

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Micobiota toxígena e aflatoxinas nos componentes dos alimentos
destinados à alimentação de caprinos no Estado do Rio de Janeiro**

Rosemeri da Silva Garcia

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

**MICROBIOTA TOXÍGENA E AFLATOXINAS NOS COMPONENTES DOS
ALIMENTOS DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO DE CAPRINOS NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

ROSEMERI DA SILVA GARCIA

Sob orientação do Professor:
Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, Ph.D, L.D.

**Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências em Microbiologia
Veterinária.**

**SEROPÉDICA, RJ
Novembro de 2006**

XXXX XX
XCXXx

Garcia, Rosemeri da Silva

Micobiota toxígena e aflatoxinas nos componentes dos alimentos destinados à alimentação de caprinos no Estado do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. UFRRJ. Instituto de Veterinária. 2006.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.
UFRRJ. Instituto de Veterinária. *Ph.D.* L.D.

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

ROSEMERI DA SILVA GARCIA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ___/___/_____

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

Prof^a. Dra. Ana Maria Dalcerro, Dsc. UNRC, Córdoba (Argentina)

Prof^a. Dra. Gloria Maria Direito (Dsc) UFRRJ

Prof^o. Dr. Paulo Oldemar Scherer (*Ph.D*) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus amados filhos, por terem sido privados por muitos dias da minha companhia.

À minha amada mãe Ivette e irmã Vanessa por me acolherem com tanto carinho nas noites em que dormi no seu lar, sempre me esperando de braços abertos.

À minha mais que irmã Sonia Garcia pelo amor imensurável desde que nasci, pessoa maravilhosa e que tenho o privilégio de tê-la sempre ao meu lado.

Ao meu esposo Reinaldo Pires pela compreensão da minha falta de tempo.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, meu orientador e grande amigo, responsável não apenas pela orientação deste trabalho, mas também pelo direcionamento da minha vida acadêmica e profissional.

À professora Dra. Glória Maria Direito pela atenção e carinho dispensados em todos os momentos difíceis dessa jornada.

À professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza pela possibilidade de participar de aulas dinâmicas, ministradas com muito profissionalismo.

Aos amigos bolsistas de iniciação científica, acadêmicos Luiz Antonio Moura Keller e Kelly Moura Keller, sem os quais a parte prática teria sido muito mais difícil e demorada. Sempre na torcida para que meu trabalho se realizasse da melhor forma possível. Obrigada pela ajuda e entendimento pela minha falta de tempo e distância.

Aos funcionários e técnicos do Projeto Sanidade Animal: Valcir Pires, Luis Jorge Soares, Adevaldo José Gonçalves e Joselita Teodora de Jesus, pelo incentivo e carinho em todos os momentos necessários.

Ao meu querido sogro Antonio Carivaldo Pires, que me ajudou durante toda a graduação e que continua me ajudando até hoje.

À professora Dra. Vera Teixeira de Jesus pela ajuda nas pesquisas dentro da sua área.

Aos meus funcionários e aos funcionários dos capris em que foram realizadas as coletas, em especial ao Marcelo pela ajuda pontual e atenção.

Aos amigos que porventura tenha esquecido, mas que sempre estiveram na torcida.

Agradeço, por fim, Aquele que colocou tantas pessoas maravilhosas em meu caminho, pessoas que tornaram a minha vida repleta de realizações, Aquele que me deu a própria vida: Nosso Senhor Jesus Cristo.

BIOGRAFIA

Rosemeri da Silva Garcia, filha de Ivette da Silva Garcia e Osvaldo Moreira Garcia, nasceu em 22 de agosto de 1968, no bairro de Anchieta, município do Rio de Janeiro/RJ.

Iniciou suas atividades escolares no Centro Educacional Abraão Lincon no mesmo bairro, terminando o Ginásio no Colégio Roma-Copacabana, Rio de Janeiro. O segundo grau foi cursado no Colégio Estadual Infante Dom Henrique, Copacabana, Rio de Janeiro.

Em 1990, iniciou o Curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-o em 1995.

Em 1996 fez curso de Especialização Técnica em Caprinocultura na França, onde retornou em 1997 e iniciou um curso específico sobre fabricação de queijos de Cabra Franceses. Desde então, sua formação foi totalmente voltada para a área de caprinocultura leiteira no Estado do Rio de Janeiro.

Em 2004 ingressou no Curso de Pós-Graduação, *stricto sensu*, em Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Atualmente é responsável técnica do Capril Genève, um dos capris de maior expressão tecnológica e empresarial do Estado do Rio de Janeiro.

RESUMO

GARCIA, Rosemeri da Silva. Micobiota toxígena e aflatoxinas nos componentes dos alimentos destinados à alimentação de caprinos no Estado do Rio de Janeiro. 2006. 39p Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

O crescimento fúngico é a principal causa de diminuição da qualidade dos alimentos pela deteriora e pela produção de suas micotoxinas, causando efeitos adversos sobre a saúde humana e animal. A presença de micotoxinas nas rações, em especial as aflatoxinas, representa grande preocupação por seus efeitos adversos sobre o metabolismo do animal. A cevada resíduo do processo de malteação (CR) têm sido utilizada como alternativa importante para a produção animal devido a seus altos níveis protéicos, fibras e baixo custo. A microbiota micotoxígena que se desenvolve nestes alimentos influi na qualidade sanitária dos mesmos, além de causar empobrecimento energético dos grãos. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* e são os principais gêneros produtores de micotoxinas. A caprinocultura tem apresentado um acentuado crescimento nos últimos anos em nosso país, principalmente na região serrana do Estado do Rio de Janeiro. Visto a escassez de dados na literatura e a importância em Saúde Pública destes metabólitos no leite, os objetivos deste trabalho foram: 1) identificar a biota fúngica associada aos componentes dos alimentos de caprinos leiteiros, 2) determinar a ocorrência de aflatoxinas. A determinação da micobiota das amostras coletadas nos diferentes períodos de amostragem, provenientes de quatro capris no Estado do Rio de Janeiro, foi realizada de acordo com Dalcero et al. (1997). A detecção das aflatoxinas se realizou de acordo com o método de “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) utilizando-se kits de teste BEACON (Beacon Analytical Systems Inc., USA). Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais freqüentes. Outros gêneros isolados em menor freqüência foram *Cladosporium spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* e *Moniliella spp.* As amostras de CR apresentaram as maiores contagens fúngicas, superando os limites tolerados, o que indica uma baixa qualidade higiênica deste substrato. *Penicillium citrinum* foi a espécie toxígena mais freqüente neste gênero e para o gênero *Aspergillus*, o *A. wentii* foi isolado com maior freqüência. *Fusarium verticillioides* foi a única espécie toxígena do gênero isolada a partir destes alimentos. O cultivo em agar coco evidenciou a presença de cepas citrininógenas, ochratoxígenas e aflatoxígenas. As análises por ELISA em placas revelaram contaminação por aflatoxinas em 81,3 % dos concentrados e em 66,7 % das CR, com médias de 2,37 ng.g⁻¹ e 8,72 ng.g⁻¹, respectivamente, estando portanto abaixo dos limites estabelecidos (<50,0 ng.g⁻¹). Uma boa correlação foi obtida para o kit, r= 0,9988. No caso particular de cabras, a contaminação dos alimentos com aflatoxinas representa um risco quando se considera a possibilidade de bioconversão da aflatoxina B1 em aflatoxina M1 que é secretada com o leite. Risco este agravado quando se avalia a possibilidade deste leite contaminado ser utilizado para a fabricação de queijos, quando ocorrerá a concentração da aflatoxina M1 no produto final. Este trabalho apresenta dados interessantes para veterinários dedicados à produção animal. Este estudo contribui para o conhecimento da contaminação fúngica e suas micotoxinas nos componentes os alimentos destinadas à alimentação de caprinos leiteiros.

Palavras-chave: Caprinos leiteiros, Aflatoxinas, ELISA.

ABSTRACT

GARCIA, Rosemeri da Silva. **Toxigenic mycobiota and aflatoxins detection in compounds of dairy goats feeds from Rio de Janeiro State.** 2006. 39p Dissertation (*Magister Scientiae* in Veterinary Microbiology). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

Fungal growth is the main cause of reduction food quality causing deterioration and producing mycotoxins that will have detrimental effects on human and animal health. The presence of mycotoxins in feeds, especially aflatoxins, represents an important concern because they can have adverse effects on animal metabolism. Barley's residue of the malting process (CR) has been used as alternative food for animal production because its high protein levels, fibers and cheap costs. The mycotoxigenic flora that can grow in these foods and feeds change its sanitary quality and can lead to nutrient losses. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria* are the most frequent genera producing mycotoxins. The goat breeding on our country is showing an excellent growth in the last few years, especially in mountaineer region of Rio de Janeiro State. Because of the few data throughout the world and the Public Health importance of this subject, the aims of this study were: 1) to identify the mycobiota in foods compounds for dairy goats, 2) to determine natural occurrence of aflatoxins. Mycoflora determination of the samples collected in four caprine centers, at different periods, was determined according to Dalcero et al. (1997). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) commercial kits (Beacon Analytical Systems Inc, Portland, USA) were used for aflatoxins detection. *Penicillium* and *Aspergillus* were the most frequent genera. Others genera were isolated in smaller frequency as *Cladosporium spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* and *Moniliella spp.* The CR samples had the highest average of total counts for filamentous fungi bigger than the established limit to ensure the feed quality. *Penicillium citrinum* was the toxigenic specie most frequent in this genus e for *Aspergillus* genus, the *A. wentii* was the most frequent. *Fusarium verticillioides* was the only toxigenic specie isolated from these foods. The incubation in coconut agar showed the presence of citrininogenic, ochratoxigenic e aflatoxigenic molds. Feeds and CR had 81.3% and 66.7% incidence of aflatoxins and 2.37 ng.g⁻¹ and 8.72 ng.g⁻¹ aflatoxin average concentrations, respectively. These results are smaller than the established limit (<50.0 ng.g⁻¹). A good correlation was obtained (r= 0.9988). In the particular case of goats, the contamination of foods with aflatoxins represents a risk because there is the possibility of conversion aflatoxin B1 in aflatoxin M1 which can be secreted by the milk. This risk gets great importance if you use the contaminated milk in cheese manufacture process because the toxin will get concentrated in final product. The few studies available on fungal contamination and the presence of aflatoxins in materials used as goat feed ingredients enhance the contribution of this study. The work brings useful data for veterinaries dedicate in animal and public health.

Key words: Dairy goats, Aflatoxins, ELISA.

ÍNDICE DE TABELAS

	página
Tabela 1 – Níveis de aflatoxinas, soma das quatro frações (B1 + B2 + G1 + G2), detectados em amostras de produtos vegetais e rações animais comercializados no Brasil.	8
Tabela 2 – Contagens totais de fungos contaminantes em amostras de alimentos destinados à alimentação de caprinos no Estado do Rio de Janeiro.	17
Tabela 3 – Valores de absorbância das soluções padrões de aflatoxinas obtidos em leitor de ELISA em comprimento de onda de $\lambda=450$ nm.	21

ÍNDICES DE FIGURAS

	página
Figura 1 - Estrutura química das principais aflatoxinas.	7
Figura 2 - Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero <i>Penicillium</i> a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três condições de temperatura (5, 25 e 37° C).	14
Figura 3 - Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero <i>Aspergillus</i> nos meios CYA, MEA e CY20S em dois regimes de temperaturas.	14
Figura 4 – Prevalência (%) de gêneros fúngicos isolados de produtos vegetais e rações destinadas à alimentação de cabras.	18
Figura 5 – Distribuição (%) de espécies de <i>Penicillium</i> em amostras de produtos vegetais e rações destinadas à alimentação de cabras.	19
Figura 6 – Distribuição (%) de espécies de <i>Aspergillus</i> em amostras de produtos vegetais e rações destinadas à alimentação de cabras.	20
Figura 7 – Correlação dos valores de absorbância obtidos dos padrões de aflatoxinas ($\lambda=450$ nm) e o logaritmo das concentrações dos padrões de aflatoxinas. $R^2= 0,9988$.	21
Figura 8 – Frequência (%) de aflatoxinas em amostras de alimentos destinados à caprinos no Estado do Rio de Janeiro.	22
Figura 9 – Porcentagem (%) de amostras contaminadas por aflatoxinas segundo o tipo de alimento e níveis de contaminação.	23

SUMÁRIO

	página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Fungos	3
2.2 Microbiota Toxígena em Produtos Vegetais e Rações Comerciais	3
2.3 Micotoxinas	5
2.4 Aflatoxinas	6
2.4.1 Características físicas e químicas das aflatoxinas	7
2.4.2 Ocorrência natural das aflatoxinas	7
2.4.3 Biotransformação da aflatoxina B1 (AFB1)	9
2.4.4 Toxidez das aflatoxinas	9
2.5 Metodologias para Detecção de Micotoxinas	11
2.6 Utilização da Cevada Resíduo do Processo de Malteação (CR) na Alimentação Animal	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Local e Instalações	12
3.2 Amostras dos Componentes dos Alimentos e da CR	12
3.3 Processamento das Amostras	12
3.4 Equipamentos	12
3.5 Métodos	12
3.5.1 Isolamento, contagem e classificação da microbiota contaminante	12
3.5.2 Testes de ELISA	15
3.5.3 Capacidade toxígena das cepas fúngicas isoladas	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Isolamento e Contagem	17
4.2 Detecção de Micotoxinas	20
5. CONCLUSÕES	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, com cerca de 12,2 milhões de cabeças de caprinos, possui o 9º maior rebanho mundial. Entretanto, contribui com apenas 1% da produção mundial de leite de cabra (FAO, 1996). A caprinocultura tem apresentado um acentuado crescimento nos últimos anos em nosso país, principalmente na região serrana do Estado do Rio de Janeiro, hoje considerada Bacia leiteira do Estado. Este crescimento tem sido proporcionado tanto pelo aumento efetivo do rebanho, bem como pelo número de novas propriedades envolvidas nessa atividade agropastoril. Verifica-se um aumento expressivo na demanda por carne caprina, leite e derivados, resultando no elevado valor de comercialização do produto acabado.

A caprinocultura representa hoje, em nosso País, uma atividade cuja participação sócio-econômica tem sido crescente e que tem se firmado, cada vez mais, como alternativa de viabilização para pequenas e médias propriedades rurais. Este fato, aliado às características da espécie (docilidade, porte pequeno e relativa rusticidade), tem permitido a sua exploração utilizando a mão-de-obra familiar e instalações simples e de baixo custo.

Dessa maneira, a atividade se apresenta como uma alternativa a ser considerada na política de viabilização sócio-econômica incrementando a renda *per capita* e melhorando o nível nutricional da família de pequenos produtores, pela disponibilização da proteína animal.

Junto a todo esse crescimento, torna-se necessário que os profissionais envolvidos com a caprinocultura incorporem, cada vez mais, tecnologias buscando avanços nas áreas de genética, nutrição, sanidade e manejo, os quais possibilitarão a instalação de uma indústria altamente eficiente e competitiva no país, buscando melhorias na sanidade dos animais envolvidos, o aumento da produtividade do nosso rebanho e assegurando a qualidade dos produtos caprinos aos consumidores.

Com todo esse aumento tanto no tamanho do rebanho, como em número de propriedades, tem-se buscado melhorias desde o melhoramento genético até o produto acabado para que nenhum fator afete negativamente a produção, determinando prejuízos aos produtores. Neste contexto, deve-se ressaltar a importância dos contaminantes naturais de rações como as micotoxinas.

As micotoxinas são produtos tóxicos do metabolismo secundário de fungos que podem contaminar os grãos de cereais no campo, durante a colheita, no transporte e, principalmente, durante o armazenamento. Algumas condições climáticas contribuem para o crescimento fúngico e à produção de micotoxinas, tais como: atividade de água (Aa), umidade relativa (UR) e temperatura (T°C).

Os principais fungos produtores de micotoxinas estão compreendidos entre as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*. Gêneros estes que reúnem espécies cuja maioria está amplamente disseminada na natureza utilizando variados tipos de substratos.

A contaminação é um processo aditivo, pode iniciar-se, por exemplo, com a presença de espécies de *Fusarium* a campo e desenvolver-se durante as operações de colheita e secagem. Toxinas adicionais podem ser produzidas no armazenamento devido à ação de fungos típicos de silos, principalmente as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*. Ressalta-se ainda o fato de que as micotoxinas, geralmente, apresentarem grande estabilidade química, o que permite a sua persistência no alimento, mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem. Outro aspecto importante relacionado à ação dos fungos tóxicos

é o impacto sobre o valor nutricional das matérias primas utilizadas na elaboração de rações causando empobrecimento energético dos grãos.

A contaminação de rações para caprinos no Estado do Rio de Janeiro ainda não foi bem estudada, fato comprovado pelos pouquíssimos dados encontrados na revisão bibliográfica. Isto se justifica em função de que a caprinocultura, embora em constante crescimento, ainda seja um ramo de atividade agropecuária muito recente no Brasil.

As enfermidades causadas pelas micotoxinas são denominadas micotoxicoses, as quais são caracterizadas por síndromes difusas, com lesões em órgãos vitais como fígado e rins, levando à menor produtividade, maior incidência de doenças devido à imunossupressão e interferências com a capacidade reprodutiva.

No Brasil, devido às condições climáticas favoráveis, diversas micotoxinas têm sido identificadas em alimentos destinados ao consumo humano e animal. Contudo, deve-se destacar a importância das aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona, não apenas pela ocorrência freqüente, mas também pelo elevado potencial tóxico para os animais.

A contaminação das rações para caprinos e o processo crônico de intoxicação ainda não foram devidamente caracterizados, assim como a resistência dos caprinos às micotoxinas. Conseqüentemente, os níveis de metabólitos tóxicos que potencialmente possam ocorrer no leite, carnes, vísceras e derivados oriundos destes animais devem ser considerados.

Atualmente, a preocupação da comunidade científica 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 seus subprodutos industrializados. A ingestão diária e constante de pequenas quantidades destes compostos, sem dúvida, possui um papel importante na indução e modulação de patologias no homem e nos animais.

A presença de micotoxinas nas várias etapas que envolvem a produção caprina configura-se como um grande desafio para a atividade atualmente. Apesar do avanço tecnológico em que se encontra o segmento brasileiro hoje, alguns fatores continuam sem grandes alterações, como, por exemplo, a freqüência e a intensidade da presença de micotoxinas nos alimentos destinados aos caprinos.

Os números são expressivos e comprovados pela própria FAO, entidade de alimentação e agricultura ligada às Nações Unidas: nada menos que 25 % dos grãos do mundo estão contaminados com micotoxinas, e estes constituem a base das formulações de rações animais. Conhecer os fungos toxígenos, as micotoxinas produzidas e seus efeitos tóxicos tornaram-se indispensáveis aos médicos veterinários e a todos os profissionais voltados para a preservação da saúde animal e humana.

O município de Teresópolis, localizado na região serrana do Estado do Rio de Janeiro é considerado hoje, um dos pólos mais importantes da caprinocultura comercial fluminense.

Tendo em vista a relevância do município para a economia do Estado do Rio de Janeiro, os objetivos deste trabalho foram:

- a) Estabelecer a freqüência e a prevalência da microbiota toxígena contaminante nos componentes dos alimentos destinados à caprinos de leite.
- b) Detectar a presença de aflatoxinas.
- c) Determinar o perfil toxicogênico das cepas potencialmente toxígenas isoladas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos

Os fungos são microrganismos ubíquos presentes tanto em climas tropicais quanto temperados. Entretanto, a maior biodiversidade de fungos ocorre em climas tropicais, portanto, nessas condições deve haver um maior cuidado com a contaminação e o crescimento de espécies toxígenas em produtos agrícolas, devido ao maior risco de produção de micotoxinas (Almeida et al., 2000). O Brasil, com seu clima predominantemente tropical propicia condições ideais para a proliferação de fungos potencialmente toxígenos (Sabino et al., 1988).

Aspergillus spp. e seus teleomorfos *Emericella* e *Eurotium* são usualmente relatados como contaminantes, com uma alta taxa em substratos orgânicos, especialmente em grãos estocados e rações (Kozakiewicz, 1989). Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento são a umidade, atividade de água, temperatura, período de armazenamento, nível de contaminação, matérias estranhas, insetos, nível de oxigênio, condições físicas da semente ou do grão e condições sanitárias da semente, do grão ou das rações (Dionello et al., 2000; Bueno et al., 2004).

O gênero *Aspergillus spp.* distingue-se morfológicamente pela presença de uma estrutura denominada aspergilo derivada de *aspergillum*. Esta é composta por estípede não septadas e vesículas terminais, a qual pode dar origem a métulas e fiálides que formam os conídios. A maioria das espécies deste gênero fúngico cresce entre 15-30 °C, com uma temperatura ótima entre 20-25 °C, Entretanto, algumas espécies podem crescer em temperaturas mais elevadas (>35 °C). Observa-se que condições ótimas para o crescimento fúngico podem não ser as mesmas para a produção de seus metabólitos secundários (Raper & Fennell, 1965).

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

Os fungos do gênero *Fusarium* são comumente encontrados no solo, capazes de contaminar grãos, que podem ser usados em rações destinadas à nutrição de animais de produção. Esse gênero fúngico apresenta distribuição mundial e muitas espécies são consideradas importantes patógenos vegetais. Os fungos filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, fitotoxinas, além das micotoxinas. Embora existam dezenas de espécies de *Fusarium*, apenas um número limitado é responsável pela maior parte da contaminação de produtos agrícolas e alimentos por micotoxinas. Sabe-se que cepas de *Fusarium moniliforme* são capazes de produzir várias micotoxinas na natureza, tais como a moniliformina, fumonisinas, ácido fusárico, fusariocinas e zearalenona (Henry et al., 2000).

Quando produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e pelos animais, provocando as micotoxicoses (Moss, 1991).

2.2 Micobiota Toxígena em Produtos Vegetais e Rações Comerciais

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

Outro estudo em 150 amostras de milho recém-colhido 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 spp.* (23,5 a 82,5 % de espigas infectadas) e de *Penicillium spp.* (15 a 89 % de espigas infectadas), segundo Ono (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 spp.* foi prevalente (40,6 %), seguido de *Penicillium spp.* (39,8 %) e *Fusarium spp.* (14,7 %), dentre outros.

Dalcerio 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 spp.* em 98 % das amostras, seguida de *Fusarium spp.* com 87 % e *Aspergillus spp.* em 52 %. Dentre as espécies do gênero *Aspergillus*, as mais freqüentemente isoladas foram: *A. flavus* (32 %) e *A. parasiticus* (30 %), *Eurotium repens* (17 %), *A. candidus* (15 %), *A. tamarii* (11,5 %), *A. terreus* (12 %), *A. fumigatus* (9,5 %), *A. niger* (5,5 %), *A. parvulus* (1 %) e *A. oryzae* (0,5 %).

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

Fungos aflatoxígenos isolados de ração para aves na Índia apresentaram uma alta incidência com níveis variando de 76 % e 86 % para as espécies de *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente. Em outro estudo com fungos toxígenos em rações para frangos de corte Benkerroum & Tantaoui-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 spp.* (35,7 %), *Aspergillus spp.* (20,4 %), *Fusarium spp.* (10,2 %), *Alternaria spp.* (6,1 %), *Mucor spp.* (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 *A. ornatius* (3/40).

Não se tem dado muita atenção a constituição da microbiota de matérias primas e rações destinadas ao consumo de bovinos, ovinos e caprinos, principalmente no que se refere a micobiota toxígena. Abdel-Fattah et al. (1982) estudaram a micobiota de rações para animais com especial referência aos aflatoxígenos e detectaram predominância de espécies de *Aspergillus* (*A. niger* e *A. flavus*) seguidos de *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* e fungos da ordem Mucorales nas amostras destinadas à bovinos. Abramsom et al. (1980) verificaram que houve predominância dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* quando analisaram 51 amostras de alimentos destinados a bovinocultura.

Em 288 amostras de rações para bovinos, Sanchis et al. (1986) estabeleceram 100% de contaminação fúngica, sendo o *A. flavus* encontrado com maior frequência (54,5%). Dutton & Kinsey (1995) estabeleceram uma predominância da contaminação por espécies do gênero *Fusarium* (70%) em rações para bovinos na África do Sul.

Oliveira et al. (2001) estudaram a micobiota de 75 amostras de milho ensilado para o consumo animal em Maringá, Santa Catarina. Estes autores encontraram uma micobiota constituída por *Aspergillus* (25,5%), onde predominaram as espécies *A. flavus* e *A. fumigatus*; *Penicillium* (21,3%), onde as espécies mais frequentes foram *P. oxalicum* e *P. citrinum*. Espécies de fungos de deteriora foram isoladas com menor frequência e foram pertencentes aos gêneros *Cladosporium* (9,3%); *Neurospora* (5,3%); *Chaetomium* (4%) e outros (34,6%).

Rosa (2002) observou que em amostras de produtos que apresentaram baixa atividade de água (Aa), isto é, radícula de cevada, polpa cítrica e ração, prevaleceram os xerofílicos. Os valores médios de ufc.g⁻¹ para os produtos vegetais e rações encontrados foram elevados em DRBC em função do número de leveduras isoladas. As espécies fúngicas predominantes variaram de acordo com o tipo de matéria prima analisada. Assim, em amostras de milho observaram-se os seguintes gêneros: *Aspergillus* (62,4%), *Fusarium* (60,2%), *Penicillium* (43,8%), *Cladosporium* (12,5%), *Eurotium* (10%), *Mucor* sp (6%), *Alternaria* (2%), *Rhizopus* (1%). Dentre as espécies de *Aspergillus* isoladas observaram-se as seguintes frequências: *A. flavus* 23/68 (33,8%), *A. niger* 12/68 (17,6%), *A. ochraceus* 10/68 (14,7%), *A. terreus* 8/68 (11,8%), *A. versicolor* 8/68 (11,8%), *A. niveus* 5/68 (7,4%) e *A. fumigatus* 3/68 (4,4%). O gênero *Penicillium* esteve representado pelas seguintes espécies: *P. citrinum* 11/48 (21,9%), *P. decumbens* 8/48 (16,7%), *P. purpurogenum* 6/48 (12,5%), *P. variable* 5/48 (10,4%), *P. glabrum* 5/48 (10,4%), *P. janczewskii* 4/48 (8,3%), *P. verrucosum* 4/48 (8,3%), *P. funiculosum* 2/48 (4,2%), *P. janthinellum* 2/48 (4,2%), *P. lividum* 1/48 (2,1%) e *P. fellutanum* 1/48 (2,1%). As amostras de produtos de bagaço de cevada apresentaram predominância de leveduras (100%), entretanto os fungos filamentosos estiveram presentes em 68% das amostras e foram distribuídos nas seguintes frequências de contaminação: *Penicillium* (59,3%), *Fusarium* (52%), *Aspergillus* (1%), *Cladosporium* (25,4%), *Mucor* (24%), *Absidia* (8%), *Alternaria* (3%) e *Curvularia* (2%). As espécies de *Aspergillus* isoladas foram: *A. niger* 8/22 (36,4%), *A. terreus* 5/22 (22,7%), *A. ochraceus* 5/22 (22,7%), *A. flavus* 3/22 (13,6%), *A. carbonarius* 1/22 (4,5%). As espécies de *Penicillium* isoladas foram: *P. citrinum* 8/37 (21,6%), *P. verrucosum* 5/37 (15,5%), *P. rugulosum* 4/37 (10,8%), *P. funiculosum* 4/37 (10,8%), *P. viridicatum* 4/37 (10,8%), *P. janthinellum* 4/37 (10,8%), *P. lividum* 3/37 (8,1%), *P. islandicum* 3/37 (8,1%), *P. fellutanum* 1/37 (2,7%) e *P. brevicompactum* 1/37 (2,7%).

Rosa et al. (2006) estudaram a micobiota e produção de ocratoxina A (OTA) em 96 amostras de rações para frangos de corte e observaram prevalência de *Aspergillus flavus* e *Penicillium citrinum*. Houve alta incidência (46%) de fungos produtores de OTA, assim como encontraram elevados níveis desta toxina, capazes de provocar surtos em animais.

Keller et al. (2005) ao analisarem amostras de rações para eqüinos observaram que o gênero *Aspergillus* foi o mais frequente neste substrato, tendo o *Aspergillus flavus* como espécie mais prevalente. Assim como encontraram amplo intervalo nos níveis de contaminação por aflatoxinas, desde 0,01 até 99,4 ppb.

Não foram encontrados trabalhos na literatura revisada sobre o isolamento, identificação e caracterização toxígena de fungos em alimentos vegetais e rações destinados à alimentação de caprinos.

2.4 Aflatoxinas

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus*, descobertas em 1960, após provocarem surto tóxico em perus na Inglaterra (*Turkey-X-disease*). Neste surto, milhares de aves morreram após consumirem ração tendo como um dos seus constituintes a torta de amendoim, proveniente do Brasil. (Leeson et al., 1995).

São conhecidos, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂. As aflatoxinas, no entanto, apresentam diferentes graus de atividade biológica: a aflatoxina B₁ (AFB₁), além de ser a mais freqüentemente encontrada em substratos vegetais, é a que apresenta maior poder toxigênico, sendo considerada como carcinógeno humano tipo 1 (IARC, 1993), seguida de G₁, B₂ e G₂ (Leeson et al., 1995).

2.4.1 Características físicas e químicas das aflatoxinas

A estrutura química das aflatoxinas é muito semelhante, dado que são compostos químicos simples e de baixo peso molecular, sendo que todas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide, conforme se observa na Figura 1. As aflatoxinas B apresentam um anel ciclopentona na molécula, enquanto que as da série G apresentam anel lactona (Hussein & Brasel, 2001).

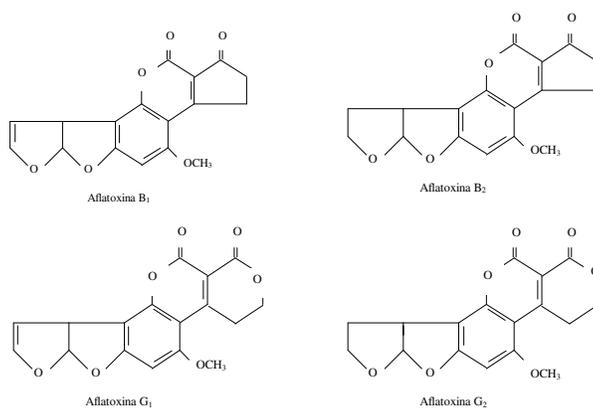


Figura 1 - Estrutura química das principais aflatoxinas. Fonte: Diaz e Boermans, 1994.

Podemos classificar as aflatoxinas como compostos de natureza cristalina, termoestáveis e solúveis em solventes polares, como o clorofórmio e metanol. Podem ser destruídas totalmente na presença de soluções fortemente alcalinas, como a amônia e o hipoclorito.

As aflatoxinas caracterizam-se pela elevada toxidez que apresentam. Em Saúde Animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos e carcinogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido (Osweiler, 1990). De modo análogo, em Saúde Pública, as aflatoxinas são identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados.

2.4.2 Ocorrência natural das aflatoxinas

A ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus*, bem como de suas toxinas em alimentos e rações animais, apresenta distribuição mundial, com predomínio nas regiões de clima tropical e subtropical. A contaminação de produtos vegetais ocorre através do contato com os conídios do fungo, presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem. A utilização de práticas agrícolas incorretas, que prolongam o contato dos produtos com o solo, as lesões na superfície dos grãos, provocadas por insetos, e o armazenamento inadequado, em locais úmidos e sem ventilação, são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxígenos.

A ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência, principalmente no Estado de São Paulo, em alimentos destinados ao consumo humano e animal, sobretudo milho e rações. No período de 1980 a 1987, Sabino et al. (1988) relataram a ocorrência de AFB₁ em 7,79 % das amostras de rações animais analisadas, com nível médio de 241,2 µg/kg de AFB₁.

Oliveira et al. (1998) analisaram amostras de ração destinadas à alimentação de aves, provenientes de uma fábrica e de quatro granjas situadas em Manaus, Amazonas. O *Aspergillus* spp. foi o mais frequente gênero isolado (71,7 %), sendo que o *Aspergillus flavus* foi a espécie mais isolada dentro desse gênero (53,3 %). Cerca de 44 % das cepas de *A. flavus* produziram AFB₁ e AFB₂, com níveis variando entre 40,4 a 10.827 µg/kg e de 79,4 a 2.835 µg/kg, respectivamente.

Considerando a toxidez das aflatoxinas, o Brasil estabeleceu em 1988, o nível máximo de tolerância de 50 µg/kg, dada pela somatória de B₁+B₂+G₁+G₂, sendo válido para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal.

Levantamentos realizados no país indicam um elevado percentual de amostras positivas, com concentrações potencialmente capazes de originar efeitos deletérios na produtividade animal. Os níveis de aflatoxinas encontrados em alimentos e rações, obtidos em alguns desses estudos podem ser observados na Tabela 1.

É importante ressaltar que a concentração de aflatoxinas tende a aumentar ao longo da cadeia de produção e comercialização de rações. Jones et al., (1982) analisaram a matéria prima, a ração produzida na fábrica e, posteriormente, a mesma ração armazenada, encontrando médias de contaminação de 1,2, 6,0 e 8,8 µg/kg de aflatoxinas, respectivamente. Ainda no mesmo experimento, observou-se uma forte correlação entre o tempo de armazenamento, frequência e o nível de aflatoxinas encontrados. Os autores observaram que ótimas condições encontradas para a produção de aflatoxinas nas rações ocorreram com umidade relativa do ar entre 70-89% e temperatura ambiente entre 19-27°C.

Tabela 1 – Níveis de aflatoxinas, soma das quatro frações (B1 + B2 + G1 + G2), detectados em amostras de produtos vegetais e rações animais comercializados no Brasil.

Tipo de Produto	Origem das amostras	Frequência ^a (%)	Nível médio (µg/kg)	Referência
Rações	Diversos Estados	25,5	50 – 7,800 ^b	Sabino, 1980
Milho	Minas Gerais	18,1	83	Sabino et al., 1986
Rações	Diversos estados	10,4	241	Sabino et al., 1988
Milho	Região Sul	18,2	79	Sabino et al., 1989

Milho	Região Sudeste	8,6	35	Sabino et al., 1989
Milho	Rio Grande do Sul	28,9	1,906	Santurio et al., 1992
Rações e Milho	Rio Grande do Sul	24,9	4 – 1,906 ^b	Baldissera et al., 1993
Sorgo	Diversos estados	12,8	7 – 33 ^b	Silva et al., 2000
Rações	Rio de Janeiro	56,9	1 – 32 ^b	Ribeiro et al., 2000

^a Número de amostras positivas / total de amostras analisadas;

^b valores referentes às concentrações mínima e máxima.

2.4.3 Biotransformação da aflatoxina B₁ (AFB₁)

A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastrointestinal, e a sua biotransformação ocorre primariamente no fígado, por enzimas microssomiais do sistema de funções oxidases mistas, associadas ao citocromo P-450. A AFB₁ é considerada uma das substâncias mais tóxicas para o fígado, sendo este o principal órgão atingido (Osweiler, 1990).

A AFB₁ é considerada um carcinógeno Tipo 1, que requer uma ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos. A forma ativada da AFB₁ é o composto eletrofilico altamente ativo, identificado como 8,9-óxido de AFB₁, ou AFB₁-epóxido, originado a partir da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB₁. A AFB₁-epóxido é capaz de reagir rapidamente com macromoléculas, como o ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas, através de ligações covalentes. Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas. A atividade biológica da molécula de DNA que está ligada à AFB₁-epóxido é alterada, originando assim os mecanismos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁. A formação desses adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA os quais podem ser retirados da molécula, após a sua formação, deixando sítios vagos, que tendem a ser preenchidos com adenina, resultando num ponto de mutação bastante significativo.

Os mecanismos de toxidez aguda das aflatoxinas estão ligados aos adutos formados pela ligação entre o RNA e proteínas à AFB₁-epóxido, o que acaba provocando a morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células. A inibição da síntese protéica no fígado e a diminuição das proteínas plasmáticas durante a aflatoxicose são amplamente descritas na literatura.

2.4.4 Toxidez das aflatoxinas

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. Com relação às espécies exploradas, a susceptibilidade é maior em patos, seguidos de perus, gansos, faisões e frangos. Mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, a relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade e composição da dieta, entre outros fatores. Para muitas espécies, os machos são mais susceptíveis que as fêmeas, ao passo que, em geral, a sensibilidade é acentuadamente maior nos jovens que nos adultos.

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e do tempo de exposição, determinando assim intoxicações agudas e crônicas. A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxina, sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo. Caracteriza-se principalmente pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (Osweiler, 1990).

Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens (Leeson et al., 1995). Ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com baixos níveis de aflatoxinas por um longo período de tempo, podendo a exposição ao contaminante ser contínua ou intermitente. Esta patologia é de difícil diagnóstico, apesar de constituir a principal forma de intoxicação em condições naturais, o que ocasiona perdas econômicas consideráveis às criações animais (Pier, 1992).

Giambrone et al. (1985a) alimentaram frangos de corte por 35 dias, com rações contendo diferentes níveis de AFB₁, e observaram redução no ganho de peso e alterações histológicas no fígado, apenas nas aves que receberam diariamente rações com aflatoxina acima de 500µg/kg. Contudo, em outro experimento, Giambrone et al. (1985b) não constataram sinais de aflatoxicose em frangos alimentados com níveis até 800µg/kg. de AFB₁ por 5 semanas, porém perus submetidos aos mesmos tratamentos revelaram, além de baixos índices de ganho de peso e de conversão alimentar, um aumento na morbidade por causas variadas e na mortalidade. Os autores concluíram que níveis na ração de até 66 µg/kg de AFB₁ são seguros na alimentação de frangos e perus. Os resultados obtidos por Kan et al. (1989) corroboram essa afirmativa, pois ao alimentarem frangos de corte com rações contendo 50 a 100 µg/kg de AFB₁, não observaram nenhuma diferença entre os tratamentos quando comparados ao grupo controle.

Por outro lado, Doerr et al. (1983) realizaram dois experimentos com frangos de corte, submetendo-os à intoxicação em condições semelhantes às criações convencionais (densidade de 0,074 m²/ave). No experimento 1 encontraram significativa redução no peso vivo e eviscerado dos animais expostos a rações contendo níveis de 75, 225 e 675 µg/kg de aflatoxinas, quando comparado ao grupo controle. Porém no experimento 2, efetuado sob as mesmas condições do experimento 1, não houve diminuição significativa no peso vivo dos animais recebendo rações contaminadas com 300 e 900 µg/kg de aflatoxinas. Os autores ressaltaram que, quando frangos de corte são alojados e manejados de maneira semelhante aos aviários comerciais, torna-se difícil prever um nível seguro de contaminação na ração, devido aos vários efeitos ambientais capazes de produzir estresse nos animais, os quais podem potencializar os efeitos da aflatoxina.

Jones et al. (1982) avaliaram cinco companhias de frangos de corte, selecionando de cada uma, seis produtores, dividindo-os em 3 categorias (bom, regular e fraco), de acordo com um indicador de produtividade (média de peso de mercado x 100/conversão alimentar). Ao final do experimento, os autores constataram que os produtores classificados como bons tinham uma frequência de contaminação na ração de 18% (concentração média de 6,13 µg/kg), enquanto que os classificados como regulares e fracos apresentavam, respectivamente, frequências de contaminação de 22,1 e 31,3% (níveis médios de 6,5 e 14,0 µg/kg). Os resultados apresentaram correlação significativa, entre os grupos, para taxa de mortalidade e condenação de carcaça.

No que concerne às poedeiras, as principais manifestações da aflatoxicose, em condições experimentais, incluem redução da produção e do peso dos ovos, aumento da gordura hepática e alteração de enzimas séricas (Leeson et al., 1995).

Oliveira et al. (2001) alimentaram galinhas poedeiras por 60 dias, com rações contendo 100, 300 e 500 µg de AFB₁/kg. Os resultados indicaram que a AFB₁, a partir de 100 µg/kg, causou diminuição significativa no consumo de ração, enquanto que apenas os níveis de 300 e 500 µg/kg causaram a diminuição significativa do peso das aves.

Reprodutoras de frangos de corte e codornas poedeiras tiveram significativa diminuição no consumo de ração e na produção de ovos quando expostas a níveis acima de 500 µg/kg de AFB₁.

As aflatoxinas também exercem efeitos sobre o sistema imunitário. Entre os efeitos de imunossupressão, demonstrados em animais de experimentação, destacam-se aplasia do timo, redução do número e da atividade de células T, diminuição da resposta de anticorpos, supressão

da atividade fagocitária e redução de componentes humorais, como complemento (C4), interferon e imunoglobulinas IgG e IgA (Pestka & Bondy, 1990; Pier, 1992). Todas estas alterações contribuem para a ocorrência de infecções concomitantes, sobretudo por agentes virais e bacterianos, associados à exposição dos animais às rações contaminadas com aflatoxinas.

2.5 Metodologias para Detecção de Micotoxinas

Os primeiros métodos para a determinação de aflatoxinas em alimentos foram desenvolvidos em meados dos anos 60, tendo como base a propriedade fluorescente da toxina, quando exposta à luz ultravioleta. Deste modo, a técnica de identificação e quantificação utilizada de início, e ainda largamente empregada na atualidade, foi a cromatografia de camada delgada - CCD. Posteriormente, com o desenvolvimento dos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), houve um incremento notável no grau de precisão das análises, porém, com aumento significativo dos custos das mesmas (Chu, 1984)

No início da década de 80 surgiu uma nova perspectiva para a análise de aflatoxinas, com a introdução de métodos imunológicos, ou imunoenaios, fundamentados nas reações específicas entre anticorpos e antígenos, com destaque para os de radioimunoensaio, cromatografia de imunoafinidade e de ensaio por enzimas imuno-adsorvidas - ELISA (Frémy & Chu, 1989; Pestka et al., 1995).

Existem, atualmente, conjuntos de ELISA, produzidos em escala comercial, para execução de análise de micotoxinas em alimentos. Esses sistemas são de execução simples, e podem ser empregados diretamente nas amostras, um vez que não requerem etapas de purificação devido a alta especificidade e sensibilidade dos anticorpos. Esta característica representa uma vantagem considerável do método, pois permite a sua aplicação em grande número de amostras, em intervalo de tempo relativamente pequeno, o que não ocorre com os métodos cromatográficos.

2.6 Utilização da Cevada Resíduo do Processo de Malteação (CR) na Alimentação Animal

O cultivo de cevada está dirigido para a produção de malte (85%), ração animal (8%) e semente (7%). Os grãos depois de serem considerados como cevada de qualidade “cervejira” sofrem um processo de malteação que resulta na produção de malte. Este processo consiste em submeter a cevada à hidratação que permite a germinação e promove conversões bioquímicas. Posteriormente os grãos secos, são mecanicamente separados das raízes germinadas durante a etapa de germinação. Este subproduto é denominado radícula de cevada e é utilizado para ser incorporado ao alimento balanceado para animais. A radícula tem sido uma alternativa interessante tanto para as malterias como para fins agropecuários, em função dos elevados níveis de proteína e fibra que apresenta (Lopez-Diaz & Flannigan, 1997). Por outro lado, após o cozimento industrial obtém-se um material cuja fermentação produzirá a cerveja. A fase sólida desta mescla dispõe-se em forma de resíduo de cervejaria (CR). As cervejarias brasileiras produzem aproximadamente 15 mil toneladas deste resíduo orgânico de aparência pastosa, não tóxica, com 80% de fase líquida. Por seus aportes nutricionais, tratando-se de um alimento rico em fibras e significativos níveis protéicos, os bovinos são seus maiores consumidores, mas é também utilizada na alimentação de caprinos. A qualidade deste alimento torna este resíduo extremamente importante para os produtores de leite, capaz de incrementar a produção em até 30%. A composição de dietas alimentares balanceadas que incluem resíduo de cevada confere às

rações características nutricionais que aumentam a produtividade na relação custo/benefício das atividades agropecuárias comerciais. Tratando-se de um alimento que pode substituir os componentes protéicos e volumosos da dieta, promovendo reduções significativas nos custos destas atividades produtivas, é uma das mais atrativas opções nutricionais do mercado de alimentos e rações (Fagundes, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Instalações

As análises micotoxicológicas foram realizadas nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM) do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizados no prédio do Projeto Sanidade Animal, convênio Embrapa/UFRRJ.

3.2 Amostras dos Componentes dos Alimentos e da CR

Durante o período de agosto de 2005 a março de 2006 foram coletadas, segundo o plano de amostragem proposto por Dalcerio et al. (1997), amostras representativas de concentrados para caprinos de quatro capris, um situando-se no município de Niterói e os outros três no município de Teresópolis, Estado do Rio de Janeiro, as quais foram produzidas por duas fábricas diferentes.

Além disso, foi coletada CR proveniente de duas cervejarias situadas na região serrana. Estas amostras primárias foram homogeneizadas e quarteadas várias vezes para obter-se uma amostra representativa de 0,5kg (amostra de laboratório), que foi submetida novamente a um processo de quarteamento e homogeneização para obter-se duas sub-amostras para a análise, as quais foram armazenadas a 4°C até o seu uso.

3.3 Processamento das Amostras

No laboratório, as amostras recebidas eram trituradas até que se tornassem homogêneas e depois de quarteadas eram pesadas alíquotas de 10g, que eram submetidas à metodologia de diluição de placas descritas por Pitt & Hocking (1997). Todas as análises micológicas foram realizadas sob câmara de segurança biológica, onde procedeu-se as diluições e as semeaduras em placas nos meios para isolamento, contagem e identificação da microbiota contaminante.

3.4 Equipamentos

- a) Leitor de ELISA: modelo Quick ELISA, Drake Eletrônica e Comércio Ltda, Lote/ nº série 322.
- b) Espectrofotômetro Shimadzu mod. 2001. (Shimadzu Co.®, Kyoto, Japão)
- c) BOD marca Ética (Ética^{MR} - 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).

3.5 Métodos

3.5.1 Isolamento, contagem e classificação da microbiota contaminante

A contagem de unidades formadoras de colônias por grama (ufc.g⁻¹) de fungos filamentosos e leveduras foi realizada segundo metodologia de diluição decimal seriada descrita por Pitt & Hocking (1997), conforme a seguir:

Agitou-se em liquidificador, em copo estéril, 10 gramas da amostra em 90 ml de água peptonada a 0,1%. A partir desta diluição inicial (10^{-1}) preparou-se diluições decimais seriadas até 10^{-4} . Inoculou-se (em triplicata) alíquotas de 0,1 ml de cada uma das diluições nos meios de cultivo, tais como: Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) utilizado para contagem geral (King et al. 1979, modificado por Pitt & Hocking, 1985); Dicloran 18% Glicerol Agar (DG18) um meio seletivo para fungos xerofílicos (Hocking & Pitt, 1980) e o meio de Nash Snyder (NASH) para isolamento de espécies do gênero *Fusarium spp.*

As placas de DRBC, DG18, e NASH foram incubadas a 25° C por sete dias em estufa BOD Ética. Todas as placas foram observadas diariamente, selecionando-se para enumeração aquelas que continham em torno de 10 a 100 ufc.g⁻¹ (Dalcerio et al., 1997).

Os resultados obtidos forneceram a contagem dos propágulos fúngicos, expressa através de unidades formadoras de colônia por grama (ufc.g⁻¹) de amostra analisada.

As colônias fúngicas selecionadas para identificação foram repicadas em tubos inclinados de Agar Extrato de Malte (MEA) ou Agar V-8 (V8), sendo incubadas novamente para o desenvolvimento fúngico, e mantidas sob refrigeração até serem repicadas nos meios próprios para identificação de cada gênero e espécie.

Os resultados da contagem foram expressos através das unidades formadoras de colônias (ufc.g⁻¹); as cepas de fungos isoladas foram identificadas segundo as chaves taxonômicas de Klich & Pitt (1988) para o gênero *Aspergillus*, Pitt & Hocking (1997) para o gênero *Penicillium* e Nelson et al. (1983) para espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*. A chave proposta para o gênero *Penicillium* foi baseada na semeadura em três meios básicos como: Agar Czapek Extrato de Levedura (CYA); Agar Extrato de Malte (MEA) e Agar 25% Glicerol Nitrato (G25N), sendo estes meios incubados de acordo com o seguinte regime:

a) As três placas de CYA são incubadas por 7 dias em três temperaturas diferentes (5, 25 e 37° C);

b) Duas placas de MEA e uma de G25N são incubadas a 25° C.

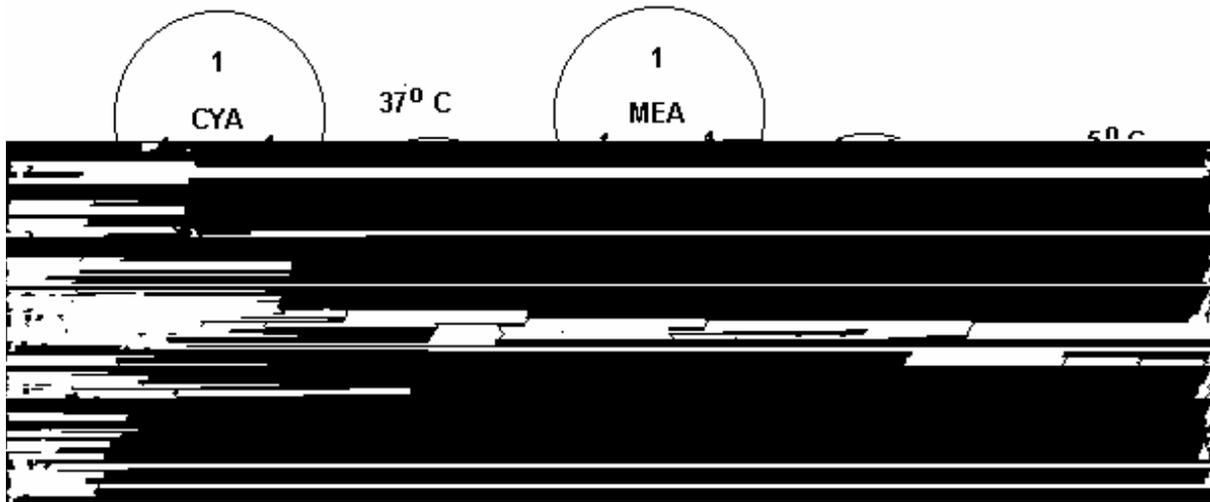


Figura 2 - Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero *Penicillium* a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37° C).

A classificação dos *Aspergillus* foi baseada na sementeira padrão em três meios básicos: Agar Czapek Extrato de Levedura (CYA); Agar Czapek Extrato de Levedura com 20% de Sacarose (CY20S) e Agar Extrato de Malte (MEA), sendo estes meios incubados de acordo com o seguinte regime:

- a) As placas de CYA foram incubadas por sete dias em duas temperaturas diferentes (25 e 37° C);
- b) Duas placas de MEA e duas de CY20S foram incubadas a 25° C, conforme o esquema da Figura 3.

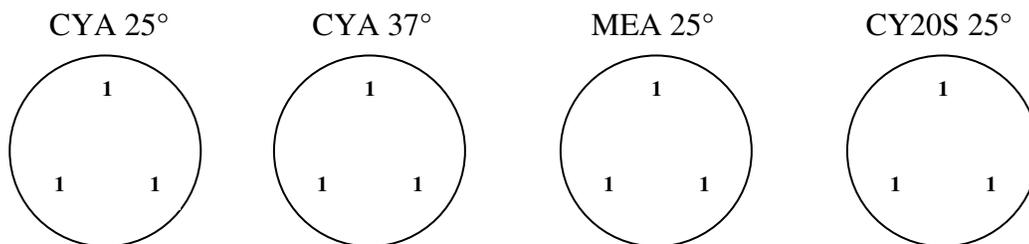


Figura 3 - Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero *Aspergillus* nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas.

As colônias com características morfológicas do gênero *Fusarium* no meio de Nash-Snyder foram semeadas no meio Agar Folhas de Cravos (CLA) e incubadas por 7 dias a 24°C obedecendo fotoperíodo de 12 horas de luz branca e 12 horas de luz negra. A partir daí, foi realizado cultivo monospórico do isolado sendo novamente cultivado em CLA, obedecendo as

mesmas condições de luz e temperatura. A cepa isolada foi então cultivada em CLA e agar inclinado de Agar Batata Dextrose (PDA), para identificação final das espécies.

Para os demais gêneros fúngicos foi utilizada a chave taxonômica proposta por Samson et al. 2000.

Todos os meios de cultivo foram preparados em nossos laboratórios do NPMM utilizando drogas e reagentes certificados Merck - Química e Sigma Co.

3.5.2 Testes de ELISA

Para a realização dos testes foram utilizados kits comerciais desenvolvidos e produzidos pela Beacon Analytical Systems Inc (Portland, Maine – EUA). O kit Beacon em placa utiliza o método de ELISA competitivo para análise quantitativa das micotoxinas. Neste estudo foram utilizados os kits destinados à quantificação de aflatoxinas totais.

A micotoxina foi extraída da amostra agitando-a com metanol e água. O extrato obtido foi filtrado e depois testado através de imunoensaio. O conjugado micotoxina-HRP-enzima foi pipetado nos poços seguido dos calibradores ou amostras de extrato. Em seguida, pipetou-se o anticorpo da micotoxina para iniciar a reação. Durante uma incubação de 10 minutos a micotoxina da amostra e o conjugado micotoxina-HRP-enzima competiram por um número limitado de anticorpos. Passados os 10 minutos de incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e a placa foi lavada para remoção de qualquer enzima que não tenha se ligado ao anticorpo. Um substrato de limpeza foi adicionado aos poços e qualquer toxina do conjugado-enzima foi convertida na cor azul. Seguindo uma incubação de 10 minutos, a reação foi interrompida e a intensidade da cor de cada poço foi lida. As amostras de cores desconhecidas foram comparadas com as cores dos calibradores e a concentração da micotoxina das amostras foi obtida. Os padrões de aflatoxinas utilizados no kit corresponderam a 0, 2, 8, 20 and 80 µg/L (ppb) de aflatoxinas totais.

Resultados quantitativos foram obtidos por simples comparação das absorbâncias das amostras com a absorbância dos calibradores. Amostras contendo cores mais claras que um poço de calibrador teve uma concentração de micotoxina maior que a concentração do calibrador. Amostras que contiveram cores mais escuras que um poço de calibrador tiveram uma concentração menor que a concentração do calibrador. Uma interpretação quantitativa requereu um gráfico das absorbâncias dos calibradores (eixo X) vezes o logaritmo da concentração dos calibradores (eixo Y) em papel gráfico. Uma linha reta foi traçada através dos pontos dos calibradores e as absorbâncias das amostras foram inseridas nesta linha. O ponto correspondente do eixo Y foi a concentração da amostra em questão.

3.5.3 Capacidade toxígena das cepas fúngicas isoladas

As cepas fúngicas identificadas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em Agar Leite de Coco (CAM) e da aplicação do “Agar Plug Method” descrito por Frisvad & Thrane (1995), modificado por Bragulat et al. (1998).

Todos os meios foram vertidos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro com um volume de 18 ml de meio de cultivo. Foram retirados um “plug” de 5 mm de diâmetro com furador de rolha do centro de cada uma das colônias cultivadas em cada placa de Petri. Os “plugs” foram acondicionados em frascos de cor âmbar contendo 1 mL de Metanol.

Os meios foram inoculados com suspensões das respectivas cepas na ordem de 10^5 ufc.g⁻¹, incubadas a 28°C por 7 a 14 dias em BOD Ética e, a partir da evidência de crescimento

tiveram a fluorescência ao redor da colônia monitorada diariamente através de irradiação ultravioleta de $\lambda=365$ nm, com lâmpada Mineral Light UVSL25.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e Contagem

As amostras de CR apresentaram valores de contagem superiores aos dos componentes dos alimentos nos três meios de isolamento. No meio DRBC, as amostras dos componentes dos alimentos apresentaram médias de $2,2 \times 10^5$ ufc.g⁻¹, sendo que os valores variaram entre $1,0 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^5$ ufc.g⁻¹. No meio DG18, seletivo para fungos xerofílicos, a maior carga fúngica obtida foi de $1,4 \times 10^6$ ufc.g⁻¹ em amostras de CR. No meio de Nash-Snyder, seletivo para fungos do gênero *Fusarium*, os valores médios obtidos foram de $2,0 \times 10^5$ ufc.g⁻¹, sendo que os valores mínimos e máximos estiveram entre 2×10^2 e 5×10^5 ufc.g⁻¹, respectivamente. A contagem fúngica nos diferentes meios de isolamento estão apresentadas na Tabela 2 na forma de 90° percentil; significa que 90% das amostras apresentaram níveis iguais ou menores ao valor apresentado.

Tabela 2 – Contagens totais de fungos contaminantes em amostras de alimentos destinados à caprinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro.

Alimentos	Contagem de propágulos fúngicos (ufc.g ⁻¹) ^a		
	DRBC	DG18	Nash-Snyder
Componentes	$2,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$
CR	$2,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$7,0 \times 10^3$

^a90° percentil das triplicatas.

Os resultados obtidos mostraram que tanto as amostras dos componentes de alimentos, quanto as amostras de CR mostraram-se de baixa qualidade higiênica, com contagens superiores aos limites tolerados estabelecidos (GMP, 2005), isto é, da ordem de $1,0 \times 10^4$ ufc.g⁻¹. Observou-se predominância da população de fungos filamentosos sobre a de leveduras, sendo isoladas um total de 35 cepas de espécies pertencentes a seis gêneros fúngicos, que em ordem de prevalência foram: *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cladosporium spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* e *Moniliella spp.*, além de fungos da ordem dos Mucorales (2,86%), conforme Figura 4.

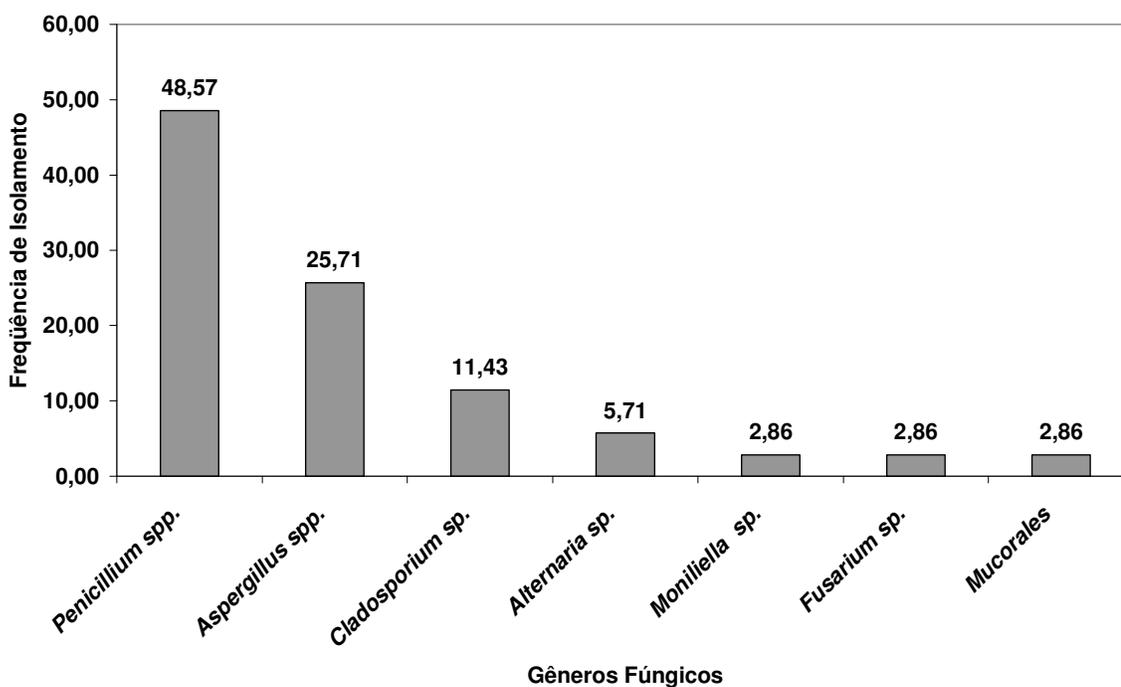


Figura 4 – Frequência (%) de gêneros fúngicos isolados dos componentes dos alimentos destinados à cabras.

Dentre as 17 espécies de *Penicillium* isoladas, o *Penicillium citrinum* mostrou-se o mais prevalente (35,71%), seguido por *P. funiculosum* (21,43%) e *P. purpurogenum* (14,29%), entre outros, como está apresentado na Figura 5. O gênero *Aspergillus* foi representado por *A. wentii* (33,33%), *A. carbonarius* (22,22%), *A. fumigatus*, *A. parasiticus* e *A. flavus* em menor frequência (Figura 6). A única espécie de *Fusarium* isolada foi a de *F. verticillioides* (100%). Estes resultados foram similares àqueles encontrados por Almeida et al. (2000) e por Ribeiro et al (2006).

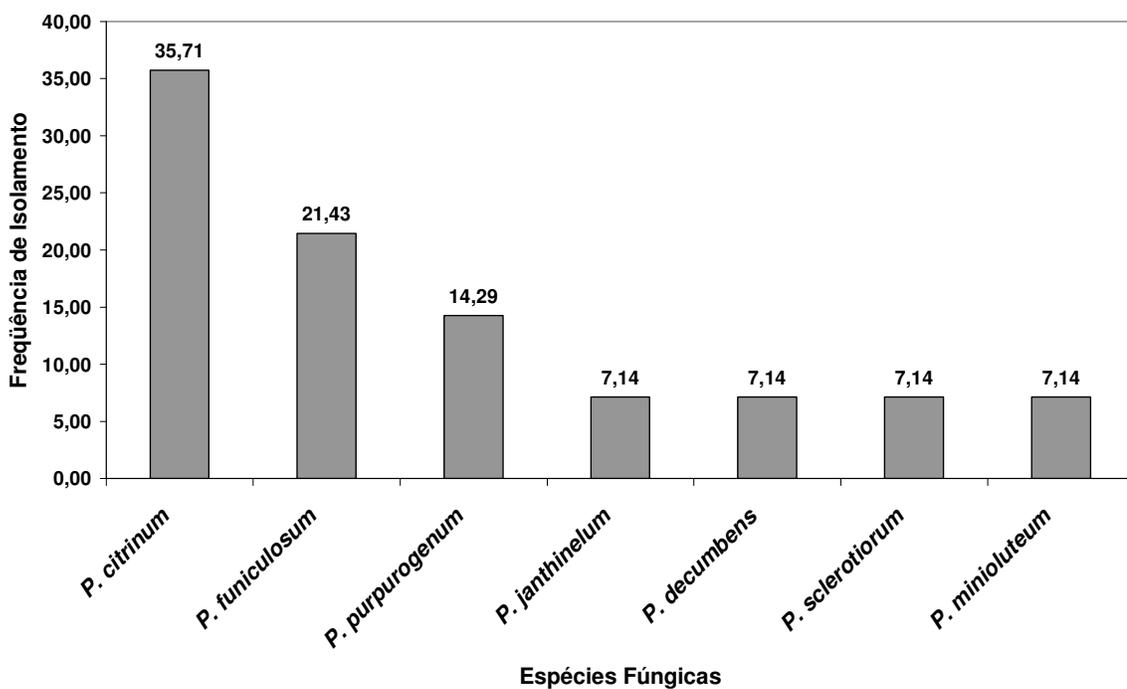


Figura 5 – Distribuição (%) de espécies de *Penicillium* em amostras dos componentes de alimentos destinados à caprinos leiteiros.

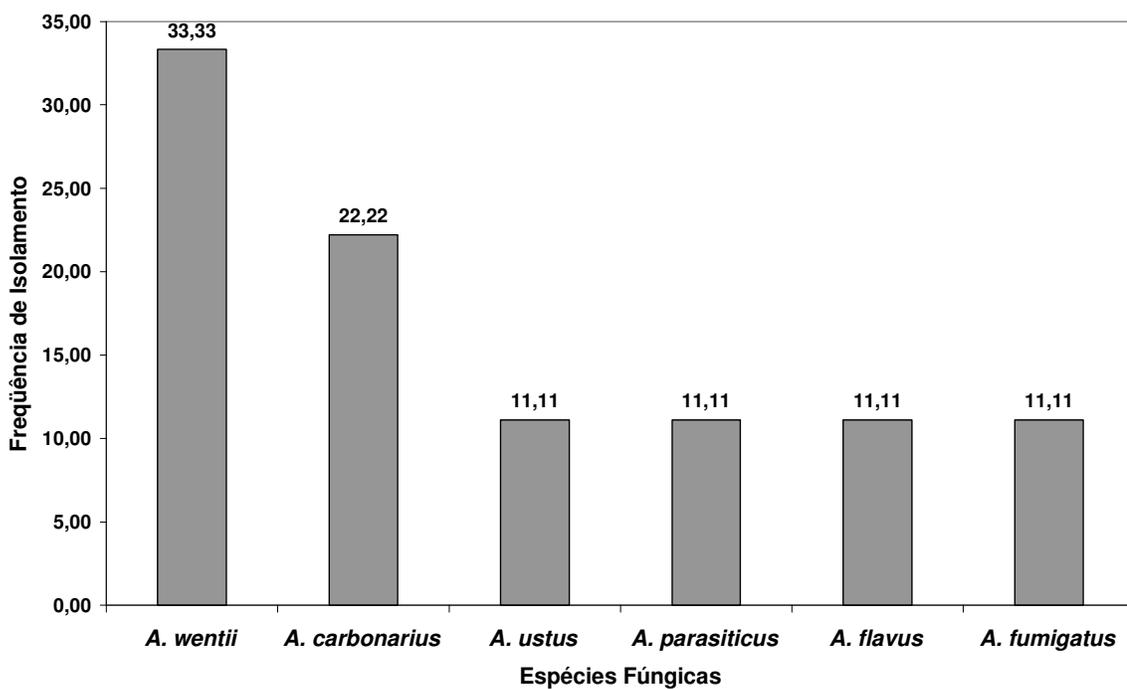


Figura 6 – Distribuição (%) de espécies de *Aspergillus* em amostras dos componentes de alimentos destinados à caprinos leiteiros.

Dentre as cepas de *Penicillium citrinum* isoladas todas se mostraram citrininógenas quando cultivadas em Agar Coco. As cepas de *Aspergillus carbonarius* isoladas não se mostraram ocratoxígenas, enquanto que as de *Aspergillus parasiticus* foram produtoras de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ e as de *A. flavus* produziram AFB₁ e AFB₂ quando cultivadas em Agar Coco por 7 dias.

A presença dessas espécies potencialmente toxígenas constitui um risco potencial de contaminação do alimento pelas micotoxinas. Quando este alimento é mal conservado, o fungo toxígeno encontra condições favoráveis, principalmente de temperatura e atividade de água, para iniciar a produção de suas toxinas.

Também ocorre que a exposição aos esporos fúngicos de *A. fumigatus* pode resultar em infecções fúngicas particularmente naqueles órgãos expostos a invasão externa como as vias aéreas, glândulas mamárias e útero durante o parto.

4.2 Detecção de Micotoxinas

Os valores de absorvância das soluções padrões de aflatoxinas nas concentrações de 0, 2,0, 8,0, 20,0 e 80,0 ng.g⁻¹ estão apresentadas na Tabela 3. Estes valores foram plotados em um gráfico das absorvâncias dos calibradores (eixo X) vezes o logaritmo da concentração dos calibradores (eixo Y) da curva padrão de aflatoxinas e estão representados na Figura 7. Obteve-se um valor de R²= 0,9988.

Tabela 3 – Valores de absorvância das soluções padrões de aflatoxinas (0, 2, 8, 20 e 80 ng.ml⁻¹) obtidos em leitor de ELISA em comprimento de onda de λ=450 nm.

Padrões de Aflatoxinas Concentração (ng.ml ⁻¹)	Leitura do Equipamento (Absorvância λ= 450 nm)
0,0	2,201
2,00	1,58
8,00	1,117
20,00	0,746
80,00	0,391

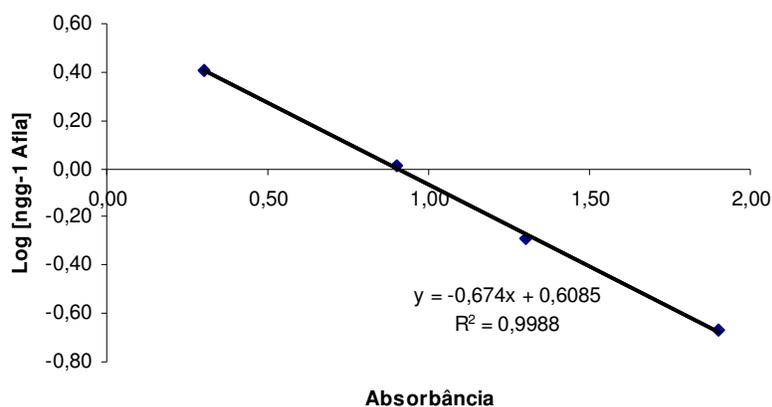


Figura 7 – Correlação dos valores de absorbância obtidos dos padrões de aflatoxinas ($\lambda=450$ nm) e o logaritmo das concentrações dos padrões de aflatoxinas. $R^2= 0,9988$.

Os resultados das análises de ELISA feitas nas amostras de ração e de cevada mostraram uma contaminação por aflatoxinas em 32/41 (78,0 %) das amostras, com concentrações variando de <2 até 43 ng/g. A distribuição das concentrações de aflatoxinas nas amostras analisadas esta apresentada na Figura 8.

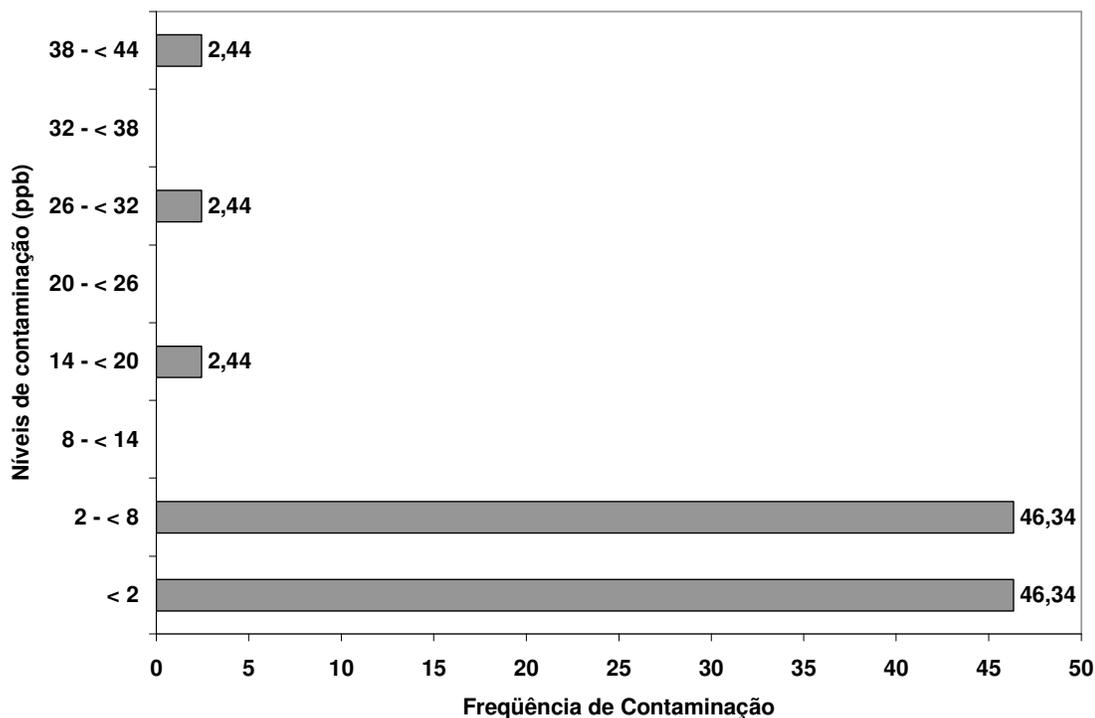


Figura 8 – Frequência (%) de contaminação com aflatoxinas em amostras de alimentos destinados à caprinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro.

Os valores médios de aflatoxinas totais detectados em amostras de CR foram de 8,72 ng.g⁻¹ e em componentes de alimentos foram de 2,37 ng.g⁻¹ (Figura 9). Quando analisamos os níveis de contaminação de aflatoxinas por tipo de alimento utilizado, observamos que as

amostras de CR se mostraram tão contaminadas quanto às amostras de componentes de alimentos (próximo a 50%), tendo as amostras de CR os níveis mais elevados de contaminação por aflatoxinas (Figura 9).

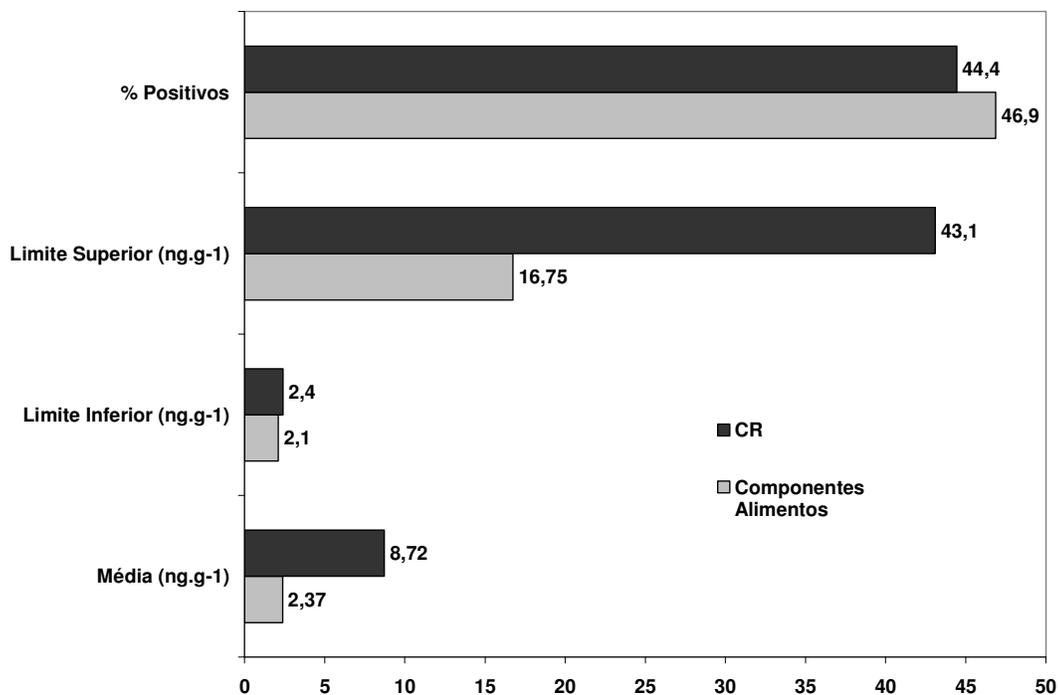


Figura 9 – Porcentagem (%) de amostras contaminadas por aflatoxinas segundo o tipo de alimento e níveis de contaminação.

Observou-se que não há estudos para esta região, ao analisarmos a literatura nacional sobre as freqüências e concentrações de aflatoxinas nestes substratos. Tanto quanto são limitados os dados no que diz respeito a este tipo de estudo de monitoramento. A identificação e a determinação das toxinas contaminantes revestem-se de grande importância para o estabelecimento e análise do risco de exposição do homem e dos animais domésticos a estas toxinas.

No caso particular de cabras, a contaminação dos alimentos e rações com aflatoxinas representa um risco ainda maior quando se considera a possibilidade de bioconversão da aflatoxina B1 em aflatoxina M1 que é secretada com o leite. Risco este agravado quando se avalia a possibilidade deste leite contaminado ser utilizado para a fabricação de queijos, quando ocorrerá a concentração da aflatoxina M1 no produto final.

A legislação brasileira atual permite níveis de até 50 ppb de aflatoxinas totais nas matérias primas utilizadas para alimentação animal (Portaria nº07 de 09/11/1988, MAPA), porém a implicação na saúde pública humana, os efeitos na saúde dos caprinos, assim como os efeitos econômicos da contaminação dos alimentos por micotoxinas, nos níveis de ocorrência locais e naqueles praticados pelo mercado internacional, geram necessidades urgentes de se estabelecerem mecanismos de controle, capazes de atingirem níveis muito baixos.

Os atuais Limites Máximos de micotoxinas regulamentados pela União Européia (Regulamento (CE) Nº 466/2001 da Comissão de 8/03/2001) e Bloco Asiático são bastante restritivos, cerca de menos de 4 ppb de aflatoxinas totais, trazendo fortes implicações econômicas para os países exportadores, que vêm enfrentando sérias dificuldades para manter

e alcançar novos mercados, conduzindo a questão para um quadro bastante preocupante, a partir do ano de 2000, quando a União Européia instituiu o Sistema de Alerta Rápido para Alimentos (RASFF). Desde então as autoridades brasileiras vêm recebendo notificações sobre a presença de aflatoxinas em produtos exportados para aquele Bloco Econômico, com freqüentes devoluções de mercadorias com níveis de contaminação, muitas vezes, aceitáveis pelas Normas Codex.

O Comitê Especialista em Aditivos e Contaminantes Alimentares da FAO - CCFAC vem fazendo recomendações aos países produtores de alimentos para implementar programas de redução dos níveis de contaminação por micotoxinas como: ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e, principalmente, as aflatoxinas.

5. CONCLUSÕES

- A microbiota estudada a partir de amostras de CR e dos componentes dos alimentos destinados à caprinos no Estado do Rio de Janeiro foi composta principalmente por espécies potencialmente toxígenas pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*;
- O gênero *Penicillium* foi o mais freqüente, sendo o *Penicillium citrinum* a espécie toxígena mais prevalente;
- O *Aspergillus wentii* foi a espécie mais prevalente dentro das espécies freqüentes do gênero *Aspergillus*, seguido das espécies potencialmente produtoras de ocratoxinas (*A. carbonarius*) e aflatoxinas (*A. flavus* e *A. parasiticus*);
- Evidenciou-se a ocorrência de aflatoxinas em 81,3% das amostras de alimentos destinados à caprinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro;
- Os níveis médios de aflatoxinas totais detectados em amostras dos componentes de alimentos ($2,37 \text{ ng.g}^{-1}$) foram inferiores ao limites brasileiros estabelecidos ($< 50 \text{ ng g}^{-1}$);
- Os níveis médios de aflatoxinas totais detectados em amostras de CR ($8,72 \text{ ng.g}^{-1}$) foram inferiores ao limites brasileiros estabelecidos ($< 50 \text{ ng g}^{-1}$).
- A metodologia analítica baseada na técnica de ELISA competitivo foi eficiente, apresentando um valor de $R^2 = 0,9988$.
- Este trabalho apresenta dados de fundamental interesse para os veterinários que atuam no ramo da caprinocultura leiteira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, H.M.; KAMEL, Y.Y. ; MEGALLA, S.E.; HAFEZ, A.H. Aflatoxin and aflatoxicosis. *Mycopathologia*, v. 77, n. 3, p. 129-135, 1982.
- ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas, Informação e documentação, Referências – Elaboração, NBR 6023, 2002.
- ABRAMSON, D.; SINHA, R.N.; MILLS, J.T. Mycotoxin storage and odour formation in moist cereals grain during granary storage. *Cereal Chemistry*, v. 57, p. 346-351, 1980.
- AH-SEO, J.; WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. *Applied Environmental Microbiology*, v.65, p.1331-1334, 1999.
- ALMEIDA, A.P.; CORRÊA, B.; MALLOZI, M.A.B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L.M.V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, p.321-326, 2000.
- ASEVEDO, I.G.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C.R.; ALMEIDA, R.M.A.; SOUZA, V.M. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus spp.* isolate from stored maize. *Revista de Microbiologia*, v.25, n. 1, p.46-50, 1994.
- BALDISSERA, M.A.; SANTÚRIO, J.M.; CANTO, S.H.; PRANKE, P.H.; ALMEIDA, C.A.A.; SCHIMIDT, C. Aflatoxinas, ochratoxina e zearalenona em alimentos para consumo animal no sul do Brasil-Parte II. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.53, p.5-10, 1993.
- BAUDURET, P. A mycological and bacteriological survey on feed ingredients and mixed poultry feeds in Reunion Island. *Mycopathologia*, v. 109, p. 157-164, 1990.
- BENKERROUM, S.; TANTAOUI-ELARAKI, A. Study of toxigenic moulds and mycotoxins in poultry feeds. *Rev. Med. Veterinarie*, v. 152, n. 4, p. 335-342, 2001.
- BRAGULAT M.R., ABARCA M.L., ACCENSI F. AND CABAÑEZ F.J. New screening method for ochratoxicogenic molds in pure cultures. *Revue. Med. Vet.*, v. 149, n. 6, p. 515, 1998.
- BROWN, T.P.; ROTTINGHAUS, G.E.; WILLIAMS, M.E. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: performance and pathology. *Avian Disease*, v.36, p.450-454, 1992.
- BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. *Journal of Food Protection*, v.47, n.8, p.637-646, 1984.
- BUENO, D.J.; SILVA, J.O.; OLIVER, G. Fungal isolation and enumeration in foods. *Methods Mol. Biol.*, v.268, p.127-131, 2004.
- CAMARGOS, S.M.; SOARES, L.M.V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLETTO, N. Fumonisin in corn cultivars grown during the 94/95 season in the

- state of São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá, SP. Abstract Book. Guarujá, SP: 2000. p.142.
- CASADO, J.M.; THEUMER, M.; MASIH, D.T.; CHULZE, S.; RUBINSTEIN, H.R. Experimental subchronic mycotoxicoses in mice: individual and combined effects of dietary exposure to fumonisins and aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*, v.39, n.6, p.579-586, 2001.
- CHU, F.S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. *Journal of Food Protection*, v.47, p. 562-569, 1984.
- COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) N° 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY TASK FORCE REPORT. *Mycotoxins: economic and health risks*. Ames, IA., n.1116, 1998
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY TASK FORCE REPORT. *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*. Ames, IA., 2003. n.139.
- DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIO, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, v. 137, p. 179-184, 1997.
- DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIO, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, v. 141, p. 37-43, 1998.
- DIONELLO, R.G.; RADIINZ, L.L; ELIAS, M.C.; MEIRELLES, M.C.A. Método de secagem e sistema de armazenamento na ocorrência de micotoxinas em milho. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v.25, p. 9-15, 2000.
- DOERR, J.A.; HUFF, W.E.; WABECK, C.J.; CHALOUPKA, G.W.; MAY, J.D.; MERKLEY, J.W. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, v.62, p.1971-1977, 1983.
- DUTTON, M.F. & KINSEY, A. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa 1994. *Mycopathologia*, Volume 131, Number 1, p. 31-36, 1995.
- FAGUNDES, M.H. Sementes de cevada. 2003. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/cas/especiais/CEVADA-SEMENTE.pdf>> Acesso em: 28 nov. 2006.
- FAO Food and Nutrition Paper 45. *World Regulations for Mycotoxins*, 1995. A compedium., Rome, 1996.

- FRÉMY, J.M.; CHU, F.S. Immunochemical methods of analysis for aflatoxin M₁. In: Van Egmond, H.P., ed. *Mycotoxins in dairy products*. London, Elsevier Applied Science, p. 97-125, 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. (Eds.) *Handbook of applied Mycology: "Mycotoxins in Ecological Systems"*. New York; Marcel Dekker, 1992. v.5, p.32-57.
- FRISVAD, J.C. & THRANE, U. Mycotoxins production by food-borne fungi. P.251-260. In: R.A. Sanson; Hoekstra, T.S ; Frisvad, J.C. & Filtenborg (eds). *Introduction to Food-Borne Fungi*. 4 th Ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands. 1995.
- GIAMBRONE, J.J.; DIENER, U.L.; DAVIS, N.D.; PANANGALA, V.S.; HOERR, F. J. Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. *Poultry Science*, v.64, p.852-858, 1985a.
- GIAMBRONE, J.J.; DIENER, U.L.; DAVIS, N.D.; PANANGALA, V.S.; HOERR, F. J. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. *Poultry Science*, v.64, p.1678-1684, 1985b.
- GHOSH, R.C.; CHAUHAN, H.V.S.; ROY, S. Immunosuppression in broilers under experimental aflatoxicosis. *Br. Vet. J.*, v.146, p.457-462, 1990.
- GMP Regulations on Product Standards in the Animal Feed Sector. GMP 14; 04-06-2004. Productschap diervoeder (Den Haag, Netherland). April, 2003.
- HENRY, M.H.; WYATT, R.D.; FLETCHER, O.J. The toxicity of purified fumonisin B1 in broiler chicks. *Poultry Science*, v.79, p.1378-1384, 2000.
- HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Additives and Contaminants*, v.13, p.173-183, 1996.
- HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran-Glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 39, n. 3, p. 488-492, 1980.
- HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v.167, p.101-134, 2001.
- IARC Ochratoxin A. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Myco-toxins, pp. 489-521. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1993.

- IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtabl>> Acesso em: 25 set 2006.
- JAVED, T.; BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L.; DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; COTE, L.M.; BUCK, W.B. Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or purified fumonisin B₁ and moniliformin. *Mycopathologia*, v.123, p.171-184, 1993.
- JONES, F.T.; HAGLER, W.H.; HAMILTON, P.B. Association of low levels of aflatoxin in feed with productivity losses in commercial broiler operations. *Poultry Science*, v.61, p.861-868, 1982.
- KAN, C.A.; RUMP, R.; KOSUTZKY, J. Low level exposure of broilers and laying hens to aflatoxin B₁ from naturally contaminated corn. *Arch. Gefluegelkd*, v.53, p.204-206, 1989.
- KELLER K.M.; QUEIROZ B.D.; KELLER L.A.M.; RIBEIRO J.M.M.; CAVAGLIERI L.R., GONZÁLEZ PEREYRA M.L., DALCERO A.M. AND ROSA C.A.R. (2006). The mycobiota and toxicity of equine feeds. *Vet. Res. Comm.* (aceito para publicação: VERC28).
- KING, A.D.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of fungi from foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 37, n. 5, p. 959-964, 1979.
- KLEIN, P.J.; BUCKNER, R.; KELLY, J.; COULOMBE, JR., R.A. Biochemical basis for the extreme sensitivity of turkeys to aflatoxin B₁. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.165, n.1, p.45-52, 2000.
- KLICH, M.; PITT, J.I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: CSIRO. 116 p., 1988.
- KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. *Mycology Papers*, 161: 1-188, 1989.
- KPODO, K.; THRANE, U.; HALD, B. *Fusaria* and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. *International Journal of Food Microbiology*, v.61, n.2-3, p.147-157, 2000.
- KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, S.A.; BAILEY, R.H.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of Long-term Feeding of Diets Containing Moniliformin, Supplied by *Fusarium fujikuroi* Culture Material, and Fumonisin, Supplied by *Fusarium*

- moniliforme* Culture Material, to Laying Hens. Poultry Science, v. 78, p. 1499–1505, 1999.
- LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph: University Books, 1995.
- LI, Y.C.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; FRITSCHKE, K.L.; ROTTINGHAUS, G.E. The individual and combined effects of fumonisin B₁ and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poult. Poultry Science, v.79, n.6, p.871-878, 2000.
- LOPEZ-DIAZ, T.M.; FLANNIGAN, B. Production of patulin and cytochalasin e by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat, Int. J. Food Microbiol. v. 35, p. 129-136, 1997.
- MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M.A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. Mycopathología, v. 142, p. 27-32, 1998.
- MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; ALMEIDA, C.A.A.; DILKIN, P. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. Arquivos do Instituto Biológico, v.68, n.1, p.41-45, 2001.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Portaria nº 07 de 09 de novembro de 1988. Publicada no Diário Oficial da União em 14 de novembro de 2002.
- MILLER, J.D. Review: Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. Journal of Stored Products Research, v.31, n.1, p.1-16, 1995.
- MOSS, M.O. Economic importance of mycotoxins-recent incidence in the United States. Animal Science, v.27, p.3941-3949, 1991.
- NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., and MARASAS W.F.O. Fusarium species: An illustrated manual for identification. University Park, PA: The Pennsylvania State University Press. 1983.
- NTAFI (NATIONAL TRADE OF ANIMAL FEED INDUSTRIES) National Association of Animal Feed Manufacturers. Perfil da Indústria Brasileira de Alimentação Animal. São Paulo, p. 8, 2000..
- OGUNDERO, V.W. Toxicogenic fungi and deterioration of Nigerian poultry feeds. Mycopathologia, v. 100, p. 75-83, 1987.
- OLIVEIRA, C.A.F.; ALBUQUERQUE, R.; CORREA, B.; KOBASHIGAWA, E.; REIS, T.A.; FAGUNDES, A.C.A.; LIMA, F.R. Produção e qualidade dos ovos de poedeiras submetidas à intoxicação prolongada com aflatoxina B₁. Arq. Inst. Biol., v. 68, n. 2, p. 1-4, 2001.

- 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.
- OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? *Vet. Med.*, v.85, p.89-94, 1990.
- PESTKA, J.J.; BONDY, G.S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.68, p.1009-1016, 1990.
- PESTKA, J.J.; ABOUZIED, M.N.; SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technology*, v.49, p.120-128, 1995.
- PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal Animal Science*, v.70, p.3964-3967, 1992.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and food spoilage*. 2 ed., London: Blackie Academic & Professional. 593 p., 1997.
- PLACINTA, C.M; D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, v.78, n.1-2, p.21-37, 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 Additives and Contaminants*, v.12, n.3, p.313-319, 1995.
- RAPER, K.B.; FENNEL, D.I. *The genus Aspergillus*. Baltimore: Willians & Wilkins. 686 p., 1965.
- RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPARD, G.S.; VANSCHALKWYF, D.J. *Fusarium moliniforme* and fumonisins in corn and in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, v.82, p.353-357, 1992.
- RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; FRAGA, M.E.; DIREITO, G.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. *Letters in Applied Microbiology*, Grã-Bretanha, v. 42, n. 2, p. 179-184, 2006.
- RIBEIRO, J.M.M.; ROSA, C.A.R.; CURVELLO, F.A., FRAGA, M.E. Toxigenic mycoflora and mycotoxins (aflatoxins and ochratoxin A) in poultry feed in Rio de Janeiro, Brazil.

In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá, SP. Abstract Book. Guarujá, SP: 2000. p.133.

ROSA, C.A.R. Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimenta cão de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal. Tese de Doutorado (Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2002..

SABINO, M. Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.40, p.153-158, 1980.

SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais, Parte 1. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 46, p. 65-71, 1986.

SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H.; GIANNATTASIO, C.M.P. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.48, p.81-85, 1988.

SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O.; GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins in maize in Brazil. Part II. . Food Additives and Contaminants, v.6, p.327-331, 1989.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S. Introduction to Food and Airborne Fungi. 6 ed., Utrech-Centraalbureau Voor Schimmelcultures. 388 p., 2000.

SANCHIS, V.; SALA, N.; PALOMES, A.; SANTAMARIA, P.; BURDASPAL, P.A. Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic molds in foods and feeds in Spain. J. Food Prot., v. 49, p. 445-448, 1986.

SANTURIO, J.M.; BALDISSERA, M.A.; ALMEIDA, C.A.A.; AHMAD, S.H.E.; PRANKE, D.H.L.; HENRICH, C.M.; ZANANDREA, S. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinadas ao consumo animal no sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 1992, São Paulo, sp. Anais. São Paulo, SP: 1992. p.14.

SCUSSEL, V.M. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis:Insular, p.19-22, 1988.

SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; SHEPARD, G.S.; THIEL, P.G.; HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.40, n.6, p. 994-997, 1992.

- SILVA, J.B.; POZZI, C.R.; MALLOZZI, M.A.B.; ORTEGA, E.M.; CORREA, B. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in stored brazilian sorghum. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá, SP. Abstract Book. Guarujá, SP: 2000 p.145.
- SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. Mycotoxins and animal foods. London: CRC Press, 1991. p. 816-841.
- VINING, L.C. Functions of secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol., v.44, p.395-427, 1990
- WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.H.; RILEY, R.T.; MERRILL JR., A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins, Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. J. Biol. Chem., v.266, n.22, p. 14486-14490, 1991.
- WATSON, D.H. Natural toxicants in food. Chichester: Ellis Horwood, 1987. p. 232-247.
- WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. Poultry Science, v.72, p.456-466, 1993.
- WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in the young turkey poult. Poultry Science, v.73, n.10, p.1517-1525, 1994.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)