

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CESAR DANIEL KRÜGER

OCRATOXINA A EM SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO SOB  
INSPEÇÃO SANITÁRIA. I. DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS SÉRICOS POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA. II. CORRELAÇÃO COM AS LESÕES RENAIIS E  
HEPÁTICAS.

NITERÓI, RJ  
2006

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

CESAR DANIEL KRÜGER

OCRATOXINA A EM SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO SOB  
INSPEÇÃO SANITÁRIA. I. DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS SÉRICOS POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA. II. CORRELAÇÃO COM AS LESÕES RENAI E  
HEPÁTICAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> LEILA GATTI SOBREIRO  
Co-orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DA ROCHA ROSA  
Prof. Dr. ROGÉRIO TORTELLY

Niterói  
2006

CESAR DANIEL KRÜGER

OCRATOXINA A EM SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO SOB  
INSPEÇÃO SANITÁRIA. I. DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS SÉRICOS POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA. II. CORRELAÇÃO COM AS LESÕES RENAIS E  
HEPÁTICAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Apresentada em 22 de fevereiro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> LEILA GATTI SOBREIRO – Orientadora  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DA ROCHA ROSA  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. ROGÉRIO TORTELLY  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO  
Universidade Federal Fluminense

Niterói  
2006

À Leticia, minha esposa, símbolo de amor pela pesquisa e pelos animais, pessoa forte e honesta, minha fonte de inspiração.

## AGRADECIMENTOS

À Dr.<sup>a</sup> Leila Gatti Sobreiro, pelo auxílio e orientação, pela amizade que cultivamos há tempos e por sempre ter acreditado em meu potencial.

Ao Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, pela orientação, por ter plantado a semente desta dissertação, abrindo este caminho em minha vida e pelo incentivo dado a minha pesquisa.

Ao Dr. Rogério Tortelly, pela orientação e apoio dispensados para esta dissertação e por ser um exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa.

À Dr.<sup>a</sup>. Glória Maria Direito, que me orientou na execução das análises cromatográficas e foi fundamental para o aprendizado sobre esse assunto árduo e vasto.

Ao CNPq, órgão financiador destes dois anos de dedicação à pesquisa.

Aos meus colegas de turma do mestrado, Agostinho Sérgio Scofano e Davi de Oliveira Almeida, por terem sido fundamentais na coleta dos materiais e parte de seu processamento e também nas fotos das lâminas.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFF, representados pelo professor e colega de pós-graduação Marcelo Figueiredo, que viabilizaram a realização de uma parte experimental do projeto.

Ao Dr. Sérgio Borges Mano, atual coordenador da pós-graduação de Medicina Veterinária da UFF, que exerce um excelente serviço à frente desta coordenação.

Aos secretários da pós-graduação, Dráusio de Paiva Ferreira e José Luiz Gomes de Azevedo, amigos com os quais pude contar para resolver diversos entraves durante estes dois anos, no mínimo.

Ao Valcir de Oliveira Pires, técnico de laboratório da UFRRJ, que esteve sempre disposto a auxiliar em todos os procedimentos laboratoriais.

À Dr.<sup>a</sup>. Lúcia Severo, chefe do S.I.E. - RJ, que disponibilizou o acesso aos matadouros para a coleta das amostras.

Aos auxiliares de inspeção e gerentes da J.M. Coelho Distribuidora de Alimentos Ltda. – SIE 572 e da Farming Alimentos Ltda. - SIE 582, que se colocaram à total disposição durante as coletas, tornando possível este trabalho.

Ao Luiz Keller, Kelly Moura Keller, Beatriz Dias Queiroz e Jéssika Mara Martins Ribeiro, colegas da equipe do laboratório de micotoxinas da UFRRJ que me receberam com muita atenção.

Aos meus pais, Oscar e Eva Krüger, pelo amor e por me apoiarem e entenderem minha ausência.

À minha amada esposa, Letícia Mattos de Souza Dantas, que é um exemplo de Ser Humano e sem a qual não teria inspiração para realizar meus sonhos, e por ser também uma profissional brilhante, talentosa e dedicada aos animais.

À Norma Vollmer Labarthe, que é um exemplo de pessoa e pesquisadora.

A Jorge Guerrero e Mary Anne Guerrero, por me darem a honra de serem meus amigos.

A Otilio Machado Pereira Bastos, uma pessoa maravilhosa e rara, pela amizade e apoio.

Aos meus filhotes de bigodes, Lili, Gegê, Foca, Davidson e Anúbis, que são muito amados e me dão muitas alegrias.

Aos meus sogros, Marília e Inácio dos Santos Alonso, pelo apoio incondicional e por estarem sempre me incentivando.

À Mêry e Athayde de Mattos, avós de coração, que apoiaram irrestritamente a mim e a Letícia.

Aos animais, em especial os suínos, que são importantes fontes para uma nutrição saudável, se respeitados os códigos sanitários e de bem estar. Perdoem-nos se nem sempre vocês são abatidos da maneira menos dolorosa possível.

A todas as pessoas que contribuíram, abrindo laboratórios à noite, conseguindo

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES,	p.9
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS,	p.10
RESUMO,	p.11
ABSTRACT,	p.12
1 INTRODUÇÃO,	p.13
2 OBJETIVOS,	p.15
2.1 OBJETIVO GERAL,	p.15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS,	p.15
3 REVISÃO DE LITERATURA,	p.16
3.1 BREVE HISTÓRICO DA MICOTOXICOLOGIA,	p.16
3.2 IMPORTÂNCIA DAS MICOTOXINAS EM ALIMENTOS,	p.18
3.3 ORIGEM E IMPORTÂNCIA DA OCRATOXINA,	p.20
3.4 MECANISMOS DE AÇÃO DA OCRATOXINA,	p.26
3.4.1 Propriedades da molécula,	p.26
3.4.2 Farmacocinética,	p.27
3.4.3 Absorção e distribuição,	p.27
3.4.4 Biotransformação,	p.28
3.4.5 Atuação no organismo,	p.29
3.4.6 Excreção,	p.31
3.5 SINAIS CLÍNICOS EM SUÍNOS,	p.31
3.6 ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS EM SUÍNOS,	p.34
3.7 IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE HUMANA,	p.39
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A,	p.45
3.9 LEGISLAÇÃO,	p.47

3.10	PREVENÇÃO,	p.50
4	MATERIAL E MÉTODOS,	p.55
4.1	MATERIAL,	p.55
4.1.1	Amostras,	p.55
4.1.2	Equipamentos,	p.55
4.1.3	Padrão,	p.56
4.1.4	Reagentes e Soluções,	p.57
4.2	MÉTODOS,	p.57
4.2.1	Coleta do material,	p.57
4.2.2	Procedimentos para cromatografia,	p.58
4.2.2.1	<u>Condições do cromatógrafo,</u>	p.58
4.2.2.2	<u>Procedimentos de extração descrito por Curtui e Gareis (2001),</u>	p.58
4.2.3	Cálculo da concentração de ocratoxina A em amostras de soro suíno,	p.59
4.2.4	Procedimentos do exame histopatológico,	p.59
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA,	p.60
5	RESULTADOS,	p.61
6	DISCUSSÃO,	p.67
7	CONCLUSÕES,	p.70
8	CONSIDERAÇÕES,	p.71
9	OBRAS CITADAS,	p.72

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig.1 Estrutura química da ocratoxina A. (7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3-metil-isocumarina ligado através do grupo 7-carboxílico por uma ligante amida a L-fenilalanina) (STORMER, 1992; WHO IARC 1993), p.21
- Quadro 1 Características químicas, físicas e físico-químicas da ocratoxina A, p.26
- Fig.2 Fluxograma da técnica descrita por Curtui e Gareis (2001) com indicação de pequenas alterações realizadas durante as análises, p.62
- Fig.3 Etapa de extração da ocratoxina. Eppendorfs com 0,8 ml de soro + 0,2 ml de TCA15% + 1 ml de diclorometano após mistura (→) e “eppendorfs” com diclorometano após retirada das fases superior e intermediária (→), p.63
- Fig.4 Linearidade do padrão de ocratoxina A utilizado, equações da reta e logarítmica, p.63
- Fig.5 Cromatograma do padrão de ocratoxina A utilizado nas análises de soro suíno, p.64
- Fig.6 Exemplo de cromatograma de amostra de soro suíno com pico no tempo de retenção da ocratoxina A (→), p.64
- Tabela 1 Concentração de ocratoxina A em amostras de soro suíno submetido à CLAE, p.64
- Tabela 2 Achados histopatológicos mais frequentes em rins de suínos divididos por coleta, p.65
- Fig.7 Suíno. Rim. Infiltrado inflamatório perivascular mononuclear, p.66
- Fig.8 Suíno. Rim. Detalhe do aspecto vacuolar da degeneração. H.E., p.66
- Fig.9 Suíno. Rim. Focos de vasculite crônica. H.E. (→), p.66
- Fig.10 Suíno. Rim. Nefrite intersticial crônica. Nota-se desorganização da arquitetura do órgão determinado por acentuada fibrose (→) e infiltração de mononucleares (→) que ora individualizam, ora ocasionam o desaparecimento de túbulos. H.E., p.66

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

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

## RESUMO

A ocratoxina é produzida principalmente por espécies de *Aspergillus* e pelo *Penicilium verrucosum* e é uma micotoxina altamente nefrotóxica, além de também ter efeitos hepatotóxicos. O suíno é uma das espécies mais sensíveis aos efeitos tóxicos da ocratoxina A que pode ser encontrada no sangue, rins, fígado, músculo e gordura destes animais. O homem pode se contaminar ao ingerir grãos, seus derivados, produtos e subprodutos de origem animal contaminados. A prevenção é a principal forma de evitar problemas causados pela ingestão de ocratoxina A. Para quantificar a ocratoxina A no soro de suínos, a técnica mais indicada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi realizado o levantamento da concentração de ocratoxina A, através da técnica de Curtui e Gareis (2001), em 87 suínos destinados ao abate em matadouro sob Inspeção Estadual na região serrana do Estado do Rio de Janeiro. Também foi realizado o estudo anatomopatológico dos rins e fígados desses animais procurando-se correlacionar as alterações com os resultados de tais concentrações. Através da análise do soro por CLAE observou-se que 4,59% das amostras de soro analisadas apresentaram-se acima do limite de detecção ( $0,073 \text{ ng ml}^{-1}$ ) e quantificação ( $0,062 \text{ ng ml}^{-1}$ ). A metodologia empregada para a detecção de OTA em soro suíno mostrou-se eficiente. As alterações histopatológicas mais frequentemente encontradas em rins foram: infiltrado inflamatório intersticial (35,63%), multifocal (16,09%) na região medular (5,74%) e degeneração tubular (11,48%). No fígado a maior ocorrência foi de infiltrado inflamatório em espaço porta (12,64%). Não houve correlação significativa entre os achados histopatológicos e a ocorrência da micotoxina no soro. Existe a necessidade de monitorar a ocorrência desta toxina no Brasil, visto que a maioria dos casos de nefropatia em matadouros sob inspeção não tem suas causas definidas.

Palavras-chave: Ocratoxina A. Soro suíno. Cromatografia líquida de alta eficiência. Achados histopatológicos.

## ABSTRACT

Ochratoxin A is mainly produced by species of *Aspergillus* and *Penicillium verrucosum* and is a highly nephrotoxic micotoxin, besides having hepatotoxic effects. Swine is one of the most sensible species to the toxic effects of ochratoxin A. Ochratoxin A can be detected in the animal's blood, kidneys, liver, muscle and fat. Human beings can be contaminated by ingestion of contaminated grains, swine meat and byproducts. Prevention is the best way to avoid problems consequent to ochratoxin A ingestion. To quantify ochratoxin A in swine serum, the most indicated technique is the high precision liquid chromatography (HPLC). A survey of ochratoxin A concentration in swine serum was performed using 87 finished swines original from a slaughter house under state inspection in the Rio De Janeiro State, using Curtui and Gareis (2001) technique. Kidney and liver anatomopathologic study was also carried out. In many serum samples (4.59%) ochratoxin A levels were above detection ( $0.073 \text{ ng ml}^{-1}$ ) and quantification limits ( $0.062 \text{ ng ml}^{-1}$ ). The methodology used for ochratoxin A detection in swine serum revealed to be efficient. The most frequently kidney injuries found were inflammatory interstitial infiltrated (35,63%), multifocal (16,09%) in the medular region (5,74%) and tubular degeneration (11,48%). In liver samples, inflammatory infiltrated in the space carries was the most frequently observed alteration (12.64%). There was no significant correlation between histopathologic findings and ochratoxin A occurrence in serum. It is necessary to monitor ochratoxin A occurrence in Brazil, since most of the nephropathy cases in slaughter houses under inspection does not have determined causes.

Keywords: Ochratoxin A. Swine serum. High precision liquid chromatography. Histopathologic findings

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse pelos fungos e pelas micotoxinas é enorme, não só sob o ponto de vista científico, como pela perspectiva da economia e da saúde pública. Os efeitos prejudiciais das micotoxinas em humanos e animais têm sido reconhecidos desde a década de 60. A atenção dispensada ao entendimento das micotoxinas é necessária para que sejam tomadas medidas compensatórias relacionadas principalmente a minimização dos danos causados pela ingestão destes metabólitos.

Apesar dos esforços da comunidade científica mundial, as estatísticas sobre a indução de doenças pelas micotoxinas ainda são insuficientes. Portanto, muitos estudos ainda devem ser realizados para avaliar os vários efeitos toxicológicos das micotoxinas em humanos e animais. Problemas como baixo rendimento das colheitas, índices zootécnicos desfavoráveis, doenças nos animais, alterações nos alimentos com perdas de características sensoriais e nutricionais, elevados custos derivados da prevenção e dos tratamentos para a descontaminação e aparecimento de doenças geralmente de caráter crônico em humanos são determinantes para fundamentar a necessidade do aprofundamento do conhecimento das micotoxinas.

A exposição do homem às micotoxinas ocorre tanto por via alimentar como respiratória através do consumo e/ou manipulação de grãos contaminados por fungos desde a etapa da colheita até seu armazenamento e distribuição. Estas contaminações são muito comuns e de difícil controle, por dependerem de diversos fatores. Os grãos contaminados servem de base para a alimentação de várias espécies animais, incluindo o homem. O nível de contaminação está diretamente relacionado a quantidade de grãos, *in natura* ou na forma de rações, ingerida pelos animais. Portanto, a prevenção destas situações é indispensável, tentando-se, ao máximo, reduzir os problemas no campo, aplicando, entre outros fatores,

técnicas convenientes de colheita, secagem e armazenamento desses grãos, além da análise de grãos suspeitos de contaminação fúngica.

Os métodos de análise têm se tornado mais rápidos e eficazes para que supram as necessidades dos locais de produção do alimento, seja animal ou vegetal. Isso possibilita uma maior agilidade nos processos e na garantia de qualidade do alimento que irá para o consumo humano ou para o arração animal.

Devido ao fato da ocratoxina A ocorrer naturalmente em alimentos e rações e também em tecidos de suínos de produção, numerosas investigações experimentais têm sido realizadas para melhorar o conhecimento sobre essa toxina.

No Brasil, são escassos os dados epidemiológicos sobre a ocorrência de ocratoxina em alimentos. É necessário um maior esforço em busca deste conhecimento, visto que o país é um dos maiores produtores e exportadores de grãos e carnes. A capacitação dos laboratórios e de pessoal para implantar técnicas adequadas de análises e também o rastreamento dos pontos críticos é determinante para que o país não sofra restrições políticas e econômicas frente ao comércio internacional e busque ainda a diminuição das perdas durante o processo de produção dos alimentos em geral.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Pesquisar a ocorrência de ocratoxicose em suínos abatidos na região serrana do Rio de Janeiro.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a contaminação natural e a presença de ocratoxina A em suínos através da análise sérica;
- Correlacionar a presença de ocratoxina A no soro com as possíveis lesões renais e hepáticas destes animais;
- Avaliar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência na detecção de resíduos de ocratoxina A em soro sanguíneo suíno.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 B

(SCHOENTAL, 1995). Já na era moderna, as mais importantes epidemias relacionadas com micotoxinas foram: ergotismo, que matou centenas de pessoas na Europa no último milênio, causado pelo *Claviceps purpurea* presente em grãos como o centeio; aleucia tóxica alimentar, responsável pela morte de mais de 100.000 russos entre 1942 e 1948 que está associada a presença do fungo *Fusarium* no trigo, no painço e na cevada, cujas principais manifestações são inflamações das mucosas e gastroenterite aguda, podendo evoluir para uma síndrome hemorrágica genital e sintomas neurológicos; estaquibotriotoxicose, que matou centenas de milhares de cavalos na antiga União Soviética na década de 30, produzida pela toxina do fungo *Stachybotrys atra* (*S. chartarum*, *S. alternans*); e a aflatoxicose, que matou 100.000 perus jovens no Reino Unido em 1960 e tem causado doenças e casos de óbito em animais e, provavelmente, no homem (PITT, 2000). Mais recentemente, arqueologistas que efetuaram estudos em tumbas egípcias morreram misteriosamente. Uma das hipóteses apontadas como causa foi a inalação de micotoxinas, particularmente a ocratoxina A, que poderia estar relacionada com uma série de incidentes envolvendo falência aguda renal (DI PAOLO et al., 1993).

O período entre 1960 e 1975 foi chamado de “corrida do ouro” para as micotoxinas pois muitos cientistas reuniram seus esforços e realizaram pesquisas bem fundamentadas sobre esses agentes tóxicos (BENNETT; KLICH, 2003). O fato mais marcante para o estudo das micotoxinas ocorreu no início da década de 60, quando mais de 100.000 perus morreram na Inglaterra, causando um grande prejuízo para os criadores destas aves. Os pesquisadores da época começaram, então, a buscar a causa para tal ocorrência. Descobriram que as mortes aconteceram após a alimentação com grãos contaminados provenientes do Brasil. Começaram então a constatar que existia algo no produto brasileiro que estava levando a morte desses animais. Entre as várias hipóteses que surgiram na época, duas chamaram mais a atenção: a existência de um contaminante externo e a possibilidade da ocorrência de um contaminante natural dos grãos. Naquela ocasião, não havia certeza de que se tratava de uma micotoxina (ALLCROFT et al., 1961; SARGEANT et al., 1961; CAMPOS, 1999). Foram realizados experimentos com os grãos provenientes do Brasil e de outros locais considerados isentos do contaminante desconhecido, denominado inicialmente de fator tóxico e a doença ocasionada por ele foi descrita como “doença X dos perus” (ALLCROFT et al., 1961; SARGEANT et al., 1961). Naquela época existiam, naturalmente, mais dúvidas do que certezas sobre a origem das mortes. Muitos estudos começaram a ser publicados com conclusões geralmente polêmicas e controversas. Alguns defendiam a tese de que eram contaminantes naturais

enquanto outros achavam que eram contaminantes tóxicos externos. Alguns ainda defendiam que a toxidez aumentava com o calor, e um outro grupo de cientistas defendia o oposto.

Num dos primeiros estudos experimentais realizados após a descoberta do “fator X”, os pesquisadores procuraram examinar os extratos derivados dos grãos contaminados através do uso de diferentes solventes para verificarem se o fator desconhecido fazia parte de algum grupo de substância anteriormente descrita. Dividiram esses extratos por toxidez e administraram individualmente em patos em crescimento e não conseguiram defini-lo como um alcalóide. Suspeitaram então de que a substância poderia ser derivada de microrganismos e continuaram suas pesquisas com o objetivo de isolar o princípio ativo tóxico que estava causando a morte dos animais (SARGEANT et al., 1961).

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

### 3.2 IMPORTÂNCIA DAS MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

O campo das micotoxinas é complexo e interdisciplinar, envolvendo muitos conhecimentos e uma grande capacidade de inter-relacionar diferentes áreas. De uma forma geral, podem-se relacionar cinco principais aspectos do estudo das micotoxinas. O estudo sobre os gêneros alimentícios consiste em todos os aspectos da produção, comercialização e utilização deste alimento; o sistema da deterioração tem muitos fatores inter-relacionados, isto é, o fator biológico, químico, físico, micro e macroambiental; o conhecimento da micotoxina envolve aspectos relacionados com a produtividade, metabolismo, toxicologia, saúde e oferta e distribuição na natureza; as formas de controle compreendem a prevenção, análise da micotoxina e segregação do material contaminado e detoxificação, tendo a análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) como excelente ferramenta e por fim, a análise do sistema sócio-econômico que relaciona e envolve a conjuntura cultural, política e econômica estudada (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004).

As micotoxinas não são apenas difíceis de definir, são também complicadas para classificar. Devido a suas diversas estruturas químicas e origem biossintética, seus variados efeitos biológicos e sua produção por um variado número de diferentes espécies de fungos, os esquemas de classificação tendem a refletir a área do profissional que realiza sua

categorização. Clínicos frequentemente os relacionam com os órgãos que são afetados. Assim, as micotoxinas podem ser classificadas em hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas e imunotoxinas. Biólogos celulares colocam as micotoxinas em grupos genéricos como teratogênicos, mutagênicos, carcinogênicos e alérgenos. Químicos orgânicos as classificam com base na sua estrutura química (ex. cumarinas, lactonas); bioquímicos de acordo com sua origem biosintética (derivados de aminoácidos) e micologistas, pelo fungo que as produzem (toxinas de *Aspergillus*, toxinas de *Penicillium*). Nenhuma dessas classificações é inteiramente satisfatória (BENNETT; KLICH, 2003).

As micotoxinas compõem uma mistura de toxidez, carcinogenicidade e mutagenicidade resultantes da atividade metabólica secundária dos fungos toxígenos que podem ser produzidas em uma ampla variedade de produtos alimentícios (*commodities*) e sob uma variedade grande de situações, sendo reconhecidamente tóxicas para outras formas de vida (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; DILKIN, 2002). São compostos orgânicos de baixo peso molecular e não possuem imunogenicidade (DILKIN, 2002). A presença das micotoxinas nos alimentos e rações é potencialmente perigosa para a saúde de homens e animais, pois além de não estimular o sistema imune, já que não é reconhecido como estranho ao organismo, possuem vários efeitos tóxicos e grande estabilidade frente ao aquecimento (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; PITTET, 1998). A ocorrência de micotoxinas em alimentos é um problema de grande interesse em todo o mundo (WOOD 1992), chegando a afetar mais de 25% da produção anual de grãos (LAWLOR; LYNCH, 2001).

São reconhecidas mais de cem espécies de fungos produtores de micotoxinas que podem se desenvolver em um grande número de substratos destinados, tanto à alimentação humana, quanto a animal, e produzir um grande número de micotoxinas (MIDIO; MARTINS, 2000). Este número é desconhecido, embora alguns autores afirmem que existam cerca de 400 micotoxinas reconhecidas (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; PITTET, 1998; DILKIN, 2002; MIDIO; MARTINS, 2000; PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004) onde cerca de 250 destas micotoxinas já tiveram sua estrutura química definida. No entanto, a maioria ainda não teve definido seu impacto biológico sobre a saúde humana e animal (OSWEILLER, 1998).

Cerca de trinta espécies de fungos foram reconhecidos e associados com a ocorrência natural de micotoxicoses em animais (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980). Entre todas as micotoxinas conhecidas, aproximadamente uma dúzia delas tem sido propriamente

investigadas e recebem atenção regular por serem consideradas de maior importância como ameaça a saúde humana e animal (PITTET, 1998; BENNETT; KLICH, 2003).

As principais micotoxinas podem ser divididas em: Aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como *A. flavus* e *A. parasiticus*; Ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus ochraceus* e diversas espécies do gênero *Penicillium*; Fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* e a Patulina, produzida por diversas espécies do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e *Biossochlamys*, principalmente pelo *Penicillium expansum* (PITTET, 1998; BENNETT; DILKIN, 2002; KLICH, 2003; PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004).

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

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

### 3.3 ORIGEM E IMPORTÂNCIA DA OCRATOXINA

A ocratoxina tem recebido considerável atenção nos últimos anos, não apenas por afetar seriamente o desempenho dos animais e seu bem-estar, mas também por ocasionar efeitos deletérios nos humanos, devido a suas propriedades nefrotóxicas e carcinogênicas (KROGH, 1977; KROGH et al., 1979; GOLINSKI et al., 1985; COOK et al., 1986; NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1989; LINDNER, 1990; HALD, 1991; KUIPER-GOODMAN, 1991; LACEY et al., 1992; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; STORMER, 1992; PITTET, 1998; OSWEILLER, 1998; BARISIC et al., 2002; MÜLLER et al., 2004). Existem diferentes formas da ocratoxina, determinadas pelas letras A, B, C, D, além dos seus grupamentos metil e etil-ésteres. Elas têm sido isoladas de culturas fúngicas, sendo que a

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

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

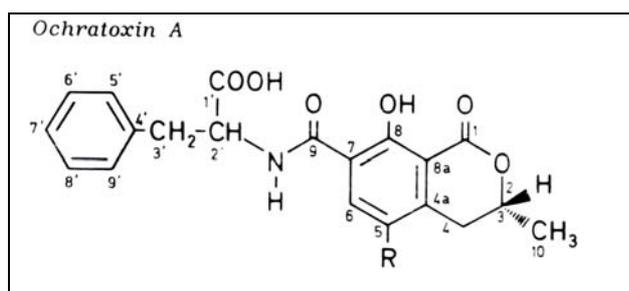


Fig.1: Estrutura química da ocratoxina A. (7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3-metil-isocumarina ligado através do grupo 7-carboxílico por um ligante amida a L-fenilalanina) (STORMER, 1992; WHO IARC 1993).

Os primeiros estudos sobre a origem da ocratoxina isolaram a toxina primeiramente do *Aspergillus alutaceus* (atualmente conhecido como *Aspergillus ochraceus*) e, posteriormente, foram descobertos outros membros deste grupo que também a produzem (KROGH, 1976; SCOTT, 1978; PITTET, 1998; PITT, 2000), como o *A.sulphureus*, *A.melleus*, *A.sclerotiorum*, *A.ostianus*, *A.petrakii* e ainda *Penicillium viridicatum*, *P.palitans*, *P.cyclopium*, *P.commune*, *P.variabile* e *P.purpurescens* (SCOTT, 1978; PITTET, 1998). Os estudos relacionaram a ocorrência natural de ocratoxina com grãos e alimentos produzidos apenas em países de climas temperados ou continentais (SCOTT, 1978; ROSA, 1999). No entanto, com o avanço das pesquisas, alguns fungos tiveram suas classificações alteradas e observaram ainda que a contaminação por ocratoxina A encontrava-se muito mais disseminada do que descrito inicialmente (WHO, 2001).

Entre o gênero *Penicillium*, foi descrito inicialmente a espécie *P. viridicatum* como principal produtora de ocratoxina e este conceito permaneceu por mais de uma década. Eventualmente, tornou-se claro que isolados considerados como *P. viridicatum* produtores de ocratoxina foram corretamente classificados em uma espécie separada, *Penicillium verrucosum*, sendo relacionado quase que exclusivamente aos grãos produzidos em zonas temperadas (PITT, 2000).

Informações relativamente recentes indicaram que a ocratoxina A é produzida por apenas algumas espécies relacionadas ao *Aspergillus ochraceus*, todas classificadas em *Aspergillus* subgênero *Circumdati* seção *Circumdati*. Além do *A.ochraceus*, esse grupo de produtores de ocratoxina A inclui dois fungos ascospóricos, *Neopetromyces muricatus* (estado assexual do *A.muricatus*) e *Petromyces alliaceus* (estado assexual do *A.alliaceus*) somados ao *Aspergillus sclerotiorum* e o *A.sulphureus* (WHO, 2001). *N.muricatus* é o nome correto para os produtores isolados de ocratoxina A que foram previamente identificados como *A.melleus* (PITTET, 1998; WHO, 2001). Ambos, *N.muricatus* e *P.alliaceus* são espécies incomuns. Isolados de *A.sclerotiorum* raramente produzem toxina, apesar de isolados de *A.sulphureus* serem produtores usuais, esta é uma espécie rara. Excetuando o *A. ochraceus*, todas essas espécies são muito incomuns em alimentos e não são conhecidos como causadores de espoliação. Por essa razão, a única espécie de alguma importância na produção de ocratoxina A do *Aspergillus* seção *Circumdati* é o *A.ochraceus* (WHO, 2001). Ocasionalmente, isolados da espécie *Aspergillus niger* podem produzir ocratoxina A. Entretanto é relatado que *Aspergillus carbonarius* é o produtor mais comum, e uma fonte muito mais importante (PITT, 2000; WHO, 2001). Estas espécies são muito difundidas em alimentos tropicais, e tem uma importante característica que é a resistência a temperaturas elevadas, não sendo eliminados pelos processos de secagem dos grãos. *Aspergillus carbonarius* é uma importante fonte de ocratoxina A em frutas secas de parreiras, vinhos e provavelmente café (ROSA, 1999; PITT, 2000). O impacto na saúde humana da ocratoxina A por estas espécies ainda não foi avaliado (PITT, 2000). Outras espécies têm sido relacionadas como produtoras de ocratoxina A, mas nenhuma delas teve até agora confirmações fundamentadas (WHO, 2001).

A presença de ocratoxina já foi detectada em muitos alimentos, sendo mais comum em alimentos vegetais secos e armazenados, onde geralmente encontram um substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; HALD, 1991; KUIPER-GOODMAN, 1991; WHO, 2001; DILKIN, 2002; FAO, 2001). Entre os alimentos que sofrem a ação espoliadora do fungo e podem apresentar a ocratoxina, temos o milho, trigo, aveia, amendoim, arroz, cevada, sorgo, semente de algodão, e, ocasionalmente, as silagens de alguns

destes grãos e seus produtos derivados (KROGH, 1977; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; COOK et al., 1986; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; OSWEILLER, 1998; JORGENSEN, 1998; WHO, 2001; COSTA; GERMANO; GERMANO, 2006). Um dos estudos realizados em relação ao substrato afirmava que as sementes oleaginosas proporcionavam melhores condições para o crescimento dos fungos quando comparados a outros grãos (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Outros produtos como queijos, temperos, azeitonas pretas e carnes processadas já foram relacionados com a presença do *Aspergillus ochraceus* (WHO, 2001).

Os fungos toxigênicos estão presentes no ambiente e, de uma forma geral, os cultivares estão sujeitos a albergarem estes fungos. Por sua vez, eles podem ou não germinar, crescer e elaborar suas toxinas de acordo as condições específicas exigidas pelo tipo de fungo, considerando-se que a variação regional e sazonal está diretamente associada com o tipo de toxina produzida no campo. Estas condições ótimas para o crescimento do fungo são extremamente variáveis (COOK et al., 1986; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKY, 1991; FRISVAD; SAMSON, 1992; WOOD, 1992; OSWEILLER, 1998; CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002; DILKIN, 2002). Em geral, períodos mais quentes e úmidos favorecem o desenvolvimento dos fungos (FROHLICH, MARQUARDT; OMINSKY, 1991).

Nos produtos estocados em depósitos ou moinhos, a associação com fatores da natureza não é observada, pois a produção de toxinas ocorre de acordo com as condições de armazenagem e distribuição para o mercado (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002; DILKIN, 2002).

Desta forma, os fungos podem ser divididos em fungos de campo, que crescem sob condições que ocorrem antes da colheita e fungos de armazenamento, que normalmente desenvolve-se na pós-colheita (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; OSWEILLER, 1998).

Fatores não-naturais como danos mecânicos durante a colheita e alterações nos grãos por insetos e fatores naturais como umidade e temperatura tornam a safra mais suscetível a invasão fúngica e a formação de toxina no campo (KROGH, 1976; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; WOOD, 1992; OSWEILLER, 1998).

Por outro lado, os fungos que se desenvolvem e produzem toxinas nos grãos e outros concentrados durante o período de armazenamento são influenciados por fatores relacionados, principalmente, com umidade e temperatura inadequadas, combinadas com longos períodos

de permanência nos armazéns (KROGH, 1976; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; FRISVAD; SAMSON, 1992; OMINSKI et al., 1996; OSWEILLER, 1998; FAO, 2001).

Muitos estudos relacionam estes elementos, indicando estreita relação entre a quantidade de ocratoxina A produzida por algumas espécies de fungos e parâmetros como atividade de água, temperatura, tempo de estocagem, tipo de substrato, presença de microflora competitiva, cepa de fungo e integridade da semente (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; WOOD, 1992; MILANEZ; SCHOENLEIN-CRUSIUS; OKINO, 2002; PARDO et al., 2004). As cepas também podem influenciar na produção da toxina, já que nem todas as subculturas de cepas bem conhecidas produzem as mesmas quantidades de ocratoxina A KROGH 1977, COOK 1986 (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; MILANEZ; SCHOENLEIN-CRUSIUS; OKINO, 2002).

Como visto, a combinação das condições climáticas com as condições de manejo dos produtos vegetais influi diretamente sobre a produção de micotoxinas. Em geral as condições de campo são mais desfavoráveis em países de climas quentes e úmidos, como o Brasil, ou em épocas que apresentem estas características, enquanto que as condições de armazenamento podem estar presentes em todos os lugares do mundo desde que favoreçam o desenvolvimento das micotoxinas (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; KROGH, 1976; OMINSKI et al., 1996; DILKIN, 2002; FAO, 2001).

A distribuição geográfica dos fungos na natureza é bem ampla (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; CREPPY, 2002). Os fungos que produzem ocratoxina, como os do gênero *Penicillium*, usualmente se desenvolvem em cereais a baixas temperaturas e, portanto, são os maiores produtores de ocratoxina nas áreas de baixa temperatura, predominante nos países de clima temperado (COOK et al., 1986; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; WHO, 2001). Como os cereais são amplamente utilizados na alimentação animal na Europa, e a ocratoxina A é relativamente estável *in vivo*, esta micotoxina é também encontrada em alguns produtos de origem animal naquela região, especialmente em rins e fígados suínos (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; FAO, 2001).

Já o *Aspergillus ochraceus* é, provavelmente, o mais importante produtor de ocratoxina em países de clima tropical e subtropical (FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; DILKIN, 2002).

Considera-se, em geral, uma atividade de água ótima para o crescimento e germinação do *Aspergillus ochraceus* entre 0,95 a 0,99, com limite mínimo de 0,79 (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; WHO, 2001; PARDO et al., 2004; FAO, 2001). A temperatura de crescimento do *A. ochraceus* varia de 8 a 37°C, com crescimento ótimo em torno de 28°C

(TRENK; BUTZ; CHU, 1971; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; WHO, 2001; PARDO et al., 2004; FAO, 2001). Essa temperatura ótima de crescimento assemelha-se a da formação de aflatoxinas. Entretanto, a ocratoxina A continua apresentando um considerável crescimento aos 15°C, diferente das aflatoxinas que tem uma formação muito baixa nessa faixa. Em relação à formação de ocratoxina B, ocratoxina C e um de seus produtos derivados da hidrólise, o ácido diidro-isocumarínico, a quantidade de ocratoxina B formada a 28°C no final de 17 dias de incubação foi 25 vezes menor que a quantidade de ocratoxina A. Nesse período não foi detectada a formação de ocratoxina C e o ácido diidro-isocumarínico apresentou-se em muito baixa concentração (TRENK; BUTZ; CHU, 1971). Em um experimento realizado no Brasil, a produção e o crescimento ótimo de *A. ochraceus* em cevada ocorreu com uma atividade de água de 0,82 a 25 e 30°C (RIBEIRO et al., 2006).

O *Penicillium verrucosum* é um fungo de crescimento lento com capacidade de desenvolvimento em baixa atividade de água e a baixas temperaturas. Desenvolve-se de forma ótima em atividade de água menor que 0,80 (WHO, 2001) e temperatura ótima de 20°C, variando de 0 a 30°C (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; COOK et al., 1986; WHO, 2001; FAO, 2001).

De forma geral, o crescimento fúngico e a produção dos seus metabólitos secundários apresentam um maior desenvolvimento em grãos estocados quando encontram um teor de umidade nos grãos maior que 16% e uma umidade do ar maior que 85% (COOK et al., 1986; FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; OSWEILLER, 1998; DILKIN, 2002). A espécie *Aspergillus ochraceus* cresce lentamente num pH de 2,2 e, em melhor velocidade, com pH entre três e dez (WHO, 2001).

Uma importante característica da ocratoxina A é sua estabilidade térmica e sua resistência ao tratamento térmico. É altamente estável em alimentos contaminados e estocados, podendo ser recuperada da amostra previamente contaminada, cerca de 45% da toxina após três meses de armazenamento. Apesar da ocratoxina A pura ser foto-sensível, o efeito da luz sobre as toxinas aderidas aos cereais tem pouca importância, apresentando níveis similares em amostras estocadas no escuro ou não. Isso indicaria que a remoção de ocratoxinas de cereais pode ser muito difícil, tendo como melhor forma de proteção, a prevenção da formação de toxina através de procedimentos de manipulação satisfatórios (TRENK; BUTZ; CHU, 1971).

### 3.4 MECANISMOS DE AÇÃO DA OCRATOXINA A

#### 3.4.1 Propriedades da molécula

As micotoxinas em geral são metabólitos secundários, isto é, aparentam não exercer influência sobre o metabolismo e o crescimento fúngico (PITT, 2000). A maioria apresenta-se com peso molecular entre 50 e 500 Dalton e, desta forma, essas pequenas moléculas não demonstram propriedades antigênicas, não induzindo assim a resposta do sistema imunológico humano (ELLING, 1977; PIER, 1992; PITT, 2000). O principal perigo das micotoxinas na dieta humana reside na sua inabilidade para detectá-las biologicamente (PITT, 2000). Algumas características químicas, físicas e físico-químicas da ocratoxina A estão representadas no quadro 1.

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

<p><b>Ocratoxina A</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nome (chemical abstract): L-Phenilalanine, N-[(5-chloro-3, 4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)-carbonyl]-R-</li> <li>• Nome sistemático (IUPAC): N-{{(3R)-5-chloro-8hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl}carbonyl}-3-phenyl-L-alanine</li> <li>• Sinonímia: (-)-N-[(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl) carbonyl]-3-phenylalanina</li> <li>• N<sup>o</sup>registro no CAS: 303-407-9</li> </ul>
<p><b>Características e propriedades físico-químicas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Descrição: cristais brancos (recristalizados de xileno); intensa fluorescência em luz ultravioleta, emitindo fluorescência verde e azul, em soluções ácidas e alcalinas, respectivamente.</li> <li>• Peso molecular: 403,84 Dalton</li> <li>• Ponto de fusão: 169°C – recristalizada de xileno e em benzeno como 90°.</li> <li>• Absorbância UV máxima (benzeno): 213,332 nm (<math>\epsilon</math> 36.800, 6.400) (etanol): 215,333 nm (<math>\epsilon</math> 34.000, 2.400)</li> <li>• Emissão de fluorescência: máxima a 467 nm em etanol a 96% e de 428 nm em etanol absoluto</li> <li>• Reação ótica: <math>[\alpha]_D^{21} -46.8^\circ</math> (c=2,65 mmol/L [1,07 g L<sup>-1</sup>] em clorofórmio) e <math>[\alpha]_D^{20} -118^\circ</math> (c=1,1 mmol/L em clorofórmio).</li> </ul>
<p><b>Solubilidade</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A forma de ácido livre é moderadamente solúvel em solventes orgânicos como: clorofórmio, etanol, metanol e xileno.</li> <li>• Água 1 mg ml<sup>-1</sup> a 19°C</li> <li>• DMSO (dimetilsulfóxido): <math>\geq 100</math> mg ml<sup>-1</sup> a 19°C</li> <li>• Etanol 90%: 10 a 50 mg ml<sup>-1</sup> a 19°C</li> <li>• Metanol: moderadamente solúvel</li> <li>• Acetona: 50 a 100 mg ml<sup>-1</sup> a 19°C</li> <li>• Tolueno: não avaliado.</li> <li>• Clorofórmio: não avaliado.</li> </ul>

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

### 3.4.2 Farmacocinética

A relação entre a toxicocinética da ocratoxina A e as propriedades de ligação com a albumina varia entre as diferentes espécies animais, inclusive o homem, devido às diferenças na fisiologia (GALTIER, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Fatores como a constante de dissociação, a porcentagem de toxina livre ou não ligada e a meia-vida desta toxina após injeção intravenosa têm sido avaliadas, embora permaneça desconhecida a relação entre a ligação das proteínas, a baixa taxa de depuração da toxina (*clearance*) para a circulação sistêmica e a toxicidade da ocratoxina A (MARQUARDT; FROHLICH, 1992).

### 3.4.3 Absorção e distribuição

A ocratoxina A parece ser absorvida de forma passiva através da membrana lipídica do trato gastrointestinal na sua forma não ionizada ou parcialmente ionizada (GALTIER, 1991, MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GODIN et al., 1997; BERGER et al., 2003). A difusão da forma não ionizada pode ser considerada o principal mecanismo de transferência gastrointestinal para muitos eletrólitos fracos (GALTIER, 1991; GODIN et al., 1997). O grupo hidróxi-fenólico no anel diidro-isocumarínico e o grupo carboxílico em fenilalanina são os responsáveis primários pela absorção da ocratoxina A, pois são eles que dão as propriedades de ácido fraco da molécula (GALTIER, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GODIN et al., 1997). Alguns trabalhos relatam evidências que sugerem que na maioria das espécies animais, a ocratoxina A é absorvida primariamente pelo estômago. Outro trabalho ainda relata que a absorção máxima ocorre no esôfago e, em menor grau, no jejuno (GALTIER, 1991).

A ocratoxina A é uma micotoxina com propriedades de um ânion orgânico e acredita-se que sua entrada nas células tubulares renais ocorra na porção média e terminal do túbulo proximal através do sistema de transporte orgânico (FRIIS; BRINN; HALD, 1988; ; GALTIER, 1991; STORMER, 1992; WHO, 2001).

No sangue, a toxina está firmemente ligada às proteínas plasmáticas e, aparentemente, nenhuma é filtrada pelo glomérulo, penetrando na célula através da membrana peritubular (FRIIS1988; WHO, 2001). A ligação com as proteínas plasmáticas preveniria sua reabsorção pelos enterócitos através de sua membrana basolateral (BERGER et al., 2003). A secreção

tubular renal e a reabsorção da micotoxina poderiam facilitar sua persistência residual nos rins (GALTIER, 1991).

O pH da digesta poderia influenciar na taxa de absorção da ocratoxina A, sendo mais rápida nas partes do trato gastrointestinal com menor pH. Presume-se que o baixo pH do rúmen, particularmente nos animais alimentados com dietas com maior concentração de grãos e menor concentração de silagem poderia facilitar a absorção direta da ocratoxina A do rúmen para o sangue (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Resíduos de ocratoxina A geralmente não são encontrados nos ruminantes porque ela é clivada no rúmen por protozoários e enzimas bacterianas, sendo detectado, quando muito, traços de ocratoxina  $\alpha$  que é um produto não tóxico resultante da clivagem (GALTIER, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992).

#### 3.4.4 Biotransformação

Um fator importante que afeta a toxidez da ocratoxina A é a alta afinidade de ligação entre ela e constituintes do plasma, sendo responsável não apenas por facilitar a absorção passiva de formas não ionizadas pelo sistema digestivo, como também atuaria retardando a eliminação da ocratoxina A através da limitação da transferência da toxina da corrente sanguínea para as células hepáticas e renais, contribuindo assim para prolongar sua meia-vida. Além da albumina do plasma, existem estudos que evidenciam a existência de uma molécula de baixo peso molecular (20.000 Dalton) que se liga mais especificamente a ocratoxina A, sendo relevante no aspecto da nefrotoxicidade dos efeitos em mamíferos, pois as suas moléculas poderiam passar facilmente pela membrana glomerular normal, possibilitando o acúmulo de ocratoxina A nos rins, fato que não acontece na ligação com a albumina (MARQUARDT; FROHLICH, 1992).

Observa-se uma possível relação de dose-dependência entre parâmetros como o pico de concentração da toxina no plasma, o tempo correspondente, a meia-vida plasmática e a fração de dose absorvida (biodisponibilidade) e as diferenças na farmacocinética entre as espécies estudadas (GALTIER, 1991).

Dentre algumas espécies estudadas, o sangue de bovinos, suínos e humanos possuem uma maior afinidade de ligação entre a ocratoxina A e a albumina sérica do que espécies como aves, ratos e ovinos (GALTIER, 1991; WHO, 2001). A taxa de biotransformação de ocratoxina A em suínos é baixa, com uma meia-vida após a ingestão de cerca de 89 horas

(DRAGACCI et al., 1999) e após injeção intravenosa de cerca de 150 horas (MARQUARDT; FROHLICH, 1992).

A meia-vida avaliada para codornas foi de 12 horas, para o rato de 170 horas e para o macaco de 840 horas (35 dias) após injeção de ocratoxina A via intravenosa. Esses valores sugerem que existe uma associação positiva entre a ligação da ocratoxina A com proteínas plasmáticas e a meia-vida de eliminação (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GALTIER, 1991; WHO, 2001).

Os metabólitos secundários aparecem a partir de derivados formados pelo metabolismo primário e as cinco principais vias metabólicas são: via dos aminoácidos; via do ácido shikimico para a biossíntese de aminoácido aromático; via biossintética dos policetídeos para a acetil-coenzima A (CoA); via do ácido mevalônico para a CoA e polissacarídeos e peptideopolissacarídeos (TURNER<sup>1</sup>, 1971; TURNER, ALDRIDGE<sup>2</sup>, 1983; GRIFFIN<sup>3</sup>, 1994 apud ROSA, 1999, p.15). Segundo Galtier (1991), a hidrólise da ocratoxina A no seu derivado isocumarínico (ocratoxina  $\alpha$ ) é a principal via metabólica. Essa detoxificação ocorre através da ação de carboxipeptidases bacterianas presentes no estômago de ruminantes e no intestino grosso de outros animais. A 4-hidroxiocratoxina A é o principal metabólito hepático e a razão entre esse metabólito e a ocratoxina A excretada na urina pode estar relacionada com o potencial carcinogênico da toxina, visto que o metabólito é um agente imunossupressor quase tão efetivo quanto a ocratoxina A.

#### 3.4.5 Atuação no organismo

A proteção natural do organismo afetado com ocratoxina A pode ser comprometida. Os danos causados podem ser cumulativos e estão diretamente ligados ao período silencioso da doença, que é longo, até o aparecimento repentino dos sintomas (BARISIC et al., 2002).

A partir da entrada da ocratoxina A nas células, ela tem a capacidade de inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial (LINDNER, 1990; STORMER, 1992; BARISIC et al., 2000; WHO, 2001). Altera ainda o acúmulo de ácido p-aminohipúrico, que é um parâmetro para a via de transporte aniônico e, também, altera o caminho da via de transporte catiônica (STORMER, 1992; WHO, 2001).

---

<sup>1</sup> TURNER, W.B. Fungal Metabolites. Academic Press, London, 1971, 446p.

<sup>2</sup> TURNER, W.B.; ALDRIDGE, D.C. Fungal Metabolites II. Academic Press, London, 1983, 631p.

<sup>3</sup> GRIFFIN, D.H. Fungal Physiology-chapter 9 secondary (special) metabolism. 2ed. Wiley-Liss Publications. New York. 488p.

As micotoxinas podem provocar o aumento da glicemia com o acúmulo de glicogênio no fígado ao inibir a ativação de diferentes enzimas participantes do metabolismo do glicogênio e da glicose, como a fosforilase-quinase, enzima chave na gliconeogênese renal, exercendo um efeito negativo neste processo (LINDNER, 1990; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; STORMER, 1992; CERAIN et al., 2000; WHO, 2001). As lesões dos rins estão relacionadas com a perda de atividade de diversas enzimas do túbulo contornado proximal. A ocratoxina A provoca a liberação de alanina-aminopeptidases e leucina-aminopeptidases, como resultado da inibição do transporte aniônico e, também, inibe a enzima fosfoenolpiruvato carboxinase, bloqueando, assim, a gliconeogênese nos rins. A inibição da síntese protéica ocorre com o bloqueio da fenilalanina-tRNA sintetase após agregar-se ao grupo L-fenilalanina da ocratoxina A (LINDNER, 1990; STORMER, 1992).

Pesquisadores relatam que a diminuição da atividade da enzima fosfoenol piruvato carboxiquinase é tão marcante que ela pode ser considerada um indicador específico e altamente sensível de ocratoxina A em suínos, mas não em ratos (KROGH et al., 1988).

A distribuição da ocratoxina A pelos tecidos dos animais varia com a via de introdução, com o tempo decorrente da entrada da ocratoxina A no organismo e com a perfusão sanguínea do órgão atingido. Análises avaliaram algumas diferenças neste sentido em ratos e, de acordo com uma divisão de algumas estruturas, os resultados indicaram que existe maior possibilidade de retenção de resíduos em órgãos com menor perfusão como a pele, músculos, gordura, olhos e certas glândulas (GALTIER, 1991).

Através da via oral, a maior concentração de ocratoxina A foi encontrada após 24 horas principalmente no trato gastrointestinal seguido de significantes níveis de ocratoxina A nos rins, fígado, cérebro, músculos, pele e gordura (KROGH; HALD; PEDERSEN, 1973; KROGH, 1976; MADSEN; MORTENSEN; HALD, 1982; GALTIER, 1991). A ocratoxina A interfere em muitos processos ao nível celular como a síntese protéica, o metabolismo energético, e muitas outras atividades enzimáticas. Após inúmeras observações realizadas posteriormente à exposição natural ou experimental à ocratoxina A, um grande número de alterações morfológicas e bioquímicas ocorreram primariamente nos túbulos proximais renais e, em menor extensão, no fígado, no cérebro e em outros tecidos (BARISIC et al., 2000).

A transferência da ocratoxina A para o leite tem sido demonstrada em ratos, coelhos e humanos, mas pouco é transferido para o leite de ruminantes devido ao metabolismo da micotoxina pela microflora intestinal (CREPPY, 2002). Pode ainda ocorrer, experimentalmente, a transferência placentária da toxina e também a presença no leite de matrizes de suínos (GALTIER, 1991).

Em relação aos mecanismos de defesa celular, a exposição à ocratoxina A prejudica a indução esperada da proteína do choque térmico (Hsp70) e bloqueia os mecanismos de proteção natural das células. Estas proteínas são induzidas e ativam os mecanismos de defesa celular após a exposição da célula a situações de hipertermia, cirurgia, anestesia, dano tecidual, isquemia, diminuição da reperfusão sanguínea, inflamação, injúria oxidativa e uma variedade de outros estímulos (BARISIC et al., 2002).

#### 3.4.6 Excreção

É importante observar as rotas de eliminação da ocratoxina A e seus metabólitos, pois isso facilitaria o entendimento das fases que ocorrem e o tempo de duração desde sua entrada no organismo até sua eliminação. Após a circulação enterohepática, a toxina e a ocratoxina  $\alpha$  são excretadas nas fezes e urina em vários metabólitos ainda não totalmente identificados. Apesar da transferência placentária da ocratoxina A ter sido descrita como sendo dose-dependente em roedores, a toxina não atravessa a placenta em fetos de fêmeas suínas. O transporte da toxina nos rins é mediado por um sistema de transporte orgânico renal de caráter aniônico, podendo o próprio metabolismo renal contribuir para a detoxificação (GALTIER 1991). Apesar da evolução do conhecimento sobre os efeitos da ocratoxina A, o preciso mecanismo de ação da toxina é desconhecido (STORMER, 1992).

#### 3.5 SINAIS CLÍNICOS EM SUÍNOS

Os suínos, assim como os homens, são expostos à ocratoxina A através de sua alimentação com grãos contaminados por fungos produtores desta toxina (KROGH, 1976; DRAGACCI et al., 1999). Ao ingerir o alimento contaminado, humanos e animais suscetíveis como os suínos podem estar iniciando um processo de intoxicação que varia da forma aguda à crônica, dependendo da concentração e duração da exposição à toxina e da idade e estado nutricional do animal (KROGH, 1976; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; WOOD, 1992; DRAGACCI et al., 1999; PITT, 2000; LAWLOR; LYNCH, 2001). Com isso, estariam comprometendo a higidez e qualidade dos seus órgãos, principalmente dos órgãos alvos que são os rins e o fígado, podendo levar a morte em casos extremos, além do efeito deletério nos tecidos musculares (KROGH, 1976; DRAGACCI et al., 1999 PITT, 2000).

O suíno é tido como a espécie mais sensível aos efeitos da contaminação por ocratoxina A (HERRMAN, 1991; WHO, 2001). A dose letal 50% (DL50) de ocratoxina A para os suínos é de 1,0 a 6,0 mg/kg de peso vivo, enquanto que para camundongos é de 46 a 58 mg/kg pv e, para os ratos adultos, de 20 a 30 mg/kg pv (MARQUARDT; FROHLICH, 1992).

Os sinais clínicos podem ser confundidos com deficiências de manejo, com outras doenças, inclusive as decorrentes desta micotoxicose ou com deficiências nutricionais (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; DILKIN, 2002). As manifestações clínicas podem ser extremamente discretas, mesmo quando observadas quantidades consideráveis de ocratoxina A nos órgãos internos e a presença de quadros de nefropatia grave (RUTQVIST et al., 1978).

entre ocratoxina A e citrinina devido principalmente ao fato de que ambas possuem atividades nefrotóxicas (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004). A nefropatia suína por micotoxinas causada por citrinina já foi observada no estado do Rio de Janeiro devido a ingestão de restos de cervejaria compostos por cevada contaminada por *Penicilium citrinum* (ROSA et al., 1985). Alguns estudos apresentam dados que demonstram efeitos aditivos ou uma leve tendência para os efeitos sinérgicos entre a ocratoxina A e a citrinina (KROGH; HALD; PEDERSEN, 1973; BRAUNBERG et al., 1994), entre a ocratoxina A e a aflatoxina (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; TAPIA; SEAWRIGHT, 1985), entre a ocratoxina A e a toxina T-2 (tricoteceno) (HARVEY et al., 1994) e entre a ocratoxina A e o ácido penicílico (STOEV et al., 2001) entre outros, enquanto outros estudos não encontraram evidências para qualquer tipo de efeito significativo (MANNING et al., 1985).

Suínos alimentados experimentalmente com rações contaminadas simultaneamente por ocratoxina A e aflatoxinas apresentaram alterações histopatológicas mais acentuadas que em animais alimentados apenas com ocratoxina A, embora a taxa de crescimento tenha sido semelhante entre os dois tipos de alimentação (TAPIA; SEAWRIGHT, 1985).

O mecanismo da interação entre ocratoxina A e aflatoxina ainda não foi totalmente esclarecido. Entretanto, a presença de aflatoxina nas células do túbulo contornado proximal do rim pode interferir com a ligação da ocratoxina A as células, reduzindo assim sua capacidade de causar danos ao rim (ibid.).

A literatura mostra que os sinais clínicos variam com a dose e com o tempo de intoxicação, mas mesmo assim podem-se enumerar alguns mais comuns entre os diversos trabalhos. São eles: polidipsia, poliúria, anorexia, vômito, diarreia, enterite, desidratação, depressão, diminuição da taxa de ganho de peso e diminuição na ingestão de ração. Outros exames podem constatar alterações como proteinúria, glicosúria, redução da função imunológica e alterações nos níveis bioquímicos séricos, além de rins pálidos e aumentados, degeneração tubular e fibrose cortical (SZCZECH et al., 1973; KROGH, 1976; THACKER; CARLTON, 1977; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; TAPIA; SEAWRIGHT, 1984; MANNING et al., 1985; COOK et al., 1986; MARQUARDT et al., 1988; PIER, 1992; STORMER, 1992; HARVEY et al., 1994; OSWEILLER, 1998).

Os quadros agudos chamam a atenção por causarem sinais marcantes de doença e/ou a morte dos animais afetados, embora relativamente raros (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; OSWEILLER, 1998).

A conseqüência de alimentar suínos com cereais contaminados com mais de uma micotoxina como a ocratoxina A e citrinina é, primariamente, o desenvolvimento de

nefropatia resultando na baixa produção e possível morte e, secundariamente, a presença de resíduos (ocratoxina A) em órgãos e tecidos nos animais produtores de carne, representando assim um problema de Saúde pública (KROGH, HALD E PEDERSEN 1973; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980).

Existem poucas estatísticas precisas com relação à incidência de micotoxicoses, porém há uma consciência geral que o perigo das intoxicações crônicas é responsável pela maior parcela de perdas que se tem nos meios criatórios (COOK et al., 1986; OSWEILLER, 1998; CURTUI et al., 2001; DILKIN, 2002). No Brasil, a nefropatia micotóxica suína foi diagnosticada em Santa Catarina quando 400 suínos morreram em um intervalo de sete dias devido à ingestão de milho contaminado por *Aspergillus ochraceus* (CRUZ et al., 1984).

### 3.6 ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS EM SUÍNOS

As alterações que ocorrem nos órgãos alvos das micotoxinas em geral são identificadas inicialmente através do estudo macroscópico e microscópico, sendo uma ferramenta importante para o dimensionamento das lesões e, muitas vezes, para indicar os casos suspeitos de determinadas patologias. A realização do exame anatomopatológico é um dos passos para a detecção da contaminação por micotoxinas pela visualização de lesões sugestivas de tal doença (ELLING et al., 1985; COOK et al., 1986; STOEVE et al., 2001; BARISIC et al., 2002).

A nefropatia suína por micotoxinas tem sido encontrada regularmente pela Inspeção Veterinária dos matadouros da Dinamarca desde sua descoberta em 1928. Desde 1978, o nível de ocratoxina A em suínos tem sido indiretamente controlado através do exame macroscópico de todos os rins após o abate. Ao constatarem alterações sugestivas, esses rins são testados quimicamente para ocratoxina A e se tiverem níveis iguais ou superiores a 25 µg/kg de rim suíno, suas carcaças são condenadas (KROGH, 1976; JORGENSEN, 1998). Observou-se que a meia-vida dos resíduos de ocratoxina A variava conforme o tecido estudado, sendo que o rim apresentou a maior meia-vida, seguido pelo fígado, músculo e gordura, propondo-se então que o rim possa ser utilizado como um indicador na inspeção de carnes (KROGH et al., 1976).

As anormalidades histológicas nos rins com resíduos de ocratoxina A foram observadas em diversos estudos, sendo importantes para a confirmação do diagnóstico, juntamente com outros exames (KROGH et al., 1976; KROGH, 1977; RUTQVIST et al.,

1978; KROGH et al., 1979; GOLINSKI et al., 1984; ELLING et al., 1985; COOK et al., 1986; HARVEY, 1989, HARVEY et al., 1994; STOEV et al., 2001; BARISIC et al., 2002).

Embora a presença de alterações nesse órgão seja apenas um indicador de ocratoxicose, não podendo ser relacionada de forma restrita com a presença da toxina no animal o exame macro e microscópico é fundamental, servindo para direcionar as pesquisas (HULT et al., 1980; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; DRAGACCI et al., 1999). Para o diagnóstico definitivo é necessária uma correlação entre os achados anatomopatológicos com a história clínica e a detecção da toxina no alimento ou no animal através de métodos analíticos, o que em geral não é avaliado (COOK et al., 1986).

Um baixo índice de detecção de ocratoxina A poderia ser explicado devido ao fato da toxina ser metabolizada a níveis não-detectáveis nos tecidos quando os animais são alimentados com dietas livres de toxina por algumas semanas antes do abate, ou pelo fato das lesões serem originadas de outras micotoxinas, principalmente quando as amostras forem analisadas apenas quanto a presença de ocratoxina A (KROGH, 1976; KROGH, 1977; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; JORGENSEN; PETERSEN, 2002) ou ainda pode-se explicar com base em outros fatores relacionados aos gêneros alimentícios, como a presença de antibióticos nefrotóxicos de origem fúngica que podem induzir às alterações observadas (GOLINSKI et al., 1985). Existe uma divergência entre qual seria o melhor método a ser utilizado numa inspeção visual dos rins, deixando claro que nenhum deles é ideal. Ainda se estuda um método que consiga ser mais efetivo e controle um maior número de unidades produtoras de suínos para melhorar o método usado atualmente em alguns países (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; JORGENSEN; PETERSEN, 2002).

Historicamente, os estudos anatomopatológicos começaram a ser realizados logo após a determinação da aflatoxina que causou milhares de mortes nas criações de aves da Inglaterra em 1960. Desde então, vários experimentos vem sendo realizados para se conhecer o verdadeiro potencial das micotoxinas. Testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados com o objetivo de se conhecer o potencial tóxico das ocratoxinas. Inúmeras descobertas foram feitas quanto ao potencial tóxico da ocratoxina através da utilização de diversos modelos animais como aves, cobaias, suínos, cães e peixes (ALLCROFT et al., 1961; SARGEANT et al., 1961; ELLING, 1977; ALVAREZ et al., 2004).

Um dos animais mais utilizados foram os ratos de laboratório. Alterações apresentadas por roedores foram descritas de forma semelhante em suínos por diversos experimentos (ELLING, 1977; THACKER; CARLTON, 1977; ALVAREZ et al., 2004). Outro grupo muito estudado são as aves, que levaram os pesquisadores a identificar as aflatoxinas, sendo

historicamente o ponto de partida para a pesquisa das micotoxinas. Os efeitos da contaminação de aves por ocratoxina A estão descritos em vasta literatura (ELLING et al., 1975; DWIVEDI; BURNS, 1984; DWIVEDI; BURNS; MAXWELL, 1984; BIRÓ et al., 2002).

Alguns trabalhos avaliaram as várias fases de rins com nefropatia e dividiram em grupos de acordo com a severidade das lesões apresentadas. Por ser uma visão subjetiva, cada pesquisa relacionava seus achados de acordo com sua conveniência, mas sempre seguindo um padrão determinado pela evolução e comprometimento das lesões encontradas (ELLING; MOLLER, 1973; RUTQVIST et al., 1978; STOEV; HALD; MANTLE, 1998). De uma forma geral, os casos de nefropatia suína por micotoxinas podem ser identificados durante a inspeção veterinária nos matadouros a partir dos seguintes aspectos: mudança de cor dos rins (rins pálidos), manchas na superfície renal, fibrose cortical, alterações mais pronunciadas na superfície ventral e ausência de alterações em outros órgãos, especialmente o fígado (KROGH, 1976). Sugere-se que o túbulo contornado proximal seja o principal alvo dentro do néfron ocasionada pela nefropatia suína induzida por ocratoxina A (ELLING, 1977).

Em um destes estudos, suínos foram previamente contaminados através de ingestão de ração com ocratoxina A e ao final do experimento, foram separados em grupos de acordo com o grau de fibrose intersticial apresentado no córtex renal.

- O grupo I apresentava macroscopicamente rins de tamanho normal a levemente aumentado, coloração de marrom avermelhado a marrom claro observada principalmente na área ventral. Microscopicamente as lesões estavam restritas ao córtex. No túbulo proximal foi observada uma pequena redução no tamanho das bordas em escova e pouca descamação de células epiteliais. Nenhuma alteração foi vista no glomérulo, mas nos raios medulares ao redor deles foi notada a presença de moderada fibrose intersticial, observada mais claramente na área ventral do rim.
- O grupo II teve o peso dos rins aumentados em 10%, apresentava cor marrom claro e o córtex estava com áreas de fibrose e densidade aumentada, principalmente na região ventral. No exame histológico, algumas células do túbulo proximal tinham degenerado, com citoplasma basófilo, as bordas em escova estavam ausentes e a membrana basal estava densa e sem forma. Os depósitos de colágeno intersticial estavam distribuídos de forma difusa, predominantemente na parte ventral do rim.
- O grupo III apresentava rins com aumento de peso de 25%, coloração vermelho-acinzentada em toda a superfície, com áreas de fibrose distribuídas de forma difusa em todo o córtex. Muitos glomérulos estavam totalmente hialinizados e além dos muitos

túbulos dilatados, foram notados no córtex cistos contendo fluido seroso e poucos linfócitos.

Em nenhum dos grupos foi observada proliferação de endotélio glomerular, epitélio ou células mesangiais (ELLING; MOLLER, 1973). Embora todo o alimento estivesse contaminado com ocratoxina A, as diferenças notadas entre os três grupos poderiam ser explicadas devido às diferenças no tempo de exposição ao alimento contaminado e à quantidade de toxina consumida por cada suíno, já que os animais deste experimento tinham aproximadamente o mesmo peso e idade (KROGH, 1976).

Um pouco mais tarde, um trabalho experimental investigou rins lesionados de suínos que apresentavam principalmente degeneração tubular e nefrite intersticial fibrosa. O grau de alterações variou desde leve à severa, sendo relacionado ao número de áreas fibrosadas e sua extensão (RUTQVIST et al., 1978).

O grau leve significava achado com focos de fibrose ocasionais usualmente localizados no limite entre o córtex e a região medular. O grau severo foi caracterizado por uma substituição por tecido fibroso de grande parte do córtex renal e camada medular. Os suínos estudados apresentavam rins com nefrite, alto nível de ocratoxina A e com severas alterações, avaliadas como irreversíveis. Entretanto, alguns animais apresentavam boas condições físicas, provavelmente devido a sua curta vida média que variava entre cinco e seis meses, e também a conhecida capacidade compensatória dos rins que evitaria que as alterações externas fossem notadas (ibid.).

Num estudo realizado por Stoev; Hald e Mantle (1998), os rins foram divididos em cinco grupos, que, de forma resumida, apresentaram variações no volume, peso e coloração:

- Grupo I, rins levemente pálidos e com poucos focos branco-acinzentados e com volume aumentado em até 20%;
- Grupo II, rins dilatados e com focos difusos mais pronunciados na face ventral e com petéquias, com aumento de volume de 20 a 200%;
- Grupo III, dilatados e pálidos, chegando a se tornarem cilíndricos, com 100 a 300 % de aumento de volume;
- Grupo IV, rins com presença de cistos de dois mm até cinco cm, além de manchas difusas em toda a superfície e com cerca de duas vezes o tamanho de um rim normal;
- Grupo V, rins fibróticos, encontrados em animais acima de um ano de idade, superfície endurecida com muito tecido conectivo e atrofia tubular e esclerose glomerular mais avançadas que do grupo anterior e com tamanho aumentado de 20 a 60%.

Esses rins foram analisados aleatoriamente durante a inspeção nos matadouros de suínos e durante a análise para a detecção de ocratoxina A em nove rins entre quatorze pesquisados apresentaram ocratoxina A, enquanto houve uma tendência de aumento no ano seguinte quando 82 rins apresentaram a toxina, mesmo que em quantidades menores. As rações também foram pesquisadas, mostrando-se como principal fonte de ingestão de ocratoxina A, já que das amostras estudadas, todas apresentaram algum nível de contaminação (STOEV; HALD; MANTLE, 1998).

A grande maioria dos trabalhos experimentais relata as mesmas alterações histopatológicas nos rins e fígado acometidos por ocratoxina A, bem como em outros órgãos, variando apenas de graus de severidade, com uma ou outra diferença entre eles. São relacionadas alterações renais como a degeneração e atrofia tubular, fibrose periglomerular e fibrose intersticial, descamação e necrose das células epiteliais dos túbulos contornados proximais, estendendo-se para os néfrons, dilatação dos túbulos contornados e coletores, redução das bordas em escova. Essas alterações são variáveis, não sendo, portanto, condição específica para a presença da ocratoxina A (KROGH; HASSELAGER; FRIIS, 1970; SZCZECH et al., 1973; ELLING, 1977; RUTQVIST et al., 1978; KROGH et al., 1979; GOLINSKI et al., 1984; TAPIA; SEAWRIGHT, 1984; ELLING et al., 1985; COOK et al., 1986; ROUSSEAU et al., 1987; GALTIER, 1991; HALD, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; HARVEY et al., 1994; DRAGACCI et al., 1999; STOEV et al., 2001).

Macroscopicamente, pode-se visualizar com maior frequência o aumento de tamanho, cor alterada de leve a pronunciadamente pálida e com pontos esbranquiçados, superfície lisa ou com vesículas, e ao corte, grandes quantidades de tecido conectivo no córtex, com cistos entre eles (ELLING; MOLLER, 1973; RUTQVIST et al., 1978; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; HALD, 1991; STOEV; HALD; MANTLE, 1998).

A análise sanguínea quanto à presença de resíduos de ocratoxina A tem sido muito estudada e correlacionada aos achados histopatológicos (RUTQVIST et al., 1978; KROGH et al., 1979; GOLINSKI et al., 1984). Em alguns estudos, estas análises levam a resultados extremamente interessantes para o desenvolvimento de novos métodos para a pesquisa das micotoxinas, especialmente da ocratoxina A. Em estudos comparativos entre os níveis de concentração em diferentes tecidos, os resultados apresentados demonstraram que as concentrações de ocratoxina A no sangue e no plasma foram, respectivamente, cinco e treze vezes maior que as concentrações nos rins (RUTQVIST et al., 1978; HULT et al., 1979).

### 3.7 IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE HUMANA

Atualmente, as doenças transmitidas por alimentos através de microrganismos constituem um grande problema para os órgãos de Saúde Pública. Apesar das doenças causadas por bactérias concentrarem a preocupação da maioria dos estudos em saúde humana e de se acreditar que o número total de pessoas afetadas por fungos ser menor que o número total de afetados por infecções bacterianas, virais e por protozoários, as doenças fúngicas são um sério problema de saúde no mundo, sendo que as micotoxinas relacionadas com alimentos são responsáveis por um grande número de mortes (PITT, 2000; BENNETT; KLICH, 2003). Ainda que tenha importância internacional, as micotoxinas são geralmente pouco entendidas e ignoradas pelo público em geral (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004) e o número de pessoas afetadas por micotoxicoses ainda é desconhecido (BENNETT; KLICH, 2003). Um problema grave envolvendo as micotoxinas que não será discutido aqui é o desenvolvimento e fabricação de armas biológicas (BENNETT; KLICH, 2003; PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004).

Os fungos são os principais patógenos de vegetais e insetos, mas eles não são considerados agentes importantes para doenças em vertebrados, isto é, o número de fungos de importância médica é baixo. O crescimento de fungos em hospedeiros animais produz as doenças coletivamente chamadas de micoses, que são freqüentemente adquiridas via inalação de esporos no ambiente contaminado ou por um incomum crescimento de espécies comensais que normalmente residem na pele do homem ou em seu trato gastrointestinal. As micoses causadas por patógenos oportunistas são doenças generalizadas de distribuição cosmopolita, usualmente ocorrendo em pacientes com o sistema imune comprometido. Essas espécies tornam-se patogênicas na presença de drogas antibacterianas, quimioterápicas ou imunossupressivas, imunodeficiências por vírus e outros fatores predisponentes (BENNETT; KLICH, 2003).

Apesar de a principal via de ingestão ser através de alimentos, a micotoxicose pode ser transmitida também por via respiratória e dérmica, entre outras. Ao contrário das micoses, as micotoxicoses são exemplos de intoxicação por via natural, tendo analogia com as patologias causadas pela exposição a resíduos de pesticidas ou metais pesados. Os sintomas de micotoxicoses dependem do tipo de micotoxinas, quantidade e duração da exposição, idade, saúde, e sexo do indivíduo exposto e, em menor grau, os efeitos sinérgicos envolvendo a genética, o estado nutricional e a interação com outras injúrias tóxicas. Assim, a severidade da intoxicação por micotoxinas pode variar de acordo com fatores como a deficiência de



solúvel em gordura e não excretada rapidamente, ela acumula-se nos depósitos de gordura dos animais afetados, e é transferida para as pessoas que irão ingerir este suíno contaminado. Uma segunda fonte são as massas, principalmente o pão, feitos com trigo ou outro grão contendo a toxina (PITT, 2000). A presença de ocratoxina A em cereais sugere uma maior possibilidade de estarem presentes também na alimentação humana e animal (FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991; VRABCHEVA et al., 2000). Uma pesquisa realizada em diferentes regiões da Bulgária revelou uma grande incidência de ocratoxina A em cereais produzidos na região e, embora não tenha sido significativa estatisticamente, observaram uma relação entre a contaminação dos grãos com a contaminação dos moradores pela micotoxina (VRABCHEVA et al., 2000).

Devido à ocorrência da ocratoxina A em uma ampla variedade de alimentos, a sua presença no sangue humano tem sido sugerida como um indicador para avaliar indiretamente sua exposição (PITTET, 1998; VRABCHEVA et al., 2000). Análises em amostras de soro humano em muitos países têm revelado que o sangue de pessoas saudáveis freqüentemente contém ocratoxina A, o que poderia confirmar uma difundida e continuada exposição. Na Alemanha, 57% das amostras testadas foram positivas para ocratoxina A; na França, 20%; na Tunísia, 82%; na Suíça, 100% das amostras testadas demonstraram concentrações mensuráveis de ocratoxina A (com o menor limite de detecção); na Argélia 62%; no Canadá, 40%; enquanto que no Marrocos, os exames revelaram que 60% das amostras testadas foram positivas para ocratoxina A, sendo que destas, 61,5% eram homens e 56% eram mulheres (KUIPER-GOODMAN, 1991; FILALI et al., 2002).

A presença de ocratoxina A na Europa central tem duas conseqüências: a presença da toxina em muitos gêneros alimentícios europeus, especialmente pães e alimentos baseados em farinha de trigo, e a presença da toxina nos animais que tem sua dieta baseada nos cereais. (WHO, 2001).

Desde a grande mortandade de perus na década de 60, os estudos avançaram muito na pesquisa das micotoxicoses. A grande importância do estudo e conhecimento da ocratoxina está relacionada com a sua possível implicação como agente causador de uma nefropatia nos homens. Esta micotoxina já foi descrita como o principal causador da nefropatia em suínos e, em relação aos homens, o seu envolvimento já é admitido, com estudos avaliando o risco de exposição amplamente difundidos em muitos países da Europa e alguns outros do hemisfério norte (ELLING; MOLLER, 1973; KROGH, 1976; KUIPER-GOODMAN, 1991; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GODIN et al., 1997; CREPPY, 2002; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002; GROSSO et al., 2003).

A NEB caracteriza-se por provocar uma lesão bilateral não-inflamatória nos rins e foi descrita pela primeira vez em 1956 afetando populações na Bulgária e depois na Iugoslávia e Romênia (KROGH et al., 1976; GODIN et al., 1997; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002).

Os estudos comparativos auxiliam na identificação das populações com maiores riscos de estarem expostas à contaminação da micotoxina, entretanto, não identificam a fonte da contaminação (KUIPER-GOODMAN, 1991; CREPPY, 2002). A maior parte dos estudos que relacionam a exposição humana e os riscos e níveis de intoxicação pela ocratoxina A foram realizados nos países da região dos Balcãs. Apenas para uma melhor localização geográfica, os países que formam os Balcãs são divididos em duas regiões: os Balcãs do Leste, formados pela Bulgária, Chipre, Grécia, Romênia e Turquia e os Balcãs do oeste, formados pela Albânia, Bósnia e Herzegovina, Croácia, Republica da Macedônia, Eslovênia e Sérvia e Montenegro (antiga Iugoslávia) (BRANCO, 2006; WIKIPÉDIA, 2006).

Apesar de a doença ter sido reconhecida em meados da década de 50 e ter sido estudada intensivamente desde então, sua etiologia e muitos fatores epidemiológicos permanecem obscuros. Muitas hipóteses têm sido investigadas com respeito ao envolvimento de fatores relacionados ao ambiente e aos hospedeiros, incluindo metais pesados, minerais, bactérias, leptospiros, vírus, fatores genéticos, radiação, substâncias orgânicas e as toxinas fúngicas, mas nenhum desses tem tido suporte epidemiológico satisfatório (VRABCHEVA et al., 2000; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002).

Em áreas endêmicas para a NEB existe a contaminação freqüente dos cereais com a ocratoxina A e também uma estreita relação da presença desta toxina no sangue de muitos moradores destas regiões com as propriedades carcinogênicas que associam a nefropatia nos humanos com os tumores de trato urinário (WHO, 2001; FAO, 2001).

Suspeita-se que as micotoxicoses estejam relacionadas com a NEB, pois são notadas muitas semelhanças nas alterações histopatológicas e funcionais nos rins tanto de humanos acometidos pela doença, quanto de animais acometidos pela nefropatia induzida por ocratoxina A, principalmente os suínos (KROGH, 1976; MIDIO; MARTINS, 2000; WHO, 2001; FAO, 2001).

A possibilidade das micotoxinas estarem ligadas a NEB tem recebido fortes contribuições através de estudos e testes laboratoriais com populações humanas. Aparentemente, a ocratoxina A é a principal responsável por esta patologia. Entretanto, as organizações governamentais ainda não comprovaram cientificamente a sua etiologia. Mesmo que o risco de exposição e a contaminação dos homens sejam inquestionáveis, os estudos não

descartam a possibilidade de uma etiologia multifatorial (VRABCHEVA et al., 2000; WHO, 2001; FAO, 2001).

Os sinais e sintomas geralmente aparecem após algum tempo da exposição contínua, e são comuns também a outras doenças. O estágio inicial da nefropatia humana é caracterizado

(KROGH, 1976; RUTQVIST et al., 1978; FROHLICH; MARQUARDT; OMINSKI, 1991; DRAGACCI et al., 1999). Portanto, os programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações da vigilância sanitária (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002).

No Canadá, a exposição humana à ocratoxina A apresenta um nível de contaminação menor que 1,5 ng/kg de peso corporal por dia, sendo de baixo risco de exposição a esta toxina (KUIPER-GOODMAN, 1991). Na Itália, análises realizadas sobre 54 rins de suínos retirados no matadouro e analisados pelo teste ELISA revelaram que 78% das amostras tinham a presença de ocratoxina A em níveis maiores que 0,05 ng/g. Entretanto, nenhuma das concentrações excedeu o limite das normas da Itália, que estabelece 1ng de ocratoxina A/g em carne suína e produtos derivados, que corresponde, segundo o autor, a 25 ng/g em rins suínos (MATRELLA et al., 2006).

A idade de abate dos suínos varia de cinco a seis meses. O fato de o animal viver tão pouco, associado a grande capacidade de compensação dos rins faz com que as condições gerais daqueles animais acometidos de severa nefropatia possam estar normal ou levemente alteradas. Esta ausência de sinais clínicos nos animais criados para o consumo humano leva a uma circunstância de perigo para a saúde humana, visto que suínos com altos níveis de ocratoxina A nos tecidos podem ser mandados para o abate por não apresentarem alterações visíveis (RUTQVIST et al., 1978). Mesmo que os rins condenados durante a inspeção não sejam comercializados, o restante da carcaça é destinado para a alimentação humana. Isto pode ser um risco para os consumidores, pois se a alteração renal for causada pela ocratoxina, pode haver a possível transferência da toxina através de outros tecidos (RUTQVIST et al., 1978; ROUSSEAU; VAN PETEGHEM, 1989).

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

Existe uma grande dificuldade para relacionar uma doença a uma micotoxicose, pois é necessário provar a relação dose-resposta entre a micotoxina e a doença. Para as populações humanas, esta correlação necessita de estudos epidemiológicos determinados por estudos de monitoramento ambiental, mensurando as micotoxinas no alimento, ar ou outras amostras, e

monitoramento biológico analisando a presença de resíduos e metabólitos em tecidos, fluídos e excretas (BENNETT; KLICH, 2003).

Uma das vertentes dos estudos epidemiológicos deve estar voltada para o problema das doenças ocupacionais, pois podem ser causadas também por micotoxinas. Alguns locais apresentam maiores riscos que outros, devendo ser realizado um bom levantamento das condições de cada ambiente de trabalho. Como exemplo, ambientes de fábricas processadoras ou distribuidoras de café, trigo, milho, ou outro grão em que a ocratoxina A possa se desenvolver, podem expor os trabalhadores a grandes quantidades de partículas suspensas no ar (TARÍN; ROSELL; GUARDINO, 2004). Um monitoramento da contaminação de diversas espécies de fungos em diferentes fases do processamento do café realizado no Brasil observou que todas elas apresentavam algum grau de contaminação por *Aspergillus ochraceus* (PEREIRA et al., 2004). Não se pode menosprezar a presença de fungos e bactérias em sistemas de circulação de ar de prédios e casas, pois já foram relatadas e podem ser uma fonte de intoxicação, mesmo que incomum (HENDRY; COLE, 1993; SKAUG; EDUARD; STORMER, 2000; TARÍN; ROSELL; GUARDINO, 2004; PORTNOY et al., 2005).

### 3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A

O diagnóstico presuntivo de micotoxicose baseia-se na observação dos sinais clínicos dos animais intoxicados e através da análise de dados ambientais referentes a colheita e armazenamento dos cereais utilizados na alimentação dos suínos. Normalmente, a história de introdução de um novo lote de alimento, às vezes com características macroscópicas alteradas, está associada ao quadro de intoxicação (DILKIN, 2002). A melhor forma de diagnosticar a contaminação por micotoxinas em gêneros alimentícios seria a identificação direta dos fungos toxigênicos, o que na maioria das vezes não é possível (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004). Em relação ao objeto da análise, a ocratoxina A pode ser identificada em diferentes tecidos, principalmente o renal e o hepático e também no sangue e urina. Portanto, o diagnóstico definitivo é realizado através da análise da presença da micotoxina no alimento dos animais intoxicados ou ainda sobre os tecidos dos animais suspeitos de contaminação por micotoxinas (CHU, 1992; WHO, 2001; DILKIN, 2002; BLESÁ et al., 2004; PATERSON, VENÂNCIO, LIMA, 2004). São os chamados métodos analíticos, aprimorados com o passar dos anos graças a evolução da tecnologia que tem possibilitado a realização de exames cada vez mais específicos e sensíveis. Muitos são os

métodos utilizados para a detecção da oca



no comércio nacional e internacional (PITTET, 1998). Frequentemente, grãos colhidos com grandes quantidades de micotoxinas têm que ser destruídos (BENNETT; KLICH, 2003). Existe uma estimativa de que um quarto de todos os grãos produzidos no mundo esteja contaminado em alguma proporção por micotoxinas (FINK-GREMMELS, 1999; BENNETT; KLICH, 2003).

Vários fatores poderiam influenciar as decisões tomadas pelas autoridades sanitárias para estabelecer os limites aceitáveis para certas micotoxinas. Esses fatores não necessariamente se apresentam amparados por conhecimentos científicos (VAN EGMOND, 1995; BENNETT; KLICH, 2003). Alguns destes fatores podem estar relacionados com a disponibilidade de dados toxicológicos, a disponibilidade de dados analíticos de inspeções nos produtos, a distribuição das micotoxinas sobre os gêneros alimentícios, a disponibilidade de métodos para a análise, a existência de legislação em países com os quais se relacionam comercialmente, o suprimento suficiente de alimentos, entre outros (VAN EGMOND, 1995).

A avaliação de risco da ocratoxina A em alimentos ocorre oficialmente através de uma junta de especialistas da Organização das N

Apesar da grande importância econômica, poucos são os países que possuem uma legislação que aborde os limites de tolerância para micotoxinas em alimentos. Em 1995, cerca de 60 países enquadravam-se nesse grupo, embora a maioria regulasse apenas os níveis para aflatoxinas, deixando de estabelecer doses máximas para outros tipos de micotoxinas como a ocratoxina A, por exemplo (VAN EGMOND, 1995).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde, através da RDC nº 274, e o Ministério da Agricultura e do Abastecimento, através da portaria nº 183, equipararam a legislação brasileira com os parâmetros adotados pelo MERCOSUL em relação aos limites de aflatoxina admissíveis no leite, amendoim e no milho destinados ao consumo humano. Para o leite é estabelecido o limite de 0,5 µg/L (fluido) e 5,0 µg/L (em pó) para aflatoxina M1; para o milho e farinhas de sêmola, amendoim e pasta de amendoim o limite é de 20 µg/kg para aflatoxinas B1+B2+G1+G2 (BRASIL, 1996; 2002). Este limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial de Saúde - OMS e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO (WHO, 2002).

No MERCOSUL, apenas o Uruguai possui limite para ocratoxina A em arroz, cevada, café e milho que é de 50µg/kg (FONSECA, 2006).

Na legislação comum a todos os membros da União Européia, a ocratoxina A tem limites para cereais crus (5µg/kg), produtos derivados de cereais para consumo direto (3µg/kg) e frutas secas (10µg/kg) (CEE, 2002). Entretanto, alguns países da União Européia possuem legislação extra como o caso da Grécia que especifica limites para café cru, suco e produtos de maçã (20ppb), a Itália para café cru (8ppb), café torrado e moído (4µg/kg), cacau e produtos derivados (0,5 µg/kg), carne de suíno e derivados (1µg/kg) e cerveja (0,2 µg/kg), a Dinamarca para rins suínos (25 µg/kg ou ng/g) e a Suécia para rações para aves (200µg/kg) e para suínos (100µg/kg) (FONSECA, 2006). Em relação à regulação na Dinamarca, o limite máximo permitido de concentração de ocratoxina A no rim foi alterado em 1980 para 25 ng/g, o que corresponde a 125 ng ml<sup>-1</sup> de sangue ou 219 ng ml<sup>-1</sup> de soro (MADSEN; MORTENSEN; HALD, 1982).

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

Cada país deveria possuir um órgão regulador para o controle dos alimentos. Nos Estados Unidos, o departamento que controla alimentos e drogas – FDA tem se esforçado para monitorar o comércio de alimentos quanto a presença de micotoxinas, sendo que apenas as aflatoxinas são rotineiramente monitoradas e reguladas no país. Mesmo assim os esforços são voltados principalmente para áreas e produtos que tem historicamente problemas de contaminação ou para áreas ou produtos normalmente não afetados em que surgirem novos casos de contaminação (WOOD, 1992).

Freqüentemente, países que possuem uma legislação sobre determinado produto costumam estabelecer barreiras comerciais em relação a países que não possuem tais leis, para que sejam minimizados os problemas com este tipo de contaminação (VAN EGMOND, 1995). Alguns países como os Estados Unidos já vem impondo limites para alguns produtos em relação a determinadas micotoxinas (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004). Entretanto, é necessário que os laboratórios estejam qualificados para examinar lotes de grãos que são importados ou exportados entre os países (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980). Um efetivo programa de controle pode reduzir as quantidades de ocratoxina A consumidas através de produtos derivados de suínos (BÜCHMANN; HALD, 1985) e evitar problemas judiciais quanto a disseminação de micotoxinas como a ocratoxina A (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; BENNETT; KLICH, 2003).

Torna-se evidente a necessidade de que sejam estabelecidos padrões e monitoramento para que, a partir de então, sejam aplicadas medidas necessárias para o controle específico das diferentes micotoxinas nos diversos tipos de alimentos, desde cereais até produtos industrializados provenientes de aves e suínos, por exemplo. É evidente que a eliminação total de qualquer componente tóxico em alimentos é um objetivo inatingível. Uma grande barreira para a regulação dos padrões seguros de micotoxinas em alimentos é justamente a falta de harmonização entre os diferentes países em relação a um modelo único a ser seguido por todos (BENNETT; KLICH, 2003).

### 3.10 PREVENÇÃO

Os conceitos de segurança alimentar e qualidade total estão baseados na garantia de qualidade e no uso de suas respectivas ferramentas de controle, visando à diminuição de riscos ou agravos à saúde das pessoas e também dos animais. Dentro deste contexto, a necessidade de evitar a contaminação dos produtos que chegam à mesa do consumidor é uma

prioridade. O Brasil apresenta anualmente um número preocupante de casos de doenças transmitidas ou veiculadas por alimentos, pois muitos cidadãos brasileiros não ingerem alimentos seguros sob o ponto de vista químico, físico e/ou microbiológico. A preocupação com essa situação é crescente, à medida que o consumidor torna-se mais atento à sua própria saúde e, conseqüentemente, ao alimento que consome. A oferta de produtos com qualidade, livre de contaminantes é fundamental para o bem estar da população e deve ser garantido pelas indústrias de gêneros alimentícios. A garantia e o controle de qualidade dos alimentos é uma tendência que existe no mundo há algum tempo e que vem se tornando mais forte a cada dia no Brasil.

A contaminação dos alimentos pode ter diversas origens, destacando-se a contaminação fúngica como uma grande causadora de perda de qualidade. Estas perdas vêm sendo subestimadas ao longo dos anos, muitas vezes, por serem menos visíveis que contaminações por insetos, por exemplo, e por suas colônias visíveis serem removidas na manipulação e limpeza (DILKIN, 2002). O crescimento fúngico e produção de micotoxinas em cereais dependem das condições ambientais e pode ocorrer durante as fases de desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento ou armazenamento dos grãos (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; PITTET, 1998; DILKIN, 2002; FAO, 2001). Além das perdas relacionadas diretamente com os grãos, um fator importante na indústria de produtos de origem animal é a redução nas taxas de crescimento e na conversão alimentar devido à contaminação da dieta de suínos por ocratoxina A, que tem como resultado a perda financeira significativa para os produtores desses animais (MADSEN, 1982). Faz-se necessário a conscientização do suinocultor em utilizar rações de boa qualidade e livres de ocratoxina A e outras micotoxinas (JORGENSEN; PETERSEN, 2002).

As micotoxinas são consideradas contaminantes naturais de alimentos e sua formação é frequentemente inevitável (BENNETT; KLICH, 2003). Durante o desenvolvimento do grão existe um grande potencial para a formação de uma ampla variedade de micotoxinas de acordo com a flora fúngica presente e com as condições climáticas. Porém, nem sempre os alimentos mofados apresentam micotoxinas, bem como produtos com baixas contagens de fungos não deve ser tomado como livres de toxinas (PITTET, 1998). Muitas micotoxinas, como a ocratoxina A, são altamente estáveis em condições de alta temperatura (cozimento) e processamento, podendo persistir em um produto por muito tempo após os fungos terem desaparecido (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; PITTET, 1998). Alguns fatores que provavelmente afetam a formação das micotoxinas são: umidade, temperatura, tempo, danos no grão, concentração de oxigênio e gás carbônico, composição do substrato, quantidade de

fungos, prevalência de cepas toxigênicas, interações microbiológicas e presença de vetores invertebrados (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GODIN et al., 1997).

O uso de boas técnicas de manejo certamente auxilia na minimização do problema, mas é improvável que seja uma solução definitiva, pois o crescimento fúngico pode estar presente antes da colheita, assim como um baixo nível de produção de toxina pode ser inevitável (OMINSKI et al., 1996; PITTET, 1998). Indiferente do método de preservação, um estudo demonstrou que 9% das amostras continham ocratoxina A no início do período de estocagem (OMINSKI et al., 1996).

As medidas de prevenção podem ser usadas antes da colheita, imediatamente depois da colheita ou durante a estocagem. A estratégia básica para o controle na pré e pós-colheita sugere a utilização dos princípios do programa de análise dos perigos e pontos críticos de controles (FAO, 2001). O uso de boas técnicas de cultivo e manejo das culturas de grãos no campo que inviabilizem o crescimento fúngico e reduzam a possibilidade do seu desenvolvimento também é um fator importante na pré-colheita (DILKIN, 2002; FAO, 2001). Procedimentos como a colheita dos cereais imediatamente após a maturação fisiológica, deixando os cereais menos expostos as intempéries pode ser a primeira indicação (DILKIN 2002). A redução da umidade dos cereais através da secagem e o adequado armazenamento destes grãos são de fundamental importância para reduzir os níveis de contaminação (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; DILKIN, 2002; JORGENSEN; PETERSEN, 2002; FAO, 2001). Um teor de umidade na estocagem abaixo de 15% pode controlar efetivamente a produção de ocratoxina A nos grãos (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). O ideal é que a atividade de água nos grãos esteja abaixo de 0,8 (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; FAO, 2001).

Os riscos durante a armazenagem em países de clima seco são menores que em países da zona temperada, devido à menor umidade do ar, mas se tornam também problemáticos se as colheitas forem realizadas nas estações de chuva ou se chover inesperadamente. Os cuidados também devem ser estendidos ao transporte e a comercialização destes produtos (LACEY et al., 1992).

Atualmente, o desenvolvimento de processos biotecnológicos tem trazido importantes benefícios para a indústria de alimentos e para o consumidor. Desde o desenvolvimento da tecnologia da fermentação até os produtos derivados de manipulação genética, nota-se a busca em oferecer produtos cada vez mais seguros para a alimentação humana (BIGELIS, 1992). Estudos utilizando a engenharia genética têm sido realizados buscando o desenvolvimento de

plantas que sejam resistentes a determinados fungos e pragas (BENNETT; KLICH, 2003; FAO, 2001).

Com a conscientização ecológica, o aumento do interesse por antifúngicos de origem biológica em detrimento dos produtos químicos vem crescendo e alguns produtos têm sido desenvolvidos com esta finalidade (TUPINAMBÁ et al., 2004).

O monitoramento dos cereais e subprodutos através de técnicas de amostragem adequadas e análises micotoxicológicas antes de utilizá-los também é uma boa prática, principalmente, quando estes foram expostos a condições ecológicas favoráveis ao desenvolvimento de fungos (PITTET, 1998; DILKIN 2002).

Além do processo de secagem dos grãos, podem-se utilizar tratamentos para auxiliar na conservação do alimento quando em situações de risco, inibir e até impedir o crescimento e a produção de ocratoxina A antes ou depois da ingestão. Uma variedade de métodos físicos como fumigação, aeração, refrigeração, estocagem hermética e uso de atmosfera modificada tem sido usada para reduzir o crescimento de insetos e fungos em grãos estocados principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde os danos causados por insetos é o principal problema (CREPPY, 2002; FAO, 2001). Já foram descritos processos utilizando diferentes ácidos orgânicos como o ascórbico, amônia, adsorventes naturais ou modificados pela adição de compostos enzimáticos ou biológicos nos alimentos, fenilalanina, extratos naturais de plantas medicinais, antimicrobianos e irradiação gama ou por feixe de elétrons para destruir esporos de *Aspergillus ochraceus* (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980; MADSEN, 1982; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; GODIN et al., 1997; DILKIN 2002). Nem todos os processos são aprovados ou permitem resultados consideráveis. A radiação gama, por exemplo, pode ser usada para o controle de insetos, mas é contra-indicada para o controle de fungos, pois as dosagens requeridas são maiores que as dosagens permitidas para o uso em grãos (FAO, 2001).

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

Com uma vida média dos suínos comerciais variando de cinco a seis meses, associado a grande capacidade de compensação dos rins, os sinais clínicos podem não estar presentes no

momento do abate. Isso evidencia um perigo iminente para a saúde humana, visto que suínos com altos níveis de ocratoxina A nos tecidos podem ser mandados para o abate e serem liberados para o consumo humano, mesmo que os rins venham a ser condenados. Segundo Rutqvist et al. (1978), o exame de um ou dois indivíduos de um mesmo lote, alimentados com a mesma dieta, pode ser suficiente para uma avaliação uniforme da presença de ocratoxina A nessa dieta e nos tecidos do grupo de animais, sendo ainda mais eficiente que a pesquisa desta toxina em amostras de alimento.

Em razão da diversidade de manifestações toxicológicas e das perdas econômicas após a exposição de certas micotoxinas, existe uma necessidade continuada para proteger a saúde humana e de animais suscetíveis através da limitação de sua exposição a essas toxinas (MADSEN, 1982; WOOD, 1992). No Brasil, os investimentos em pesquisa e em sistemas de fiscalização e prevenção sobre a produção de carne suína assumem um caráter relevante, visto que é o quarto maior produtor mundial de carne suína, com 2,679 milhões de toneladas em 2004 – últimos dados – além de ser o sexto maior consumidor deste tipo de carne. As perdas e as contaminações, mesmo que em baixas porcentagens, elevam-se a níveis preocupantes numa escala de produção desta natureza. Vale ressaltar que, segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, 81% do total produzido foram consumidos no mercado interno em suas variadas formas: “in natura”, defumadas, industrializadas etc. E os 19% restantes tiveram como destino o mercado internacional, principalmente o mercado chinês, que é o maior produtor e consumidor de carne suína. A produção chinesa de suínos chegou a 47,17 milhões de toneladas, ou 51,9% do total no mundo (ABIPECS, 2004).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da UFF, nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ, no laboratório de Bromatologia do Departamento de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da UFF, contando com o apoio financeiro do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da UFF e de bolsa-auxílio do CNPq.

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Amostras

Foram analisadas 87 amostras de soro sanguíneo de suínos e seus respectivos rins e fígados. Os animais foram selecionados de forma aleatória e amostras de rim e fígado foram retiradas de todos os suínos que tiveram a amostra de sangue coletada. As amostras foram coletadas em três diferentes datas e em dois matadouros, todos sob Inspeção Estadual, sendo que a primeira e segunda coleta foram realizadas no mesmo matadouro e a terceira coleta foi realizada no segundo matadouro, todos localizados na mesma região geográfica. A primeira coleta realizada no matadouro sob o SIE 572 obteve-se 41 amostras e na segunda, 26 amostras e a coleta no matadouro sob o SIE 582 obteve-se 20 amostras.

#### 4.1.2 Equipamentos

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

- Lâmina lisa para microscopia 26x76 mm;
- Lamínula 24x32 mm;
- Frascos plásticos com tampa de rosca;
- Luvas de látex para procedimento tamanho G;
- Ponteiros de micropipeta 1 ml e 2ml;
- Tubo de vidro de 10 ml;
- Tubos com tampa (Eppendorf) de 1,5 ml e 2 ml.

Todos os equipamentos utilizados já pertenciam a estrutura das universidades envolvidas neste projeto. São os seguintes:

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

#### 4.1.3 Padrão

O padrão de ocratoxina (OTA) proveniente da SIGMA Co. (St. Louis, USA) foi analisado espectrofotometricamente e quantificado segundo metodologia preconizada pela

AOAC (SCOTT, 1995). A solução estoque permaneceu armazenada em metanol (MeOH) a temperatura de -18°C em frasco âmbar.

#### 4.1.4 Reagentes e Soluções

a) Os reagentes utilizados foram o ácido acético, metanol (Merck, Brasil), acetonitrila e diclorometano para cromatografia líquida (Ominisolv Merck), ácido tricloroacético, formol grau PA (Quimex, Brasil).

#### b) Fase móvel

A fase móvel era preparada seguindo a proporção indicada por Curtui, Gareis (2001). Era formada por acetonitrila, água Milique e ácido acético (57:41:2; v/v).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Coleta do material

O animal pesquisado foi o suíno. As amostras foram retiradas durante o abate desses animais em dois matadouros de suínos da região serrana do Estado do Rio de Janeiro, sob fiscalização do Serviço de Inspeção Estadual do referido Estado. Foram coletadas amostras de sangue, de rim e de fígado de cada animal de forma a manter a correspondência entre eles. O sangue foi coletado no momento da sangria, após a insensibilização, diretamente no tubo de ensaio sem anticoagulante e colocado em seguida em estantes apropriadas para que permanecessem em repouso por até 12 horas em temperatura ambiente para a obtenção do soro e posterior processamento. As amostras de sangue foram levadas para o laboratório de Bromatologia do Departamento de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da UFF, onde era iniciado o processo de extração da ocratoxina. Após a obtenção do extrato, ele foi encaminhado para os laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ para análise através da técnica de cromatografia líquida de alta afinidade. As amostras de rim e fígado foram coletadas em frascos plásticos e conservadas em formol na concentração de 10% após serem fatiadas de forma perpendicular em uma espessura de não mais que um centímetro. Foram coletadas de maneira aleatória, isto é, sem distinção da presença ou não de lesões macroscópicas, seguindo apenas a correspondência com o sangue.

As amostras de rim e fígado foram levadas para o laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da UFF.

#### 4.2.2 Procedimentos para cromatografia

##### 4.2.2.1 Condições do cromatógrafo

A fase móvel foi preparada imediatamente antes do início das análises. Para seu preparo foram usados acetonitrila (Grau Lichosorlv), água (Milique) e ácido acético (57:41:2; v/v), sendo misturados dentro de uma capela de fluxo contínuo e homogeneizados em banho de ultra-som. A taxa de fluxo utilizada foi de 0,5 ml/min, com duração de passagem de 15 minutos por amostra. Foi injetado, de cada amostra, um volume de 20 µl e de 20 µl para o padrão. O padrão foi injetado antes, durante e depois das análises para garantir a calibração das leituras. O detector de fluorescência foi calibrado em níveis de excitação e emissão de fluorescência de ondas de 330 e 460 nm, respectivamente. Os tempos de retenção registrados para a ocratoxina para estas condições cromatográficas de OTA esperado estaria em torno de 5 minutos. Para a quantificação da toxina, foram considerados os tamanhos dos picos formados pelas amostras (altura) dentro do tempo de retenção obtido do padrão, quando comparados com o valor de altura médio dos padrões.

##### 4.2.2.2 Procedimentos de extração descrito por Curtui e Gareis (2001)

O procedimento analítico utilizado para a detecção de OTA baseou-se na extração da micotoxina sem a utilização de coluna de imunoafinidade (Fig.2). O método descrito consistia nos seguintes passos:

- I) Coleta de 50 ml de sangue por punção jugular
- II) Repouso de 10 a 12 horas em temperatura ambiente
- III) Centrifugação a 3000 g / 15 min
- IV) Soro estocado a -20° C
- V) Colocar uma alíquota de 0,8 ml de soro, 0,2 ml TCA 15% e 1 ml diclorometano em um microtubo de 2 ml. Em seguida era homogeneizado no vórtex (agitador) por 30 segundos e deixar em repouso, em temperatura ambiente de 4 a 48 horas (Figura 3).
- VI) Centrifugar a 16060 g / 5 min. Então, três camadas são formadas.

- VII) Retirar com cuidado a camada inferior (diclorometano), colocar num tubo de 1,5 ml e reservar (Fig.3). Submeter a camada formada entre as duas fases (compacta) com a camada superior (ácida) a uma nova extração, adicionando 0,5 ml de diclorometano.
- VIII) Homogeneizar por 30 segundos esta nova mistura e centrifugar a 16060 g / 3 min. Novamente eram formadas três camadas. A camada inferior era adicionada ao extrato de diclorometano e as outras duas eram desprezadas.
- IX) Evaporar o diclorometano até a secagem em evaporador a temperatura de 40° C sob baixo fluxo de nitrogênio.
- X) Segue para cromatografia realizada com fase móvel de acetonitrila, água e ácido acético (57:41:2; v/v) e taxa de fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup> com passagem de 20 min / amostra a 25°C.

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

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

Onde:

$h_1$  = altura (mm) do pico de ocratoxina A na amostra

$V_f$  = volume final do diluente do extrato ( $\mu$ l)

$M$  = massa de ocratoxina A contida no volume de padrão injetado

$V_i$  = volume injetado da amostra em  $\mu$ l

$V_a$  = volume inicial da amostra em ml

$h_2$  = altura (mm) do pico do padrão injetado

O valor da massa do padrão foi calculado por espectrofotometria e foi de 0,0737  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4 Procedimentos do exame histopatológico

Os fragmentos de rim e fígado coletados que estavam previamente fixados em formol a 10% foram remetidos ao laboratório de Anatomia Patológica Veterinária da UFF. Estes fragmentos foram processados pelas técnicas habituais para inclusão em parafina e coradas por hematoxilina-eosina. As lâminas foram armazenadas em caixas próprias e foram examinadas em microscópio óptico posteriormente. Após o exame, foram fotografadas

algumas lesões com o auxílio de uma câmera fotográfica digital. As imagens foram tratadas através de um programa específico para imagens e houve alteração do aumento empregado na leitura. Portanto, deve-se considerar este fato ao observar as figuras das lesões.

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2003 para os cálculos de média, desvio padrão, máximos e mínimos, e para a diagramação dos gráficos.

## 5 RESULTADOS

Apesar de a técnica ter sido baseada na metodologia desenvolvida por Curtui e Gareis (2001), foi necessário alterar alguns procedimentos laboratoriais. As condições descritas pelos autores foram sucintas e apresentaram algumas etapas pouco detalhadas.

Foram coletados inicialmente 10 ml de sangue suíno na sangria. O tempo de repouso relativo a etapa V do método de Curtui e Gareis (2001) variou entre 12 e 24 horas. Na etapa VII, para realizar a extração foi necessário remover a parte superior formada pelo ácido tricloroacético e só então retirar a fase inferior com o diclorometano onde, se houvesse, estaria presente a ocratoxina. Para este procedimento não puderam ser usadas pipetas Pasteur, conforme o trabalho original previa, pois a fase intermediária formada era muito compacta e não permitia sua quebra sem interferir na independência entre as camadas superior e inferior. Na etapa IX, as amostras extraídas foram evaporadas em banho-maria sem fluxo de nitrogênio por falta de equipamento apropriado. A não-utilização do nitrogênio é apenas uma medida para tornar mais rápida a secagem do resíduo, não interferindo no resultado final.

Após a evaporação do diclorometano, o extrato estava pronto e era então enviado para os laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ, onde eram diluídos em 300  $\mu$ L de metanol e injetados no cromatógrafo para análise. A taxa de fluxo utilizada foi de 0,5 ml min<sup>-1</sup>, com duração de passagem de 15 minutos por amostra.

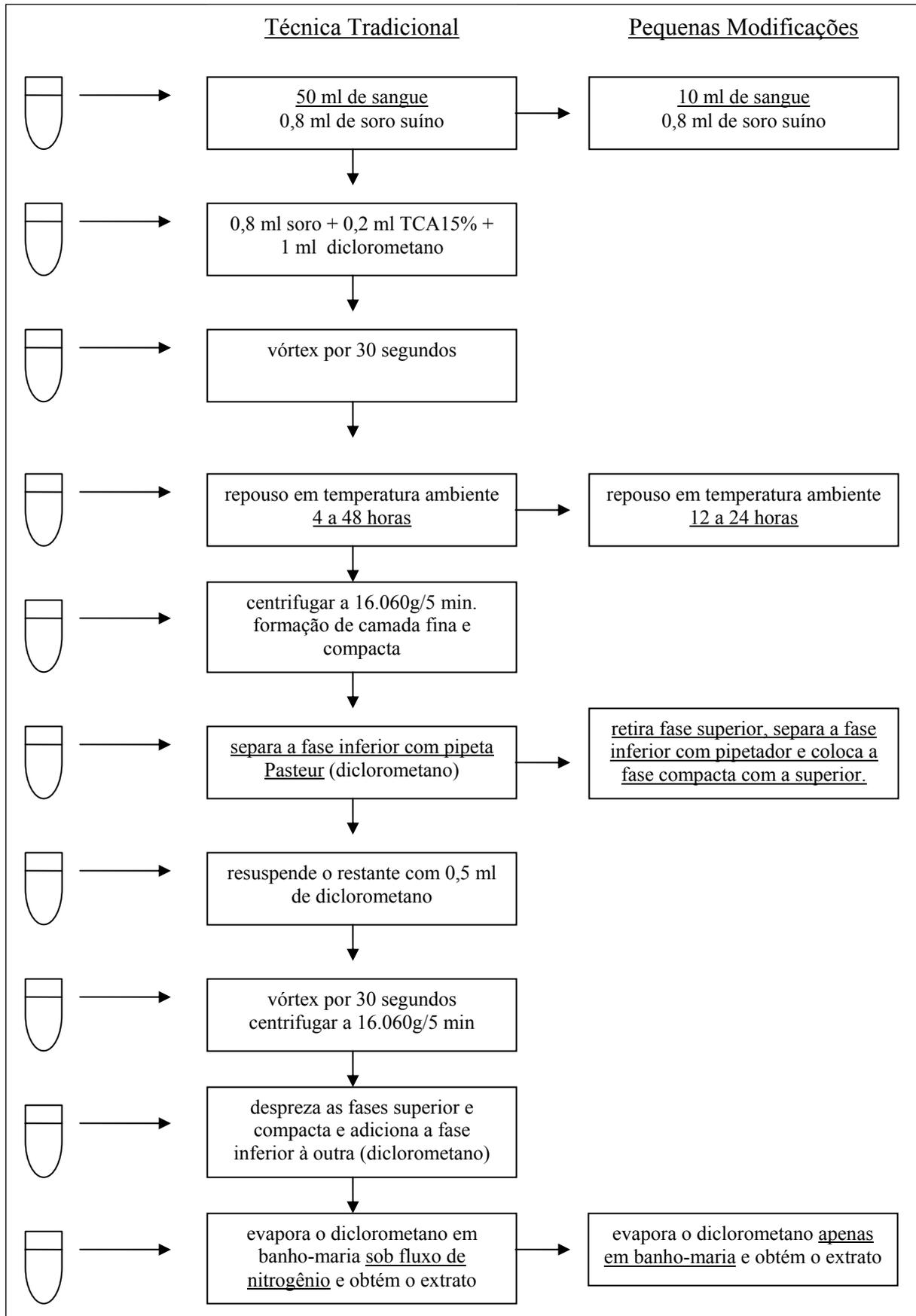


Fig.2: Fluxograma da técnica descrita por Curtui e Gareis (2001) com indicação de pequenas alterações realizadas durante as análises.

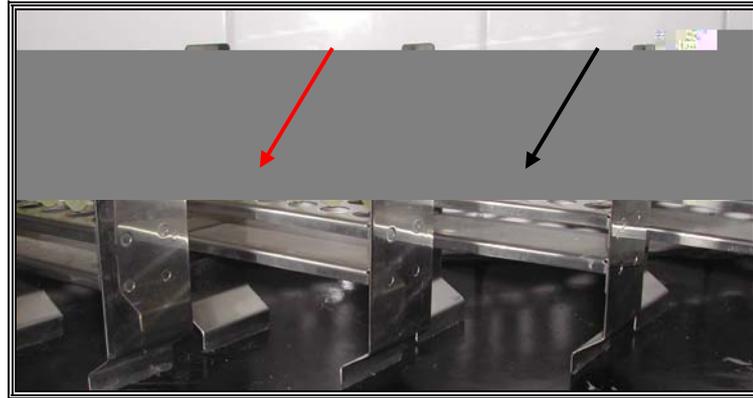


Fig.3: Etapa de extração da ocratoxina. Eppendorfs com 0,8 ml de soro + 0,2 ml de TCA15% + 1 ml de diclorometano após vórtex (→) e eppendorfs com diclorometano após retirada das fases superior e intermediária (→).

A metodologia empregada para a detecção de OTA em soros (CURTUI; GAREIS, 2001) mostrou-se eficiente e apresentou valores de recuperação de 82% para níveis de 0,73 ng ml<sup>-1</sup>, sendo que os limites de quantificação e detecção foram estimados em 0,073 e 0,062 ng ml<sup>-1</sup>, respectivamente.

A linearidade de detecção por Fluorescência em  $\lambda = 330$  nm de excitação e 460 nm de emissão dos padrões de OTA injetados em concentrações de 0,073 a 7,73 ng ml<sup>-1</sup> foram de 0,8924 (linear) e 0,9265 (logarítmica) conforme demonstrado na Fig.4.

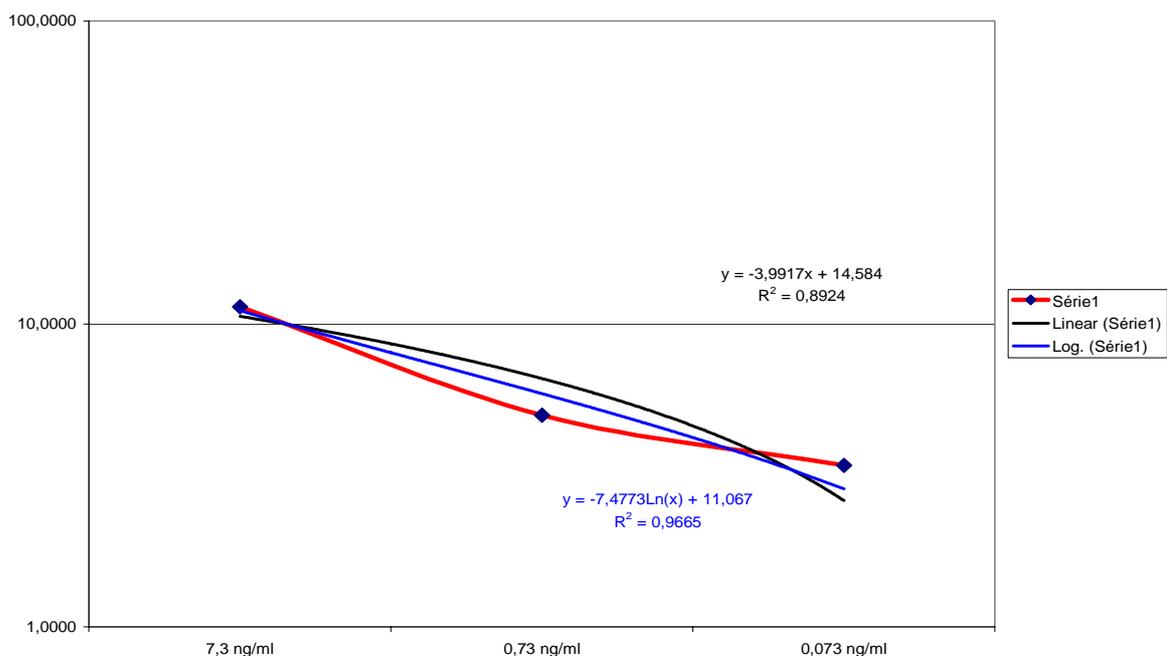


Fig.4: Linearidade do padrão de ocratoxina A utilizado, equações da reta e logarítmica.

Dentre as amostras de soro sanguíneo analisadas, detectou-se ocratoxina A (OTA) em quatro amostras (4,59 %), que apresentaram concentrações variando de 0,1546 a 1,4851 ng ml<sup>-1</sup>. Entre as amostras positivas, a média foi de 0,5739 e o desvio padrão de 0,6130. As demais amostras apresentaram-se com níveis inferiores ao limite de quantificação. Todas as amostras foram quantificadas através da altura do pico no tempo de retenção da ocratoxina A após análise dos respectivos cromatogramas (Fig.5 e 6; Tabela 1).

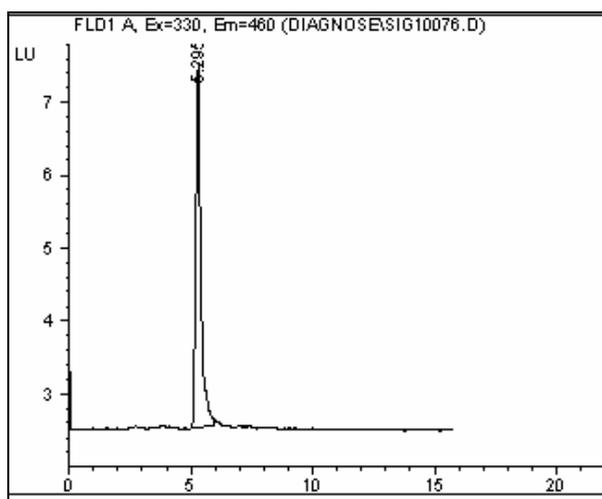


Fig.5: Cromatograma do padrão de ocratoxina A utilizado nas análises de soro suíno.

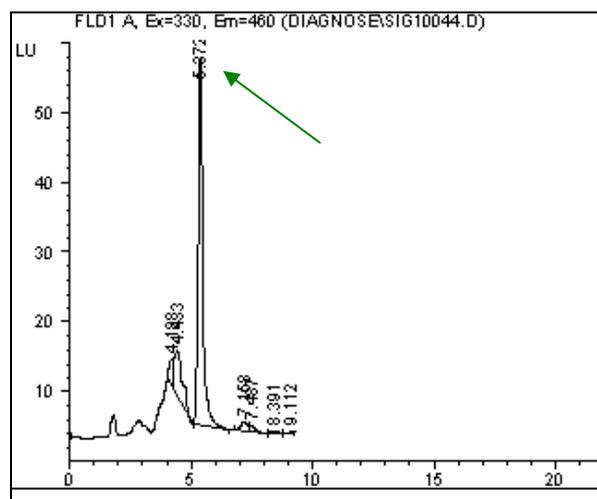


Fig.6: Exemplo de cromatograma de amostra de soro suíno com pico no tempo de retenção da ocratoxina A (→).

Tabela 1: Concentração de ocratoxina A em amostras de soro suíno submetido à CLAE.

Amostra	[ ] ng/g								
1.1	0,0007	1.26	0,0010	1.49	0,0005	2.19	0,0002	1.18	0,0356
1.3	0,0003	1.28	0,0004	1.53	0,0000	2.20	0,0002	1.20	0,0136
1.4	0,0001	1.29	0,0008	1.63	0,0007	1.13	0,0081	1.42	0,0248
1.5	0,0003	1.30	0,0006	1.64	0,0007	1.16	0,0015	1.51	0,0373
1.6	0,0005	1.31	0,0004	1.65	0,0002	1.21	0,0068	1.55	0,0185
1.7	0,0002	1.32	0,0001	1.66	0,0001	1.27	0,0085	2.8	0,0219
1.8	0,0006	1.33	ND	1.67	0,0001	1.43	0,0013	2.12	0,0106
1.9	0,0004	1.34	ND	2.1	0,0006	1.44	0,0064	1.15	0,0424
1.10	0,0007	1.35	0,0003	2.2	0,0003	1.57	0,0057	1.54	0,0645
1.11	0,0004	1.36	0,0006	2.3	0,0007	1.59	0,0075	1.56	0,0522
1.12	0,0001	1.37	0,0007	2.6	0,0007	1.62	0,0065	1.58	0,0470
1.14	0,0003	1.38	0,0007	2.7	0,0004	2.4	0,0011	1.60	0,0473
1.17	0,0008	1.39	0,0005	2.10	0,0009	2.5	0,0017	1.61	0,0518
1.19	0,0010	1.40	0,0006	2.13	0,0004	2.9	0,0018	1.2	0,1546
1.22	0,0008	1.41	0,0002	2.16	0,0002	2.11	0,0040	1.47	1,4851
1.23	0,0005	1.45	0,0006	2.17	0,0004	2.14	0,0021	1.50	0,3384
1.24	0,0001	1.46	0,0001	2.18	0,0009	2.15	0,0061	1.52	0,3176
1.25	0,0009	1.48	0,0005						

Faixas (ng ml<sup>-1</sup>): ND a 0,0010 (63%); 0,0011 a 0,0100 (17%); 0,0101 a 0,0400 (8%); 0,0401 a 0,0729 (7%) e > 0,0730 (5%) (limite de quantificação).

Os resultados dos achados histopatológicos em rins e fígados dos suínos estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Achados histopatológicos mais freqüentes em rins de suínos divididos por coleta.

Achados histopatológicos em rim suíno	Coleta 1.1 – 1.41	Coleta 1.42 – 1.67	Coleta 2.1 – 2.20	TOTAL	%	
Infiltrado inflamatório	intersticial	8	18	8	34	39,08
	perivascular	2	3	0	5	5,74
	periglomerular	1	2	1	4	4,59
	multifocal	5	3	6	14	16,09
	em região de túbulos coletores	4	0	0	4	4,59
	em região cortical	3	1	0	4	4,59
	em região medular	0	5	0	5	5,74
	com aspecto folicular	2	0	0	2	2,29
Degeneração tubular	6	3	1	10	10,48	
Glomerulonefrite proliferativa	2	1	0	3	3,45	
Cariomegalia	0	2	0	2	2,29	
Sem alterações (OK)	11	5	7	23	26,44	
Outros	8	6	5	19	21,84	

Diversas alterações morfológicas foram observadas, tais como:

- a) Rins: infiltrado inflamatório intersticial (39,08%) multifocal (16,09%), degeneração tubular (11,48%).
- b) Fígado: infiltrado inflamatório em espaço porta (12,64%).

Outros achados menos freqüentes nos rins foram: infiltrado inflamatório subcapsular, infiltrado inflamatório em região córtico-medular, infiltrado inflamatório nodular com característica vacuolar rico em figuras de mitose com imagem de céu estrelado, glomerulonefrite membranosa, fibrose multifocal, fibrose discreta, fibrose nodular periglomerular, atrofia tubular, vasculite mononuclear, presença de cilindros ocasionais, presença de cilindros na luz tubular e áreas de necrose, perda protéica em túbulos de região subcapsular, hipertrofia de células epiteliais. No fígado os achados menos freqüentes foram: processo congestivo hemorrágico centro-lobular associado a processo inflamatório mononuclear em espaço porta, hepatite focal nodular crônica granulomatosa, hepatite mononuclear em espaço porta e intralobular, ocasional cariomegalia, discretos focos de telangiectasia, colangiohepatite fibrosa focal e discreta fibrose.

Alguns desses achados podem ser visualizados nas figuras 7, 8, 9 e 10.

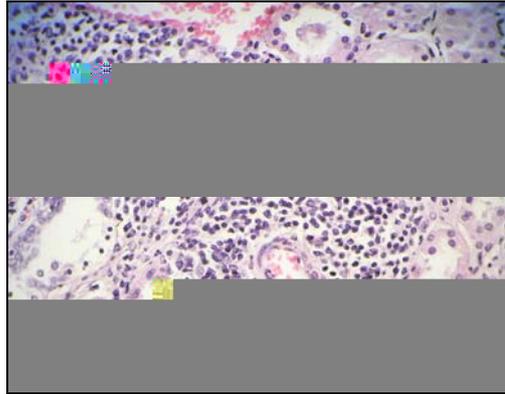


Fig.7: Suíno. Rim. Infiltrado inflamatório perivascular mononuclear.

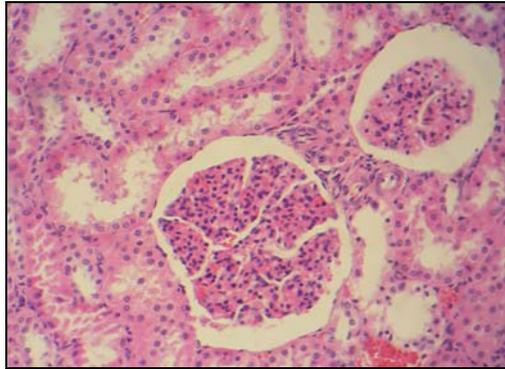


Fig.8: Suíno. Rim. Detalhe do aspecto vacuolar da degeneração. H.E.

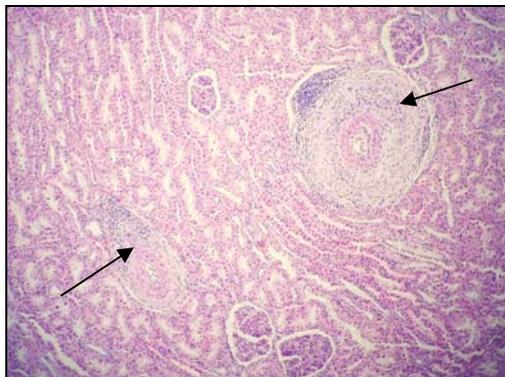


Fig.9: Suíno. Rim. Focos de vasculite crônica. H.E. (→)

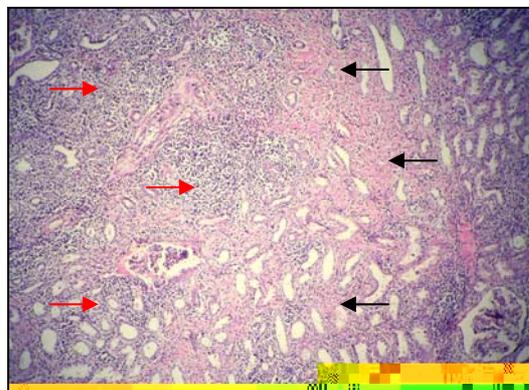


Fig.10: Suíno. Rim. Nefrite intersticial crônica. Nota-se desorganização da arquitetura do órgão determinado por acentuada fibrose (→) e infiltração de mononucleares (→) que ora individualizam, ora ocasionam o desaparecimento de túbulos. H.E.

## 6 DISCUSSÃO

Neste experimento, os dados foram divididos por coleta e seus resultados foram avaliados em conjunto com a presença de alterações histopatológicas em peças de rins e fígados. As amostras foram coletadas com os cuidados necessários quanto a contaminação cruzada e quanto a correspondência entre o sangue e as amostras de rim e fígado. Esta comparação é importante, embora nem sempre exista uma correlação da presença de ocratoxina A no sangue com as lesões nos órgãos e vice-versa (HULT et al., 1980; COOK et al., 1986; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; DRAGACCI et al., 1999).

A determinação de ocratoxina em soro por cromatografia líquida de alta eficiência descrito por Curtui e Gareis (2001) procurou adaptar as técnicas de extração e análise cromatográfica de maneira a diminuir custo, tempo de análise e para simplificar os procedimentos adotados para analisar ocratoxina A em soro suíno.

Foram obtidos dados de concentração de ocratoxina A através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência sendo que de um total de 87 amostras, detectou-se a ocratoxina A (OTA) em quatro (4,59 %) que apresentaram concentrações variando de 0,1546 a 1,4851 ng ml<sup>-1</sup>. Entre as amostras positivas, a média foi de 0,5739 e o desvio padrão de 0,6130. As demais amostras apresentaram-se com níveis inferiores ao limite de quantificação. Outros métodos podem ser utilizados com limites de detecção mais baixos, variando com o tipo de detector e da amostra (ZIMMERLI, 1995; ROSA, 1999). Ao comparar com o limite de 0,021 ng ml<sup>-1</sup> descrito por ROSA (1999), 63 amostras estariam dentro deste limite (72,41%). Embora não quantificáveis dentro do limite previsto pela técnica, todas as amostras restantes (83 / 95,41%) apresentaram pico no cromatograma, mas seus valores não chegaram ao nível de detecção estimado da presente técnica.

Ao comparar os níveis de concentração de ocratoxina A com os achados histopatológicos, estes dados revelaram que não houve esta correlação, já que dos quatro

animais com níveis detectáveis de ocratoxina A no soro sanguíneo, dois deles não apresentaram lesão renal nem hepática, um apresentou infiltrado inflamatório nos dois órgãos, e um apresentou no fígado um discreto infiltrado inflamatório em espaço porta.

Além disso, dos 83 (95,41%) suínos que não apresentaram ocratoxina A, dentro dos limites detectáveis utilizados nesta técnica de cromatografia, 60 (68,96%) apresentaram alguma lesão, sendo 45 (51,72%) apenas nos rins e seis (6,89%) apenas no fígado, nove (10,35%) nos dois órgãos e 23 (26,44%) não apresentaram lesões. Ainda que algumas lesões renais sejam caracterizadas como patognomônicas por alguns pesquisadores para a nefropatia suína por micotoxinas (KROGH et al., 1979), existe grande dificuldade de se condenar um animal suspeito de nefropatia e definir que as lesões foram ocasionadas pela ingestão de

de alguns países que estabelecem níveis toleráveis de ingestão da ocratoxina A para produtos de origem suína, os resultados encontrados por esta pesquisa revelam que, dos animais estudados, nenhum apresentou índices que superassem o limite máximo aceitável para a micotoxina, baseado em legislação mundial.

A técnica utilizada para a detecção da ocratoxina neste trabalho foi modificada em alguns pontos durante a extração para tentar adequar as condições laboratoriais utilizadas da forma mais fidedigna possível com a descrita por Curtui e Gareis (2001). Com isso, conseguimos inclusive melhorar o limite de detecção. No entanto, cabe reforçar que não ocorreu nenhuma tentativa de modificar a metodologia empregada, alterando-se apenas alguns passos devido a necessidade de adequação às condições laboratoriais utilizadas nas análises deste trabalho. O processo de extração da micotoxina do soro foi a etapa mais demorada e que necessitou de maiores adaptações. A fase compacta formada teve de ser quebrada somente após a retirada do sobrenadante, ao contrário do que a técnica original indicava, sendo este o procedimento mais relevante durante a extração das amostras de soro. Pode-se discutir uma possível alteração na consistência da mistura, visto que a temperatura ambiente do laboratório utilizado pode ter sido diferente da temperatura ambiente de laboratório em países como a Alemanha e a Romênia onde a técnica foi desenvolvida.

Na análise dos extratos, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foi satisfatória. Alguns cromatogramas apresentaram interferências e com isso nem todas as amostras puderam ser quantificadas. A presença de interferentes na formação das curvas e dos picos impossibilitou a quantificação de alguns resultados. Apesar destas dificuldades, a técnica apresentou-se eficiente. Algumas melhorias podem ser realizadas na tentativa de torná-la mais acessível no Brasil, com o ajuste de alguns parâmetros como a proporção da fase móvel e das diluições a serem utilizadas.

## 8 CONCLUSÕES

- Pela primeira vez em nosso país, a ocratoxina A foi detectada em soro sanguíneo suíno.
- A metodologia empregada para a detecção de OTA em soros mostrou-se eficiente e apresentou valores de recuperação de 82% para níveis de  $0,73 \text{ ng ml}^{-1}$  com limites de detecção e quantificação estimados em  $0,062$  e  $0,073 \text{ ng ml}^{-1}$ , respectivamente.
- As amostras negativas dentro dos limites de detecção e quantificação apresentaram pico no cromatograma, sugerindo que os animais foram sensibilizados pela ocratoxina A.
- Não é possível afirmar que as lesões encontradas nos rins estejam correlacionadas com a presença da ocratoxina A;
- O fato de a maioria das amostras terem tido resultados abaixo dos valores de detecção não significa que estes animais não tenham tido contato com a ocratoxina A ou ainda que as lesões renais que eles possuíam não possam ter sido provocadas pela ação da toxina.
- Para a população estudada, 4,59% dos animais apresentaram-se positivos para a ocratoxina A, confirmando a necessidade de maiores estudos de técnicas de identificação desta micotoxina e do acompanhamento tanto dos animais enviados aos matadouros quanto da qualidade das rações oferecidas aos mesmos, além dos produtos de origem animal.

## 8 CONSIDERAÇÕES

Existe uma conscientização crescente de que sérias conseqüências podem ocorrer devido a níveis indesejáveis de micotoxinas nos gêneros alimentícios. A existência de alimento contaminado tem um efeito negativo no consumo, nutrição e comércio internacional desses alimentos. Os efeitos prejudiciais das micotoxinas em humanos e animais têm sido reconhecidos, apesar das principais estatísticas sobre a indução de doenças pelas micotoxinas serem geralmente insuficientes, sendo necessários ainda muitos estudos para avaliar os vários efeitos toxicológicos das micotoxinas em humanos (FILALI, 2002; PETKOVA-BOCHAROVA et al., 2003). O presente estudo teve a intenção de alertar para a existência destes efeitos negativos na produção brasileira, mesmo que dentro de um universo amostral reduzido a uma região do Estado do Rio de Janeiro.

A pesquisa da ocratoxina em suínos representa uma intenção em resgatar um movimento - pois já houve alguma pesquisa nessa área (CRUZ et al., 1984) - no sentido da obtenção de dados epidemiológicos e em inovar dentro das linhas que estão em atividade atualmente no Brasil. Com os dados obtidos desta dissertação podemos observar a necessidade de se aprofundarem os estudos sobre a cadeia de produção do suíno, que representa um movimento significativo na economia do nosso país (ABIPECS, 2006). Além disso, sugere-se que também deva ser pesquisada a qualidade do alimento destinada aos suínos e a contaminação por micotoxinas em outros animais de abate.

Os riscos relativos à saúde humana e as próprias perdas na produtividade dos animais são os fatores que proporcionam maior suporte para o investimento em pesquisas desta micotoxina.

## 9 OBRAS CITADAS

ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R.B.A.; SARGEANT, K.; O'KELLEY, J. A toxic factor in Brazilian groundnut meal. *Veterinary Record*. v.73, n.17, p.428-429, 1961.

ÁLVAREZ, L; GIL, A.G.; EZPELETA, O.; GARCÍA-JALÓN, J.A.; CERAIN, L.A. Immunotoxic effects of ochratoxin A in wistar rats after oral administration. *Food and Chemical Toxicology*. v.42, n.5, p.825–834, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA – ABIPECS. *Relatório Anual 2004*. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 01 fevereiro 2006.

BARISIC, K.; PETRIK, J.; RUMORA, L.; CEPELAK, I.; GRUBISIC, T.Z.; Expression of Hsp70 in kidney cells exposed to ochratoxin A. *Archives of toxicology*. v.76, n.4, p.218-226, 2002.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. v.16, n.3, p.497-516, 2003.

BERGER, V.; GABRIEL, A.F.; SERGENT, T.; TROUET, A.; LARONDELLE, Y.; SCHNEIDER, Y.J. Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2). *Proceedings of EUROTOX 2002*, The XL congress of the European societies of Toxicology. Hungary. Toxicology Letters. v.140-141, p.465-476, 2003.

BIGELIS, R. Fungal metabolites in food processing. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. *Handbook of Applied Mycology: Foods and feeds*. New York: Mercel Dekker, INC., 1992. v.3, cap.13, p.415-443.

BIRÓ, K.; SOLTI, L.; BARNA-VETRO, I.; BAGO, G.; GLAVITS, R.; SZABO, E.; FINK-GREMMELS, J. Tissues distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathology*. v.31, n.2, p.141-148, 2002.

BLESA, J.; BERRADA, H.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. v.1046, n.1-2, p.127–131, 2004.

BRANCO, E.L.C. *Bálcãs: Eterna instabilidade político-geográfico*. Disponível em: <http://www.eduquenet.net/balcas.htm>. Acesso em: 03 fevereiro 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 183, de 21 de março de 1996. Adota o regulamento técnico MERCOSUL sobre seus limites

máximos admissíveis no leite, amendoim e no milho. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.4929, 25 mar. 1996. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC 274 da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. Aprova o regulamento técnico sobre limites máximo de aflatoxina admissíveis no leite, no amendoim, no milho, constante do anexo desta resolução. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 16 out. 2002.

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

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

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

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

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

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

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

CHU, F.S. Recent progress in analytical techniques for mycotoxins in feedstuffs. *Journal of Animal Science*. v.70, n.12, p.3950-3963, 1992.

COMISSÃO ECONÔMICA EUROPÉIA (CEE). DIRETIVA 2002/26/CE de 13 de março de 2002. Fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial do teor de ocratoxina A nos gêneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Européias*. L.75, p.38-43, 16 mar. 2002. Disponível em: <[http://europa.eu.int/eur-lex/pt/consleg/pdf/2002/pt\\_2002L0026\\_do\\_001.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pt/consleg/pdf/2002/pt_2002L0026_do_001.pdf)>. Acesso em: 20janeiro 2006.

COOK, W.O.; OSWEILER, G.D.; ANDERSON, T.D.; RICHARD, J.L. Ochrotoxicosis in Iowa swine. *Journal the American Veterinary Medical Association*. v.188, n.12, p.1399-1402, 1986.

COSTA, T.P.; GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Segurança alimentar e a cerveja: o perigo das micotoxinas. *Higiene Alimentar*. v.19, n.137, p.39-46, 2006.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*. v.127, n.1-3, p.19-28, 2002.

CRUZ, L.C.H.; ROSA, C.A.R.; CAMPOS, J.C.; TURATTI, J.A. Ocratoxicose em suínos no Estado de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. v.6, n.1, p.17, 1984.

CURTUI, V.G.; GAREIS, M. A simple HPLC method for the determination of the mycotoxins ochratoxin A and B in blood serum of swine. *Food Additives and Contaminants*. v.18, n.7, p.635-643, 2001.

- CURTUI, V.G.; GAREIS, M.; USLEBER, E.; MÄRTLBAUER, E. Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*. v.18, n.8, p.730-738, 2001.
- CZERWIECKI, L.; CZAJKOWSKA, D.; WITKOWSKA-GWIAZDOWSKA, A. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. *Food additives and contaminants*. v.19, n.11, p.1051-1057, 2002.
- DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIO, G.; ROSA, C.A.R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *nigri* in Argentina. *Food additives and contaminants*. v.19, n.11, p.1065-1072, 2002.
- DI PAOLO, N.; GUARNIERI, A., LOI, F., SACCHI, G., MANGIAROTTI, A.M., DI PAOLO, M. Acute renal failure from inhalation of mycotoxins. *Nephron*. v.64, n.4, p.621-625, 1993.
- DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. *Biológico*. v.64, n.2, p.187-191, 2002.
- DOMIJAN, A.M.; PERAICA, M.; MILETIC-MEDVED, M.; LUCIC, A.; FUCHS, R. Two different clean-up procedures for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in urine. *Journal of Chromatography B*. v.798, n.2, p.317-321, 2003.
- DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; BIRE, R.; FREMY, J.M.; COULON, S. A French monitoring programme for determining ochratoxin A occurrence in pig kidneys. *Natural Toxins*. v.7, n.4, p. 167-173, 1999.
- DWIVEDI, P.; BURNS, R.B. Pathology of ochratoxicosis in young broiler chickens. *Research in Veterinary Science*. v.36, n.1, p.92-103, 1984.
- DWIVEDI, P.; BURNS, R.B.; MAXWELL, M.H. Ultrastructural study of the liver and kidney in ochratoxicosis A in young broiler chicks. *Research in Veterinary Science*. v.36, n.1, p.104-116, 1984.
- ELANDER, R.P.; LOWE, D.A. Fungal biotechnology: an overview. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. *Handbook of Applied Mycology: fungal biotechnology*. New York: Mercel Dekker, INC., 1992. v.4, cap.1, p.1-34.
- ELLING, F. Demonstration of ochratoxin A in kidneys of pigs and rats by immunofluorescence microscopy. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinauica, Section A*. v.85 A, n.2, p.151-156, 1977.
- ELLING, F.; HALD, B.; JACOBSEN, C.; KROGH, P. Spontaneous cases of toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinauica, Section A*. v.83, n.6, p.739-741, 1975.
- ELLING, F.; MØLLER, T. Mycotoxic nephropathy in pigs. *Bulletin of the world health organization*. v.49, n.4, p.411-418, 1973.
- ELLING, F.; NIELSEN, J.P.; LILLEHOJ, E.B.; THOMASSEN, M.S.; STORMER, F.C. Ochratoxin a-induced porcine nephropathy: enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure. *Toxicon*. v.23, n.2, p.247-254, 1985.
- ENTWISLE, A.C.; JORGENSEN, K.; WILLIAMS, A.C.; BOENKE, A.; FARNELL, P.J. An intercomparison of methods for the determination of ochratoxin A in pig kidney. *Food Additives and Contaminants*. v.14, n.3, p.223-236, 1997.

FAO. FOODS AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. JECFA – *Fifty-sixth meeting*, Geneva, 6-15 February 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 10 dezembro 2005.

FILALI, A.; BETBEDER, A.M.; BAUDRIMONT, I.; BENAYADA, A.; SOULAYMANI, R.; CREPPY, E.E. Ochratoxin A in human plasma in Marocco: preliminary survey. *Human & Experimental Toxicology*. v.21, n.5, p.241-245, 2002.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins: their implications in human and animal health. *The Veterinary Quarterly*. v.21, n.4, p.115-120, 1999.

FONSECA, H. *Micotoxinas on line*. Disponível em <<http://www.micotoxinas.com.br>>. Acesso em: 29 janeiro 2006.

FRIIS, C.; BRINN, R.; HALD, B. Uptake of ochratoxin A by slices of pig kidney cortex. *Toxicology*. v.14, n.52, p.209-217, 1988.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Filamentous fungi in food and feeds. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. *Handbook of Applied Mycology: Foods and feeds*. New York: Mercel Dekker, INC., 1992. v.3, cap.2, p.31-68.

FROHLICH, A.A.; MARQUARDT, R.R.; OMINSKI, K.H. Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: A Canadian perspective. *International agency for research on cancer*. v.115, p.139-143, 1991.

FUKAL, L. A survey of cereals, cereal products, feedstuffs and porcine kidneys for ochratoxin A by radioimmunoassay. *Food Additives and Contaminants*. v.7, n.2, p.253-258, 1990.

GALTIER, P. Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. *International agency for research on cancer*. v.115, p.187-200, 1991.

GATENBECK, S.; HULT, K.; RUTQVIST, L. A fluorospectrophotometric method for ochratoxin analysis and the spontaneous occurrence of ochratoxin A in pig kidneys in Sweden. *Archives de L'Institut Pasteur de Tunis*. v. 56, n.3-4, p.257-260, 1977.

GODIN, M.; FILLASTRE, J.-P.; SIMON, P.; FRANCOIS, A.; LE ROY, F.; MORIN, J.-P. Is ochratoxin A nephrotoxic in human beings? *Advances in Nephrology*. v.26, p.181-206, 1997.

GOLINSKI, P.; HULT, K.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J.; CHELKOWSKI, J.; KNEBLEWSKI, P.; SZEBIOTKO, K. Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of polish swine. *Applied and Environmental Microbiology*. v.47, n.6, p.1210-1212, 1984.

GOLINSKI, P.; HULT, K.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J.; CHELKOWSKI, J.; SZEBIOTKO, K. Spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in porcine kidney and serum samples in Poland. *Applied and Environmental Microbiology*. v.49, n.4, p.1014-1015, 1985.

GROSSO, F.; SAID, S.; MABROUK, I.; FREMY, J.M.; CASTEGNARO, M.; JEMMALI, M.; DRAGACCI, S. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*. v.41, n.8, p.1133-1140, 2003.

HALD, B. Porcine nephropathy in Europe. *International agency for research on cancer*. v.115, p.49-56, 1991.

- HARVEY, R.B.; HUFF, W.E.; KUBENA, L.F.; PHILLIPS, T.D. Evaluation of diets contaminated with aflatoxin and ochratoxin fed to growing pigs. *American Journal of Veterinary Research*. v.50, n.8, p.1400-1405, 1989.
- HARVEY, R.B.; KUBENA, L.F.; ELISSALDE, M.H.; ROTTINGHAUS, G.E.; CORRIER, D.E. Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine. *American Journal of Veterinary Research*. v.55, n.12, p.1757-1761, 1994.
- HENDRY, K.M.; COLE, E.C. A review of mycotoxins in indoor air. *Journal of toxicology and environmental health*. v.38, n.2, p.183-198, 1993.
- HERRMAN, J.L. Risk evaluation of ochratoxin A by the joint FAO/WHO expert committee on food additives. *International agency for research on cancer*. v.115, p.327-329, 1991.
- HULT, K.; HÖKBY, E.; HÄGGLUND, U.; GATENBECK, S.; RUTQVIST, L. Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden: use in evaluation of toxin content of consumed feed. *Applied and environmental microbiology*. v.39, n.4, p.828-830, 1980.
- HULT, K.; HÖKBY, E.; HÄGGLUND, U.; GATENBECK, S.; RUTQVIST, L.; SELLYEY, G. Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed studies. *Applied and environmental microbiology*. v.38, n.5, p.772-776, 1979.
- HUNT, D.C.; PHILP, L.A.; CROSBY, N.T. Determination of ochratoxin A in pig's kidney using enzymic digestion, dialysis and high-performance liquid chromatography with post-column derivatisation. *The Analyst*. v. 104, n.1245, p. 1171-1175, 1979.
- JORGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*. v.15, n.5, p.550-554, 1998.
- JORGENSEN, K.; PETERSEN, A. Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. *Food Additives and Contaminants*. v.19, n.6, p.562-567, 2002.
- JORGENSEN, K.; VAHL, M. Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Food Additives and Contaminants*. v.16, n.11, p.451-456, 1999.
- JOSEFSSON, B.G.; MOLLER, T.E. Heat stability of ochratoxin A in pig products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v.31, n.12, p.1313-1315, 1980.
- KÖLLER, G.; ROLLE-KAMPCZYK, U.; LEHMANN, I.; POPP, P.; HERBARTH, O. Determination of Ochratoxin A in small volumes of human blood serum. *Journal of Chromatography B*, v.804, n.2, p.313-317, 2004.
- KROGH, P. Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nordisk Veterinaermedicin*. v.28, n.9, p.452-458, 1976.
- KROGH, P. Ochratoxin A Residues in Tissues of Slaughter Pigs with Nephropathy. *Nordisk Veterinaermedicin*, v.29, n.9, p.402-405, 1977.
- KROGH, P.; ELLING, F.; FRIIS, Chr.; HALD, B.; LARSEN, A.E.; LILLEHOJ, E.B.; MADSEN, A.; MORTENSEN, H.P.; RASMUSSEN, F.; RAVNSKOV, U. Porcine Nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A. *Veterinary Pathology*. v.16, n.4, p.466-475, 1979.
- KROGH, P.; ELLING, F.; HALD, B.; LARSEN, A.E.; LILLEHOJ, E.B.; MADSEN, A.; MORTENSEN, H.P. Time-dependent disappearance of ochratoxin A residues in tissues of bacon pigs. *Toxicology*. v.6, n.2, p.235-242, 1976.

- KROGH, P.; GYRD-HANSEN, N.; HALD, B.; LARSEN, S.; NIELSEN, J.P.; SMITH, M.; IVANOFF, C.; MEISNER, H. Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy: diagnostic potencial of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Journal of toxicology and environmental health*. v.23, n.1, p.1-14, 1988.
- KROGH, P.; HALD, B.; PEDERSEN, E.J. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. section B*. v.81, p.689-695, 1973.
- KROGH, P.; HASSELAGER, E.; FRIIS, P. Studies on fungal nephrotoxicity. II - Isolation of two nephrotoxic compounds from *Penicillium viridicatum* Westling: citrinin and oxalic acid. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. section B*. v.78, p. 401-413, 1970.
- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment of ochratoxin A residues in food. *International agency for research on cancer*. v.115, p.307-320, 1991.
- LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, N.; MAGAN, I.C. Grain Fungi. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. *Handbook of Applied Mycology: Foods and feeds*. New York: Mercel Dekker, INC., 1992. v.3, cap.5, p.121-177.
- LAWLOR, P.G.; LYNCH, P.B. Mycotoxins in pig feeds 2: clinical aspects. *Irish Veterinary Journal*. v.54, n.4, p.172-176, 2001.
- LINDNER, E. 1990. *Toxicología de los Alimentos*. 2ª ed. Ed.Acribia, Zaragoza.
- MADSEN, A.; MORTENSEN, H.P.; HALD, B. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs I. Influence on pig performance and residues. *Acta Agriculturae Scandinavica*. v.32, n.2, p.225-239, 1982.
- MANNING, R.O.; BROWN, T.P.; WYATT, R.D.; FLETCHER, O.J. The individual and combined effects of Citrinin and Ochratoxin A in broiler chicks. *Avian Diseases*. v.29, n.4, p.986-997, 1985.
- MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of animal science*. v.70, n.12, p.3968-3988, 1992.
- MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; SREEMANNARAYANA, O.; ABRAMSON, D.; BERNATSKY, A. Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in western Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*. v.52, n.2, p.186-190, 1988.
- MATRELLA, R.; MONACI, L.; MILILO, M.A.; PALMISANO, F.; TANTILLO, M.G. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control*. v.17, n.2, p.114-117, 2006.
- MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. *Toxicologia de alimentos*. São Paulo: Varela editora e livraria LTDA, 2000. 295p.
- MILANEZ, V.T.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; OKINO, L.K. Evaluation of Brazilian terrestrial *Aspergillus* strains for mycotoxin production. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v.61, n.1, p.7-11, 2002.
- MORGAN, M.R.A.; McNERNEY, R.; CHAN, H.W.S.; ANDERSON, H. Ochratoxin A in pig kidney determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v.37, p.475-480, 1986.
- MORTENSEN, H.P.; HALD, B.; LARSEN, A.E.; MADSEN, A. Ochratoxin A contaminated for sows and piglets: pig performance and residues in milk and pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica*. v.33, n.4, p.349-352, 1983.

- MORTENSEN, H.P.; HALD, B.; MADSEN, A. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs V. Ochratoxin A in pig blood. *Acta Agriculturae Scandinavica*. v.33, n.3, p.235-239, 1983.
- MOUSING, J.; KYRVAL, J.; JENSEN, T.K.; AALBÆK, B.; BUTTENSCHØN, J.; SVENSMARK, B.; WILLEBERG, P. Meat safety consequences of implementing visual postmortem meat inspection procedures in Danish slaughter pigs. *The veterinary records*. v.140, n.18, p.472-477, 1997.
- MÜLLER, G.; BURKERT, B.; MÖLLER, U.; DILLER, R.; ROHRMANN, B.; ROSNER, H.; KÖHLER, H. Ochratoxin A and some of its derivatives modulate radical formation of porcine blood monocytes and granulocytes. *Toxicology*. v.199, n.2-3, p. 251-259, 2004.
- MÜLLER, G.; BURKERT, B.; ROSNER, H.; KÖHLER, H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on human kidney cell lines. *Toxicology in Vitro*. v.17, n.4, p.441-448, 2003.
- NAGODAWITHANA, T.W. Products and uses of yeast and yeastlike fungi. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. *Handbook of Applied Mycology: Foods and feeds*. New York: Mercel Dekker, INC., 1992. v.3, cap.17, p.553- 603.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS n°303-47-9) in F344/N rats (gavage studies). *National Toxicology Program Technical Report Service*. v.358, n.5, p.1-142, 1989.
- NGILORITI, E.M.; KROLL, J. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in animal tissues. *Die Nahrung*. v.34, n.1, p.97-98, 1990.
- OMINSKI, K.H.; FROHLICH, A.A.; MARQUARDT, R.R.; CROW, G.H.; ABRAMSON, D. The incidence and distribution of ochratoxin A in western Canadian swine. *Food additives and contaminants*. v.13, n.2, p.185-198, 1996.
- OSWEILLER, G.D. Micotoxinas. In: OSWEILLER, G.D. *Toxicologia Veterinária*. São Paulo: Ed.Artes Médicas, 1998. Cap.29, p.440-468.
- PARDO, E.; MARÍN, S.; SOLSONA, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiology*. v.21, n.3, p.267-274, 2004.
- PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. *Research in Microbiology*. v.155, n.7, p.507-513, 2004.
- PEREIRA, R.T.G. et al. Fungos associados a frutos e grãos do cafeeiro em diferentes fases do processamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 4., 2004, Ouro Preto. *Anais...* Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Micologia, 2004. 120p. parte 1, p.29.
- PERES, T.B. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*. v.64, n.2, p.227-229, 2002.
- PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CASTEGNARO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; GARREN, L.; GROSSO, F.; NIKOLOV, I.; VRABCHEVA, T.; DRAGACCI, S.; CHERNOZEMSKY, I.N. Analysis of ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: a one month follow up study. *Medicine and Biology*. V.10, n.2, p.62-68, 2003.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I.N.; CASTEGNARO, M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a

review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food additives and contaminants*. v.19, n.3, p.282-302, 2002.

PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal of Animal Science*. v.70, n.12, p.3964-3967, 1992.

PIER, A.C.; RICHARD, J.L.; CYSEWSKI, S.J. Implications of mycotoxins in animal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.176, n.8, p.719-724, 1980.

PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*. v.56, n.1, p.184-192, 2000.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Revue de Médecine Veterinaire*. v.149, p.479-492, 1998.

PORTNOY, J.M.; KWAK, K.; DOWLING, P.; VANOSDOL, T.; BARNES, C. Health effects of indoor fungi.

- SCHOENTAL, R. Mycotoxins, porphyries and the decline of Etruscans. *Journal of Applied Toxicology*. v.11, n.6, p.453-454, 1991.
- SCOTT, P.M. Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. *Journal of food protection*. v.41, n.5, p.385-398, 1978.
- \_\_\_\_\_. Mycotoxin methodology. *Food Additives and Contaminants*. v.12, n.3, p.395-403, 1995.
- SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENÂNCIO, A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*. v.88, n.1, p.63–68, 2003.
- SHARMAN, M.; MacDONALD, S.; GILBERT, J. Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up. *Journal of Chromatography*. v.603, n.1-2, p.285-289, 1992.
- SHOTWELL, O.L.; HESSELTINE, C.W.; GOULDEN, M.L.; Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Applied microbiology*. v.17, p.765-766, 1969.
- SILVA, L.C. *Fungos e Micotoxinas em Grãos Armazenados*. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Disponível em: [www.unioeste.br/agais/fungos.html](http://www.unioeste.br/agais/fungos.html). Acesso em: 20 novembro 2003.
- SKAUG, M.A.; EDUARD, W.; STORMER, F.C. Ochratoxin A in air-borne dust and fungal conidia. *Mycopathologia*. v.151, n.2, p.93-98, 2000.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.; MORAES, N.; CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, S.J.O.; MORENO, A.M.; ROEHE, P.M. *Clínica e Patologia Suína*. 1 ed. Goiânia: Pfizer, 1999. p.464.
- SPEIJERS, G.J.A.; SPEIJERS, M.H.M. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*. v.153, n.1, p.91–98, 2004.
- STOEV, S.D.; HALD, B.; MANTLE, P.G. Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex or uncertain (mycotoxin) aetiology. *The Veterinary Record*. v. 142, n.8, p.190-194, 1998.
- STOEV, S.D.; VITANOV, S.; ANGUELOV, G.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CREPPY, E.E. Experimental Mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Veterinary Research Communications*. v.25, n.3, p.205-223, 2001.
- STORMER, F.C. Ochratoxin A – A mycotoxin of concern. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. *Handbook of Applied Mycology: mycotoxin in ecological systems*. New York: Mercel Dekker, INC., 1992. v.5, cap.16, p.403-432.
- SZCZECH, G.M., CARLTON, W.W.; TUIITE, J.; CALDWELL, R. Ochratoxin A toxicosis in swine. *Veterinary Pathology*. v.10, n.4, p.347-364, 1973.
- TAPIA, M.O.; SEAWRIGHT, A.A. Experimental combined aflatoxin B1 and ochratoxin A intoxication in pigs. *Australian Veterinary Journal*. v.62, n.2, p.33-37, 1985.
- \_\_\_\_\_. Experimental ochratoxicosis A in pigs. *Australian Veterinary Journal*. v.61, n.7, p.219-222, 1984.
- TARÍN, A.; ROSELL, M.G.; GUARDINO, X. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins aflatoxins and ochratoxin A. *Journal of Chromatography A*. v.1047, n.2, p.235–240, 2004.

THACKER, H.L.; CARLTON, W.W. Ochratoxin A mycotoxicosis in the guinea-pig. *Food and Cosmetics Toxicology*. v.15, n.6, p.563-574, 1977.

THE MERCK INDEX. Rahway, N.J., USA: Merck & CO., Inc., 1976. 9ª.

TRENK, H.L.; BUTZ, M.E.; CHU, F.S. Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspegillus ochraceus*. *Applied microbiology*. v.21, n.6, p.1032-1035, 1971.

TUPINAMBÁ, G.S. et al. Avaliação de um antifúngico produzido por *Paenibacillus polymyxa* SCE2 contra fungos que causam micotoxicoses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 4., 2004, Ouro Preto. *Anais...* Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Micologia, 2004. 120p. pt. 2, p.38.

VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials. *Food Additives and Contaminants*. v.12, n.3, p.321-330, 1995.

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

WIKIPÉDIA. *Bálcãs*. Disponível em:

<<http://pt.wikipedia.org/wiki/B%C3%A1lc%C3%A3s#Geografia>>. Acesso em: 03 fevereiro 2006).

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

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

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

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

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

# 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](#)