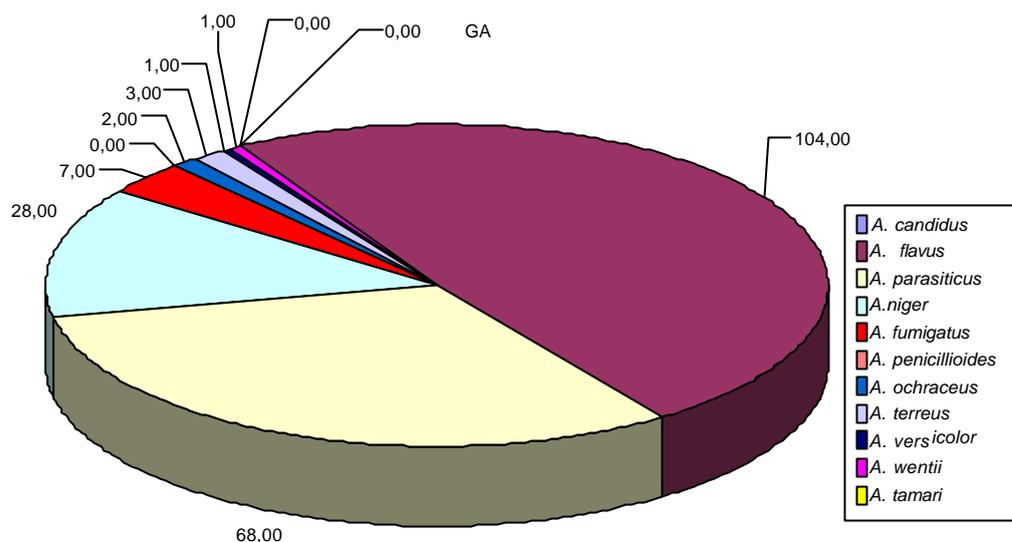
O *A. flavus* (104/238) foi a espécie prevalente dentre as amostras isoladas de rações do Grupo A, apresentando uma frequência de 43,7%, sendo seguido pelo *A. parasiticus*, com 28,6% (68/238), *A. niger*, com 11,8% (28/238) e *A. fumigatus*, com 2,94%, dentre outros, conforme Tabela 7 e Figura 6.



**Figura 5.** Prevalência dos gêneros de fungos isolados por amostras de rações e alimentos para cães, suspeitas em um processo de intoxicação natural em 2001.

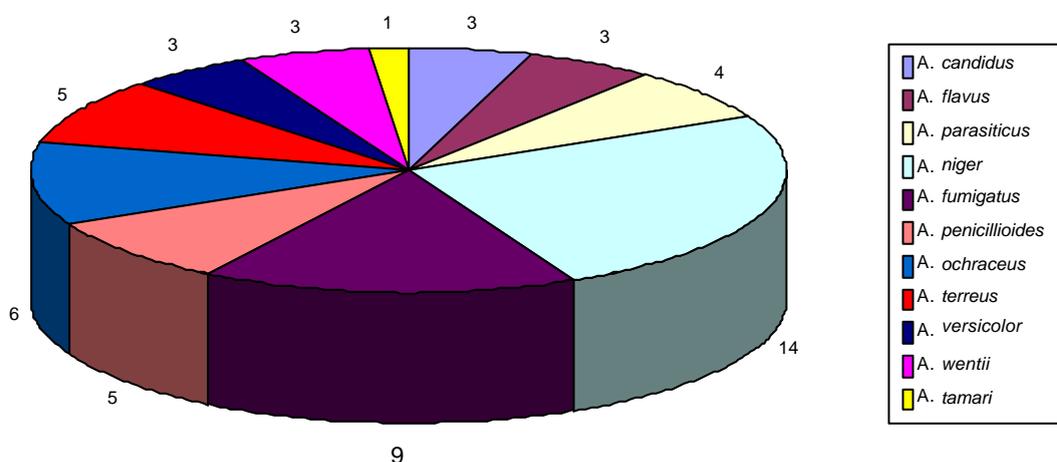
**Tabela 7.** Frequência de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas a partir de amostras de rações dos grupos A e B.

Espécies de <i>Aspergillus</i>	Grupo A	%	Gênero <i>Aspergillus</i>	Grupo B	%	Gênero <i>Aspergillus</i>	Total	%
<i>A. candidus</i>	0,00	0,00	<i>A. candidus</i>	3,00	9,38	<i>A. candidus</i>	3,00	1,11
<i>A. flavus</i>	104,00	43,70	<i>A. flavus</i>	3,00	9,38	<i>A. flavus</i>	107,00	39,63
<i>A. parasiticus</i>	68,00	28,57	<i>A. parasiticus</i>	4,00	12,50	<i>A. parasiticus</i>	72,00	26,67
<i>A. niger</i>	28,00	11,76	<i>A. niger</i>	14,00	43,75	<i>A. niger</i>	42,00	15,56
<i>A. fumigatus</i>	7,00	2,94	<i>A. fumigatus</i>	9,00	28,13	<i>A. fumigatus</i>	16,00	5,93
<i>A. penicillioides</i>	0,00	0,00	<i>A. penicillioides</i>	5,00	15,63	<i>A. penicillioides</i>	5,00	1,85
<i>A. ochraceus</i>	2,00	0,84	<i>A. ochraceus</i>	6,00	18,75	<i>A. ochraceus</i>	8,00	2,96
<i>A. terreus</i>	3,00	1,26	<i>A. terreus</i>	5,00	18,63	<i>A. terreus</i>	8,00	2,96
<i>A. versicolor</i>	1,00	0,42	<i>A. versicolor</i>	3,00	9,38	<i>A. versicolor</i>	4,00	1,48
<i>A. wentii</i>	1,00	0,42	<i>A. wentii</i>	3,00	9,38	<i>A. wentii</i>	4,00	1,48
<i>A. tamari</i>	0,00	0,00	<i>A. tamari</i>	1,00	3,13	<i>A. tamari</i>	1,00	0,37
Total	238,00	100,00	Total	32,00	100,00	Total	270,00	100,00



**Figura 6.** Frequência de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas a partir de amostras de rações do grupo A (GA).

O *A. niger* (14/32) foi a espécie prevalente dentre as amostras isoladas de rações do Grupo B, apresentando uma frequência de 43,75%, sendo seguido pelo *A. fumigatus*, com 28,13% (9/32), *A. ochraceus*, com 18,75% (6/32) e *A. terreus*, com 18,63%. As espécies de *A. parasiticus* e *A. flavus* tiveram frequência de 9,32% e 12,5%, respectivamente, como apresentado na Tabela 7 e Figura 7. A Figura 7 mostra que o gênero *Aspergillus* foi, em valores absolutos, oito vezes maior nas amostras do GA do que nas do grupo B.



**Figura 7.** Frequência de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas a partir de amostras de rações do grupo B (GB).

A frequência de *A. flavus* e *A. parasiticus*, potencialmente aflatoxígenos, foi considerada elevada e esteve de acordo com o que relataram MAGNOLI *et al.* (1998, 2002), SCUDAMORE *et al.* (1998) e ROSA (2002). Estes valores foram mais elevados para as amostras do GA e foram equivalentes a 76,3% das cepas isoladas do gênero *Aspergillus*. As amostras do grupo B apresentaram poucas cepas de fungos pertencentes

a espécies aflatoxígenas, e as do grupo C não apresentaram crescimento fúngico. Neste último caso isto poderia ter ocorrido pela adição de conservantes e antifúngicos. Estes achados concordam com BUENO *et al.* (2001) que consideraram a espécie *A. flavus* como a mais freqüente e prevalente em amostras de ração para animais de companhia na Argentina.

#### b. Micobiota das amostras obtidas no comércio do estado do Rio de Janeiro

As amostras de rações para cães adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro eram denominadas como “Grupo Standard” (GS) com 28 amostras analisadas, “Grupo Premium” (GP) com 13 amostras analisadas e “Grupo Super Premium” (GSP) com 9 amostras. Dentre estas amostras, 19 constituíam em marcas destinadas à alimentação de filhotes e 31 à alimentação de cães adultos. Estas amostras foram analisadas microbiologicamente para avaliação da carga fúngica contaminante (ufc/g) e amostra analisada. Os resultados médios obtidos estão apresentados na Tabela 8 e mostram as faixas de ufc/g e as suas respectivas médias obtidas nos meios DRBC, DG18 e NASH a partir das amostras coletadas.

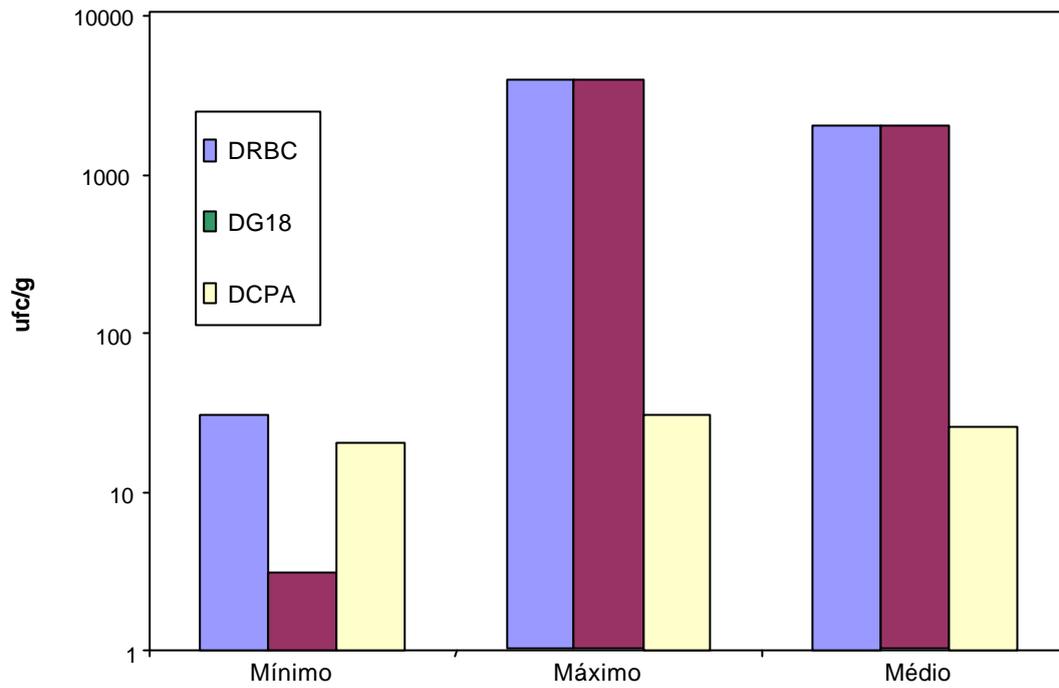
**Tabela 8.** Contagem total dos fungos filamentosos isolados de amostras de rações para cães.

Grupos de Rações	DRBC	DG18	NASH
	Fungos filamentosos UFG g <sup>-1</sup>	Fungos filamentosos UFG g <sup>-1</sup>	Fungos filamentosos UFG g <sup>-1</sup>
Standard	2,6 x 10 <sup>2</sup> a 3,8 x 10 <sup>3</sup>	1,8 x 10 <sup>2</sup> a 3,8 x 10 <sup>3</sup>	0,4 x 10 <sup>1</sup> a 2,0 x 10
Premium	NC a 1,0 x 10 <sup>2</sup>	0,2 x 10 a 4,0 x 10 <sup>2</sup>	NC a 3,0 x 10
Super Premium	NC a 4,0 x 10	NC a 5,0 x 10	NC a 1,0 x 10

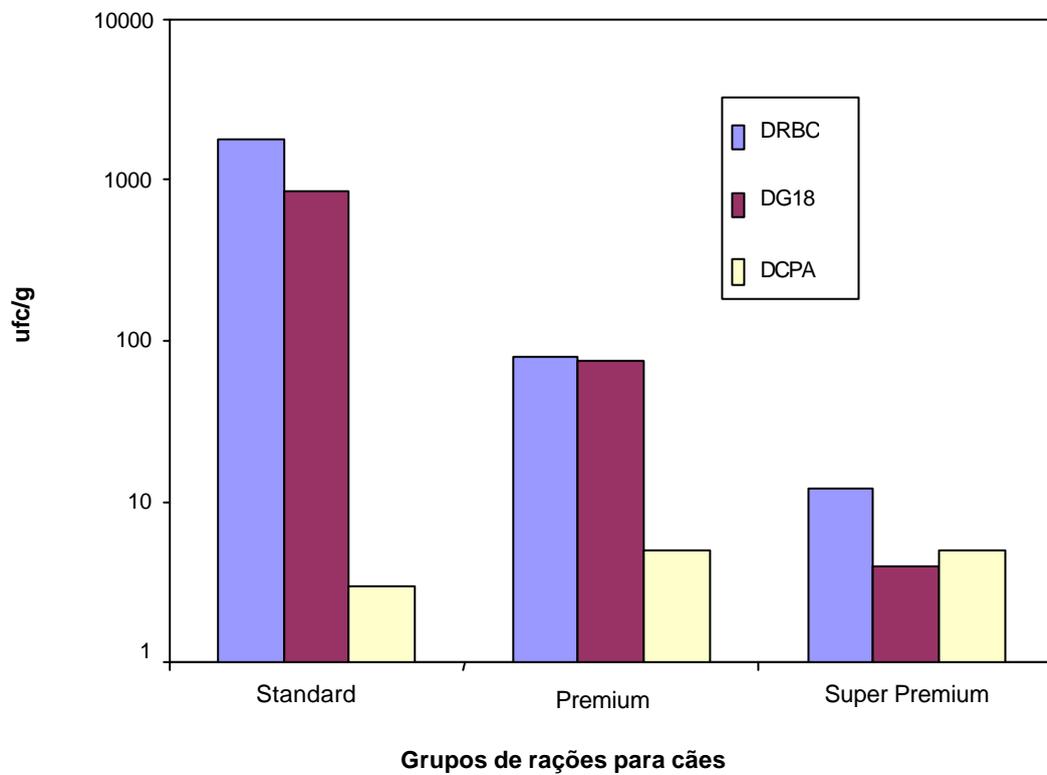
NC = não houve crescimento.

As maiores contagens (ufc/g) foram obtidas nas amostras pertencentes ao GS, onde se obteve valores médios de 1,8 x 10<sup>3</sup> ufc/g em meio DRBC, 8,6 x 10<sup>3</sup> ufc/g em meio DG18 e 1,1 x 10 ufc/g para o meio DCPA. Os valores encontrados para as amostras de GP apresentaram valores médios de 8 x 10 ufc/g no meio DRBC, de 7,5 x 10 ufc/g em meio DG18 e < 1 x 10 ufc/g para o meio DCPA, conforme demonstrado na Figura 8. Observou-se um decréscimo nos valores que foram diretamente proporcionais à qualidade das amostras analisadas, isto é, quanto mais proteína e mais cara a ração, menor foram os valores médios de ufc/g de ração detectados. Nas amostras pertencentes aos grupos GP e GSP, os valores médios obtidos estiveram dentro dos limites estabelecidos como condição tolerável de qualidade higiênico-sanitária (GMP, 2005) (Figura 9).

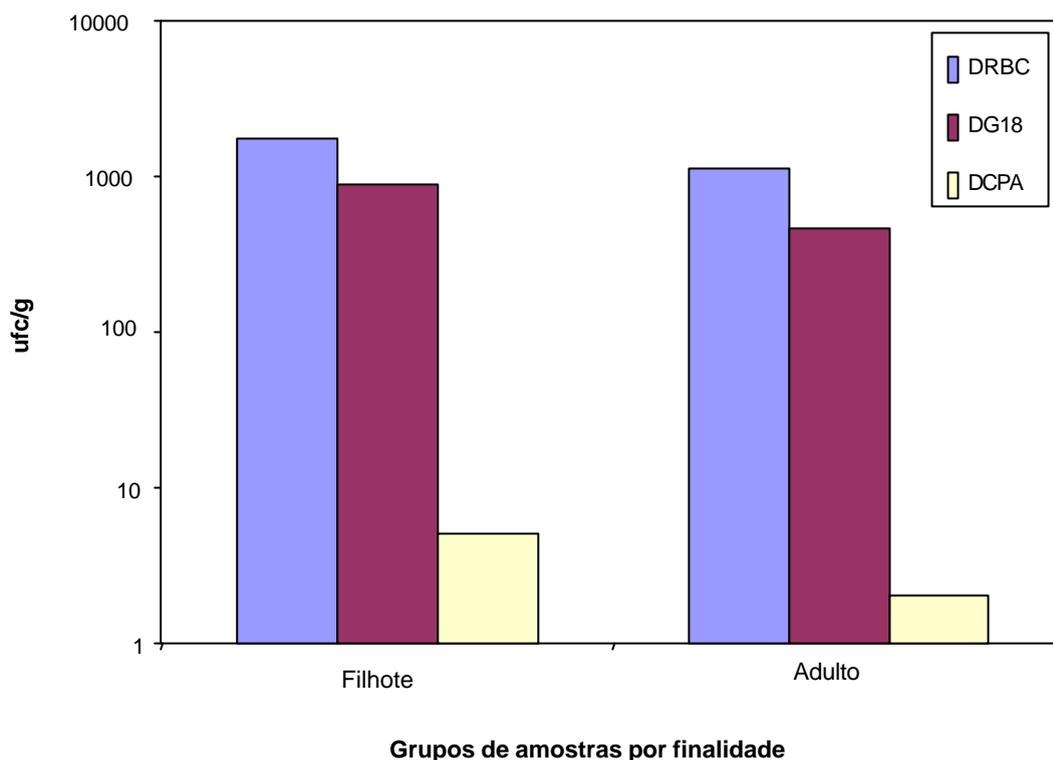
Quando os valores foram tabulados, levando-se em consideração a finalidade das rações, isto é, para filhotes ou para adultos, os valores médios encontrados para as amostras destinadas a alimentação de filhotes (Figura 10) foram de 1,7 x 10<sup>3</sup> ufc/g no meio DRBC, de 8,9 x 10<sup>2</sup> ufc/g para DG18 e < 1 x 10 ufc/g para o meio DCPA. Os valores médios para as amostras de ração destinadas a cães adultos foram de 1,1 x 10<sup>3</sup> ufc/g para DRBC, de 4,6 x 10<sup>2</sup> ufc/g para DG18 e < 1x10 ufc/g para DCPA. Todos estes valores estiveram de acordo com a norma GMP (2005).



**Figura 8.** Valores mínimos, máximos e médio de unidades formadoras de colônias por grama (ufc/g) de ração para cães, em meios de DRBC, DG18 e DCPA.



**Figura 9.** Valores de ufc/g de ração para cães dos Grupos Standard (GS), Premium (GP) e Super Premium (GSP), em meios de DRBC, DG18 e DCPA.



**Figura 10.** Valores de ufc/g de ração destinadas à alimentação de filhotes e adultos em meios de DRBC, DG18 e DCPA.

Observou-se maior incidência de fungos filamentosos, sendo isolados 117 cepas pertencentes a cinco gêneros fúngicos, além da ordem Mucorales (Tabela 9). As espécies prevalentes foram pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e seus teleomorfos (59,82%), seguido por *Penicillium* (20,51%) e por *Fusarium* (13,68%), dentre outros. No gênero *Aspergillus* foram identificados em nível de espécies, e foram predominantes as pertencentes à seção *Flavi* (61,1%). O *A. flavus* foi a espécie de maior prevalência (34,5%) seguida de *A. parasiticus* (27,1%).

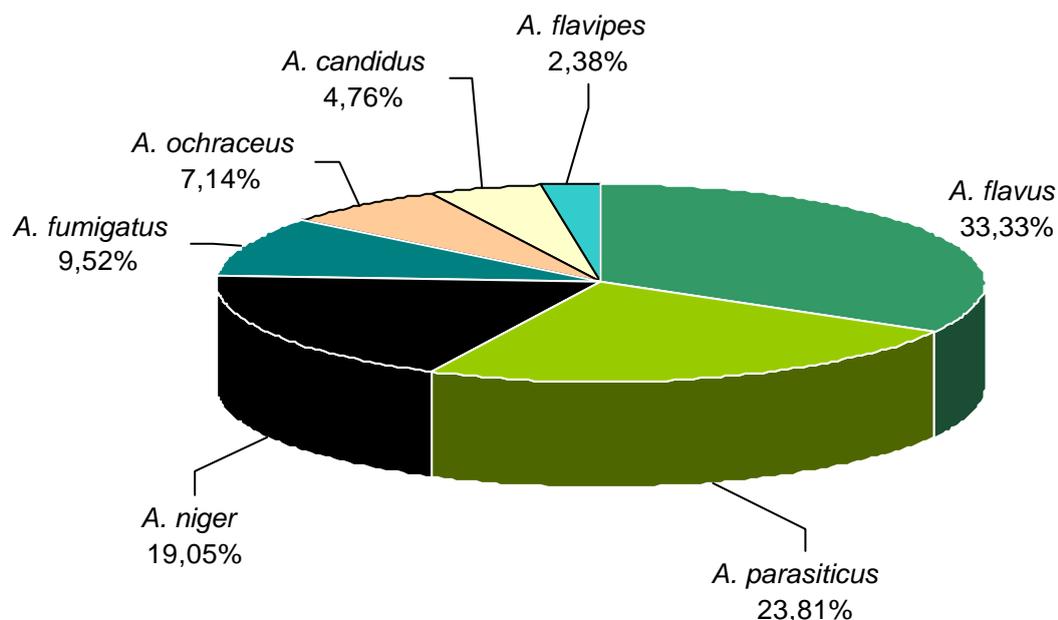
**Tabela 9.** Fungos filamentosos isolados de amostras de rações para alimentação de cães.

Gênero fúngico	Número de isolados	Incidência (%)
<i>Aspergillus sp.</i> e teleomorfos	70	59,82
<i>Penicillium sp.</i>	24	20,51
<i>Fusarium sp.</i>	16	13,68
<i>Cladosporium sp.</i>	5	4,27
Mucorales	2	1,72
Total	117	100,0

Entretanto, outras espécies toxígenas importantes, como o *A. ochraceus*, e patogênicas, como o *A. fumigatus*, foram isoladas em menor incidência (Tabela 10; Figura 11). Estes resultados estiveram de acordo com os resultados observados por DALCERO *et al.* (1997), MAGNOLI *et al.* (1998, 2002), BUENO *et al.* (2001) e MARTINS *et al.* (2003).

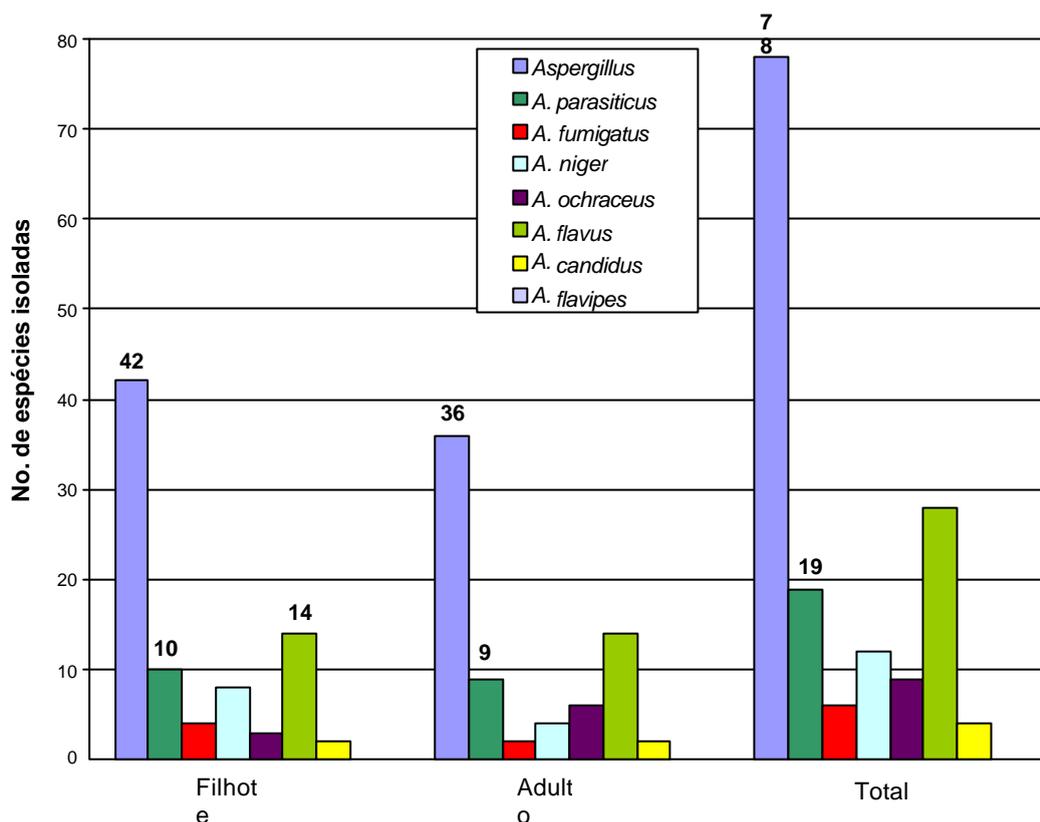
**Tabela 10.** Espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de amostras de rações de cães.

Seção	Número de isolados	Prevalência (%)
<i>Fumigati</i>		
<i>A. fumigatus</i>	04	5,7
<i>Flavipedes</i>		
<i>A. flavipes</i>	01	1,4
<i>Flavi</i>		
<i>A. parasiticus</i>	19	27,1
<i>A. flavus</i>	24	34,5
<i>Nigri</i>		
<i>A. niger</i>	11	15,6
<i>Circundati</i>		
<i>A. ochraceus</i>	07	10,0
<i>Candidi</i>		
<i>A. candidus</i>	04	5,7
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>100,0</b>



**Figura 11.** Frequência relativa das espécies do gênero *Aspergillus*, isoladas a partir de rações destinadas à alimentação de cães filhotes e adultos, comercializadas no estado do Rio de Janeiro.

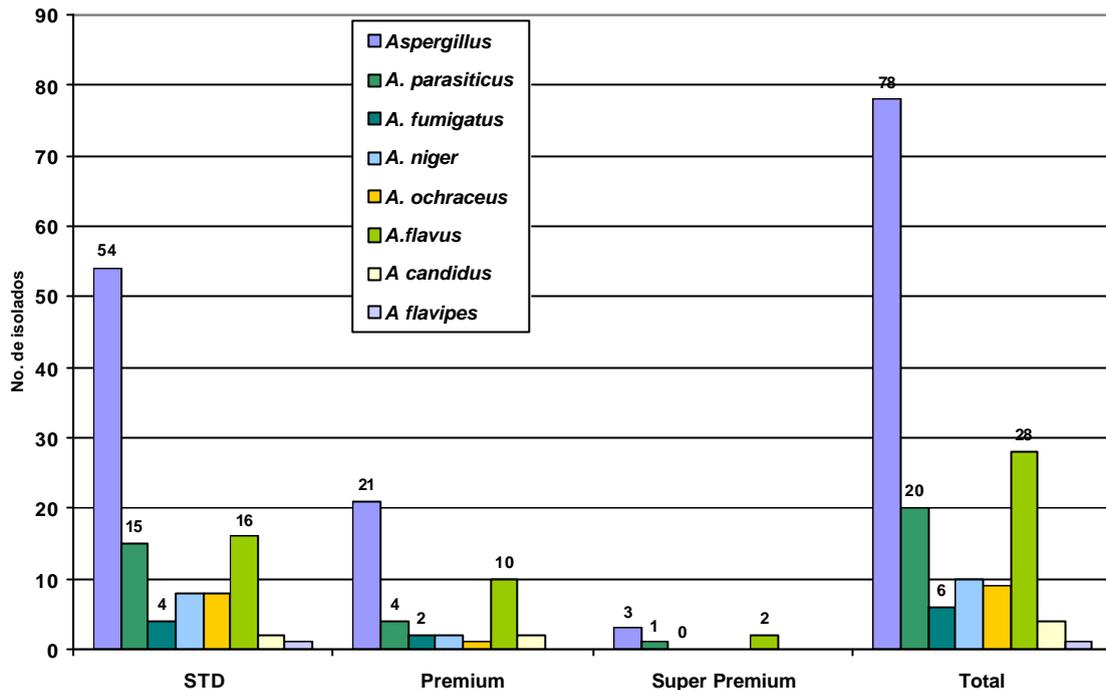
Quando os resultados obtidos foram tabulados levando-se em consideração a finalidade da ração, isto é, amostras destinadas à alimentação de filhotes e amostras para cães adultos, observou-se uma frequência maior de *A. flavus* dentre os isolados (14/42), seguida de *A. parasiticus* (10/42), o que pode ser observado na Figura 12. Ambas as espécies do gênero *Aspergillus* são potencialmente produtoras de aflatoxinas, sendo a primeira produtora de AFB1 e AFB2 e a segunda de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. O *A. flavus* é a espécie que predomina em milho e derivados em função de suas características ecofisiológicas e o *A. parasiticus* é a espécie que predomina em amendoim e derivados (PITT & HOCKING, 1997).



**Figura 12.** Frequência das espécies de *Aspergillus* distribuídas por finalidade de ração para cães.

A análise dos resultados, quando se levou em conta a categoria do produto analisado, revelou que o *A. flavus* foi predominante nas amostras do GS (16/54), seguido pelo *A. parasiticus* (10/16). No GP a frequência do *A. flavus* foi de 10/21 e a de *A. parasiticus* foi de 2/21. No Grupo GSP o *A. flavus* foi isolado duas vezes e o *A. parasiticus* uma vez de um total de três isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* (Figura 13).

A frequência de isolamento de *A. flavus* e *A. parasiticus* também foi proporcional e decrescente, quando se analisou estes resultados com a qualidade das amostras, isto é, a frequência de isolados aflatoxígenos foi maior nos produtos Standard do que nos classificados como Premium ou Super Premium. Este fato reforça a certeza da melhor condição higiênico-sanitária nas amostras pertencentes a estas categorias econômicas mais elevadas no nosso mercado, conforme pode ser avaliado na Figura 13.



**Figura 13.** Frequência de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, isoladas a partir de amostras de rações para cães, agrupadas nas categorias Standard (GS), Premium (GP) e Super Premium (GSP).

MARTINS *et al.* (2003) isolaram e identificaram um número de fungos aflatoxígenos a partir da micobiota de alimentos comerciais para cães e gatos. A espécie prevalente foi *A. flavus* e foi encontrada em 14-16% das amostras em Portugal. Em outro estudo, estes autores identificaram um número significativo de espécies de *Aspergillus* em alimentos similares com umidade na faixa de 20-25% e com quatro semanas de incubação.

Mesmo que a presença de fungos toxicógenos não necessariamente resulta na produção de uma micotoxina, prevenir o crescimento fúngico pode minimizar o risco de uma micotoxicosis. BUENO *et al.* (2001) propuseram que alimentos com um conteúdo de umidade abaixo de 11,5% poderiam inibir o crescimento fúngico nestes insumos.

### c. Micobiota obtida de amostras na linha de produção de uma indústria de rações para cães

Os valores médios de unidades formadoras de colônias, obtidos nas análises micológicas das amostras de ingredientes e de ração, de uma linha de produção em uma indústria de alimentos balanceados para cães, estão apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13, respectivamente, para os meios DRBC, DG18 e Nash-Snyder Ágar.

As maiores contagens médias obtidas foram de: a)  $1,53 \times 10^4 \pm 2,51 \times 10^3$  ufc/g no meio DRBC para as amostras de milho colhidas no terceiro mês; b) de  $7,10 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^3$  ufc/g para as amostras de milho moído; c) de  $5,43 \times 10^4 \pm 3,51 \times 10^3$  para as amostras de farinha de sorgo; e, d)  $2,13 \times 10^4 \pm 6,50 \times 10^3$  ufc/g para amostras de farinha de milho e glúten 21%.

**Tabela 11.** Contagem de colônias de fungos (UFC/g) isoladas no meio diclorán rosa de bengala cloranfenicol (DRBC).

Unidades formadoras de colônias/g (UFC/g) de alimento							
DRBC							
Mês	Milho	Milho moído	Farinha de sorgo	Farinha de milho e glúten (21%)	Farinha de carne e ossos	Farinha de vísceras de aves	Alimento terminado
1	$6,33 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10^3$	$7,10 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^3$	$4,33 \times 10^4 \pm 3,05 \times 10^3$	$1,33 \times 10^4 \pm 3,51 \times 10^3$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$3,66 \times 10^3 \pm 1,15 \times 10^3$
2	$8,33 \times 10^3 \pm 1,15 \times 10^3$	$6,03 \times 10^4 \pm 3,05 \times 10^3$	$5,23 \times 10^4 \pm 3,51 \times 10^3$	$1,16 \times 10^4 \pm 2,51 \times 10^3$	$0,0 \pm 0,0$	$4,66 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$	$6,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$
3	$1,53 \times 10^4 \pm 2,51 \times 10^3$	$3,43 \times 10^4 \pm 1,52 \times 10^3$	$4,13 \times 10^4 \pm 3,51 \times 10^3$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$5,66 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$
4	$7,66 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$	$5,0 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^2$	$2,30 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^3$	$2,13 \times 10^4 \pm 6,50 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
5	$6,66 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10^2$	$2,46 \times 10^4 \pm 1,52 \times 10^3$	$4,83 \times 10^4 \pm 4,93 \times 10^3$	$1,33 \times 10^4 \pm 3,51 \times 10^3$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$1,33 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$
6	$1,26 \times 10^4 \pm 2,30 \times 10^3$	$5,13 \times 10^4 \pm 6,50 \times 10^3$	$4,60 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^3$	$9,33 \times 10^3 \pm 2,88 \times 10^3$	$1,33 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$	$0,0 \pm 0,0$	$5,66 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10^3$
7	$7,33 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$	$4,70 \times 10^4 \pm 1,73 \times 10^3$	$4,83 \times 10^4 \pm 6,65 \times 10^3$	$1,20 \times 10^3 \pm 1,73 \times 10^3$	$5,33 \times 10^3 \pm 1,52 \times 10^3$	$0,0 \pm 0,0$	$3,66 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$
8	$8,66 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$	$5,33 \times 10^4 \pm 5,85 \times 10^3$	$4,86 \times 10^4 \pm 5,77 \times 10^2$	$1,16 \times 10^3 \pm 1,52 \times 10^3$	$0,0 \pm 0,0$	$1,33 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$	$1,33 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$
9	$1,50 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^3$	$5,33 \times 10^4 \pm 1,15 \times 10^3$	$4,80 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^3$	$1,16 \times 10^4 \pm 1,15 \times 10^3$	$0,0 \pm 0,0$	$1,33 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$	$0,0 \pm 0,0$
10	$1,16 \times 10^4 \pm 5,77 \times 10^2$	$4,33 \times 10^4 \pm 4,16 \times 10^3$	$5,43 \times 10^4 \pm 3,51 \times 10^3$	$9,0 \times 10^3 \pm 3,0 \times 10^3$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

**Tabela 12.** Contagem de colônias de fungos (UFC/g) isoladas no meio diclorán glicerol 18% Ágar (DG18).

Unidades formadoras de colônias/g (UFC/g) de alimento							
DG18							
Mês	Milho	Milho moído	Farinha de sorgo	Farinha de milho e glúten (21%)	Farinha de carne e ossos	Farinha de vísceras de aves	Alimento terminado
1	$4.66 \times 10^3 \pm 3.05 \times 10^3$	$7.66 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$2.83 \times 10^5 \pm 5.77 \times 10^3$	$0.0 \pm 0.0$	$1.56 \times 10^4 \pm 1.53 \times 10^3$	$0.0 \pm 0.0$	$3.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$
2	$0.0 \pm 0.0$	$7.33 \times 10^3 \pm 2.08 \times 10^2$	$1.19 \times 10^5 \pm 2.08 \times 10^3$	$0.0 \pm 0.0$	$1.40 \times 10^4 \pm 2.0 \times 10^3$	$2.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$2.66 \times 10^3 \pm 2.08 \times 10^2$
3	$8.33 \times 10^3 \pm 1.15 \times 10^3$	$6.0 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$	$2.08 \times 10^5 \pm 5.77 \times 10^3$	$0.0 \pm 0.0$	$8.0 \times 10^4 \pm 3.6 \times 10^3$	$2.66 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$2.66 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$
4	$2.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$5.33 \times 10^3 \pm 2.08 \times 10^2$	$8.73 \times 10^5 \pm 5.77 \times 10^3$	$5.0 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$	$1.26 \times 10^4 \pm 1.15 \times 10^3$
5	$6.0 \times 10^3 \pm 2.0 \times 10^3$	$0.0 \pm 0.0$	$1.13 \times 10^5 \pm 1.53 \times 10^4$	$1.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$0.0 \pm 0.0$	$1.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$2.66 \times 10^3 \pm 1.53 \times 10^3$
6	$3.33 \times 10^3 \pm 3.21 \times 10^3$	$1.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$1.11 \times 10^5 \pm 2.08 \times 10^3$	$1.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$1.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$1.66 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$3.33 \times 10^3 \pm 1.53 \times 10^3$
7	$0.0 \pm 0.0$	$4.66 \times 10^3 \pm 1.53 \times 10^3$	$9.83 \times 10^5 \pm 5.77 \times 10^3$	$0.0 \pm 0.0$	$1.4 \times 10^4 \pm 1.0 \times 10^3$	$1.66 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$3.0 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$
8	$0.0 \pm 0.0$	$8.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$2.44 \times 10^5 \pm 5.77 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$	$8.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$4.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$4.33 \times 10^3 \pm 1.15 \times 10^3$
9	$5.66 \times 10^3 \pm 1.53 \times 10^3$	$5.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$1.15 \times 10^5 \pm 5.77 \times 10^3$	$2.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$1.33 \times 10^4 \pm 5.77 \times 10^3$	$1.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$1.66 \times 10^3 \pm 1.15 \times 10^3$
10	$1.07 \times 10^4 \pm 1.15 \times 10^3$	$5.33 \times 10^3 \pm 2.52 \times 10^2$	$1.10 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^3$	$1.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$0.0 \pm 0.0$	$1.33 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$	$4.0 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$

**Tabela 13.** Contagem de colônias pertencentes ao gênero *Fusarium* (UFC/g) isoladas no meio de Nash-Snyder (NS).

Unidades formadoras de colônias/g (UFC/g) de alimento							
NS							
Mês	Milho	Milho moído	Farinha de sorgo	Farinha de milho e glúten (21%)	Farinha de carne e ossos	Farinha de vísceras de aves	Alimento terminado
1	0,0 ± 0,0	5,33 x 10 <sup>3</sup> ± 3,51 x 10 <sup>3</sup>	2,34 x 10 <sup>5</sup> ± 1,15 x 10 <sup>3</sup>	2,76 x 10 <sup>4</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	6,0 x 10 <sup>3</sup> ± 1,0 x 10 <sup>3</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2	2,33 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	1,10 x 10 <sup>3</sup> ± 2,64 x 10 <sup>3</sup>	2,04 x 10 <sup>5</sup> ± 5,29 x 10 <sup>3</sup>	2,53 x 10 <sup>4</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
3	0,0 ± 0,0	4,66 x 10 <sup>3</sup> ± 1,15 x 10 <sup>3</sup>	1,61 x 10 <sup>5</sup> ± 4,16 x 10 <sup>3</sup>	2,86 x 10 <sup>4</sup> ± 3,05 x 10 <sup>3</sup>	4,66 x 10 <sup>3</sup> ± 1,15 x 10 <sup>3</sup>	2,66 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	0,0 ± 0,0
4	0,0 ± 0,0	6,33 x 10 <sup>3</sup> ± 1,52 x 10 <sup>3</sup>	2,22 x 10 <sup>5</sup> ± 7,63 x 10 <sup>3</sup>	4,53 x 10 <sup>4</sup> ± 3,05 x 10 <sup>3</sup>	0,0 ± 0,0	4,66 x 10 <sup>3</sup> ± 2,08 x 10 <sup>3</sup>	0,0 ± 0,0
5	1,33 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	5,33 x 10 <sup>3</sup> ± 2,51 x 10 <sup>3</sup>	2,14 x 10 <sup>5</sup> ± 7,57 x 10 <sup>3</sup>	3,66 x 10 <sup>4</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
6	2,66 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	3,66 x 10 <sup>3</sup> ± 1,15 x 10 <sup>3</sup>	2,03 x 10 <sup>5</sup> ± 7,50 x 10 <sup>3</sup>	2,33 x 10 <sup>4</sup> ± 1,15 x 10 <sup>3</sup>	0,0 ± 0,0	1,33 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	0,0 ± 0,0
7	1,33 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	6,0 x 10 <sup>3</sup> ± 1,0 x 10 <sup>3</sup>	2,33 x 10 <sup>5</sup> ± 4,16 x 10 <sup>3</sup>	1,80 x 10 <sup>4</sup> ± 1,0 x 10 <sup>3</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,33 x 10 <sup>3</sup> ± 2,08 x 10 <sup>3</sup>
8	0,0 ± 0,0	6,33 x 10 <sup>3</sup> ± 1,0 x 10 <sup>3</sup>	2,19 x 10 <sup>5</sup> ± 3,05 x 10 <sup>3</sup>	2,53 x 10 <sup>4</sup> ± 1,52 x 10 <sup>3</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup> ± 1,0 x 10 <sup>3</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
9	1,0 x 10 <sup>3</sup> ± 0,0	1,33 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	2,17 x 10 <sup>5</sup> ± 4,16 x 10 <sup>3</sup>	1,63 x 10 <sup>4</sup> ± 1,52 x 10 <sup>3</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,33 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>
10	1,0 x 10 <sup>3</sup> ± 0,0	7,0 x 10 <sup>3</sup> ± 1,73 x 10 <sup>3</sup>	1,99 x 10 <sup>5</sup> ± 4,16 x 10 <sup>3</sup>	1,93 x 10 <sup>4</sup> ± 3,05 x 10 <sup>3</sup>	1,33 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>	0,0 ± 0,0	2,33 x 10 <sup>3</sup> ± 5,77 x 10 <sup>2</sup>

As contagens para fungos xerofílicos realizadas em meio DG18 foram mais elevadas para: a) milho na ordem de  $1,07 \times 10^4 \pm 1,15 \times 10^3$  ufc/g; b) para milho picado em níveis máximos de  $8,33 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$  ufc/g; c) para farinha de sorgo em níveis máximos de  $9,83 \times 10^5 \pm 5,77 \times 10^3$  ufc/g; e, d) farinha de milho e glúten 21% em níveis máximos de  $5,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$  ufc/g.

As contagens obtidas para *Fusarium sp.*, em meio específico de Nash-Snyder Ágar foram de  $2,66 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$  para milho, de  $7,0 \times 10^3 \pm 1,73 \times 10^3$  para milho picado, de  $2,34 \times 10^5 \pm 1,15 \times 10^3$  para farelo de sorgo, de  $2,22 \times 10^5 \pm 7,63 \times 10^3$  para farelo de milho e glúten 21% e de  $5,33 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10^3$  para rações terminadas.

As análises de contagem fúngica dos ingredientes, tanto para fins gerais, como para fins xerofílicos mostraram que os ingredientes utilizados para fabricação de ração estiveram dentro dos limites estabelecidos como padrão de qualidade higiênico-sanitária (GMP, 2005). Os achados para farinha de milho e glúten 21% estão de acordo para com os achados de SCUDAMORE *et al.* (1998) para amostras destes ingredientes estudados no Reino Unido. Os valores encontrados para milho e derivados foram semelhantes àqueles encontrados por DALCERO *et al.* (1997), MAGNOLI *et al.* (1998, 2002), POZZI *et al.* (2002), RIBEIRO *et al.* (2006), FRAGA *et al.* (2007) e KELLER *et al.* (2007).

Foram isoladas 1.114 cepas de fungos filamentosos, sendo o maior número de isolados obtidos de amostras de farinha de sorgo e de farinha de milho e glúten 21% (Tabela 14; Figura 14). O gênero *Aspergillus* foi o gênero prevalente em todos os ingredientes amostrados, apresentando as seguintes frequências: a) 65% para as amostras de milho em grão; b) 73,7% para as amostras de milho moído; c) 75,3% para as amostras de farinha de sorgo; d) 89% para farinha de milho e glúten 21%; e) 60% para farinha de ossos e carne; f) 92% para farinha de vísceras de aves; e, g) 89% para as amostras de ração terminada. A prevalência de espécies do gênero *Aspergillus* esteve em consonância com os achados de DALCERO *et al.* (1997), MAGNOLI *et al.* (1998, 2002), BUENO *et al.* (2001), RIBEIRO *et al.* (2006), FRAGA *et al.* (2007) e KELLER *et al.* (2007). Assim como, estes autores relataram, que a alta frequência e prevalência de espécies potencialmente aflatoxígenas em ingredientes destinados à preparação de ração animal, é um fator de risco.

O ingrediente que mais apresentou espécies fúngicas isoladas e caracterizadas foi o farelo de sorgo. A incidência elevada de espécies potencialmente toxígenas, aliada aos elevados números de contagem fúngica, caracterizaram este ingrediente como a principal fonte de inóculo a ser transferido ao produto final. Diferentemente do que relataram SCUDAMORE *et al.* (1998), que consideraram o glúten de milho como o mais contaminado dentre as amostras de ingrediente. Estes autores também consideraram que as amostras de ração, ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, estiveram mais contaminadas que os ingredientes que a compuseram, quando um estudo foi realizado no Reino Unido.

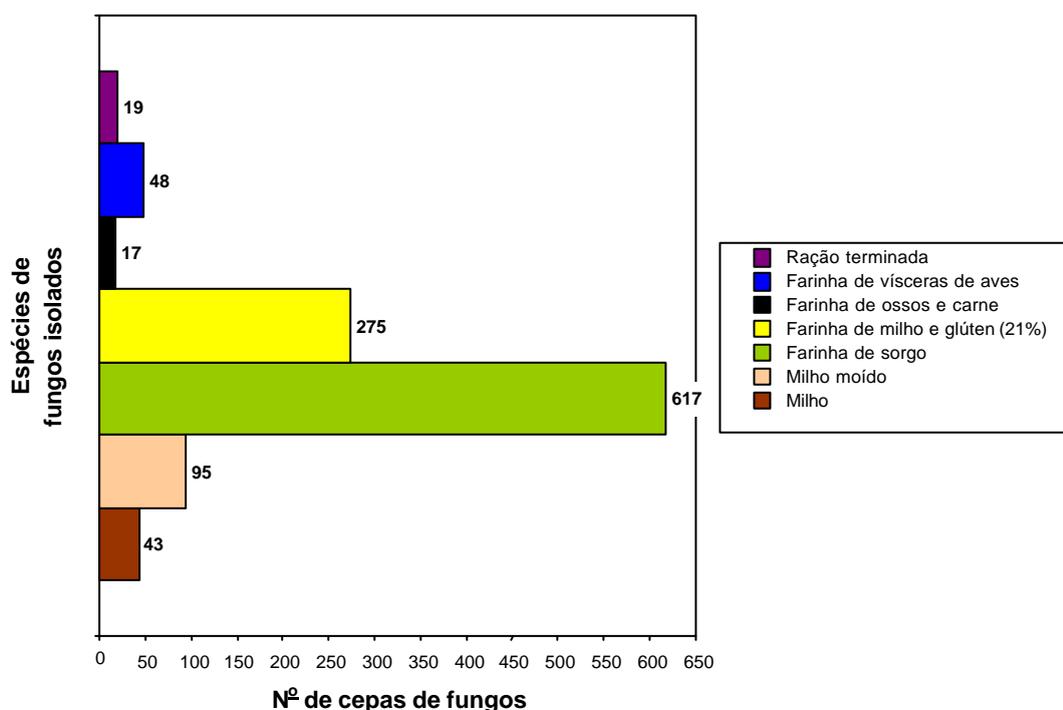
As espécies de *Aspergillus* isoladas foram as de *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Aspergillus sydowii* e *A. versicolor*. A frequência destas espécies variou conforme o substrato isolado, onde *A. flavus* foi mais frequente em amostras de milho (64,1%), farinha de milho (64,2%), farinha de milho e glúten 21% (86%) e em ração terminada (58%). O *A. fumigatus* mostrou-se mais frequente nas amostras de farinha de vísceras de aves (93%), ração terminada (25%) e de farinha de ossos e carne (20%), conforme mostra a Figura 15.

**Tabela 14.** Distribuição dos gêneros de fungos isolados das matérias primas e da ração terminada.

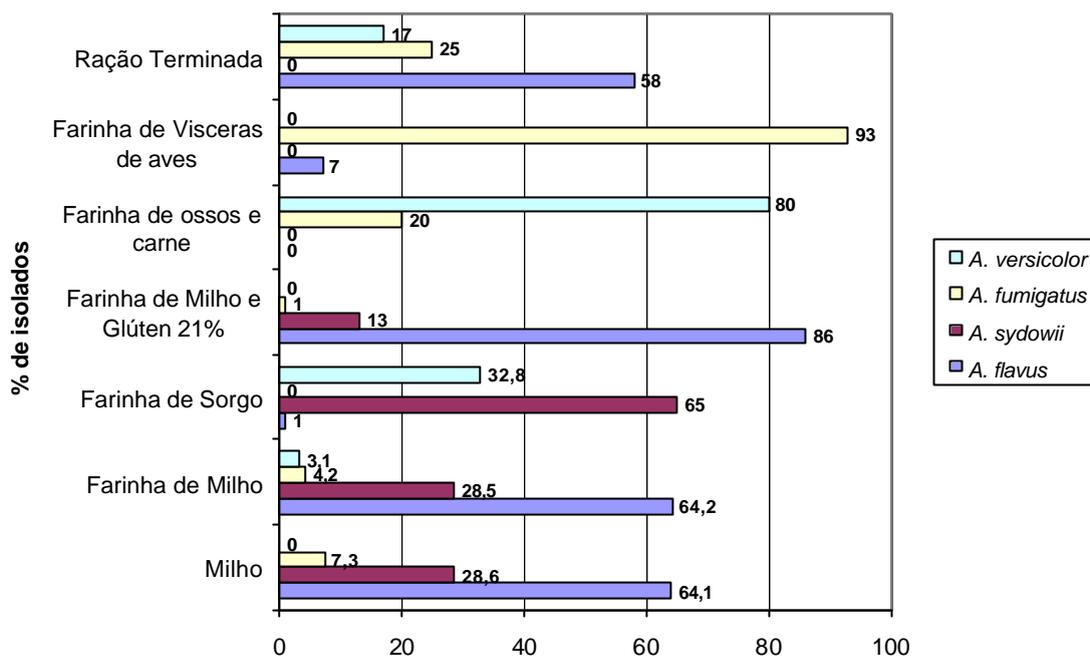
Substrato	Cepas isoladas <sup>1</sup> (%)	Gêneros de fungos	Porcentagem <sup>2</sup> (%)
Milho em grão	43	<i>Aspergillus sp.</i>	65
		<i>Mucor sp.</i>	30,4
		<i>Eurotium sp.</i>	4,6
Milho moído	95	<i>Aspergillus sp.</i>	73,7
		<i>Penicillium sp.</i>	10,5
		<i>Fusarium sp.</i>	10,5
		<i>Acremonium sp.</i>	4,2
		<i>Levedura sp.</i>	1,1
Farinha de sorgo	617	<i>Aspergillus sp.</i>	75,3
		<i>Alternaria sp.</i>	22,3
		<i>Fusarium sp.</i>	2,4
Farinha de milho e glúten (21%)	275	<i>Aspergillus sp.</i>	89
		<i>Fusarium sp.</i>	7,8
		<i>Penicillium sp.</i>	3,2
Farinha de carne e ossos	17	<i>Aspergillus sp.</i>	60
		<i>Fusarium sp.</i>	29
		<i>Levedura sp.</i>	11
Farinha de vísceras de aves	48	<i>Aspergillus sp.</i>	92
		<i>Mucor sp.</i>	4
		<i>Levedura sp.</i>	4
Ração terminada	19	<i>Aspergillus sp.</i>	89
		<i>Levedura sp.</i>	11

<sup>1</sup> Número de cepas isoladas.

<sup>2</sup> Percentagens de amostras de cada gênero presentes nos substratos.



**Figura 14.** Frequência relativa de isolados fúngicos, obtidos a partir de amostras de matérias primas, e da ração terminada em uma linha de produção de alimentos balanceados para cães.



**Figura 15.** Distribuição das espécies do gênero *Aspergillus* isoladas das matérias primas e da ração terminada.

Nestas amostras deste ensaio micológico, não foram detectadas cepas de *A. parasiticus*, mas sim de *A. flavus* que, de acordo com a literatura é a espécie prevalente no milho e derivados, enquanto *A. parasiticus* é mais freqüente e predominante em amostras de amendoim e derivados (OGUNDERO, 1981; BAUDURET, 1990; ASEVEDO *et al.*, 1994; DALCERO *et al.*, 1998; PITT & HOCKING, 1997; BENKERROUM & TANTAOU-ELARAKI, 2001; ROSA, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2006; FRAGA *et al.*, 2007; KELLER *et al.*, 2007).

*A. fumigatus* foi a espécie prevalente em farinha de vísceras de aves e, embora não tenha ainda caráter toxígeno estabelecido, é considerado um dos mais importantes patógenos fúngicos do sistema respiratório e abortivo (CRUZ & ROSA, 1981). Assim, este ingrediente, com os níveis elevados de isolados encontrados, traduz-se em importante fonte de transferência de propágulos fúngicos desta espécie para o produto final que foi a ração terminada.

*Fusarium sp.* não foi freqüente nas amostras de ingrediente e ração analisadas, diferentemente do que observaram (DALCERO *et al.*, 1997; ONO *et al.*, 1999; MAGNOLI *et al.*, 2002; POZZI *et al.*, 2002).

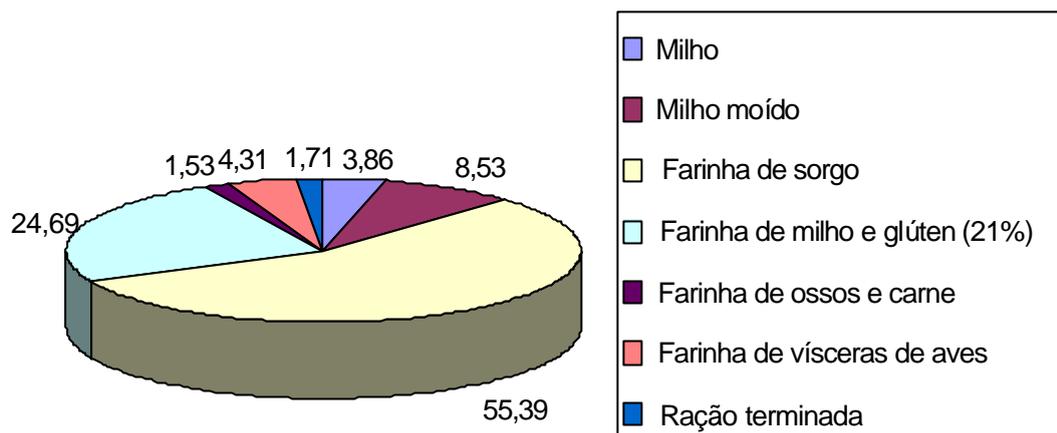
A Tabela 15 apresenta os valores absolutos e relativos da freqüência de isolamentos de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas a partir das amostras de ingredientes e ração terminada.

Nas contagens de unidades formadoras de colônias das amostras analisadas, são consideradas fora do padrão aquelas amostras com contagens de  $10^{-4}$  para cima, sendo alimentos de baixa qualidade higiênica. No presente experimento, utilizando-se o meio de cultura DG18 ficaram acima de  $10^{-4}$ , uma amostra de milho, as 10 amostras de farinha de sorgo e cinco amostras de farinha de carne e ossos. As amostras de milho moído, farinha de milho e glúten 21%, farinha de vísceras de aves e da ração pronta mostraram contagens de  $10^{-3}$  para baixo em todas as 10 amostras analisadas; utilizando-se o meio de cultura DRBC ficaram acima de  $10^{-4}$ , quatro amostras de milho, as 10 amostras de milho moído, as 10 amostras de farinha de sorgo e cinco amostras de

farinha de milho e glúten 21%. As amostras de farinha de carne e ossos, farinha de vísceras de aves e da ração pronta mostraram contagens de  $10^{-3}$  para baixo em todas as 10 amostras analisadas. Utilizando-se o meio de cultura NS ficaram acima de  $10^{-4}$ , as 10 amostras de farinha de sorgo e as 10 amostras de farinha de milho e glúten 21%; as amostras de milho, milho moído, farinha de carne e ossos, farinha de vísceras de ave e ração pronta mostraram contagens de  $10^{-3}$  para baixo em todas as 10 amostras analisadas (Figura 16).

**Tabela 15.** Valores absolutos e frequência relativa de isolamentos de espécies do gênero *Aspergillus*, a partir das amostras de ingredientes e ração terminada, e dentro do gênero por ingredientes vegetais e ração terminada.

Amostras/cepas	Cepas	% do total	% do ingrediente	% do gênero
Milho em grão	43,00	3,86	100,00	
<i>Aspergillus</i>	28,00	2,51	65,12	100,00
<i>A. flavus</i>	18,00	1,62	41,86	64,29
<i>A. sydowii</i>	8,00	0,72	18,60	28,57
<i>A. fumigatus</i>	2,00	0,18	4,65	7,14
<i>A. versicolor</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
Milho moído	95,00	8,53	100,00	
<i>Aspergillus</i>	70,00	6,28	73,68	100,00
<i>A. flavus</i>	45,00	4,04	47,37	64,29
<i>A. sydowii</i>	20,00	1,80	21,05	28,57
<i>A. fumigatus</i>	3,00	0,27	3,16	4,29
<i>A. versicolor</i>	2,00	0,18	2,11	2,86
Farelo de sorgo	617,00	55,39	100,00	
<i>Aspergillus</i>	465,00	41,74	75,36	100,00
<i>A. flavus</i>	4,00	0,36	0,65	0,86
<i>A. sydowii</i>	301,00	27,02	48,78	64,73
<i>A. fumigatus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. versicolor</i>	160,00	14,36	25,93	34,41
Farinha de Milho e Glúten 21%	275,00	24,69	100,00	
<i>Aspergillus</i>	245,00	21,99	89,09	100,00
<i>A. flavus</i>	210,00	18,85	76,36	85,71
<i>A. sydowii</i>	32,00	2,87	11,64	13,06
<i>A. fumigatus</i>	3,00	0,27	1,09	1,22
<i>A. versicolor</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
Ração Terminada	19,00	1,71	100,00	
<i>Aspergillus</i>	17,00	1,53	89,47	100,00
<i>A. flavus</i>	10,00	0,90	52,63	58,82
<i>A. sydowii</i>	3,00	0,27	15,79	17,65
<i>A. fumigatus</i>	4,00	0,36	21,05	23,53
<i>A. versicolor</i>	0,00	0,00	0,00	0,00



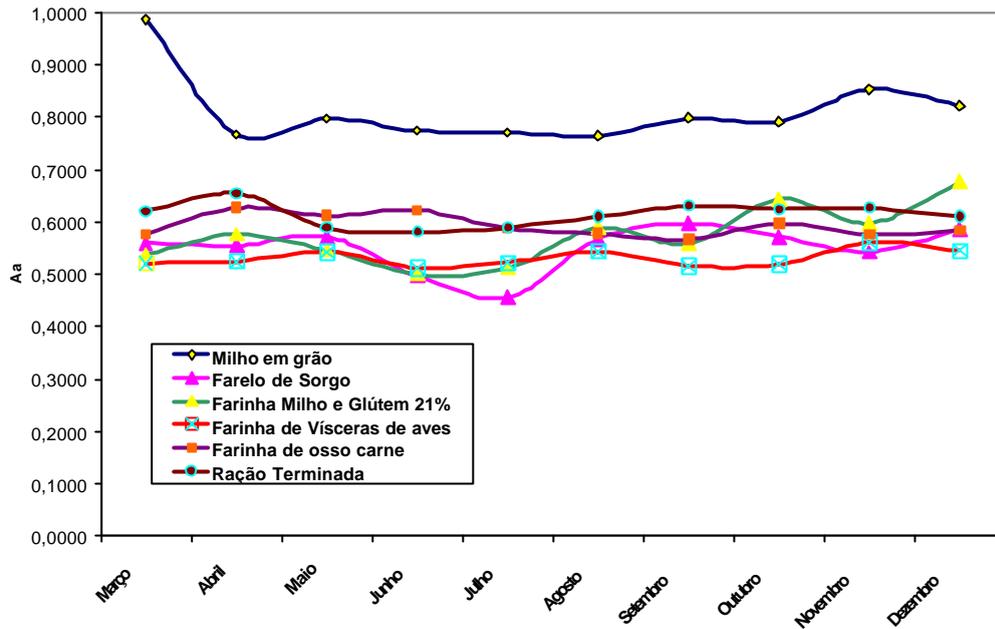
**Figura 16.** Número de espécies fúngicas isoladas de amostras de ingredientes e ração.

A distribuição dos diferentes gêneros fúngicos isolados dos ingredientes e do alimento terminado destinado à alimentação de cães, como mostra a Tabela 15, o número de isolados variou em uma faixa entre 17 e 617 espécies, sendo a farinha de sorgo e a farinha de milho e glúten 21%, os ingredientes com maior número de isolados, embora que no alimento terminado e na farinha de carne e ossos se detectou o menor número de espécies isoladas. Em todas as amostras analisadas se encontraram espécies pertencentes ao menos a um dos principais gêneros toxigênicos, *Aspergillus*, *Penicillium* e/ou *Fusarium*. Em todos os substratos, *Aspergillus* foi o gênero fúngico predominante, com porcentagens de isolamento entre 60 e 92%. Espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* foram isoladas somente a partir do milho moído e farinha de milho e glúten 21% em porcentagens menores de 11%.

#### 4.2 Análise da atividade de água ( $A_a$ ) das amostras de ingredientes utilizados para produção de ração para alimentação de cães

Os valores de atividade de água ( $A_a$ ) verificados nas amostras de ingredientes e rações durante os meses de março a dezembro estão apresentados na Figura 17. Os valores de  $A_a$  para o milho em grão foram os mais elevados durante todo o período de observação, variando de 0,765 a 0,987; os valores de  $A_a$  para amostras de milho moído oscilaram entre 0,501 a 0,677; os valores de  $A_a$  para farelo de sorgo estiveram entre 0,456 a 0,598; a  $A_a$  para amostras de farinha de vísceras de aves esteve entre 0,512 a 0,562; para farinha de carne e ossos os valores de  $A_a$  variam entre 0,567 a 0,628; e, para ração terminada a  $A_a$  variou de 0,581 a 0,685.

Os valores de  $A_a$  obtidos nas amostras coletadas na indústria mostraram que, com exceção das amostras de milho dos meses de março e dezembro, estiveram dentro da faixa de segurança, onde o crescimento fúngico, mesmo das cepas xerofílicas não seriam estimulados (JIMENEZ *et al.*, 1985; LACEY & MAGAN, 1991).



**Figura 17.** Valores de atividade de água observados nas amostras de ingredientes e ração terminada, durante os meses de março a dezembro de 2005.

### 4.3 Avaliação da capacidade aflatoxigenas das espécies isoladas a partir de amostras de rações destinadas à alimentação de cães

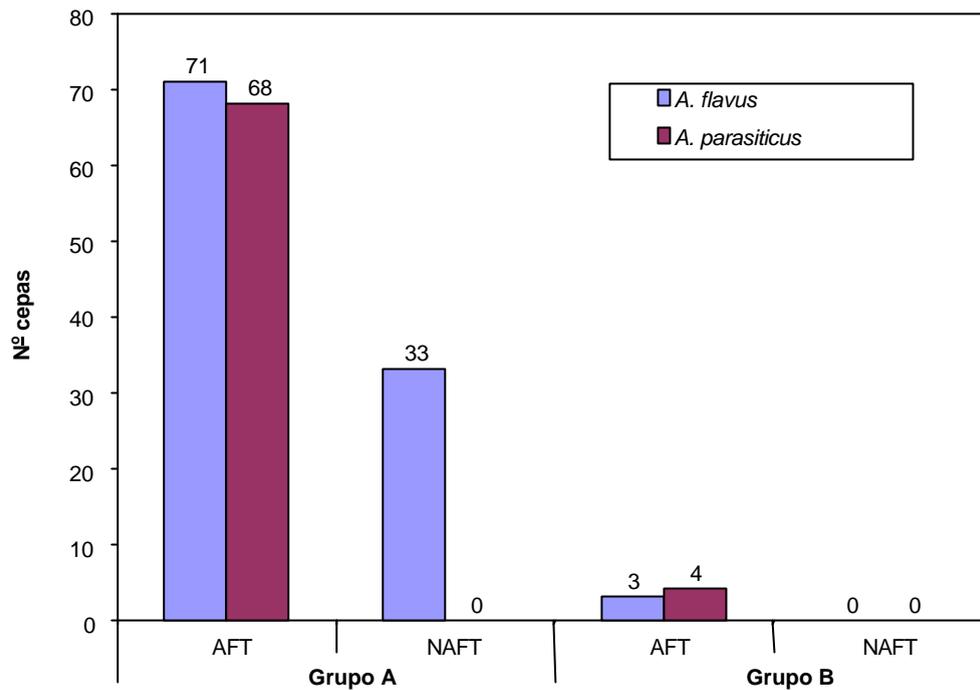
#### 4.3.1 Capacidade aflatoxígena da microbiota isolada de amostras de rações envolvidas em um episódio de intoxicação natural em cães no estado do Rio de Janeiro

A análise da capacidade aflatoxígena foi realizada nas 104 cepas de *A. flavus* isoladas das amostras de ração do grupo A e B e demonstrou que, no grupo A, 68,27% (71/104) das cepas mostraram-se produtoras de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e 31,73% (33/104) mostraram-se não aflatoxígenas. No grupo B, 100% (3/3) das cepas de *A. flavus* foram produtoras de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> (Figura 18).

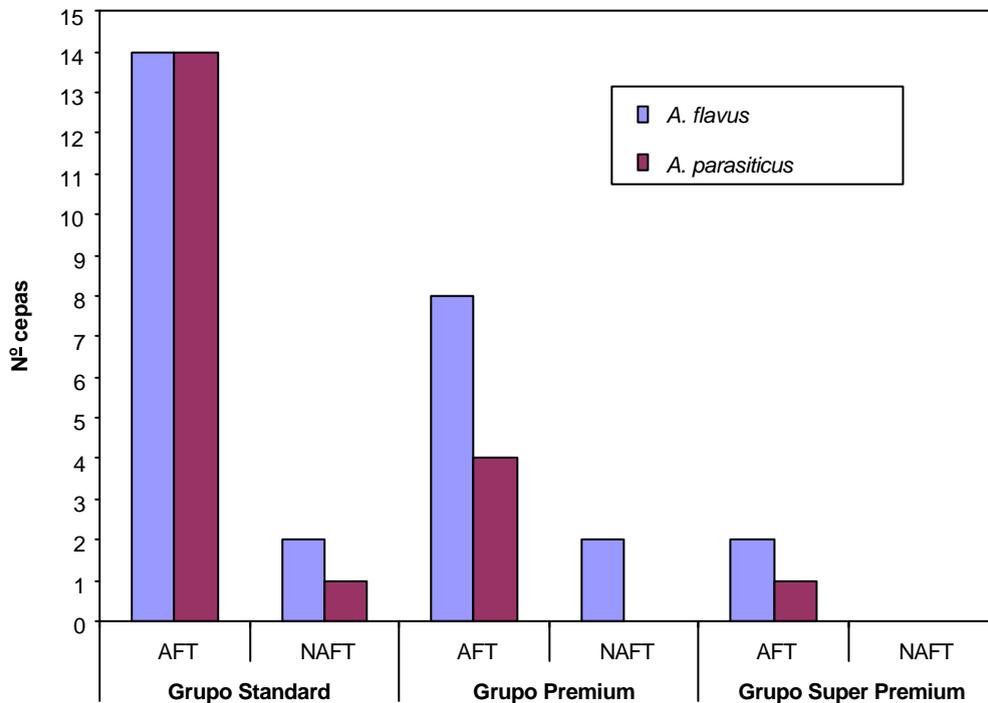
As cepas de *A. parasiticus* isoladas do grupo A (68) e do grupo B (4) mostraram-se 100% produtoras de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (Figura 18).

#### 4.3.2 Avaliação da capacidade aflatoxígena da microbiota isolada das amostras de rações de cães obtidas no comércio do estado do Rio de Janeiro

A avaliação da capacidade aflatoxígena mostrou que as cepas de *A. flavus* foram produtoras de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> em 87,5% (14/16) dos isolados do Grupo Standard (GS), em 80% (8/10) dos isolados do Grupo Premium e em 100% (2/2) dos isolados do Grupo Super Premium. O perfil aflatoxígeno das cepas de *A. parasiticus* mostrou que 93,3% (14/15) foram produtoras de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, quando isoladas de amostras de ração do GS. As cepas de *A. parasiticus* isoladas de amostras do GP (4) e do GSP (1) foram 100% produtoras de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (Figura 19).

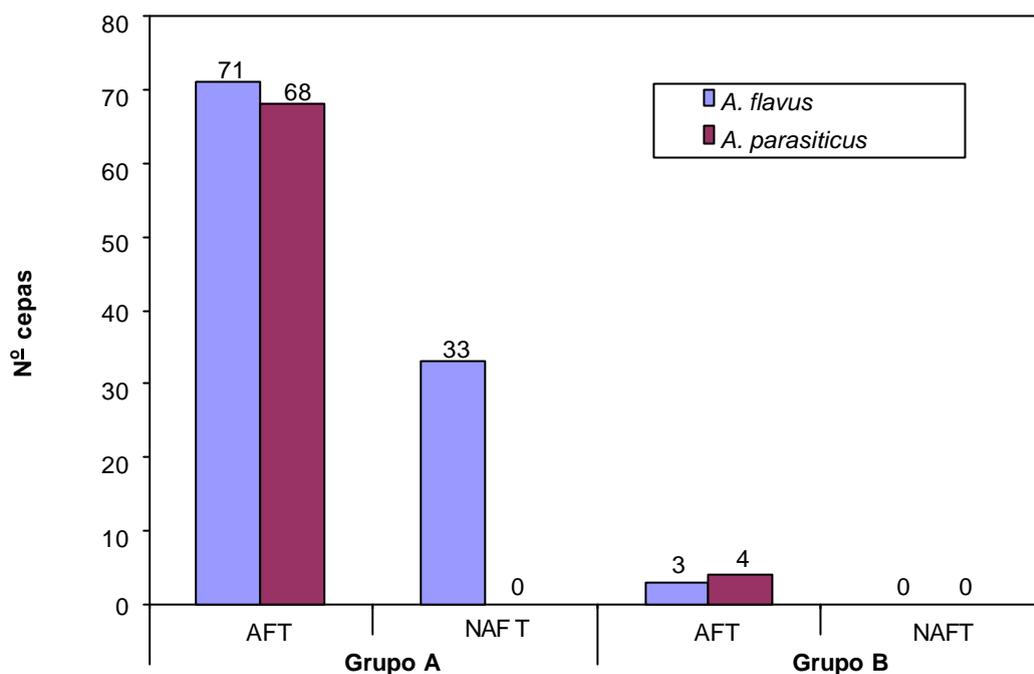


**Figura 18.** Capacidade aflatoxígenas (AFT) das cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, isoladas a partir de amostras de rações envolvidas em episódio de intoxicação natural em cães no estado do Rio de Janeiro.



**Figura 19.** Capacidade aflatoxígenas (AFT) das cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* isoladas a partir de amostras de rações Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro.

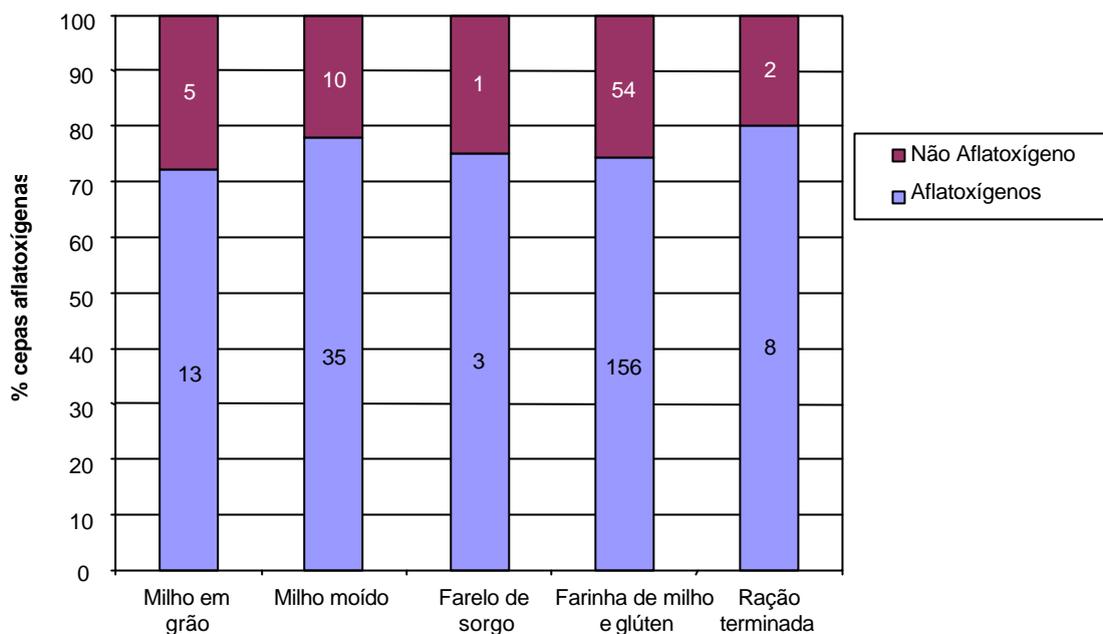
Em termos de finalidade de utilização de ração para cães, isto é, ração para filhotes e para adultos, o perfil da capacidade aflatoxígena das cepas de *A. flavus* observado foi de 85,71% (12/14) de cepas produtoras de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, tanto para filhotes, bem como, para adultos. O perfil da capacidade toxígena do *A. parasiticus* observado foi de 100% (10/10) produtor de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, para amostras de ração para filhotes, e de 88,89% (8/9) de cepas produtoras das quatro aflatoxinas, para rações destinadas à alimentação de adultos (Figura 20).



**Figura 20.** Capacidade aflatoxígenas (AFT) das cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* isoladas a partir de amostras de rações destinadas a filhotes e adultos de categorias Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro.

#### 4.3.3 Avaliação da capacidade aflatoxígena da microbiota isolada de amostras de ingredientes e ração terminada de cães obtida em uma linha de produção de uma indústria

A análise da capacidade aflatoxígena das 287 cepas de *A. flavus*, isoladas de amostras de ingredientes e ração terminada obtida em uma linha de produção industrial, mostrou que 74,9% foram produtoras de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>. Estes valores oscilaram entre 72,2% das cepas isoladas de milho em grão (13/18) a 80% observado em ração terminada (8/10). A Figura 21 mostra os valores absolutos do número de cepas de *A. flavus* aflatoxígenas (AFT) e não aflatoxígenas (NAFT) por ingrediente e ração.



**Figura 21.** Capacidade aflatoxigena (AFT) de cepas de *A. flavus* isolados de amostras de ingrediente e rações para cães obtidas de uma linha de produção industrial.

#### 4.4 Determinação de aflatoxinas em amostras de ração destinadas à alimentação de cães

##### 4.4.1 Determinação de aflatoxinas em amostras de rações envolvidas em um episódio de intoxicação natural em cães no estado do Rio de Janeiro

As análises micotoxicológicas das 117 amostras de ração mostraram a contaminação de 79 (67,52%) das amostras, sendo que todas pertenciam ao Grupo A. As amostras consideradas ND (< 2 ng/g) foram: oito amostras pertenciam ao Grupo A; todas do Grupo B e C.

Os valores de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) detectados variaram de 2,7 a 318 ng/g com média de 109,9 ± 84,6 ng/g e valor do 90º percentil de 225,6 ng/g. A aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) foi detectada em 55,6% das amostras em concentrações que variaram de 4,0 a 86 ng/g, cuja média foi de 23,6 ± 14,6 ng/g e valor do 90º percentil de 37,2 ng/g.

A aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) foi detectada em 19,7% das amostras em concentrações que variaram de 8,0 a 108 ng/g, média de 52,5 ± 22,4 ng/g e valor do 90º percentil de 72,0 ng/g. A aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) teve frequência de 19,7% e apresentou-se em níveis de 4,0 a 24,0 ng/g, valores médios de 10,0 ± 5,6 ng/g e valor do 90º percentil de 17,4 ng/g.

Os valores de aflatoxinas totais (AFTs) observados nas amostras positivas variaram de 2,7 a 482 ng/g com média de 148,3 ± 122,2 ng/g e valor do 90º percentil de 322,2 ng/g. A Tabela 16 apresenta os parâmetros estatísticos dos valores de aflatoxinas observados nas amostras de ração para cães dos Grupos A, B e C analisadas, e mostra todos os valores das concentrações de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> e AFTs), comparado ao limite de tolerância estabelecido pelo MAPA (2007) para rações animais.

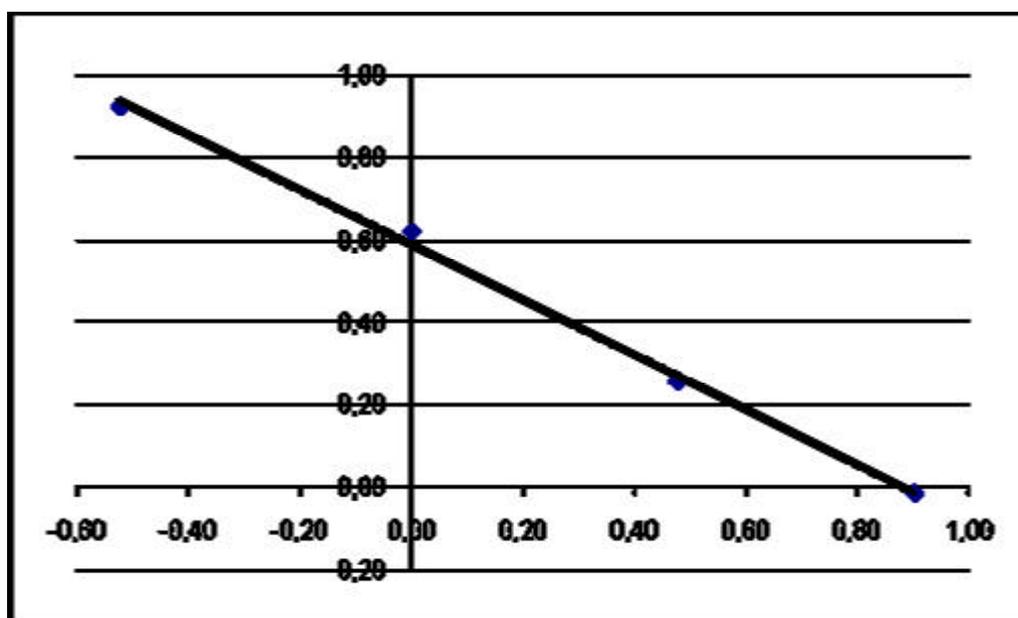
**Tabela 16.** Valores médios dos parâmetros, desvio padrão (SD), mediana, limites inferior e superior, moda e 90° percentil das concentrações de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, detectadas em amostras de ração e alimentos para cães dos Grupos A, B e C.

Parâmetros	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub> (ng/g)	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFTS
Média	109,9	23,6	52,5	10,0	148,3
SD	84,6	14,6	22,4	5,6	122,2
Mediana	96,0	24,0	49,0	8,0	114,0
Limite superior	318,0	86,0	108,0	24,0	482,0
Limite inferior	2,7	4,0	8,0	4,0	2,7
Moda	74,4	9,3	45,0	8,0	83,7
90° percentil	225,6	37,2	72,0	17,4	322,2

Unidades = ng/g.

#### 4.4.2 Determinação de aflatoxinas em amostras de ração para cães obtidas no comércio do estado do Rio de Janeiro

As análises de aflatoxinas totais em amostras de ração para cães obtidas no comércio do estado do Rio de Janeiro foram realizadas por ELISA, cujos valores de calibração estão apresentados na Figura 22. Obteve-se valores de  $R_2 = 0,9973$  (Logit/Log) e de  $R_2 = 0,9737$  (Linear/Log) para os kits comerciais utilizados, quando a concentração dos padrões de aflatoxinas foram de 0, 0,3, 1,0, 3,0 e 8,0 ng/ml.



**Figura 22.** Curva de calibração dos padrões de aflatoxinas para o kit ELISA na concentração de 0, 0,3, 1,0, 3,0 e 8,0 ng/g, onde foram encontrados valores de  $R_2 = 0,9973$  (Logit/Log) e de  $R_2 = 0,9737$  (Linear/Log).

A análise através do método ELISA para aflatoxinas totais das 49 amostras de ração destinadas à alimentação de cães, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro e, que compuseram os grupos Standard (GS), Premium (GP) e Super Premium (GSP), apresentaram-se contaminadas com aflatoxinas totais (AFT) em 35 amostras (71,4%) (Tabela 17).

**Tabela 17.** Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA, em rações Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Grupo Standard	Grupo Premium	Grupo Super Premium	Total das amostras
Positivos/total (N <sup>o</sup> )	27/28	5/12	3/9	35/49
Positivos (%)	96,43	41,66	33,33	71,43
Média	4,62	2,34	0,44	3,50
Desvio padrão	2,34	3,09	0,85	2,84
Limite inferior	>0,3	>0,3	>0,3	>0,3
Limite superior	9,43	8,11	4,2	9,43
90° percentil	7,28	6,32	5,67	7,19

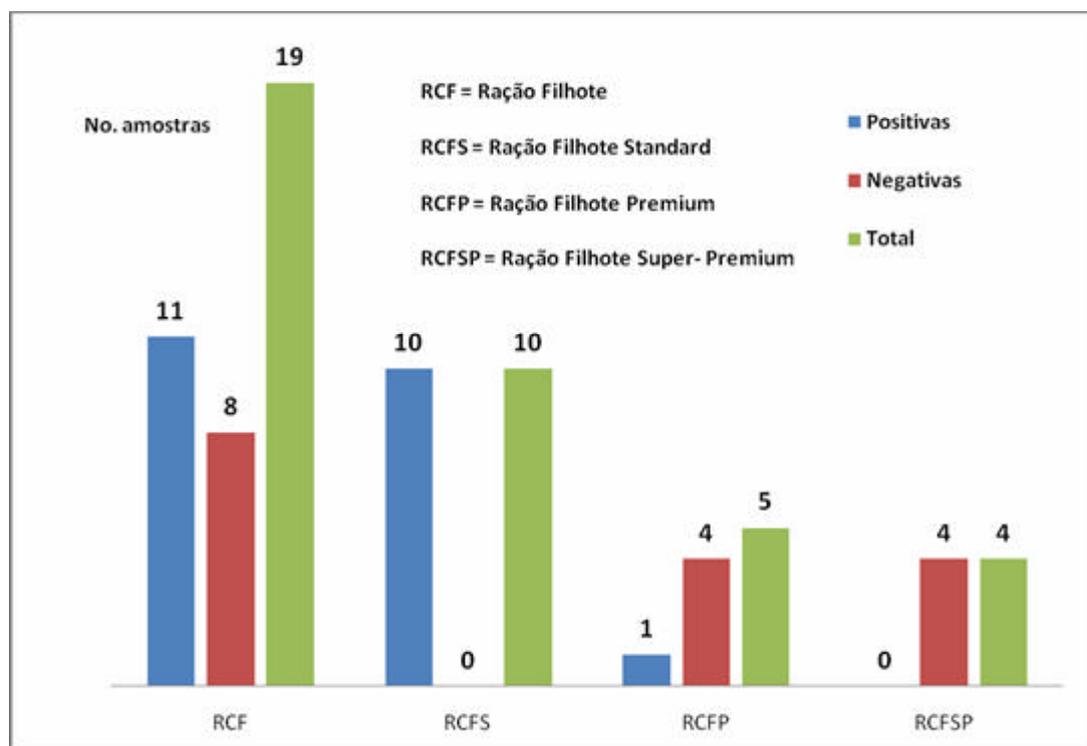
Unidades = ng/g.

A concentração média de aflatoxinas totais em amostras de ração destinadas à alimentação de filhotes foi de  $2,70 \pm 2,55$  ng/g, variando de > 0,3 a 6,94 ng/g em 57,8% das amostras analisadas. As amostras de ração para filhotes do Grupo Standard (RCFS) foram 100% positivas para AFTS, com ocorrência na faixa de 2,37 a 6,94 ng/g, com média de  $4,4 \pm 1,81$  ng/g. As amostras para filhotes do Grupo Premium (RCFP) foram positivas para AFTs em 20% das amostras com níveis variando de > 0,3 a 5,73 ng/g, onde a média deste sub-grupo foi de  $1,38 \pm 2,42$  ng/g. As amostras de ração para filhotes do grupo GSP (RCFSP) foram 100% negativas para aflatoxinas totais (Tabela 18). A Figura 23 apresenta os valores relativos a aflatoxina em amostras e ração para filhotes e seus sub-grupos.

**Tabela 18.** Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA, em rações para filhotes Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro.

Parâmetros	RCF	RCFS	RCFP	RCFSP
Positivo/total (N <sup>o</sup> )	11/19	10/10	1/4	0/4
Positivos (%)	57,9	100	20	0
Média	2,70	4,4	1,39	0
Desvio padrão	2,55	1,81	2,42	0
Limite inferior	> 0,3	2,37	> 0,3	0
Limite superior	6,94	6,94	5,73	0
90º percentil	6,68	6,94	0,3	0

Unidade = ng/g.



**Figura 23.** Número de amostras positivas e negativas para aflatoxinas totais determinadas por ELISA em amostras de ração destinadas à alimentação de filhotes (RCF) dos grupos Standard (RCFS), Premium (RCFP) e Super Premium (RCFSP).

As amostras de ração para adultos apresentaram positividade em 80% das amostras, onde os níveis de AFTs variaram entre > 0,3 a 9,43 ng/g, com média de  $4,0 \pm 2,91$  ng/g. As rações destinadas à alimentação de adultos que compuseram o grupo Standard (RCAS) apresentaram níveis de AFTS de > 0,3 a 9,43 ng/g, em 94,4% das amostras com média de  $4,75 \pm 2,62$  ng/g. As amostras do Grupo Premium para alimentação de adultos (RCAP) foram positivas pra AFTS em 57%, com níveis variando entre > 0,3 a 8,1 ng/g, cuja média foi de  $3,11 \pm 3,4$  ng/g. As amostras do Grupo Super Premium para alimentação de adultos apresentaram níveis de AFTS em > 0,3 a 6,38 ng/g em 60% das amostras com níveis médios de  $2,68 \pm 2,99$  ng/g (Tabela 19).

**Tabela 19.** Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA, em rações para adultos Standard, Premium e Super Premium, adquiridas no comércio do estado do Rio de Janeiro.

Parâmetros	RCA	RCAS	RCAP	RCASP
Positivo/total (N <sup>o</sup> )	24/30	17/18	4/7	3/5
Positivos (%)	80	94,4	57,14	60
Média	4,0	4,74	3,11	2,68
Desvio padrão	2,91	2,61	3,40	2,99
Limite inferior	> 0,3	> 0,3	> 0,3	> 0,3
Limite superior	9,43	9,43	8,11	6,38
90º percentil	7,54	7,66	7,0	6,0

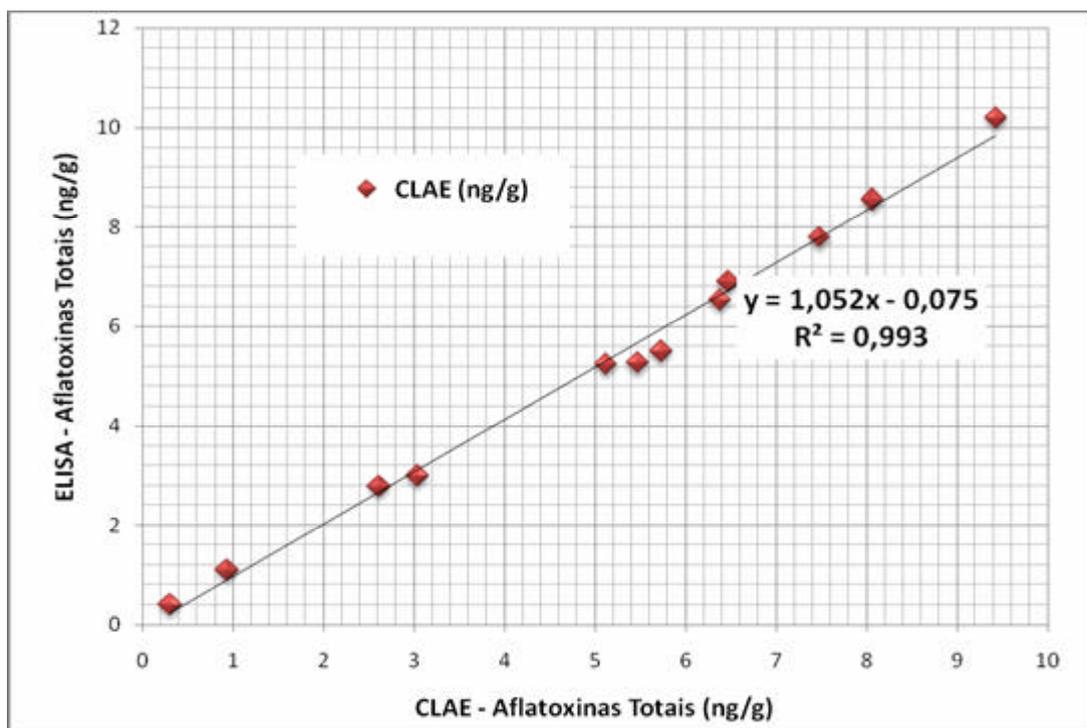
Unidade = ng/g.

A correlação entre as análises realizadas por ELISA e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) mostrou um R<sup>2</sup> de 0,993, conforme a Figura 24.

#### 4.4.3 Determinação de aflatoxinas em amostras de ingredientes e ração para cães obtidas em linha de produção industrial

##### a. Determinação de aflatoxinas em milho como ingrediente para formulação de ração para cães

As análises de aflatoxinas totais em milho por ELISA mostraram que as amostras estiveram contaminadas em 100% (10/10), ocorrendo em níveis de 0,95 a 14 ng/g, com média de  $3,70 \pm 3,79$  ng/g. As análises das amostras por CLAE mostraram a presença de AFB<sub>1</sub> em 100% das amostras em níveis que variaram de 1,18 a 21,8 ng/g, com média de  $4,17 \pm 6,25$  ng/g. A correlação entre os dois métodos mostrou um valor de R<sub>2</sub> = 0,949. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 20 e na Figura 25.

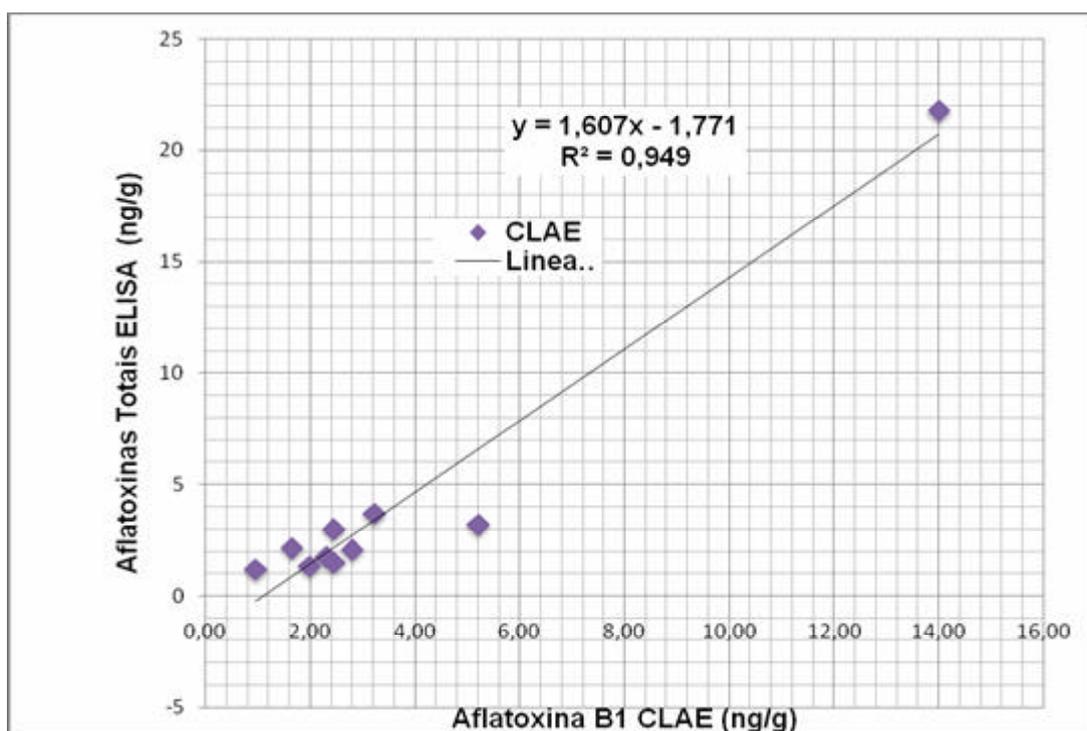


**Figura 24.** Correlação entre os valores obtidos nas análises por ELISA e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

**Tabela 20.** Valores médios, freqüência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em milho como ingrediente de rações para cães.

Ingrediente	Parâmetros	ELISA	CLAE
	Positivo/total (N <sup>o</sup> )	10/10	10/10
	Positivos (%)	100,00	100,00
	Média	3,70	4,17
Milho inteiro	Desvio padrão	3,79	6,25
	Limite inferior	0,95	1,18
	Limite superior	14,00	21,80
	90º percentil	3,20	5,20

Unidade = ng/g.



**Figura 25.** Correlação entre os valores de aflatoxinas totais obtidos por ELISA e os valores de AFB<sub>1</sub> obtidos por CLAE, em amostras de milho como ingrediente de ração para cães.

**b. Determinação de aflatoxinas em milho moído como ingrediente para formulação de ração para cães**

As análises das amostras de milho moído por ELISA mostraram uma contaminação em 100%, onde a concentração de AFTs variou entre 7,08 a 23,1 ng/g, com média de  $14,59 \pm 5,17$  ng/g. A análise das amostras por CLAE evidenciou 100% de contaminação por AFTs que ocorreram na faixa de 8,3 a 24,5 ng/g, cuja média foi de  $15,32 \pm 5,2$  ng/g. A correlação entre os valores determinados pelas duas metodologias mostrou um valor de  $R_2 = 0,976$ . Os parâmetros relativos aos dois métodos estão demonstrados na Tabela 21 e a correlação entre ELISA e CLAE está representada na Figura 26.

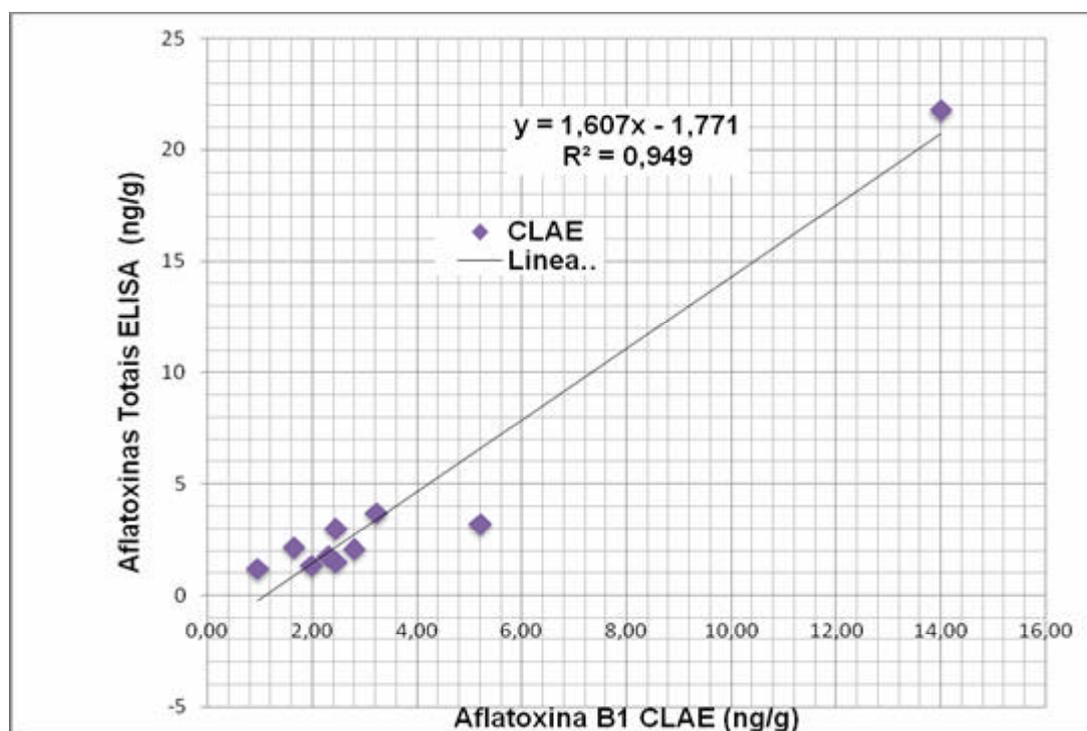
**c. Determinação de aflatoxinas em farelo de milho e glúten 21% como ingrediente para formulação de ração para cães**

As análises de aflatoxinas totais em farelo de milho e glúten 21% por ELISA evidenciaram que as amostras estavam contaminadas em 70% (7/10), ocorrendo em níveis de  $< 0,3$  a 12,9 ng/g, com média de  $4,30 \pm 4,9$  ng/g. As análises das amostras por CLAE mostraram a presença de AFB<sub>1</sub> em 50% das amostras em níveis que variaram de  $> 0,1$  a 13,3 ng/g, com média de  $4,1 \pm 6,0$  ng/g. A correlação entre os dois métodos mostrou um valor de  $R_2 = 0,947$ . Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 22 e a correlação esta representada na Figura 27.

**Tabela 21.** Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em milho moído como ingrediente de rações para cães.

Ingrediente	Parâmetros	ELISA	CLAE
	Positivo/total (N <sup>o</sup> )	10/10	10/10
	Positivos (%)	100	100
	Média	14,59	15,32
Milho moído	Desvio padrão	5,17	5,2
	Limite inferior	7,08	8,3
	Limite superior	23,1	24,5
	90° percentil	19,7	21,1

Unidades = ng/g.

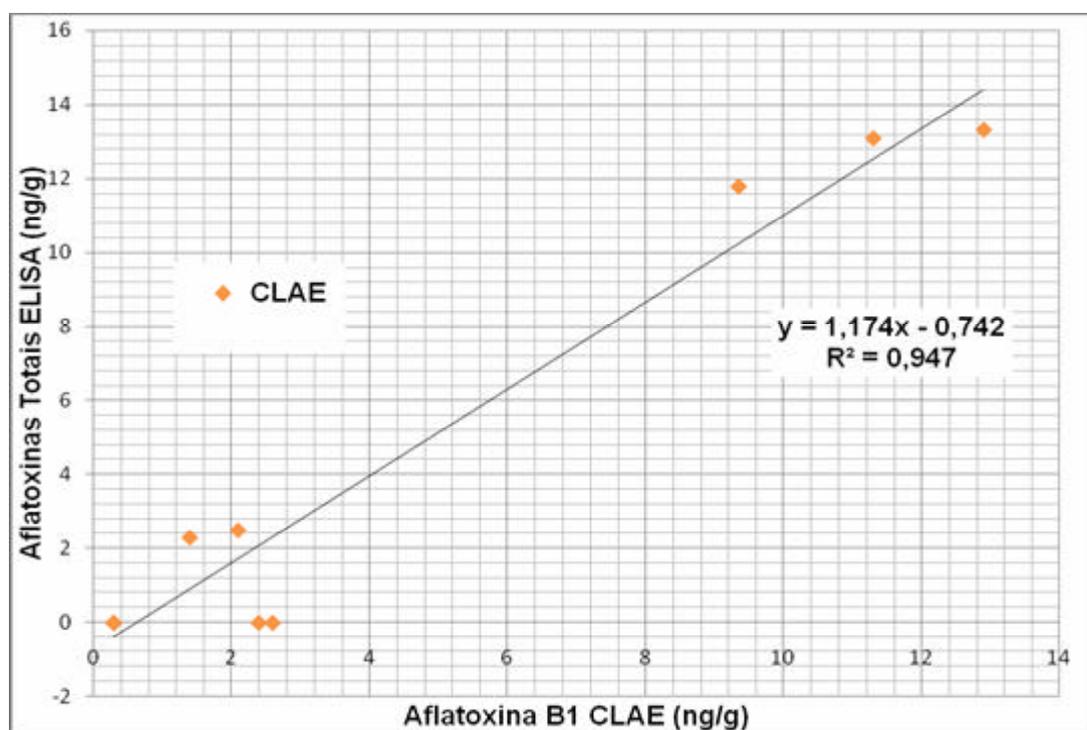


**Figura 26.** Correlação entre os valores de aflatoxinas totais obtidos por ELISA e os valores de AFB<sub>1</sub> obtidos por CLAE, em amostras de milho moído como ingrediente de rações para cães.

**Tabela 22.** Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em farelo de milho e glúten 21% utilizado como ingrediente de rações para cães.

Ingrediente	Parâmetros	ELISA	CLAE
Farelo de milho e glúten 21%	Positivo/total (N <sup>o</sup> )	7/10	5/10
	Positivos (%)	70	50
	Média	4,3	4,08
	Desvio padrão	4,9	6,03
	Limite inferior	< 0,3	0,1
	Limite superior	12,9	13,33
	90° percentil	11,3	13,1

Unidades = ng/g.



**Figura 27.** Correlação entre os valores de aflatoxinas totais obtidos por ELISA e os valores de AFB<sub>1</sub> obtidos por CLAE, em amostras de farelo de milho e glúten 21%, utilizados como ingrediente de rações para cães.

#### d. Determinação de aflatoxinas em farelo de sorgo como ingrediente para formulação de ração para cães

As análises de aflatoxinas totais em farelo de sorgo por ELISA evidenciaram que as amostras estavam contaminadas em 90% (9/10), ocorrendo em níveis de < 0,3 a 17,9 ng/g, com média de  $12,8 \pm 5,23$  ng/g. As análises das amostras por CLAE mostraram a presença de AFB<sub>1</sub> em 100% das amostras em níveis que variaram de 0,1 a 23,8 ng/g, com média de  $17,4 \pm 7,1$  ng/g. A correlação entre os dois métodos mostrou um valor de  $R_2 = 0,883$ . Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 23 e a correlação está representada nas Figuras 28 e 29.

**Tabela 23.** Valores médios, frequência absoluta e relativa, e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em farelo de sorgo utilizado como ingrediente de rações para cães.

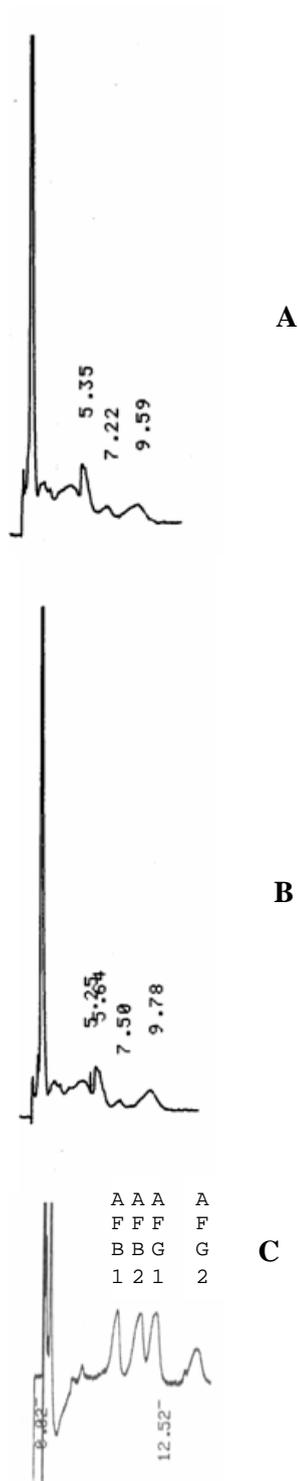
Ingrediente	Parâmetros	ELISA	CLAE
	Positivo/total (N <sup>o</sup> )	9/10	9/10
	Positivos (%)	90	90
	Média	12,79	17,36
Farelo de Sorgo	Desvio padrão	5,23	7,1
	Limite inferior	0,00	0,1
	Limite superior	17,90	23,8
	90º percentil	16,40	23,8

Unidades = ng/g.

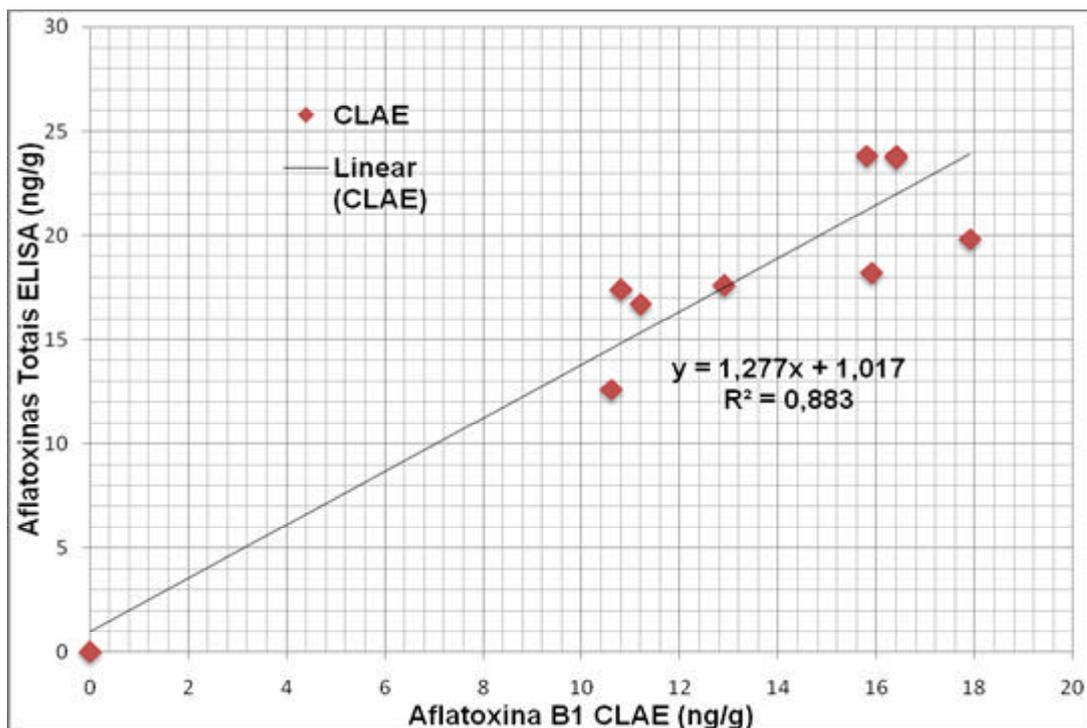
#### e. Derminação de aflatoxinas em ração termina da

As análises de aflatoxinas totais em ração terminada por ELISA evidenciaram que as amostras estavam contaminadas em 20% (2/10), ocorrendo em níveis de 2,3 e 2,4 ng/g. As análises de aflatoxina B<sub>1</sub> nas amostras por CLAE, demonstraram que não havia contaminação (< 0,1 ng/g). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 24.

Os ingredientes, principalmente milho e derivados, têm sido incriminados como fontes de micotoxina em ração animal, principalmente aquelas destinadas à alimentação de cães e gatos (SCUDAMORE *et al.*, 1997; GARLAND & REAGOR, 2001; HENKE *et al.*, 2001; MAIA & SIQUEIRA, 2002). Os resultados deste trabalho mostraram-se de acordo com estes autores, entretanto os valores detectados foram baixos e em sua maioria detectados em amostras de milho e derivados.



**Figura 28.** Cromatogramas em fase normal de sílica gel e detecção por ultravioleta (350 nm); cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de ingredientes: A. amostra de sorgo (S6) com pico de AFB<sub>1</sub> em RT = 7,22; B. amostra de sorgo (S7) com pico de AFB<sub>1</sub> em RT = 7,5; e, C. padrão de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.



**Figura 29.** Correlação entre os valores de aflatoxinas totais obtidos por ELISA e os valores de AFB<sub>1</sub> obtidos por CLAE, em amostras de farelo de sorgo como ingrediente de rações para cães.

**Tabela 24.** Valores médios, frequência absoluta e relativa e parâmetros estatísticos referentes à contaminação por aflatoxinas totais determinadas por ELISA e por CLAE, em ração terminada para cães.

Ingrediente	Parâmetros	ELISA	CLAE
	Positivo/total (N <sup>o</sup> )	2/10	0/10
	Positivos (%)	20	0
	Média	4,3	0
Ração terminada	Desvio padrão	4,9	0
	Limite inferior	> 0,3	> 0,1
	Limite superior	12,9	-
	90º percentil	-	-

Unidades = ng/g.

## 4.5 Episódio de intoxicação natural aguda de cães por aflatoxinas

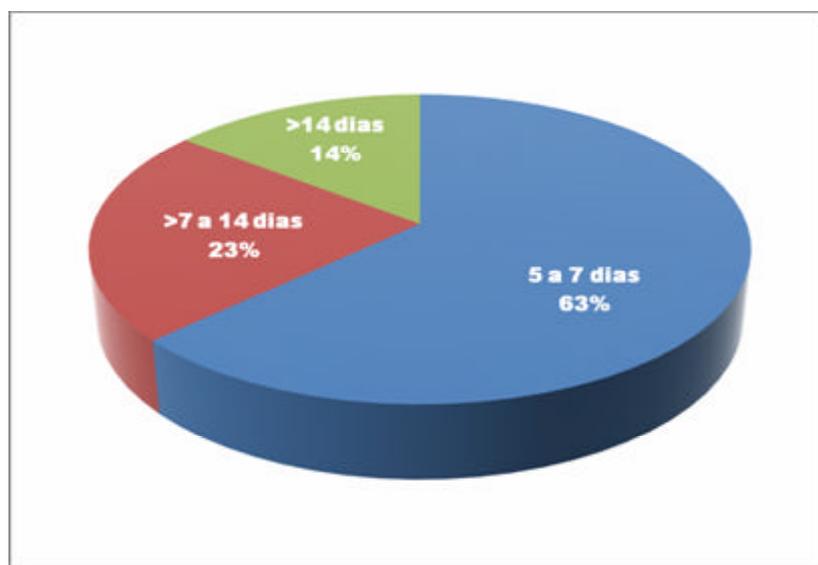
As análises cromatográficas das amostras de ração do grupo A, envolvidas com quadro de intoxicação aguda, mostraram níveis de aflatoxinas totais variando de 2,7 a 482 ng/g, com média de  $148,3 \pm 122,2$  ng/g, conforme relatado anteriormente no item 4.4.1.

Segundo relatos de médicos veterinários de clínicas particulares e do Serviço de Patologia Animal do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (IMMVJV), localizado em São Cristovão, Rio de Janeiro, RJ, houve mais de 480 mortes. O Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ pode acompanhar, em conjunto com o Serviço de Patologia Animal do IMMJV, 62 casos com anamnese, acompanhamento clínico e *post mortem*.

### 4.5.1 Quadro evolutivo

Os sintomas observados foram de anorexia, depressão, poliúria (urina de cor escura), polidipsia, manifestações hemorrágicas, tais como: petéquias, equimoses cutâneas, epistaxe, melena, diátese hemorrágica terminal, icterícia, convulsão, coma e morte. A taxa de morbidade foi de 100% e a de mortalidade estimada em 83%.

Os sinais e sintomas ocorreram entre 5 a 14 dias após o consumo de ração suspeita do Grupo A. Os animais (39) evoluíram para a morte de 5 a 7 dias; outros 14 cães vieram a óbito no lapso de > 7 a 14 dias e nove cães morreram com mais de 14 dias (Figura 30).



**Figura 30.** Quadro evolutivo com morte dos 62 animais observados.

### 4.5.2 Bioquímica sérica

As análises bioquímicas séricas de animais intoxicados foram fornecidas por clínicas veterinárias particulares e foram referentes a 25 casos clínicos, dos 62 casos acompanhados. A Tabela 25 apresenta os valores bioquímicos séricos colecionados dos 25 cães.

**Tabela 25.** Valores médios de parâmetros bioquímicos séricos de 25 cães naturalmente intoxicados por aflatoxinas em rações do Grupo A.

Período	N <sup>o</sup>	Parâmetro				
		ASAT	ALAT UI/ml <sup>1</sup>	$\gamma$ -GT	FAS	Bilirrubina mg/dl
Normalidade		14,1 (10 a 21)	20 (14 a 40)	0,92 (0 a 2,26)	0,85 (0,71 a 1,5)	0,13 (0 a 0,37)
5 a 7 dias	12	114 $\pm$ 26	429 $\pm$ 53	8,23 $\pm$ 1,5	4,24	8,76 $\pm$ 0,97
>7 a 14 dias	5	232 $\pm$ 35	345 $\pm$ 34	13,4 $\pm$ 3,18	6,98	6,78 $\pm$ 0,97
> 14 dias	8	186 $\pm$ 19	306 $\pm$ 112	6,4 $\pm$ 4,3	9,12	3,14 $\pm$ 2,18

<sup>1</sup> Unidades Sigma-Frankel ou Unidades Sigma/ml.

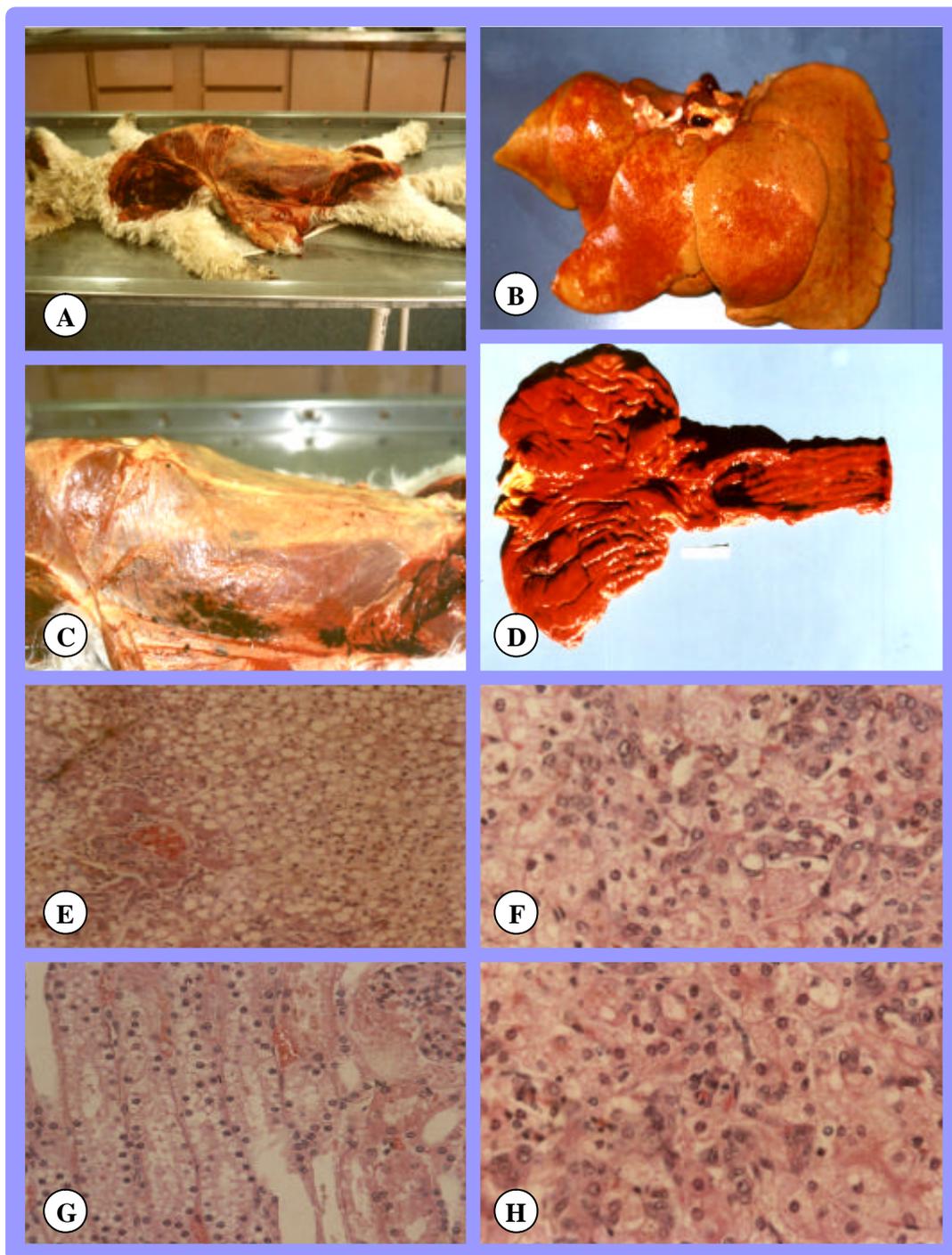
### 4.5.3 Achados de necropsia (macroscopia)

A maioria dos animais necropsiados apresentou icterícia (Figura 31), petéquias e/ou sufusões em diversos tecidos e órgãos, principalmente no subcutâneo, serosas, estômago, intestinos, pulmões, coração e linfonodos. Observou-se hidrotórax e hidroperitônio de caráter moderado a acentuado, constituído de líquido transparente e, por vezes amarelado. Fígado com bordos aumentados, superfície levemente rugosa, de consistência ora normal, ora levemente diminuída, de tonalidade amarelo pardacenta, com focos avermelhados em padrão noz-moscada (Figura 31). Observou-se edema de parede de vesícula biliar em poucos casos. Rins com superfície castanho-avermelhada, por vezes com superfície de corte levemente amarelada.

### 4.5.4 Achados histopatológicos

As lesões mais significativas foram observadas em nível hepático que exibiu quadro de hepatite aguda, sub-aguda ou crônica, em função a diferentes concentrações de aflatoxinas em diferentes períodos de exposição. Nos casos considerados agudos, a hepatite foi do tipo esteatohepatite, onde predominaram alterações degenerativas e colestáticas. Havia tumefação turva e esteatose predominantemente microvacuolar e, mais raramente macrovacuolar, de distribuição centrolobular e mediazonal, algumas vezes pan-acinar, poupando a faixa estreita de hepatócitos na periferia do lóbulo. A necrose não foi um componente. Houve infiltrado inflamatório de leve a moderado, multifocal de mononucleares portal ou parenquimatoso, exibindo por vezes raros neutrófilos. Bilestase intracelular e canalicular em graus variados; congestão difusa e pequena hemorragia centrolobular.

A hepatite crônica observada (> 14 dias) exibia proliferação de ductos biliares, de moderada a acentuada, no espaço porta e intralobular e de fibroblastos, de leve a moderada, no espaço porta e por vezes estendendo-se ao parênquima. Estas proliferações determinaram, geralmente, alterações importantes na arquitetura hepática que exibia aspecto lobulado. Na hepatite sub-aguda foram encontradas características intermediárias entre as formas anteriormente descritas, sendo que a proliferação de ductos e de fibroblastos foi menos intensa.



**Figura 31.** Achados de necropsia e histopatologia em Canino com Aflatoxicose. A-C = Animal necropsiado mostrando icterícia, petéquias e/ou sufusões. B = Fígado com bordos aumentados, superfície rugosa, de consistência ora normal, ora levemente diminuída, de tonalidade amarelo pardacenta, com focos avermelhados em padrão nozmoscada. D = Estômago com hemorragia da mucosa. E-F-H = Hepatite aguda foi do tipo esteatohepatite, onde predominaram alterações degenerativas e colestáticas (HE 200x); G = Rins com degeneração vacuolar e presença de pigmento biliar em graus variados no epitélio tubular (HE 200x).

Os rins mostraram degeneração vacuolar e presença de pigmento biliar em graus variados no epitélio tubular, por vezes observou-se discreta necrose tubular. Presença de cilindros pigmentados, congestão difusa e pequenas áreas de hemorragia. Houve, geralmente, acúmulo de material amorfo eosinofílico na cápsula de Bowman.

As rações que alimentaram os animais acometidos no episódio de intoxicação natural no Rio de Janeiro, continham níveis de aflatoxinas totais dentro de valores semelhantes aos estabelecidos e detectados por BASTIANELLO *et al.* (1986), KELLERMAN *et al.* (1988), GARLAND & REAGOR (2001) e BÖHN & RAZZAI-FAZELI (2005). Os sintomas clínicos observados foram semelhantes aos relatados por estes autores, entretanto houve diferenças quanto ao tempo de exposição às aflatoxinas na ração.

As análises bioquímicas séricas dos animais envolvidos neste episódio, mostraram elevados níveis de Alanina Aminotransferase (ALAT), Fosfatase Alcalina (FAS), Gama-Glutamil Transferase (gGT) e Bilirrubina Total (BT), e foram semelhantes aos relatados por GARLAND & REAGOR (2001).

As lesões macroscópicas e os achados histopatológicos, principalmente aqueles observados no fígado, foram compatíveis com aqueles relatados na literatura por GARLAND & REAGOR (2001) e BÖHN & RAZZAI-FAZELI (2005).

Os cães estão expostos através da inclusão acidental de milho e derivados contaminados nos processos da manufatura do alimento balanceado (BAYLEY & GROTH, 1959; BASTIANELLO *et al.*, 1986; STENSKE *et al.*, 2006), ou em alguns casos, devido à preparação inadequada de alimentos dos animais de forma caseira (KETTERER *et al.*, 1975; GREENE *et al.*, 1977; LIGGETT *et al.*, 1986). Um problema relevante no aparecimento de casos de aflatoxicoses consiste na persistência de seus sintomas durante vários meses antes de serem diagnosticados, podendo estar afetados um grande número de animais (BASTIANELLO *et al.*, 1986; FDA, 2005). Os achados e sintomas descritos na evolução crônica da aflatoxicose humana e animal por CARVALHO *et al.* (2000), só encontraram similar em fígados de bovinos intoxicados por plantas dos gêneros *Senecio*, *Crotalina* e outros, cujos princípios ativos (fitotoxinas) são alcalóides pirolizidínicos. Assim, os diagnósticos precoces da incidência das aflatoxinas nos alimentos balanceados de cães são cruciais para o controle desta patologia.

## 5 CONCLUSÕES

### 5.1 Intoxicação natural

Os estudos histopatológicos e bioquímicos dos órgãos dos animais afetados evidenciaram a *causa mortis* (aflatoxicose), como também os estudos micotoxicológicos realizados: a carga fúngica e os níveis de aflatoxinas encontrados foram superiores aos permitidos pelas regulamentações nacionais e internacionais em vigência.

### 5.2 Alimentos balanceados comerciais de diferentes qualidades

Os alimentos estudados pertencem a distintas qualidades, de acordo com a composição e processamento recebidos. Segundo os estudos realizados, são alimentos aptos para o consumo, entretanto, potencialmente de risco em condições de armazenamento inadequado:

- a carga fúngica, mesmo que não superando os níveis permitidos, aumentou em função da diminuição da qualidade do alimento em estudo;
- os gêneros prevalentes incluíram espécies toxicógenas, entre as quais, mais de 80% de *A. flavus*/*A. parasiticus* foram capazes de produzir aflatoxinas;
- a incidência natural de aflatoxinas nas amostras analisadas estava dentro dos níveis permitidos.

### 5.3 Ingredientes e alimentos terminados da linha de produção

Alguns ingredientes analisados, principalmente aqueles compostos por milho, não estiveram dentro dos valores de ufc/g e aflatoxinas permitidos pela legislação. Mesmo que a ração terminada tenha estado dentro do requerido pela regulamentação, provavelmente pelo processamento recebido, esta representou um risco potencial, já que mais de 80% das espécies de *A. flavus*, prevalentes na ração, foram capazes de produzir aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, D. Development of molds, mycotoxins and odors in moist cereals during storage. In: CHELKOWSKI, J. (Org.). **Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Amsterdam: Developments in Food Science, 1991. p. 119-147.

ABRAMSON, D.; SINHA, R. N.; MILLS, J. T. Mycotoxin formation in HY-320 wheat during granary storage at 15 and 19% moisture content. **Mycopathologia**, v. 11, p. 181-189, 1990a.

ABRAMSON, D.; MILLS, J. T.; SINHA, R. N. Mycotoxin production in amber durum wheat stored at 15 and 19% moisture content. **Food Addit. Contam.**, v. 7, p. 617-627, 1990b.

ALEXOPOLUS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: Jhon Wiley and Sons Inc., 1996. 254 p.

AOAC. **Official methods of analysis of the association of AOAC international**. 17 ed. Maryland: AOAC Internacional, 2000. 55 p.

ASEVEDO, I. G.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C. R.; ALMEIDA, R. M. A.; SOUZA, V. M. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. Isolates from stored maize. **Rev. Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 46-50, 1994.

BARNETT H. L.; HUNTER B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1990. 370 p.

BASTIANELLO, S. S.; NESBIT, J. W.; WILLIAMS, M. C.; LANGE, A. L. Pathological findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 54, p. 635-640. 1986.

BAUDURET, P. A mycological and bacteriological survey of on feed ingredients and mixed poultry feeds in Reunion Island. **Mycopathologia**, v. 109, p. 157-164, 1990.

BAYLEY, W. S.; GROTH, A. H. The relationship of hepatitis X in dogs and moldy corn poisoning of swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 134, p. 483-486, 1959.

BENKERROUM, S.; TANTAOUI-ELARAKI, A. Study of toxigenic moulds and mycotoxins in poultry feeds. **Rev. Med. Vet.**, v. 152, n. 4, p. 335-342, 2001.

BETINA, V. Mycotoxins as secondary metabolites. In: Betina V. (Org.). **Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects**. New York: Elsevier, 1989. p. 25-47.

BLOUNT, W. P. Turkey X disease. Turkeys. **J. Brit. Turkey Fed.**, v. 9, n. 2, p. 52-77, 1961.

- BÖHN, J.; RAZZAI-FAZELI, E. Effects of mycotoxins on domestic pet species. In: DIAZ, D. (Org.). **The mycotoxin blue book**. Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 77-91.
- BONDY, G. S., PESTKA, J. J. Immunomodulation by fungal toxins. **J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.**, v. 3, p.109-143, 2000.
- BOST, J.; GASTIELLU, J. Chronic aflatoxicosis in dog. Experimental study of a collective intoxication. **Rev. Med. Vet.**, v. 51, p. 355-357, 1976.
- BOUTRIF, E.; CANET, C. Mycotoxin prevention and control. FAO programs. **Revue Méd. Vét.**, v. 149, p. 681-694, 1998.
- BUENO, D. J.; SILVA, J. O.; OLIVER, G. Mycoflora in commercial pet foods. **J. Food Prot.**, v. 64, p. 741-743, 2001.
- BULLERMAN, L. B.; SCHROEDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **J. Food Prot.**, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.
- CAMPBELL, I. M. Secondary metabolism and microbial physiology. **Adv. Microbiol. Physiol.**, v. 25, p. 198-201, 1984.
- CANDLISH, A. A. G.; FARAJ, M. K.; HASSAN, G.; SMITH, J. E. Immunoaffinity column chromatography for detection of total aflatoxins in experimental situations. **Biotechnol. Tech.**, v. 5, p. 317-322, 1991.
- CARVALHO, E. C. Q.; TORTELLY, R; MACHADO, M. E. S. Distrofia hepática na aflatoxicose canina. **R. Bras. Ci. Vet.** , v. 7, n.3, p. 186-187, 2000.
- CAST. Mycotoxins. Economic and health risks. In: **Task Force Report 116**. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 1989. 199 p.
- CRUZ, L. C. H.; ROSA, C. A. R. Aborto micótico em bovinos. Considerações sobre o diagnóstico e revisão de literatura relevante. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 4, n. 1, p. 16-19, 1981.
- DALCERO, A. M.; MAGNOLI, C.; CHIACCHERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, p. 179-184, 1997.
- DALCERO, A. M.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; REYNOSO, M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 141, p. 37-43, 1998.
- DUNKEL, F. V. The stored grain ecosystem. **J. Stored Prod. Res.**, v. 28, p. 73:87, 1992.

DUNKEL, F. V.; WITTENBERG, T. P.; REID, N. R.; MUNYARUSHOKA, E. **National storage survey of beans and sorghum in Rwanda**. Minnesota: Minn. Agr. Res. St. Univ. of Minnesota, 1986. 205 p

EL-BANNA, A. A.; PITT, J. I.; LEISTNER, L. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 10, p. 42-46, 1987.

FAO. **Worldwide regulations for mycotoxins 1995 - A compendium**. Rome: FAO Food and Nutrition, 1997. v. 64.

FDA. **FDA issues consumer alert on contaminated pet food**. Washington: U. S. Food and Drug Administration (FDA), 2005. 888 p.

FLANNINGAN, B. Primary contamination of barley and wheat grain by storage fungi. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 71, p. 37-42, 1978.

FLEURAT-LESSARD, F. Qualitative reasoning and integral mangment of the quality of stored grain: a promising new approach. **J. Stored Prod. Res.**, v. 38, p. 191-218, 2002.

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. **Vet. Res. Com.**, v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.

FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O. *Terverticillate penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production. **Mycologia**, v. 81, p. 837-861, 1989.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E. B.; ARARI, D. K. (Org.). **Handbook of applied mycology: "Mycotoxins in ecological systems"**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.32-57.

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue Méd. Vét.**, v. 149, p. 549-554, 1998.

GAMS, W.; SAMSON, R. A. Typification of *Aspergillus* and related teleomorphic genera. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Org.). **Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics**. New York: Plenum Press, 1985. p. 23-30.

GARLAND, T.; REAGOR, J. C. Chronic canine aflatoxicosis and management of an epidemic. In: KOE, W.; SANSON, R.; VAN EGMOND, H.; GILBERT, J.; SABINO, M. (Org.). **Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the milenium**. Netherlands: Ponsen & Looyen, 2001. p. 231-236.

GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxycirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** , v.62, p. 579-585, 1979.

GMP. **Regulations on product standards in the animal feed sector**. Neederland: Den Haag, 2005. 25 p.

GONZÁLES, M.; RODRIGUEZ, M. E. Z.; JACOBO, J. L.; HERNANDEZ, F.; AACOSTA, J.; MARTINEZ, O.; SIMPSON, J. Characterization of mexican isolates of *Colletotrichum lidemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. **Phytopathology**, v. 88, p. 292-299, 1998.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. **J. Food Prot.**, v. 58, p. 1395-1404, 1995.

GREENE, C. E.; BARSANTI, J. A.; JONES, B. D. Disseminated intravascular coagulation complicating aflatoxicosis in dogs. **Comell Vet.**, v. 67, p. 29-69, 1977.

HAGIWARA, M. K.; KOGIKA, M. M.; MALLUCELLI, B. Disseminated intravascular coagulation in dog with aflatoxicosis. **J. Small Anim. Pract.**, v. 31, p. 239-243, 1990.

HENKE, S. E.; BALLARDO, V. C.; MARTINEZ, B.; BALLEY, R. Survey of aflatoxin concentration in wild bird seed purchased in Texas. **J. Wildlife Dis.**, v. 37, p. 831-835, 2001.

HILL, R. A.; LACEY, J. Factors determining the mycoflora of stored barley grain. **Ann. Appl. Biol.**, v. 102, p. 467-483, 1983.

HUSSEIN, S. H.; BRASSEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

IARC. Summaries & Evaluation. Rugolysin. **Int. Ag. Res. Câncer**, v. 40, p. 99, 1986.

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.

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. **Vet. Res. Com.**, v. 31, p. 621-630, 2007.

KELLERMAN, T. Z.; COETZER, J. A. W.; NAUDÉ, T. W. **Plant poisonings and mycotoxins of livestock in Southern Africa**. Cape Town: Oxford University, 1988. 450 p.

KETTERER, P. J.; WILLIAMS, E. S.; BLANEY, B. J.; CONNOLE, M. D. Canine aflatoxicosis. **Aust. Vet. J.**, v. 51, p. 355-357, 1975.

KLICH, M. A.; PITT, J. Y. **A laboratory guide to commom *Aspergillus* species and their teleomorphs**. Austrália: Academic Press, 1988. 549 p.

KOE, W. J. Regulations of the European Union for mycotoxins in foods. **Arch. Hig. Rada. Toksikol.**, v. 50, p. 37-46, 1999.

KRISHNAMACHARI, K. A.; BHAT, R. V.; NAGARAJAN, V.; TILAK, T. B. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. **Lancet**, v. 1, p. 1061-1063, 1975.

KROGH, P. Ochratoxins in food. In: KROGH, P. (Org.). **Mycotoxins in food**. London: Academic Press, 1987. p. 97-121.

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 88**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 161-168.

LACEY, J.; HILL, S. T.; EDWARDS, M. A. Micro-organisms in stored grains: their enumeration and significance. **Trop. Stored Prod. Inf.**, v. 39, p. 19-33, 1980.

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.

LIGGETT, A. D.; COLVIN, B. M.; BEAVER, R. W.; WILSON, D. M. Canine aflatoxicosis: a continuing problem. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 28, p. 428-430, 1986.

LINDBLAD, C.; BRUBEN, L. **Small farm grain storage**. 3. ed. Washington: VITA Publications, 1980. 250 p.

LINSELL, C. A.; PERRS, F. G. Aflatoxins and liver cell cancer. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, v. 71, p. 471-473, 1977.

LOPÉZ-GARCIA, R.; PARK, D. L. Effectiveness of postharvest procedures in management of mycotoxin hazards. In: SINHA, K. K.; BHATNAGAR, D. (Org.). **Mycotoxins in agriculture and food safety**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998. p. 407-433.

MADHYASTHA, S. M.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A.; PLATFORD, G.; ABRAMSON, D. Effects of different cereals and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *A. alutaceus* and *P. verrucosum*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 38, p. 1506-1510, 1990.

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.

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. **Mycot. Res.**, v. 18, p. 8-22, 2002.

MAIA, P. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in some Brazilian pet foods. **Food Addit. Contam.**, v. 19, n. 12, p. 1180-1183, 2002.

MALLOCH, D.; CAIN, R. F. New species and combinations of cleistothecial ascomycetes. **Can. J. Bot.**, v. 50, p. 61-72, 1972.

MAPA. **Contribuição das câmaras setoriais e temáticas à formulação de políticas públicas e privadas para o agronegócio.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2007.

MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M.; BERNARDO, F. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. **Rev. Port. Cienc. Vet.**, v. 98, p. 179-183, 2003.

MAYNARD, L. A.; LOOSLI, J. K.; HINTZ, H. F.; WARNER, R. G. **Nutrição Animal.** 3. ed. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos S.A., 1984. 726 p.

MITCHELL, 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.

MOSS, M. O. Mycotoxins. centenary review. **Mycol. Res.**, v. 100, p. 513-523, 1996.

MURRAY, M. G.; PARKER, J. L.; HAY, G. **The healing power of foods.** Rocklin: Prima Publishing, 1997. 120 p.

NEAL, G. E. Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity. **Revue Méd. Vét.**, v. 149, p. 555-560, 1998.

NEWBERNE, J. W.; BAILEY, W. S.; SEIBOLD, H. R. Notes on a recent outbreak and experimental reproduction of hepatitis X in dogs. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, v. 127, p. 59-62, 1955.

NEWBERNE, P. M.; RUSSO, R.; WOGAN, G. N. Acute toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in the dog. **Pathol. Vet.**, v. 3, p. 331-340, 1966.

NEWBERNE, P. M.; WOGAN, G. N. Sequential morphologic changes in aflatoxin B carcinogenic in the rat. **Cancer Res.**, v. 28, p. 700-181, 1968.

NORTH, M. O.; BELL, D. D. **Manual de producción avícola.** 3. ed. México: Editorial El Manual Moderno, 1993. 816 p.

NORTHOLT, M. D.; VAN EGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E. Penicilic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **J. Food Prot.**, v. 42, p. 476-484, 1979.

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.

OGUNDERO, V. W. Cultural and nutritional studies of zoopathogenic fungi associated with livestock feeds in Nigeria. **Z. Allg. Mikrobiol.**, v. 21, p. 255-259, 1981.

OGUNDERO, V. W. Toxigenic fungi and deterioration of Nigeria poultry feeds. **Mycopathologia**, v. 100, p. 75-83, 1987.

OMINSKI, K. H.; MARQUARDT, R. R.; SINHA, R. N.; ABRANSOM, D. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L (Org.). **Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin**. Minnesota: Eagan Press, 1994. p. 287-312.

ONO, E. Y. S.; SUGUIRA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAI, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 147, p. 139-148, 1999.

ONYEKWEODIRI, E. O.; SHOYINKA, S. V. O. Clinicopathology of interaction between Aflatoxin and Aspergillosis in chickens. **Vet. Bul.**, v. 58, n. 2, p. 1470-1478, 1988.

OSWALD, I. P.; COMÈRA, C. Immunotoxicity of mycotoxins. **Revue. Méd. Vet.**, v. 149, p. 585-590, 1998.

OSWEILER, G. D. Mycotoxins contemporary issues of food animal health and productivity. **Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.**, v. 16, p. 511-530, 2000.

PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 257-265, 1988.

PEERS, F. G.; GILMAN, G. A.; LINSELL, C. A. Dietary aflatoxins and human liver cancer. A study in Swaziland. **Int. J. Cancer**, v. 17, p. 167-176, 1976.

PELHATE, J. Ecology of the mycoflora of grains and seeds. In: MULTON, J. (Org.). **Preservation and storage of grains, seeds and their by-products**. New York: Lavoisier Publishing, 1988. p. 244-262.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bull. World Health Organ**, v. 77, p. 754-766, 1999.

PIMENTEL, D. World resources and food losses to pests. In: GORHAM J. R. (Org.). **Ecology and management of food industry Pests**. Arlington: FDA Tech. Bull. 4. Assoc. Off. Anal. Chem., 1991. p. 5-11.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **Br. Med. Bull.**, v. 56, p. 184-192, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. Austrália: CSIRO Division of Food Science and Technology Sydney Accademic, Press, 1997. 920 p.

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.

POZZI, C. R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C. P.; CHACON-RECHE, N. O.; MEIRELLES, M. C. A. Post harvested and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Addit. Contam.**, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.

POZZI, C. R.; POZZI, J. R. A.; JÚNIOR, I. A.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação das fumonisin. **Ciênc. Rural**, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

QUINN, G. P.; KEOUGH, M. J. **Experimental design data analysis for biologists**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 154 p.

RAMOS, A. J.; HERNÁNDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means hydrated sodium calcium aluminosilication addition to feedstuffs. A review. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 65, p. 197-206, 1997.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Willians & Wilkins, 1965. 686 p.

RIBEIRO, A. M.; KOZAKIEWICZ, A. P.; RYAN, Z.; LUKE, M.; BUDDIE, B.; VENÂNCIO, A. L.; KELLEY, J. N. Fungi in bottled water: a case study of a production plant. **Rev. Iberoamer. Micol.**, v. 23, n. 3, p. 139-144, 2006.

ROSA, C. A. R. **Micobiota toxígena 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.

SAMSON, R. A. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its telemorphs. In: BENNETT J. W.; KLICH M. A. (Org.). ***Aspergillus: the biology and industrial applications***. Bulteworth, Heineman, Stoneman, London: Academic Press, 1992. p. 353-388.

SAMSON, R. A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S. **Introduction to food-borne fungi**. 3. ed. The Netherlands: Central Bureau Voor Schimmel Culturs, 1988. 299 p.

SCOTT, P. M.; TRUCKSESS, M. W. Application of immunoaffinity columns to mycotoxins analysis. **J. AOAC Int.**, v. 80, p. 941-949, 1997.

SCUDAMORE, K. A.; HETMANSKI, M. T.; NAWAZ, S.; NAYLOR, J.; RAINBIRD, S. Determiation of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. **Food Addit. Contam.**, v. 14, p. 175-186, 1997.

SCUDAMORE, K. A.; NAWAS, S.; HETMANSKI, M. T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Addit. Contam.**, v. 15, p. 30-55, 1998.

SEIBOLD, H. R.; BAILEY, W. S. An epizootic of hepatitis in the dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 127, p. 59-62, 1952.

SHARMA, M.; MÁRQUEZ, C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. **Anim. Feed. Sci. Technol.**, v. 93, p. 109-114, 2001.

SHOTWELL O. D.; HESSELTINE, I.; STUBBLEFIELD, D. Production of aflatoxin on rice. **Ap. Microbiol.**, v. 14, p. 425-428, 1966.

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. **J. Food. Prot.**, v. 49, p. 608-614, 1986.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins: Formation, analysis and significance**. New York: Jhon Wiley and Sons. 1985. 143 p.

STENSKE, K. A.; SMITH, J. R.; NEWMAN, S. J.; NEWMAN, L. B.; KIRK, C. A. Aflatoxicosis in dogs and dealings with suspected contaminated commercial foods. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 228, p. 1686-1691, 2006.

STEYN, P. S. The biosynthesis of mycotoxins. **Revue Méd. Vét.**, v. 149, p. 469-478, 1998.

TRUCKSSES, M. W.; SRACK, M. E.; NESHEIM, S.; ALBERT, R.; ROMER, T. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: Collaborative study. **J. AOAC Int.**, v. 6, p. 1512-1521, 1994.

TURNER, W. B.; ALDRIDGE, D. C. **Fungal metabolites II**. London: Academic Press, 1983. 455 p.

VAN EGMOND, H. P. Mycotoxins: regulation, quality assurance and reference materials. **Food Addit. Contam.**, 12:321-330, 1995.

VAN RENSBURG, S. J.; COOK-MOZUFFARI, P.; VAN SCHALKWYK, D. J.; VAN DER WATT, J. J.; VICENT, T. J.; PURCHASE, I. F. Hepatocelular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and transkei. **Br. J. Cancer.**, v. 51, p. 713-726, 1985.

VINING, L. C. Functions of secondary metabolites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 44, p. 395-427, 1992.

WOOD, G. E.; TRUCKSSES, M. W. Regulatory control programs for mycotoxin contaminated food. In: SINHA, K. K.; BHATNAGAR, D. (Org.). **Mycotoxins in agriculture and food safety**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1998. p. 459-481, 1998.